

Molekularbiologische und
NMR-Spektroskopische Charakterisierung
der Komplexbildung des Afadin 6
mit den kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras,
sowie mit dem Tight Junction Protein
Zonula occludens 1

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von

Malte Andrasch

aus Chur (Schweiz)

Mai 2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Gernot Längst

1. Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Kalbitzer
2. Zweitgutachterin: Prof. Dr. Christine Ziegler
3. Drittprüfer: Prof Dr. Wolfram Gronwald

Malte Andrasch

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 ZELL-ZELL-KONTAKTE IN EPITHEL-UND ENDOTHELZELLEN	3
1.2 DIE MOLEKULARE STRUKTUR DER TIGHT UND ADHERENS JUNCTIONS	7
1.3 DIE ZONULA OCCLUDENS PROTEINE ZO1-3	9
1.4 AFADIN 6	12
1.5 DIE KLEINEN GTPASEN H-RAS UND RAP1A	13
1.6 DIE KREBSERKRANKUNG UND DIE BETEILIGUNG DER PROTEINE H-RAS, RAP1A UND AF6	18
1.7 ERGEBNISSE VORHERIGER DISSERTATIONEN	20
1.8 ZIELSETZUNG	22
2. MATERIAL	23
2.1 GERÄTE UND ZUBEHÖR.....	23
2.2 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	24
2.3 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME	25
2.4 PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	26
2.5 SOFTWARE / BIOINFORMATIK	30
3. METHODEN	31
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	31
3.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
3.1.2 Herstellung von Plasmid-Konstrukten.....	32
3.1.3 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	32
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	34
3.1.6 Restriktionsverdau	35
3.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	35
3.1.8 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> und DNA Sequenzierung	37
3.1.9 Gerichtete Mutagenese	37
3.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	38
3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970).....	38
3.2.2 Herstellung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	40
3.2.3 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	43

3.2.4	Konzentrieren proteinhaltiger Lösungen	48
3.2.5	Dialyse proteinhaltiger Lösungen	48
3.2.6	Konzentrationsbestimmung der Proteine	49
3.2.7	Proteaseverdau	51
3.2.8	Nukleotidaustausch	51
3.2.9	Semi-Dry Western Blot	52
3.2.10	N-terminaler Edman-Abbau und Massenspektrometrie	55
3.3	ANALYTISCHE METHODEN	56
3.3.1	Analytische Gelfiltration (SEC)	56
3.4.2	Pulldown Experimente	57
3.4.3	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance / NMR)	59
4.	ERGEBNISSE	72
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN PROTEINE	72
4.1.1	Die Konstrukte des Afadin 6	72
4.1.2	Die Konstrukte des Zonula occludens 1	81
4.1.3	Die kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras	89
4.1.4	Pulldown-Analyse des GST-Afadin 6 mit Zonula occludens 1, H-Ras und Rap1A	97
4.2	NMR ZUORDNUNGEN DER VERSCHIEDENEN KONSTRUKTE	100
4.2.1	Die Ras-Assoziationsdomäne 1 (RA1) des Afadin 6	100
4.2.2	Die Zonula occludens 1 Konstrukte	103
4.3	NMR-INTERAKTIONSEXPERIMENTE DES AF6 MIT DEN KLEINEN GTPASEN H-RAS UND RAP1A	112
4.3.1	HSQC-Interaktionsexperiment des ¹⁵ N-AF6 mit ¹⁴ N-Rap1A[GTP]	113
4.3.2	HSQC-Interaktionsexperiment des ¹⁵ N-AF6 mit ¹⁴ N-Rap1A[GDP]	127
4.3.3	TROSY-Interaktionsmessungen [Steiner, 2001] neu prozessiert und analysiert	140
4.3.4	Alignment der Interaktionsbereiche verschiedener Ras-Binde- und Ras-Assoziations-Domänen mit H-Ras/Rap1A und Vergleich mit den Dockingexperimenten von Ralph Elsner	151
4.3.5	Zusammenfassung der aktiven Interaktionsfläche des AF6 im Komplex mit Rap1A und H-Ras	154
4.3.6	Das Verhalten der Aminosäure Alanin134 des AF6 während der Komplexbildung mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A	155
4.4	NMR-INTERAKTIONSEXPERIMENTE DES AF6 MIT DEN KONSTRUKTEN DES ZONULA OCCLUDENS 1	158
4.4.1	HSQC-Messungen des AF6 mit PDZ2 im molaren Verhältnis von 1:1,5	158
4.4.2	HSQC-Messungen des AF6 mit ZO1-MUT2 im molaren Verhältnis von 1:1,5	163
5.	DISKUSSION	168
5.1	EXPRESSION, AUFRÄUENIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER KONSTRUKTE	168
5.1.1	Die Konstrukte des Afadin 6	168
5.1.2	Die Konstrukte des Zonula occludens 1	171
5.1.3	Die kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras	172

5.2 PULLDOWN-ANALYSEN DER INTERAKTIONEN ZWISCHEN AF6 MIT ZO1, RAP1A UND H-RAS	173
5.3 DIE NMR-ANALYSE DER INTERAKTION DES AFADIN 6 MIT DEN KLEINEN GTPASEN RAP1A UND H-RAS.....	175
5.3.1 <i>Interaktion der Afadin 6 RA1-Domäne mit H-Ras[GppNHp]</i>	177
5.3.2 <i>Interaktion der Afadin 6 RA1-Domäne mit Rap1A</i>	180
5.4 DIE NMR-ANALYSE DER INTERAKTION DES AFADIN 6 MIT ZONULA OCCLUDENS 1	186
5.5 AUSBLICK	193
6. SUMMARY	194
7. ANHANG	196
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	196
TABELLENVERZEICHNIS	202
LITERATURVERZEICHNIS	203
CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN	211
8. DANKSAGUNG	223
9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	224

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
AcqPars	<i>Acquisition parameters</i> / Aufnahmeparameter
AEBSF	4-Benzensulfonylfluorid
AF6	Afadin 6 / <i>ALL fusion protein (chromosome) 6</i>
AJ	Adherens Junction
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
aPKC	atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumperoxosulfid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
ca.	circa
CAR	<i>Cocksackie adenovirus receptor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C-Terminus	Carboxy-terminales Ende eines Peptides oder Proteins
D	Aspartat
Da	Dalton
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DS	<i>Dummy scans</i>
DSS	4,4-Dimethyl-4-Silapentan-Sulfonsäure
DTE	1,4-Dithioerythol
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Phenylalanin
FHA	<i>Forkhead domain</i>
FID	<i>Free induction decay</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>Guanosin nucleotide exchange factor</i>
GM	Gaußfilter

GppNHp	Guanosin-5'-(beta, gamma-imido) triphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GSH	Glutathion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GTP hydrolysierendes Enzym
h	Stunde
H	Histidin
His₆	6-fach Histidin-Tag
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin-artigen
INEPT	<i>Insensitive nuclei enhancement by polarisation transfer</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
JAM-1	<i>Junction adhesion molecule-1</i>
K	Lysin
K	Kelvin
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Leucin
M	Methionin
max.	maximal
MAGUKs	<i>Membrane associated guanylatkinase</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
mM	Millimolar
N	Asparagin
NaN₃	Natriumazid
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	Nuclear-Overhauser-Effekt
NS	<i>Number of scans</i>
N-Terminus	Amino-terminales Ende eines Peptides oder Proteins
OD	Optische Dichte
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein data bank</i>

pg	<i>prepgrade</i>
P_i	anorganisches Phosphat
pI	isoelektrischer Punkt
PIPES	Piperazine-N,N´bis(2-Ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
ppm	<i>parts per milion</i>
ProcPars	<i>Processing parameters</i> / Prozessierungsparameter
Q	Glutamin
R	Arginin
Rap1A	<i>Ras proximate 1 A</i>
Ras	<i>Rat adeno sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute/ <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
SC	<i>Side chain</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
T	Threonin
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Tag	Affinitätsanhang
TD	<i>Time domain</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TJ	Tight Junction
TROSY	<i>Transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
U	<i>Unit</i>
ÜNK	Über Nachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan
w/v	Masse pro Volumen
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
ZO1	Zonula occludens 1
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Zusammenfassung

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Aufklärung der Interaktionsprozesse zwischen der Ras-Assoziations-Domäne 1 des Afadin 6 Proteins und den kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras mit NMR-spektroskopischen Methoden. Afadin 6 ist eines der Hauptgerüstproteine der Adherens Junctions und an der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Nectin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte beteiligt. Die kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A, die beide zur Unterfamilie der Ras-GTPasen gehören, fungieren in der Zelle durch alternierende Bindung der Nukleotide GDP und GTP als molekulare Schalter. Beide sind Teil diverser Signaltransduktionskaskaden, wie dem RTK- (Rezeptor-Tyrosin-Signalkaskade) oder dem JAK/STAT-Signalweg (*Januskinase and signal transducers and activators of transcription*), und haben durch ihre Schalterfunktion einen gravierenden Einfluss auf Differenzierungs- und Wachstumsprozesse der Zellen. Die Interaktion des Afadin 6 mit den kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras war bereits bekannt, jedoch konnten die molekularen Interaktionsmechanismen dieser Komplexbildung bis dato nicht vollständig aufgeklärt werden. Im Zuge dieser Arbeit jedoch konnten diese Komplexbildungen von Seiten des ¹⁵N-Isotop markierten Afadin 6 während diverser HSQC-NMR-Titrationsreihen mit den unmarkierten GTPasen in verschiedenen Nukleotid-Beladungszuständen auf atomarer Ebene verfolgt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass der kanonische Bindebereich der Afadin 6 Ras-Assoziations-Domäne 1 als gemeinsamer Interaktionsbereich beider GTPasen fungiert. Dieser umfasst die aktiv an der Bindung beteiligten Aminosäuren C59, T57, F55, N54, G53 und A52 des β 2-Faltblattes[N54 bis V62], sowie die Aminosäuren E77, K78, F79, R80, M83 und R84 der α 3-Helix[T67 bis F79] und der angrenzenden Loop-Region. Zusätzlich konnten die gravierenden Unterschiede beider Komplexe in Bezug auf ihre Effektor-Spezifität detailliert charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass die GTPase H-Ras an Position 31 ein Glutamat (E) trägt, im Gegensatz zu Rap1A, welches an Position 31 über ein Lysin (K) verfügt. Dieser Unterschied führt dazu, dass H-Ras eine Salzbrücke zwischen dem E31 und dem K78 des Afadin 6 ausbildet, Rap1A allerdings in der Lage ist diese Salzbrücke über die Aminosäure K31 mit dem benachbarten E77 des Afadin 6 auszubilden. Infolgedessen kommt es bei der Komplexbildung des Afadin 6 mit Rap1A zu einer Drehung des Rap1As, was bei H-Ras nicht der Fall ist. Durch diese Drehung ist Rap1A zusätzlich durch die Aminosäuren seiner Switch II Region in die Bindung involviert. Diese interagieren mit den Aminosäuren H18, H19, W20 und D26 der α 1-Helix, sowie deren angrenzende Loop-Region, des Afadin 6. Diese Tatsache kann die höhere Affinität

des Rap1A im Vergleich zu H-Ras an die RA1-Domäne des Afadin 6 erklären. Ebenso konnte ein interessanter Bindungseffekt im C-terminalen Bereich der Afadin 6 Ras-Assoziations-Domäne 1 festgestellt und näher charakterisiert werden. Dieser Bereich umfasst die Aminosäuren E131, N132, D133 und A134 des AF6-RA1-Konstruktes. Die Funktion dieser zusätzlichen Interaktion konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion des Afadin 6 mit dem Zonula occludens 1 Protein anhand biochemischer und NMR-spektroskopischer Methoden zu charakterisieren. Das Zonula occludens 1 Protein ist das Hauptgerüstprotein einer weiteren Klasse von Zell-Zell-Kontakten, den sogenannten Tight Junctions. Afadin 6 kommt in diesen Tight Junctions nicht vor, Zonula occludens 1 jedoch maßgeblich nur in den Tight Junctions. Beide Proteine scheinen während der Ausbildung neuer Zell-Zell-Kontakte colokalisiert vorzuliegen und scheinen im Verlauf dieser zellulären Prozesse, in einer noch ungeklärten wechselseitigen Beziehung zueinander zu stehen. Durch die Analyse dieser Komplexbildung von Seiten des ¹⁵N-markierten Afadin 6 aus mit der homodimeren PDZ2-Domäne und einer monomeren Mutante dieser Domäne konnte die Interaktion schließlich NMR-spektroskopisch auf die Wildtyp-PDZ2-Domäne des Zonula occludens 1 reduziert und daraufhin charakterisiert werden. Im Falle der Interaktion des Afadin 6 mit der PDZ2-Domäne des Zonula occludens 1 zeigten sich hierbei gravierende Übereinstimmungen mit den Interaktionsbereichen des Afadin 6-Rap1A-Komplexes. Hierbei scheint vor allem der Teilbereich E77 bis D82, der kanonischen Bindepotion, von großem Interesse zu sein. Dieser ist homolog zur bekannten Connexin43-Erkennungssequenz der PDZ2-Domäne des Zonula occludens 1 und kann so die Interaktion des Afadin 6 mit Zonula occludens 1 teilweise erklären.

Zusätzlich konnten die NMR-HSQC-Signale von Seiten der Zonula occludens Konstrukte PDZ2 und PDZ2-MUT2, durch HNCO-, HNCA- und CBCACONH-NMR-Experimente sequentiell zugeordnet werden und stehen nun für eine reziproke Untersuchung der Interaktionsfläche zur Verfügung.

Anhand der Analysen der Interaktionen des Zonula occludens 1, sowie der GTPasen H-Ras und Rap1A, konnten diese letztendlich über den Bindepartner Afadin 6 in einen gemeinsamen physiologischen Kontext gestellt werden.

1. Einleitung

Das Epithel- und Endothelgewebe schützt unseren Organismus, indem es eine Barriere zwischen uns und unserer Umwelt aufbaut. Es handelt sich hierbei um ein- oder mehrlagige Zellschichten, die alle äußeren (Epithel) und inneren (Endothel) Oberflächen unseres Körpers bedecken. Diese Barrieren dienen nicht nur dem mechanischen Schutz des Organismus, wie zum Beispiel das Hautepithel, sondern haben vielerlei Funktionen und unterliegen einer sehr komplexen Regulation. Eine weitere Aufgabe des Epithel- und Endothelgewebes ist es, die mit Flüssigkeit gefüllten Hohlräume unseres Körpers abzudichten wie es beim Darm- oder Nierenepithel der Fall ist. Ebenfalls muss das Eindringen von Krankheitserregern verhindert werden, wie das Beispiel der Blut-Hirn-Schranke verdeutlicht. Zusätzlich zu diesen Schutzfunktionen hat das Epithel und Endothel aber auch die Aufgabe, gelöste Stoffe aus der Umgebung aufzunehmen und auch wieder abzugeben. Das wiederum setzt eine Polarisierung der einzelnen Zellen voraus, welche die funktionelle Basis für einen gerichteten Transport bildet. Um eine solche, selektiv permeable Barriere errichten zu können, bedarf es zahlreicher Verbindungen der Zellen untereinander.

1.1 Zell-Zell-Kontakte in Epithel- und Endothelzellen

Als sogenannte Zellkontakte werden die direkten Verbindungspunkte der Zellen zu ihren Nachbarzellen in ihrem Gewebe bezeichnet. Die Kontakte werden hierbei über Zelladhäsionsmoleküle vermittelt, die zum einen in das Zytoplasma der Zelle hineinreichen und zum anderen durch die Membran hinaus in den extrazellulären Raum reichen. Im zytoplasmatischen Bereich wird die Verbindung meist durch Gerüstproteine weitervermittelt, beispielsweise an die Aktinfilamente des Zytoskeletts. Die membranständigen Zelladhäsionsmoleküle wiederum binden Zelladhäsionsmoleküle benachbarter Zellen im extrazellulären Raum, wodurch das Gewebe eine durchgängige Verbindung über den gesamten Zellkomplex erhält. Diese Verbindungen werden durch verschiedene Arten von Zell-Zell-Kontakten ausgebildet. Hierzu gehören unter anderem, die nur für Epithel und Endothel spezifischen, undurchlässigen Verbindungen der Tight Junctions (TJ oder Zonula occludens), die Adhäsionskontakte der Adherens Junctions (AJ oder Zonula adherens) und die Desmosomen, die eine mechanische Verbindung der Zellen herstellen und kommunizierende Verbindungen, wie die sogenannten Gap Junctions (Abb. 1-1 und 1-2) [Lodish, 2007].

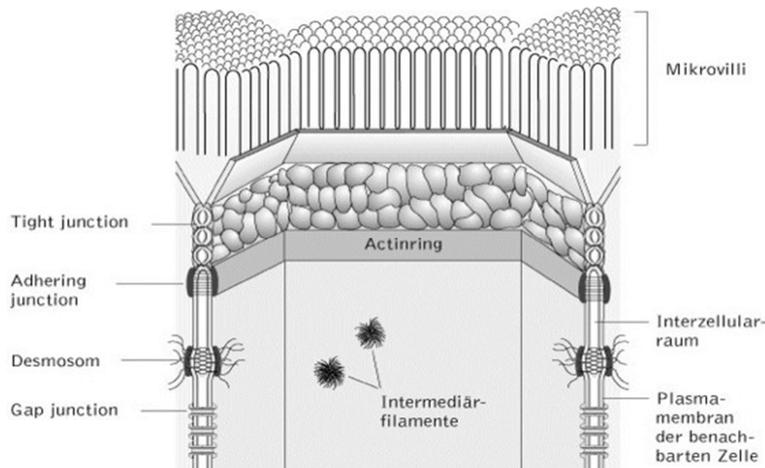


Abbildung 1-1: Zell-Zell-Verbindungen

Schematische Darstellung der verschiedenen Zell-Zell-Verbindungen im apikalen (oberen) Bereich zwischen Dünndarmepithelzellen [„Copyright 2001 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg“].

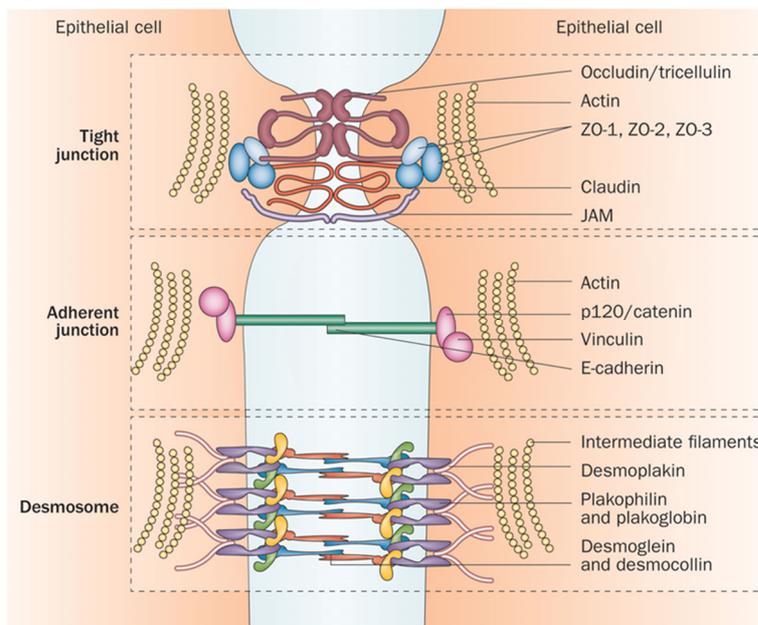


Abbildung 1-2: Funktionale Komplexe der epithelialen Zellkontakte

Dargestellt sind die apikalen Zellkontakte zwischen zwei Epithelzellen. Links sind die Namen der Zellkontakte aufgeführt, rechts die an der Ausbildung beteiligten Proteine und in der Mitte der parazelluläre Spalt mit den Zelladhäsionsproteinen [Neunlist, 2012].

Die TJ-Netzwerke sind in den Epithel- und Endothelgeweben von größter Bedeutung und bilden eine Art Gürtel, der die Zelle im apikalen Bereich komplett umspannt (Abb. 1-3).

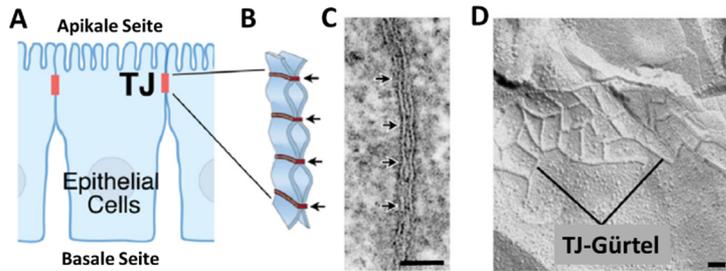


Abbildung 1-3: Epitheliale Tight Junctions [Tsukita, 2014]

(A) Lokalisierung der TJs zwischen den benachbarten Epithelzellen. **(B)** Schematische Darstellung des TJ-Gürtels. **(C)** Dünnschicht-Elektronenmikroskopie von Epithelien, die schwarzen Pfeile markieren die Position der TJs. **(D)** Elektronenmikroskopische Aufnahme (mittels Gefrierbruch-Technik) zeigt den TJ-Gürtel von Seiten der Plasmamembran. Der Maßstab in (C) und (D) entspricht 50 nm [Tsukita, 2014].

Dieses Zonula occludens Netzwerk erfüllt drei Hauptaufgaben (Abb. 1-4). Die erste Funktion ist die sogenannte „Zaun Funktion“, die eine Polarisation der Zelle in einen apikalen und einen basolateralen Teil ermöglicht. Gleichzeitig verhindert diese, dass die spezifische Verteilung der integralen Membranproteine und die Lipidzusammensetzung der beiden Membrankompartimente durch laterale Diffusion verloren geht. Eine weitere Funktion ist die Ausbildung einer Barriere zwischen den benachbarten Zellen, welche verhindern soll, dass Stoffe oder Krankheitserreger ungewollt über den parazellulären Spalt eindringen können. Diese Barriere kann jedoch auf Grund der variablen Zusammensetzung der Zelladhäsionsmoleküle selektiv permeabel für Ionen oder kleine Moleküle sein und bildet somit die dritte Funktion der TJs. Diese ermöglichen so beispielsweise die Rückresorption von wichtigen Salzen in der Niere [Niessen, 2007].

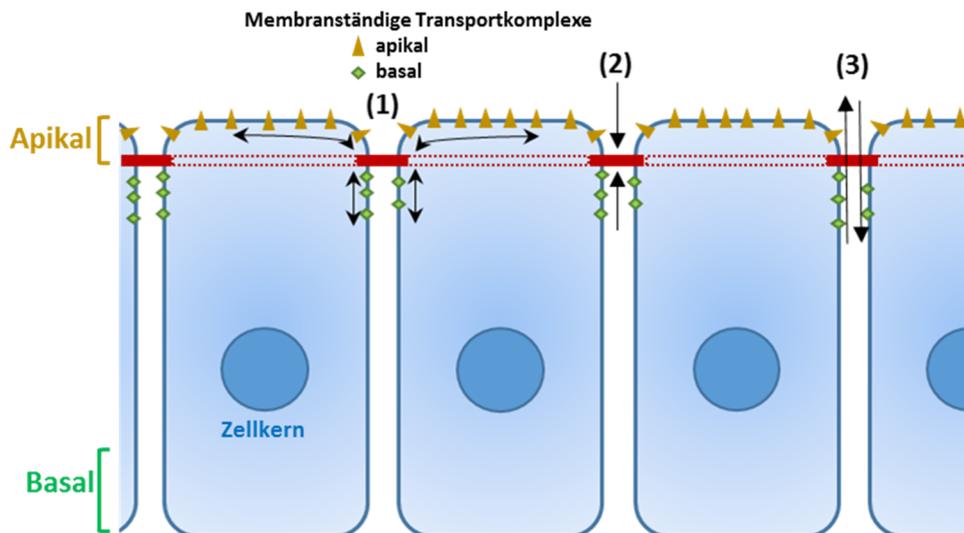


Abbildung 1-4: Die drei Hauptfunktionen der Tight Junctions

In Rot ist ein Netzwerk aus TJs dargestellt. **(1)** Die „Zaun Funktion“ verhindert die laterale Diffusion. **(2)** Die „Barrieren Funktion“ verhindert den ungewollten Transport über den parazellulären Raum und ermöglicht zusätzlich **(3)** einen selektiven parazellulären Transport.

Neben den TJs werden auch die AJs und die Desmosomen zu dem sogenannten Schlussleistenkomplex (*junctional complex*) des Epithels gezählt. Die AJs (Abb. 1-1) bilden in Epithelgewebe meist direkt unterhalb der TJs einen Adhäsionsgürtel aus. Die hierbei beteiligten Proteine sind die Ca^{2+} -abhängigen Cadherine. Diese sind integrale Membranproteine, die mit verschiedenen Ankerproteinen, wie beispielsweise den Cateninen, mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Die Proteinfamilie der Cadherine spielt auch bei den Desmosomen, knopfartigen Zell-Zell-Kontakten, eine wichtige Rolle. Hierbei sind jedoch andere Cadherine als bei den AJs beteiligt. Welche Art von Intermediärfilament an die Desmosomen gekoppelt ist hängt vom Zelltyp ab. Bei den sogenannten Gap Junctions handelt sich um Poren, die das Zytoplasma benachbarter Zellen verbinden. Gap Junctions bestehen aus einer Ansammlung von Connexonen, Protein-Komplexen, die jeweils aus 6 Connexinen aufgebaut sind. Connexine sind Transmembran-Proteine, die jeweils vier α -helikale Membrandomänen besitzen, in ihrer Gesamtlänge jedoch variieren können. Ihr Name setzt sich aus ihrer Abkürzung „Cx“ und der theoretischen molekularen Masse zusammen, beispielsweise das Cx43 [Lodish, 2007].

1.2 Die molekulare Struktur der Tight und Adherens Junctions

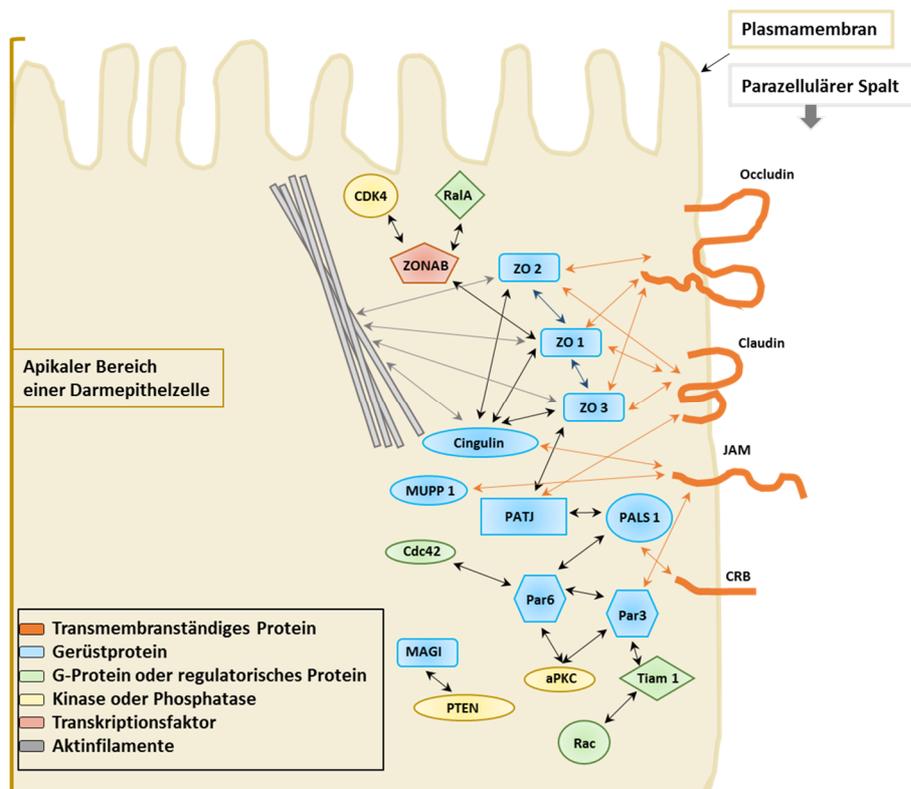


Abbildung 1-5: Komplexe Protein-Protein Interaktionen der Tight Junctions [Shin, 2006]

Die molekulare Zusammensetzung der TJs (Abb. 1-5) und AJs (Abb. 1-6) umfasst transmembranständige Proteine, die außerhalb der Zelle meist als Rezeptoren für die Ausbildung von Adhäsionskontakten dienen oder die Ausbildung parazellulärer Kanäle ermöglichen. Bei den TJs handelt es sich hierbei um die Proteine Occludin, Claudin und Triculin, die maßgeblich die selektive Permeabilität der parazellulären Barriere definieren [Günzel, 2013], sowie um die Immunoglobulin (Ig)-artigen Adhäsionsmoleküle JAM-1 (*Junction adhesion molecule-1*) und CAR (*coxsackie adenovirus receptor*). Die zytosolisch lokalisierten Adapterproteine sind im Falle der TJs die Proteine Zonula occludens 1-3 (ZO1-3), MUPP 1 und MAGI 1 [Citi, 2011]. Diese fungieren als Gerüstproteine und ermöglichen ein Andocken der Membranproteine des Zytoskeletts und von Proteinen der Signaltransduktionskaskaden, wie beispielsweise Cingulin, ZONAB oder Symplektin. Ebenso sind zwei weitere Komplexe an die TJs koordiniert und dienen der Ausbildung und Aufrechterhaltung der apikalen-basolateralen Polarität. Der Erste ist der aPKC (atypische Proteinkinase C)-Par3-Par6 Komplex, der durch die Interaktion des Par3 mit JAM-A gebunden wird, der Zweite ist der Crumbs-PALS 1-PATJ Komplex, der durch die Interaktion des PATJ mit ZO3 gebunden wird [Shin, 2006].

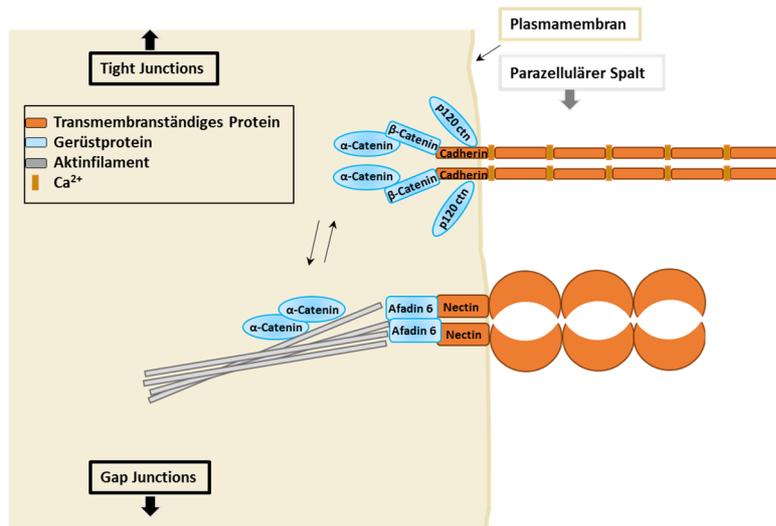


Abbildung 1-6: Übersicht über die Komponenten der Adherens Junctions [Niessen, 2007]

Bei den AJs (Abb. 1-6) ist das Ig-artige Adhäsionsprotein Nectin mit den zytosolischen Proteinen Afadin 6 (AF6) und Ponsin assoziiert. Während die Ca²⁺ abhängigen E-Cadherin Proteine mit verschiedenen intrazellulären Proteinen wie p120-Catenin, α- und β-Catenin interagieren [Meng, 2009]. Diese zytosolischen Komplexe organisieren die Verankerung der AJs an das Aktin-Zytoskelett. Hierbei verbinden α-Catenin, α-Aktinin, Vinculin und Epilin die E-Cadherine mit den Aktin-Filamenten, während der Komplex aus AF6 und Ponsin die Nectine an die Aktin-Filamente koordiniert. Bei den TJs geschieht die Kopplung an die Aktin-Filamente hauptsächlich über die ZO-Proteine. Eine derartige Assoziation des Aktin-Zytoskeletts mit den Zell-Zell-Kontakten führt zu einer gravierenden Umorientierung und Neuausrichtung des Zytoskeletts [Mege, 2006]. Unter anderem spielen kleine GTPasen eine Schlüsselrolle in solch einer Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts.

1.3 Die Zonula occludens Proteine ZO1-3

Die TJ Proteine Zonula occludens 1-3 sind periphere Membranproteine, die auf der zytoplasmatischen Seite der Epithel- oder Endothelzellen lokalisiert sind. ZO1 ist eines der Hauptgerüstproteine der TJs und liegt auch im Fokus dieser Arbeit. Die ZO-Proteine (Abb. 1-7) gehören zu der großen Familie, der an die Membran assoziierten Guanylatkinasen (MAGUKs). Diese spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf zelluläre Signaltransduktion, Kontrolle der Zellpolarität und Zell-Zell-Kommunikation. Proteine dieser Familie zeichnen sich hauptsächlich durch das Vorhandensein einer oder mehrerer PDZ-Domänen (abgeleitet von den ersten drei bekannten Proteinen die eine solche Domäne trugen PSD-95/SAP90, DLG und ZO-1) und einer SH3-Domäne (*Src-homology 3*) gefolgt von einer GuK-Domäne (katalytisch inaktive Guanylatkinase) aus, die häufig als sogenannte SH3-GuK Tandem-Einheit fungiert [Zhu, 2011].

PDZ-Domänen sind häufig auftretende Protein-Protein-Interaktions Module, die meist auch in Gerüstproteinen vorkommen und diverse biologische Prozesse regulieren, wie zum Beispiel die Aufrechterhaltung definierter Zellstrukturen, die Verknüpfung des Aktinskeletts mit Membrankompartimenten oder in Signaltransduktionsprozesse. PDZ-Domänen bestehen meist aus ca. 90 Aminosäuren (AS) und haben ein klassisches kanonisches Faltungsmotiv, bestehend aus 6 β -Faltblättern, welche eine Art halbgeöffnetes β -*Barrel* (eine Fass-ähnliche Struktur) bilden, und zwei zusätzliche α -Helices. Die Protein-Interaktion der Zielproteine erfolgt hauptsächlich über deren C-terminales Ende (5-7 AS), das meist eine Bindung mit dem „GLGF“-Motiv (oftmals eine Furchte des β 2-Faltblattes) der PDZ-Domäne eingeht [Ye, 2013]. PDZ-Domänen können teilweise aber auch interne Peptidsequenzen erkennen [Penkert, 2004], Phospholipide binden oder Dimere und Tandem-Strukturen ausbilden [Lee, 2010]. SH3-Domänen sind ebenfalls klassische Protein-Protein-Interaktionsdomänen, welche 5 β -Faltblätter (β -*Sandwich*), 3 Schleifenregionen und eine kurze 3_{10} -Helix aufweisen. Diese binden ihr Zielprotein meist über eine Prolin-reiche Sequenz (PxxP-Motiv) [Saksela, 2012]. Die Guanylatkinase-Domäne bildet in den MAGUK Proteinen meistens eine übergeordnete Struktur mit der angrenzenden PDZ- und SH3-Domäne aus und zeigt keine katalytische Kinase-Aktivität [McCann, 2012].

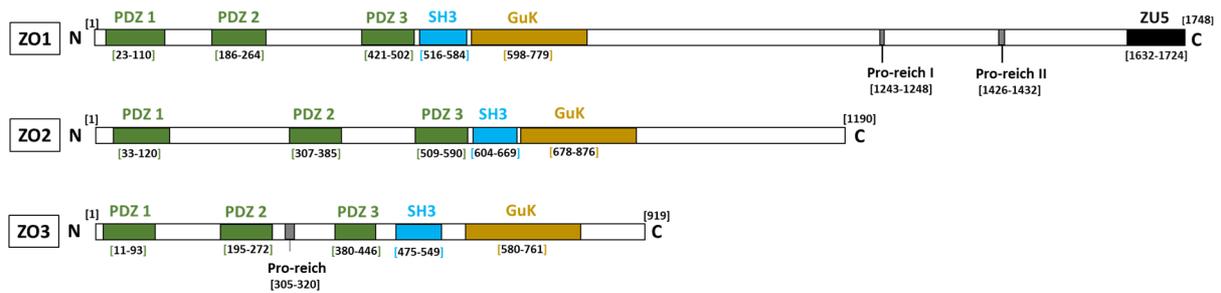


Abbildung 1-7: Schematische Übersicht über die drei humanen ZO-Proteine und ihrer konservierten Domänen

In grün sind die drei PDZ-Domänen markiert, in blau die SH3 und in braun die GuK Domäne. ZO1 besitzt zusätzlich noch eine ZU5-Domäne (in schwarz) und C-terminal zwei Prolin-reiche Regionen. Die exakte Aminosäureposition ist in eckigen Klammern angegeben.

Das ZO1 Protein (Abb. 1-8) ist mit 1748 AS und einer molekularen Masse von 225 kDa das größte der ZO-Proteine. Es besitzt im Gegensatz zu den anderen beiden ZO-Proteinen einen langen C-terminalen Bereich mit einer zusätzlichen ZU5-Domäne, für die jedoch noch keine Funktion bekannt ist. Des Weiteren tritt ZO1 in drei verschiedenen Spleißvarianten auf (α (+/-), β 1/2 und γ), dessen alternative *splicing*-Domänen allesamt im C-terminalen Bereich liegen [Gonzalez-Mariscal, 1999]. ZO1 ist ein sogenanntes Phosphorprotein, welches durch post-translationale Modifikation, beispielsweise durch die ZAK-Kinase am C-terminalen Ende der SH3-Domäne, phosphoryliert wird [Balda, 1996]. ZO1 trägt (wie alle ZO-Proteine) im Bereich der ersten PDZ- und der GuK-Domäne drei sogenannte Zellkern-Export-Signale (*nuclear export signals/ NES*) [Gonzalez-Mariscal, 1999] und scheint in speziellen Fällen zwischen dem Zellkern und der Plasmamembran zu verkehren. So konnte zum Beispiel in Zelllinien mit einer verringerten Anzahl an Zell-Zell-Kontakten, während der Reifung der Zellen und der Neubildung der Zell-Zell-Kontakte, eine starke Präsenz von ZO-1 in Kernnähe gezeigt werden [Gonzales-Mariscal, 2002]. Außerdem interagiert ZO-1 über seine SH3-Domäne mit dem Y-Box Transkriptionsfaktor ZONAB, der wiederum regulierende Funktionen im Zell-Zyklus besitzt [Balder, 2000]. Auf Grund dieser Eigenschaften wird vermutet, dass ZO1 und die ZO-Proteine allgemein, während der epithelialen Zelldifferenzierung und deren Zellwachstum, eine Kommunikation (*cross-talk*) zwischen dem Zellkern und den TJs ermöglichen [Gonzalez-Mariscal, 2003].

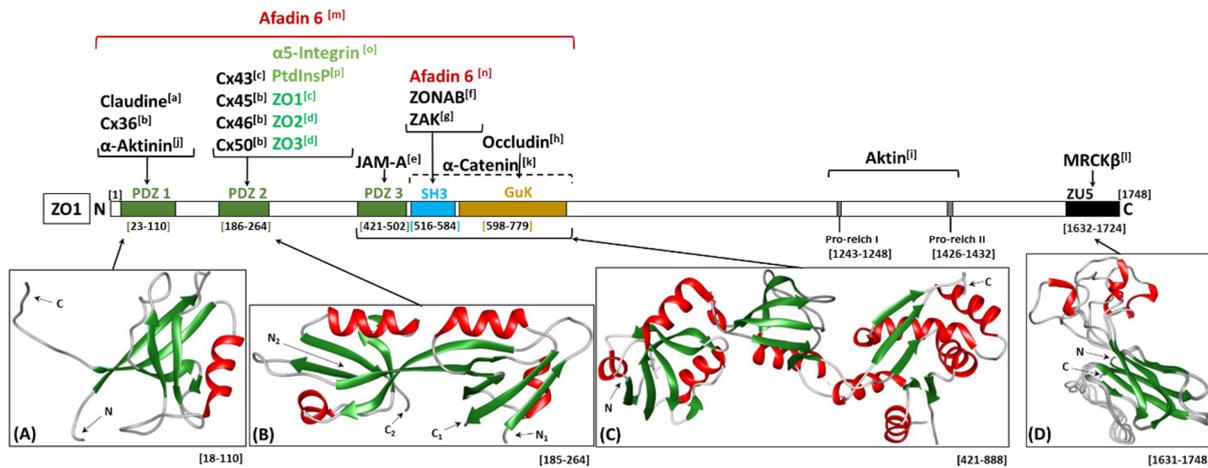


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des humanen ZO1 Proteins mit einigen seiner in den Tight Junction assoziierten Bindepertnern und den bis dato aufgeklärten Teilstrukturen

Im oberen Bereich sind die bekannten Bindepertner detailgetreu in Bezug zu ihren Bindepertitionen auf ZO1 dargestellt [**[a]** Itoh, 1997 / **[b]** Giepmans, 2004 / **[c]** Chen, 2008 / **[d]** Wittchen, 1999 / **[e]** Ebnet, 2004 / **[f]** Balda, 2000 / **[g]** Balda, 1996 / **[h]** Itoh, 2001 / **[i]** Fanning, 2002 / **[j]** Chen, 2006 / **[k]** Maier, 2013 / **[l]** Huo, 2011 / **[m]** Yamamoto, 1997 / **[n]** Ooshio, 2010 / **[o]** Hämälistö, 2013]. Für diese Arbeit interessante Interaktionspartner sind farblich hervorgehoben. Zusätzlich sind die exakten Aminosäurepositionen angegeben und die bis dato gelösten Teilstrukturen dargestellt. **(A)** PDZ1-Domäne (PDB-File „2H2B“) / **(B)** PDZ2-Domäne (PDB-File „2RCZ“) / **(C)** PDZ3-SH3-GuK Konstrukt (PDB-File „3SHW“) / **(D)** ZUS-Domäne (PDB-File „2KXR“).

ZO2 ist ein ca. 160 kDa großes Phosphorprotein, welches bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration durch die atypische Proteinkinasen (PKC) $\beta / \epsilon / \lambda / \xi$ und durch PKA phosphoryliert wird [Avila-Flores, 2001]. Ebenso kann es über seine PDZ2-Domäne mit der PDZ2-Domäne des ZO1-Proteins heterodimerisieren. Zusätzlich zu den bekannten NES, bei denen im Fall des ZO2 nur eines durch Phosphorylierung aktiviert ist, trägt ZO2 aber auch noch zwei Zellkern-Import-Signale (*nuclear localization signal* / NLS). In Kombination mit weiteren *Shuttle*-Proteinen sorgen diese dafür, dass ZO2 effektiv in den Zellkern lokalisiert werden kann [Gonzalez-Mariscal, 2004/2009/2014]. Das ZO3 Protein ist bis heute das am wenigsten verstandene der drei Zonula occludens Proteine. Es ist nur 130 kDa groß und besitzt keinen langen, C-terminalen Anteil, wie etwa ZO1 und ZO2. Es weist jedoch ein NES und zwei NLS auf, konnte aber noch nie in der Nähe des Zellkerns nachgewiesen werden. Die bis dato gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sich die Ausbildung neuer Zellkontakte in einem schrittweisen Prozess von der primären Ausbildung der AJs hin zur finalen Ausbildung der TJs vollzieht [Maier, 2013]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ohne den Interaktionspartner Afadin 6 (AF6) keine TJs und nur schwache, Cadherin-basierte AJs ausgebildet werden [Sato, 2006] und dass

die Interaktion zwischen AF6 und ZO1 nur vorübergehend in der Phase der Ausbildung der Zellkontakte stattfindet [Ooshio, 2010].

1.4 Afadin 6

AF6 (Abb. 1-9) ist ebenfalls ein Gerüstprotein, welches hauptsächlich an der Ausbildung der AJs beteiligt ist und in zwei Spleißvarianten vorkommt, dem l-AF6 (205 kDa) und dem s-AF6 (190 kDa) [Mandai, 1997]. Dem s-AF6 fehlt hierbei die C-terminale Aktin-Bindestelle und wurde bis dato nur im Gehirn nachgewiesen. AF6 wurde bereits 1997 von Yamamoto als Interaktionspartner des ZO1 Proteins identifiziert und steht im Mittelpunkt dieser Arbeit.

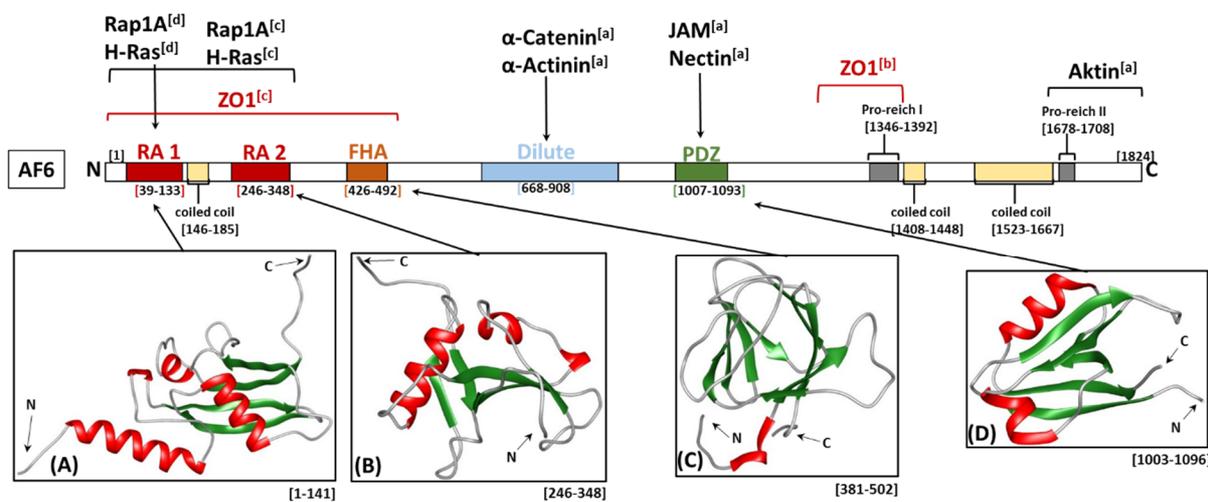


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des humanen AF6 Proteins mit einigen seiner assoziierten Bindepartnern und den bis dato aufgeklärten Teilstrukturen

Im oberen Bereich sind die bekannten Bindepartner detailgetreu in Bezug zu ihren Bindepositionen auf AF6 dargestellt [**[a]** Takai, 2007 / **[b]** Ooshio, 2010 / **[c]** Yamamoto, 1997 / **[d]** Linnemann, 1999]. Für diese Arbeit interessante Interaktionspartner sind farbig hervorgehoben. Zusätzlich sind die exakten Aminosäurepositionen angegeben und die bis dato gelösten Teilstrukturen dargestellt. **(A)** RA1-Domäne (PDB-File „AF6(1-141)“ / Steiner, 2001) / **(B)** RA2-Domäne (PDB-File „1WXA“) / **(C)** Forkehead (FHA)-Domäne (PDB-File „1WLN“) / **(D)** PDZ-Domäne (PDB-File „1T2M“).

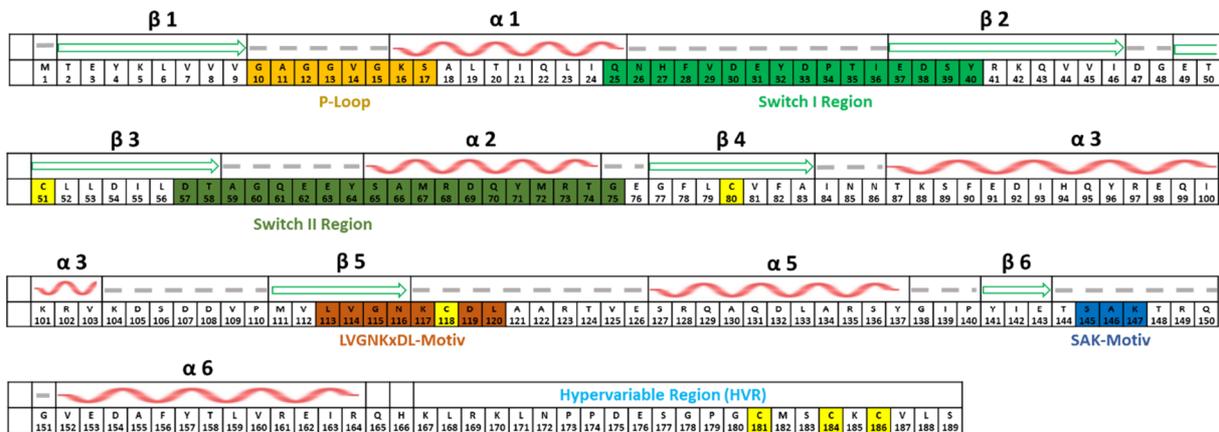
In epithelialen Zellen bindet AF6 über die Ras-Assoziations Domäne 1 aktives, Guanosin triphosphat (GTP) beladenes, Rap1A (*Ras related protein 1A*) und zwar mit einer viel höheren Affinität ($K_d = 0,25 \mu\text{M}$) als die inaktive, Guanosindiphosphat (GDP) beladene, Form ($K_d > 100 \mu\text{M}$) [Linnemann, 1999] (Kapitel 1.7). Dadurch lokalisiert Rap1A das AF6 Protein an die Plasmamembran [Tawa, 2010]. Infolgedessen können E-Cadherine an die Nectin basierten Zell-Zell-Kontakte lokalisiert werden und somit die AJs vollständig ausgebildet werden. AF6

wird aber auch in der Nähe der GAP-Junctions lokalisiert und kommt, anders als die ZO-Proteine, auch in nicht epithelialen Gewebe vor. Der komplexe AF6-vermittelte *cross-talk* zwischen den diversen Zell-Kontakten ist bis heute noch nicht komplett verstanden.

1.5 Die kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A

Im Gegensatz zu den Adenosintriphosphat (ATP) -bindenden Proteinen, die hauptsächlich die Energie des ATPs für Stoffwechselprozesse oder den Antrieb molekularer Motoren benötigen, spielen kleine GTP-bindende Proteine („G-Proteine“) eine Rolle in der Regulation der Zellbewegung, Ausbildung der Zellpolarität und der korrekten Form der Zellen, sowie in diversen Signaltransduktionsprozessen. Die Klasse der G-Proteine kann in zwei Unterklassen aufgeteilt werden, die TRAFAC- und die SIMIBI- Klasse [Vetter, 2011]. Zur Klasse der TRAFAC gehören auch die kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A, die in dieser Arbeit von besonderem Interesse sind. Die erste Struktur eines Proteins der Ras-Superfamilie wurde 1989 von dem onkogenen Protein H-Ras (*Harvey rat sarcoma viral oncogen homolog*) gelöst [Pai, 1989] und besteht aus 6 β -Faltblättern und 5 α -Helices (Abb. 1-10 / 1-11). Abgesehen von der geringen Sequenz-Homologie der Familienmitglieder mit H-Ras, von beispielsweise maximal 45% Übereinstimmung des Proteins RIT bis hin zu 11% Übereinstimmung des Proteins ARF, weisen alle G-Proteine vier bis fünf konservierte Sequenzmotive auf. Die Struktur des H-Ras stellt seit seiner Aufklärung die minimale konservierte Faltung dieser Domänen dar. Die funktionell konservierten G-Domänen (ca. 18-20 kDa) weisen eine universelle Struktur und einen universellen Schalter-Mechanismus auf. Die einzelnen Domänen werden G1-G5 für die GTP-Bindung, sowie PM1-3 für die Bindung von Phosphat oder Metallionen genannt (Abb. 1-10 / 1-11). Da die bedeutenden Konformationsänderungen in den beiden Regionen G2 und G3 stattfinden, werden diese auch als Schalterregionen bezeichnet (*Switch I* und *II*) und weisen in den meisten Fällen in *Switch I* ein konserviertes Threonin und in *Switch II* ein konserviertes Glycin auf. G1/PM1 ist der sogenannte *P-Loop*, der das α - und β -Phosphat des GTPs über ein GxxxxGKS/T Motiv bindet. G2/PM2 ist die *Switch I*-Region, die das γ -Phosphat und Mg^{2+} bindet. G3/PM3 ist die *Switch II*-Region, verfügt über die Bindeposition (DxxGQ-Motiv) des Guanosins und ist wichtig für die Hydrolyse des GTPs zu GDP. G4 (LVGNKxDL- Motiv) und G5 (SAK-Motiv) sind für die spezifische Bindung von Guanosin statt Adenosin von Bedeutung, wobei das SAK-Motiv nur sehr gering konserviert ist [Vetter, 2014]. Mittlerweile gibt es mehr als 591 aufgeklärte

3D-Strukturen in der PDB-Datenbank (Stand 2014) wobei Ras bereits mit über 57 verschiedenen Variationen vertreten ist.



P-Loop (G1): Wichtig für die Bindung des Nucleotids und stellt Kontakt zum α- und β-Phosphat her.
Switch I Region (G2): T35 stellt die Verbindung mit dem terminalen γ-Phosphat des GTPs und dem Mg²⁺-Ion her. Kein Kontakt zu GDP.
Switch II Region (G3): DXSGQ-Motiv Guanin-Bindeposition, in Ras G61 wichtig für die GTP zu GDP Hydrolyse.
LVGNKxDL-Motiv (G4): Spezifische Interaktion bevorzugt Guanin statt Adenin.
SAK-Motiv (G5): A148 spezifischer für Guanin als für Adenin.
Hypervariable Region (HVR): Dient der der Verankerung des Proteins in der Membran.

Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der kleinen humanen GTPase H-Ras

Dargestellt ist die Primär- sowie Sekundärstruktur des H-Ras Proteins. Zusätzlich sind die G-Motive G1-G5 farblich markiert und im unteren Teil der Darstellung kurz erläutert. Die Cysteine sind in gelb hervorgehoben [Vetter, 2014].

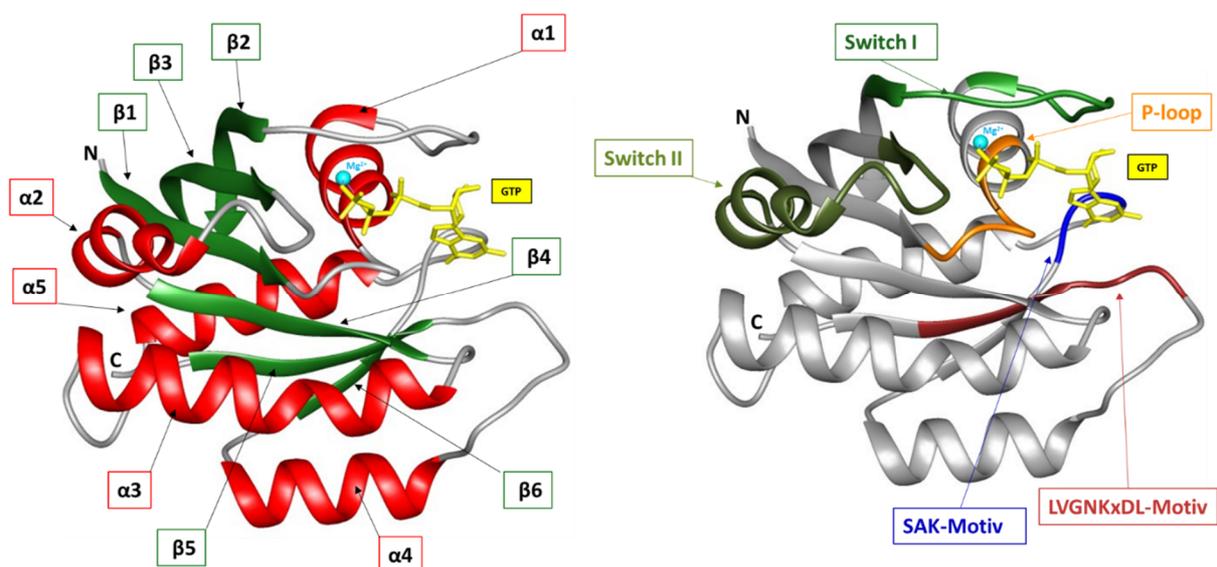


Abbildung 1-11: 3D-Struktur des humanen H-Ras in GTP-gebundener Form

Links sind die Sekundärstrukturelemente (PDB-File „5P21“) farblich hervorgehoben, mit den α-Helices in rot, den β-Faltblättern in grün und den Schleifenregionen in grau. Rechts sind die G-Motive in aktiver Konformation entsprechend der Darstellung in Abbildung 1-10 farblich markiert. GTP ist gelb und das Mg²⁺-Ion im aktiven Zentrum ist in Cyan hervorgehoben.

Alle G-Proteine haben die Eigenschaft entweder GTP (aktiv) oder GDP (inaktiv) zu binden und fungieren so als molekularer Schalter (Abb. 1-12), wobei der GDP- zu GTP-Austausch nicht von ihnen selbst, sondern von zusätzlichen Proteinen, den *Guanin-nucleotide exchange factors* (GEFs), durchgeführt wird. Durch die hydrolytische Abspaltung des γ -Phosphats des GTPs schnell die aktive Konformation, die den eher starren Zustand darstellt, in die inaktive GDP-beladene Form über, die einen eher entspannten Zustand repräsentiert. Aus diesem Grund wird der Mechanismus auch als *loaded-spring* (gespannte Feder) -Mechanismus bezeichnet [Wittinghofer, 2001]. Diese Hydrolyse kann entweder langsam, durch eine intrinsische Hydrolyse Aktivität des G-Proteins, oder schnell durch zusätzliche *GTPase-activating proteins* (GAPs) erfolgen und ermöglicht so ein schnelles Umschalten der beiden Konformationen (Abb. 1-12).

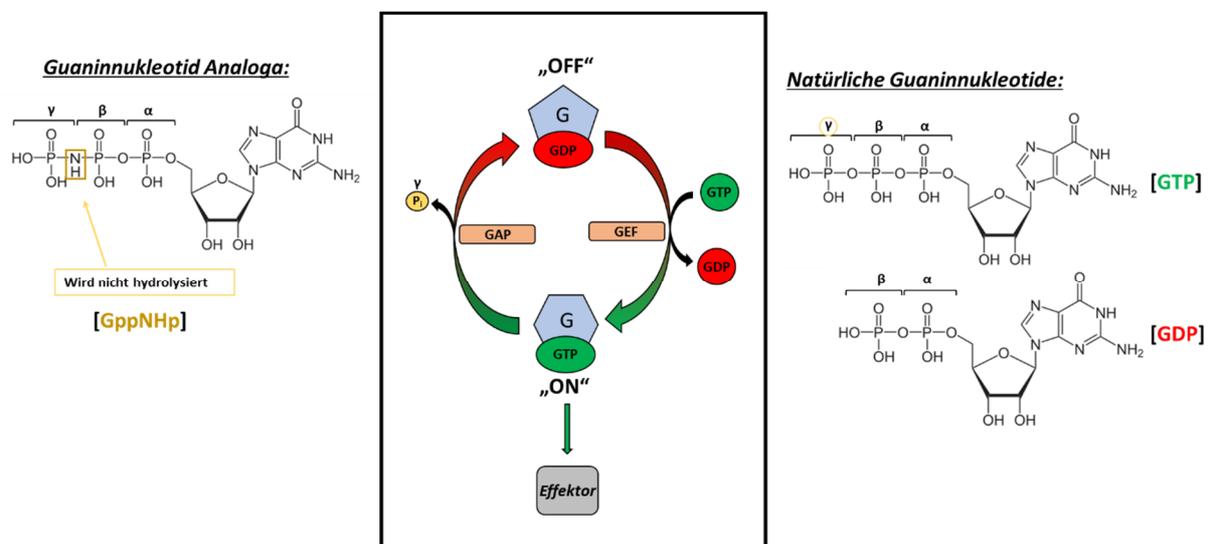


Abbildung 1-12: Schematische Darstellung des GDP-GTP-Schaltermechanismus der kleinen G-Proteine

Die G-Proteine sind in hellblau, die Nukleotide GTP in grün, GDP in rot und das durch die Hydrolyse abgespaltene γ -Phosphat in gelb dargestellt. Braun sind die GAP (*GTPase-activating proteins*) und GEF (*Guanin-nucleotide exchange factor*) Proteine, in grau die Effektoren der G-Proteine. Rechts sind die natürlich vorkommenden Nukleotide GTP und GDP, links das GTP-Analoga GppNHp (die GTPase kann hierbei das γ -Phosphat nicht abspalten und ist so kontinuierlich aktiviert) dargestellt.

Die Superfamilie der kleinen GTPasen umfasst 5 Unterfamilien, wobei mittlerweile (Stand April 2015) 167 humane Proteine identifiziert wurden, wovon 10 noch nicht zugeordnet sind. Hierzu gehört die Ras-Familie mit 39 Proteinen, die Rho-Familie mit 22 Proteinen, die Rab-Familie mit 65 Proteinen, die Sar1/Arf-Familie mit 22 Proteinen und die Ran-Familie mit einem Protein [Takai, 2001 / Owen, 2015]. Eine Unterfamilie der Ras Familie sind die Rap1 Proteine, zu der Rap1A gehört, welches wie H-Ras, von großer Bedeutung für diese Arbeit ist. Rap1A und Rap1B sind sehr nahe verwandt zu Ras, werden aber mittlerweile als unabhängig von Ras

angesehen [Frische, 2010] und sind an der Ausbildung und Kontrolle der Zellpolarität, der Integrin-vermittelten Zelladhäsion und deren Regulation, sowie an Sekretion und Proliferation der Zellen beteiligt [Schwamborn, 2004 / Caron, 2000 / Hogan, 2004 / Crittenden, 2004].

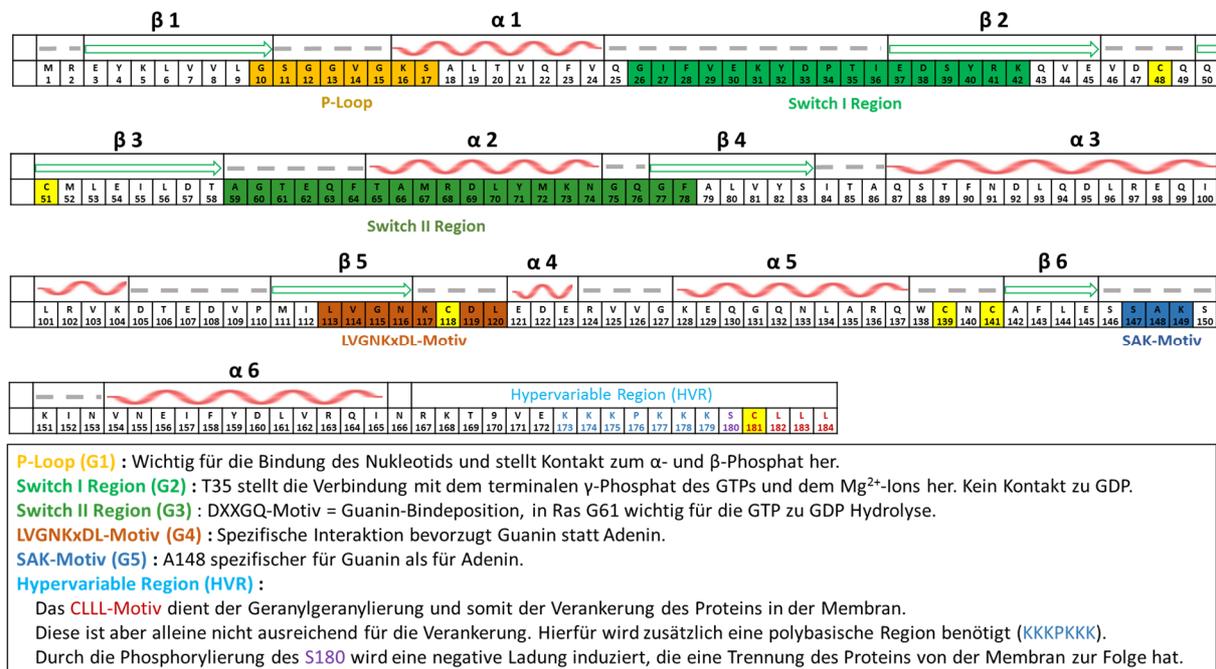


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der kleinen humanen GTPase Rap1A

Dargestellt ist die Primär- sowie Sekundärstruktur des Rap1A Proteins. Zusätzlich sind die G-Motive G1-G5 der kleinen GTPase farblich markiert und im unteren Teil der Darstellung kurz erläutert. Die Cysteine sind in gelb hervorgehoben [Vetter, 2014].

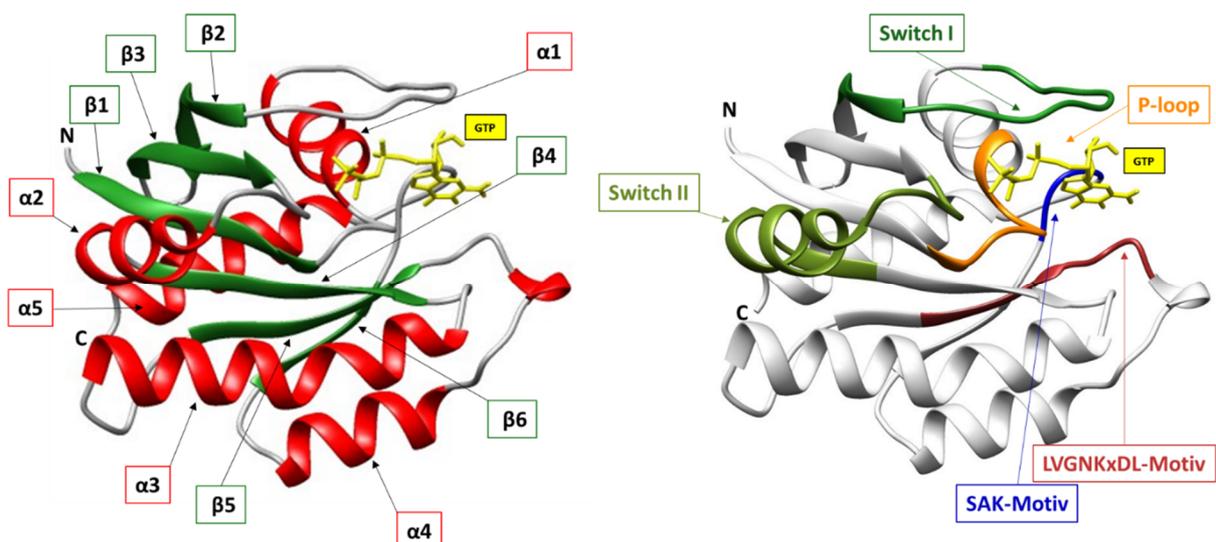


Abbildung 1-14: 3D-Struktur des humanen Rap1A in GTP gebundener Form

Links sind die Sekundärstrukturelemente (PDB-File „4KVG“) farblich hervorgehoben mit den α-Helices in rot, den β-Faltblättern in grün und den Schleifenregionen in grau. Rechts sind die G-Motive in aktiver Konformation entsprechend der Darstellung in Abbildung 1-13 farblich markiert. GTP ist gelb und das Mg²⁺-Ion im aktiven Zentrum ist in Cyan dargestellt.

Aktives Rap1A[GTP] steuert spezifisch über einen sogenannten *inside-out*-Mechanismus, die Bindung von RIAM (*Rap1-interacting adaptor molecule*) und Rekrutierung von Talin an die Plasmamembran, sowie die Signaltransduktionsprozesse in Bezug auf die Integrin-vermittelte Ausbildung und Erhaltung der Fokalen Adhäsionen (*focal adhesion*) [Zhang, 2014] (Abb. 1-15). Abnormale Rap1A Aktivität führt häufig zu einer „Integrin-Hyperaktivität“, die wiederum mit der Entwicklung von Tumoren diverser Krebsarten und deren Metastasierung in Verbindung steht.

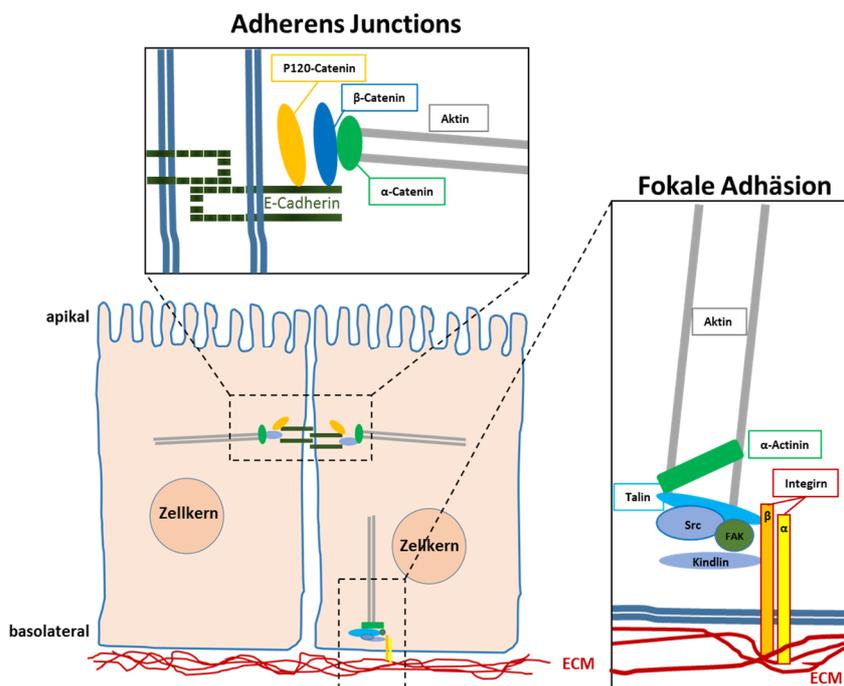


Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der Fokalen Adhäsionen in Bezug auf ihre Position und ihre Protein-Komplexe [Canel, 2013]

Die Position der Fokalen Adhäsionen befindet sich im basolateralen Teil der Epithelzellen, wird durch die E-Cadherine der Adhärenzverbindungen (in dunkelgrün) vermittelt und stellt die Verbindung mit der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix* / ECM) über die zytosomatischen Proteine Src, FAK, Kindlin, Talin, α-Actinin und die Zelladhäsionsproteine Integrin α und β her.

1.6 Die Krebserkrankung und die Beteiligung der Proteine H-Ras, Rap1A und AF6

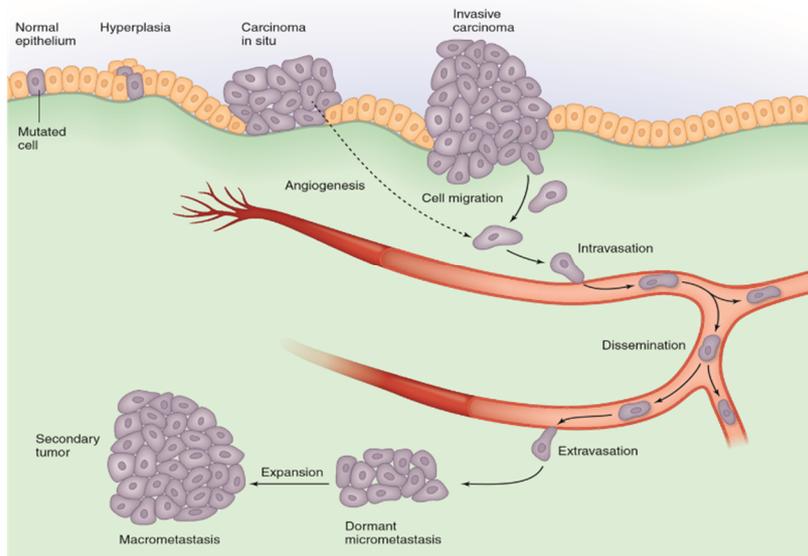


Abbildung 1-16: Schematische Darstellung des Verlaufs einer epithelialen Krebsentwicklung [Sever, 2015]

In grau sind die Entwicklungsstufen eines epithelialen Tumors von der Mutation einer einzelnen Zelle bis hin zur Metastasierung und Ausbildung eines sekundären Tumors dargestellt.

Die meisten Krebsarten gehen aus epithelialen Zellen hervor und manifestieren sich als sogenannte Karzinome in Organen wie Lunge, Haut, Brust, Leber und Pankreas [Sever, 2015]. Sarkome hingegen entstehen aus mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten (Bindegewebe), Myofibrillen (Muskelgewebe), Adipozyten (Fettgewebe) und Osteoblasten (Knochen). Nicht epitheliale Tumore wie ein Gliom, Neuroblastom oder Medullablastom können aus Zellen des Nervensystems oder wie bei der Leukämie oder Lymphomen aus hämatopoetischen Zellen hervorgehen. Die meisten Tumore entstehen durch die genetische Veränderung zellulärer Gene durch Replikationsfehler, schädliche Umwelteinflüsse (mutagene Substanzen) oder virale Einflüsse [Banks, 2012]. In Folge einer solchen Mutation kann es passieren, dass diese Zelle nicht mehr der homöostatischen Kontrolle, wie beispielsweise einem geregelten Zelltod, unterliegt und sich ungehindert teilen und vermehren kann. Durch die unkontrollierte Zellteilung kommt es zu einer Sauerstoffunterversorgung (Hypoxie) im Zentrum des Tumors, infolgedessen zur Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Gewebes aufrecht zu erhalten. Zusätzlich trennen sich Tumorzellen durch

Auflösen der Zell-Zell-Kontakte vom Zellverband und werden über die neu gebildeten Blutgefäße und den Blutkreislauf an andere Stellen des Körpers transportiert. Dort können sie adhären, sich weiter ungehindert teilen und einen sekundären Tumor ausbilden (Abb. 1-16).

Tumore können bis zu tausend unterschiedlicher Mutationen tragen, von denen jedoch der Großteil passive Mutationen (*passenger mutations*) darstellen und nur zwei bis acht dieser Mutationen die Auslöser der Krebsentwicklung (*driver mutations*) sind [Vogelstein, 2013]. Ein solcher Auslöser ist zum Beispiel die Punktmutation des Ras-Proteins, die an Aminosäureposition 12 das Glycin durch ein Valin ersetzt (G12V). Das hat zur Folge, dass Ras in seiner aktiven Konformation verbleibt [Winder, 2009]. Tatsächlich sind die Ras-Gene die für H-Ras, N-Ras und K-Ras kodieren, die am häufigsten mutierten Gene in Bezug auf Krebserkrankungen, wobei die Mutationen in Bezug auf K-Ras vorherrschend sind [Kimmelman, 2015]. Zusätzlich zählen die Ras-Tumore zu den aggressivsten und gegenüber einer Behandlung widerstandsfähigsten Arten der Krebserkrankungen. Ebenso verhält es sich mit einer abnormalen Aktivierung des Rap1A Proteins, durch eine G12V Punktmutation, durch das HPV E6 Onkoprotein (aus humanen Papillomaviren) oder durch Inhibierung seiner GEF- oder GAP-Proteine [Frische, 2010 / Zhang, 2014 / Banks, 2012 / Garmy-Susini, 2010].

Eine weitere bösartige Krebserkrankung ist die akute myeloische Leukämie (AML). Sie entsteht durch eine ungewollte Translokation (Verlagerung eines Chromosomenabschnitts an eine andere Position im selben oder in einem anderen Chromosom), Duplikation oder Amplifikation im Bereich des MLL-Proteins (*mixed lineage leukemia*), einer Histon H3 Lysin 4 spezifischen Methyltransferase. MLL ist für die embryonale Entwicklung und die Hämatopoese essentiell [Manara, 2014]. Mittlerweile sind mehr als 60 abnormale MLL-Fusionsproteine, sogenannte MLL-Chimäre bekannt, die zu AML, akuter lymphatischer oder biphänotypischer Leukämie führen. Die durch MLL-Mutation entstandene AML zeigt ein sehr diverses Krankheitsbild, abhängig davon, welche Chimären durch die Mutation entstanden sind. Innerhalb dieser 60 bekannten Chimären ist die MLL-AF6 Kombination [t(6;11)(q27;q23)] eine der aggressivsten Formen [Pigazzi, 2011]. Es konnte gezeigt werden, dass die MLL-AF6 Chimäre das native AF6 bindet, dieses in den Zellkern lokalisiert und somit die zytoplasmatische Ras-Konzentration beeinflusst. AF6 selbst hat hierbei anscheinend keine eigene transkriptionelle Aktivität [Manara, 2014]. Deshalb ist die exakte biochemische Analyse der AF6 Interaktion mit Rap1A und H-Ras von großer Bedeutung.

1.7 Ergebnisse vorheriger Dissertationen

Durch die Arbeit von Thomas Linnemann konnte bereits 1999 an der Ruhr-Universität in Bochum die minimale Ras-Assoziationsdomäne 1 des AF6 („AF6(1-141)“) bestimmt und die Kinetik der Komplexbindung des AF6 mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A ermittelt werden.

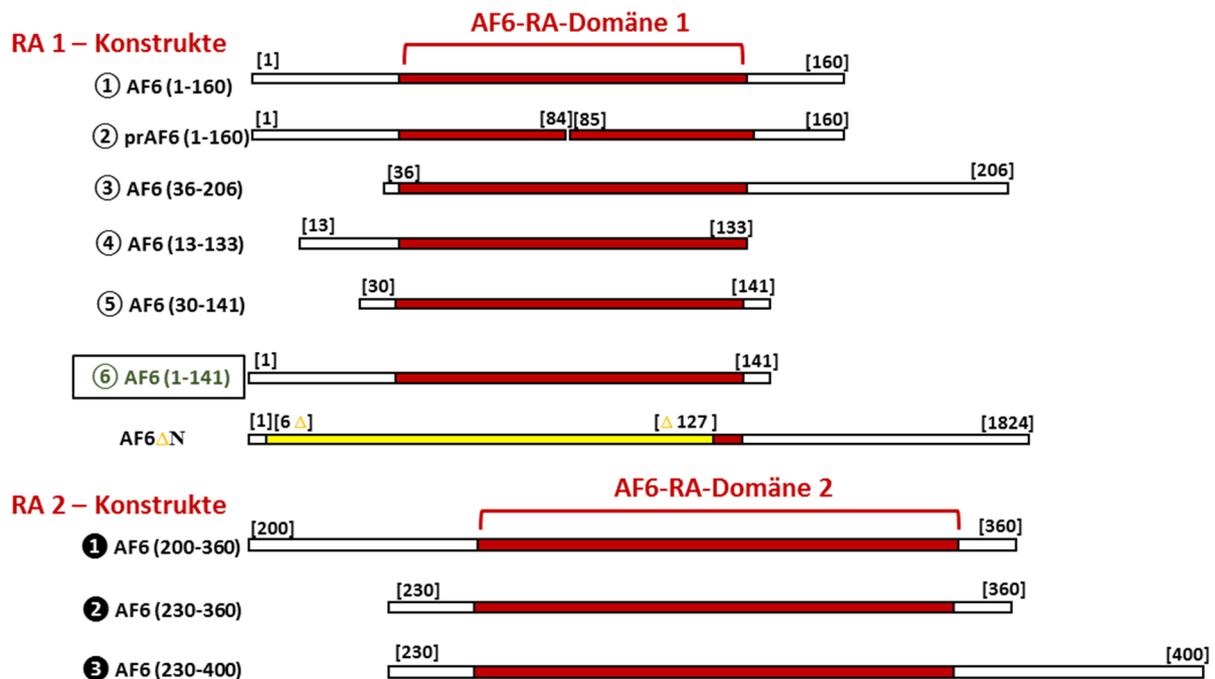


Abbildung 1-17: Darstellung der von Thomas Linnemann getesteten AF6-Konstrukte

In rot sind die Ras-Assoziationsdomänen 1 und 2 des AF6 gekennzeichnet, in gelb eine Deletion (Aminosäure 6-127), zusätzlich sind die exakten Aminosäurepositionen gekennzeichnet.

Für die AF6-RA2 Domäne ① ② ③ (Abb. 1-17) konnte keine Interaktion mit den kleinen GTPasen H-Ras/Rap1A/Rap2A gezeigt werden. Durch die Deletion von Teilen der RA1-Domäne (AF6 Δ N) konnte gezeigt werden, dass es eine zweite Bindestelle auf dem AF6-Molekül für Rap1A, jedoch nicht für H-Ras gibt. Anhand der Konstrukte ① und ② (Abb. 1-17) konnte Linnemann eine sekundäre proteolytische Spaltung des AF6(1-160) Konstruktes zeigen. Daraus resultiert ein nicht über Gelfiltration trennbares Dimer, das seine Eigenschaft, die GTPasen H-Ras und Rap1A zu binden, verloren hat. Durch die Konstrukte ③, ④, ⑤ und ⑥ konnte er das essentielle AF6-RA1 Konstrukt mit der höchsten Affinität für die kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A letztendlich auf die AS 1-141 eingrenzen [Linnemann, 1999]. Dieses Konstrukt steht in dieser Arbeit im Mittelpunkt und wird des Weiteren als „AF6 oder AF6-RA1“ bezeichnet.

Tabelle 1-1: Affinitäten des AF6 gegenüber den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A und Mutationen dieser

Mutationsposition der GTPase	H-Ras + AF6(1-141) K _d [μM]	Rap1A + AF6(1-141) K _d [μM]
Wildtyp	4	0,25
E31K	2,3	X
T35S	> 100	23
E37G	33	27
D38A	36	20
Y40C	> 10	11
R41A	13	X
D57A	33	X
E62A	7,6	X
E63A	7,2	X

Die Bestimmung der Affinitäten erfolgte durch Linnemann mittels Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor-Titration und wurde anhand der Fluoreszenz der N-Methylantraniloyl-(Mant)-Guaninnukleotide (mGXP) bei 366 nm angeregt und bei 450 nm detektiert. X bezeichnet eine nicht durchgeführte Messung.

Zusätzliche Untersuchungen an AF6 erfolgten 2001 während der Dissertation Guido Steiners an der Universität Regensburg. Dieser konnte die 3D-Struktur der minimalen RA1-Domäne des AF6 mittels NMR-Experimenten aufklären (PDB-File „AF6(1-141)“) (Abb. 1-18). Diese Erkenntnisse konnten 2006 von Ralph Elsner an der Universität Regensburg verifiziert und verbessert werden und führten zu ersten Docking-Experimenten (siehe Kapitel 4.3.4) zwischen AF6 und H-Ras, sowie AF6 und Rap1A.

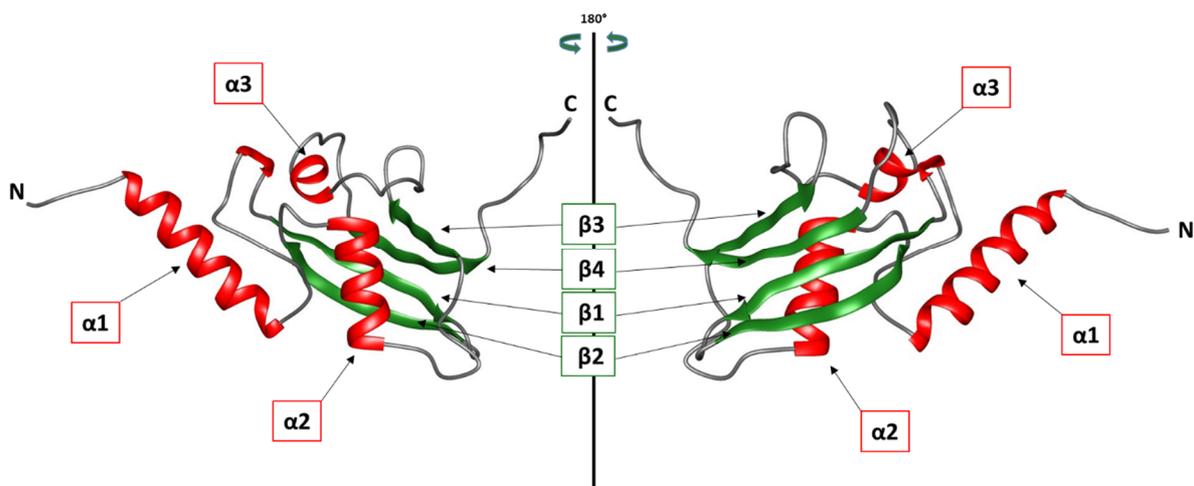


Abbildung 1-18: Die 3D-Struktur des AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“) nach Guido Steiner

In rot sind die α-Helices 1-3 gekennzeichnet und in grün die 4 β-Faltblätter. Die α1-Helix ist ein charakteristisches Merkmal dieses Konstruktes und scheint für seine Funktionalität essentiell zu sein.

Gerald Bäumel versuchte während seiner Dissertation an der Universität Regensburg die Interaktionsfläche des AF6 mit ZO1 [Yamamoto, 1999] einzugrenzen und exakt zu definieren. Letztendlich konnte er von Seiten des ZO1 das Fragment für eine Interaktion mit AF6 auf den Bereich ZO1-PDZ2-[PDZ3 (Aminosäure 186-421) minimieren. Diese Erkenntnisse dienen als Grundlage der durchgeführten Arbeit.

1.8 Zielsetzung

Die Aufklärung der komplexen Kommunikation zwischen Gerüstproteinen, Membrankompartimenten, Signalproteinen und dem Zellkern sind bereits seit Jahrzehnten entscheidende Schwerpunkte der Forschung. Auf Grund dieser Vielzahl an unterschiedlichen Interaktionen ist es von Bedeutung, auch die Verbindung zwischen den molekularen Schaltern Rap1A sowie H-Ras und ihren einzelnen Effektoren der Signalkaskaden separat zu studieren, um das Gesamtbild dieser Prozesse zu verstehen. Die Ziele dieser Arbeit waren es zum einen die molekulare Interaktionsfläche der Ras-Assoziationsdomäne des Afadin 6 mit den kleinen GTPasen H-Ras und speziell mit Rap1A in ihrem natürlichen, aktiven GTP- und inaktiven GDP-Zustand, genauer zu charakterisieren. Zusätzlich sollte die Arbeit von Gerald Bäumel, die Interaktion des Hauptgerüstproteins Zonula occludens 1 der Tight Junctions mit dem Hauptgerüstprotein Afadin 6 der Adherens Junctions einzugrenzen, weitergeführt werden. Diese sollte daraufhin ebenfalls mit biochemischen, sowie NMR-spektroskopischen Methoden analysiert werden. Die Erkenntnisse der Art der Interaktion, sowie genaues Wissen über die exakte Oberfläche dieser Interaktionen ermöglicht es, das Zusammenspiel dieser Proteine während den zellulären Prozessen der Ausbildung und Aufrechterhaltung neuer Zell-Zell-, sowie Zell-Matrix-Kontakte zu verstehen.

2. Material

2.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte

Gerät	Typ und Hersteller
800MHz- und 600MHz-NMR-Spektrometer	Avance 800 mit TCI-Cryoprobenkopf, Avance 600 mit TXI-Cryoprobenkopf, Bruker BioSpin
Brutschrank EB 53	Juan
FPLC	ÄKTA™-System, UPC 900, Frac 900
Gelelektrophoresekammern	GE Healthcare
HPLC	System Gold® 125 Solvent Module, System Gold® 166 Detector, Beckman Coulter
pH-Meter	Φ 32 pH Meter, Φ 340 pH/temp Mete, Beckman Coulter
Photometer	LambdaBIO+ , PerkinElmer
Thermocycler	Mastercycler Personal, Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifier 250/450, Branson
Waage	CP64, Sartorius PM 600 Mettler
Wassersystem	Purelab Ultra, Elga Millipore
Western-Blot-Gerät	Pierce Fast Semi-Dry Blotter, Thermo Scientific
Zentrifugen	J-6B, Avanti J-20, Avanti J-25, Beckman Coulter Biofuge Pico, mini Spin, Hereaus Instruments

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden stets in Analysequalität von den Firmen Amersham, Merk, Roche, Roth, Serva, Sigma-Aldrich, VWR und USB bezogen und gemäß der Sicherheitsdatenblätter gelagert und verwendet. Die Nukleotide GDP/GTP wurden von der Firma Pharma-Waldhof, das Analoga GppNHp von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 2-2: Molekularbiologische Kits

Script Reverse Transcription Kit	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Universal His Western Blot Kit 2.0	Clontech
SuperSignal West HisProbe™ Kit	Thermo Scientific
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
pGEM-T Easy Vector System	Promega
Gel Filtration Calibration Kit LMW	GE Healthcare
Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit	Finnzymes

Tabelle 2-3: Säulenmaterial

Hiload 26/60 Q-Sepharose FastFlow	Amersham Pharmacia
Hiload 26/60 Superdex 75 prep grade	Amersham Pharmacia
HiLoad 26/600 Superdex 200 prep grade	GE Healthcare
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare
Sephadex G25 NAP 10 / Nap 15 / PD10	Amersham Pharmacia
Ni ²⁺ -NTA Superflow / Fast Flow	GE Healthcare
Ni ²⁺ -NTA spin Kit (50)	Qiagen
Pierce Glutathione Spin Columns (3 ml)	Thermo Scientific

Tabelle 2-4: Einwegmaterialien

Einmalküvetten UV, UV(Vis) / Makro und Halb-Mikro (12,5x12,5x45 mm)	Carl Roth
NMR-Probenröhrchen 5 mm	Norell
NMR-Probenröhrchen 8 mm	Shigemi Co.
Eppendorf-Cups 1,5 / 2 ml	VWR
Falcon-Tubes 15 / 50 ml (16000 g)	VWR
Vivaspin Filtrationseinheiten (diverse Größen)	Sartorius
Sterilfilter	Steritop, Millipore, Renner

Tabelle 2-5: Molekulargewichtsstandards

PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Scientific/Fermentas
PageRuler Unstained Protein Ladder Low Range	Thermo Scientific/Fermentas
Page Ruler Prestained Protein Ladder (10-180 kDa)	Thermo Scientific/Fermentas
1 kb/ 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs (NEB)

Tabelle 2-6: Enzyme

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	NEB
T4 Polynukleotide Kinase	NEB
Phusion HF-DNA Polymerase	NEB
Fast Digest Restriktionsenzyme	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas, NEB
Taq DNA Polymerase	Fermentas, Qiagen, NEB
Thrombin	Merck

2.3 Verwendete Bakterienstämme

E. coli Stämme für die Klonierungen und die Amplifikation der gewünschten Plasmide

Diese Klonierungsstämme inhibieren den *Lac/Tac* Promotor durch das Produkt des *LacI^q*-Gens und verhindern somit eine ungewollte Expression des Zielgens der transformierten Plasmide. Sie dienen im Allgemeinen der Vervielfältigung der Plasmide im Rahmen der Herstellung transgener Proteinkonstrukte.

***E. coli* TG1 [Lucigen]**

Genotyp: F'[traD36 lacIq Δ(lacZ)M15 proA+B+] glnV (supE) thi-1 Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK mK McrB-) thi Δ(lac-proAB)

One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* [Invitrogen]

Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ-

***E. coli* XL1-Blue [Stratagene]**

Genotyp: endA1 gyrA96 (nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F':Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17 (rK-mK+)

E. coli Stämme für die Expression der gewünschten Proteinkonstrukte

Expressionsstämme dienen der Herstellung der gewünschten Proteinkonstrukte mittels ihrer transformierten Plasmide. Ziel hierbei ist es möglichst hohe Ausbeuten und entsprechende Reinheitsgrade der gewünschten Konstrukte zu erhalten. Expressionstämme sind Protease defizient um einen Abbau der rekombinanten Zielproteine bereits in der Zelle zu minimieren.

E. coli BL21 [Novagen]

Genotyp: *F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm*

Dieser Stamm verfügt über kein LacI^q -Gen, sodass eine Induktion der Expression mittels IPTG nur durch die Eigenschaften des transformierten Plasmids möglich ist. Ansonsten kommt es zu einer basalen/dauerhaften Expression des Zielkonstrukts. Dies kann bei kritischen Proteinen zum Problem werden.

E. coli BL21(DE3)pLysS [Novagen]

Genotyp: *F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)*

Wie BL21, aber mit einem zusätzlichen DE3-Element welches für eine T7-RNA-Polymerase und eine *Lac*-Repressor kodiert. Das ermöglicht eine IPTG induzierbare Expression, wenn das transformierte Plasmid einen T7-Promotor enthält. Zusätzlich verfügt der Stamm über ein pLys-Plasmid welches eine Chloaramphenicolresistenz enthält und für T7-Lysozym kodiert. T7-Lysozym ist ein Inhibitor der T7-RNA-Polymerase und führt daher zu einer noch stärkeren Unterdrückung basaler Expression und einer stringenteren Induktion durch IPTG.

E. coli Rosetta (DE3)pLysS [EMD Bioscience]

Genotyp: *F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (CamR)*

Wie BL21 (DE3)pLysS, jedoch trägt das pLysSRARE2 Plasmid die Eigenschaft für seltene eukaryotische tRNAs zu codieren. Somit können Expressionen eukaryotischer Proteine verbessert werden.

E. coli CK600K [Stratagene]

Genotyp: *McrA-, supE44, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21*

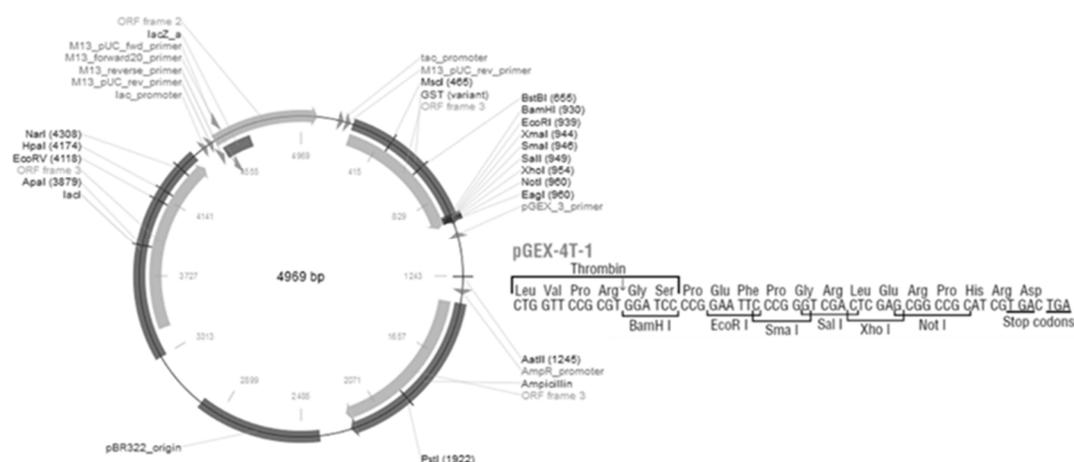
2.4 Plasmide und Oligonukleotide

Abbildung 2-1: pGEX4T1-Expressionsvektor (GE Healthcare)

Dieser trägt einen zusätzlichen N-terminalen Glutathion-S-Transferase („GST“)-Tag und einer Ampicillinresistenz zur Selektion. Dieser 26 kDa große GST-Tag dient der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie und erhöht zusätzlich die Löslichkeit des zu exprimierenden Proteins. Induziert wird die Expression durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches den *Lac*-Repressor bindet und somit die Transkription durch die RNA-Polymerase ermöglicht. IPTG selbst wird im bakteriellen System nicht verstoffwechselt [„Quelle: Sigmaaldrich.com“].

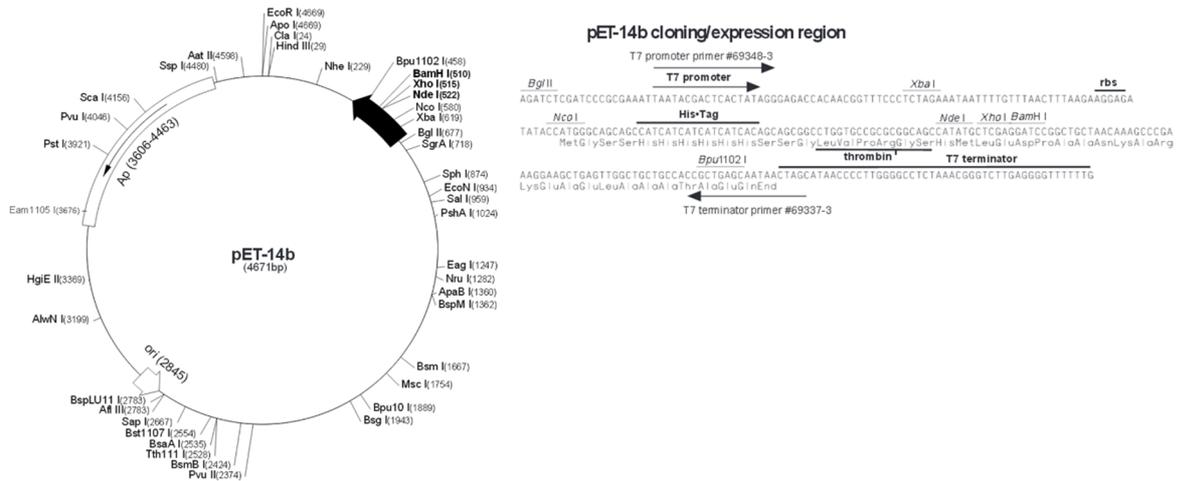


Abbildung 2-20: pET14b-Expressionsvektor [Novagene]

Verfügt über einen T7Lac Promotor, eine Ampicillinresistenz, und expremiert zusätzlich einen n-terminalen His₆-Tag. Dieser His₆-Tag dient ebenfalls der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie, ist jedoch wesentlich kleiner und ebenfalls durch Thrombin abspaltbar.

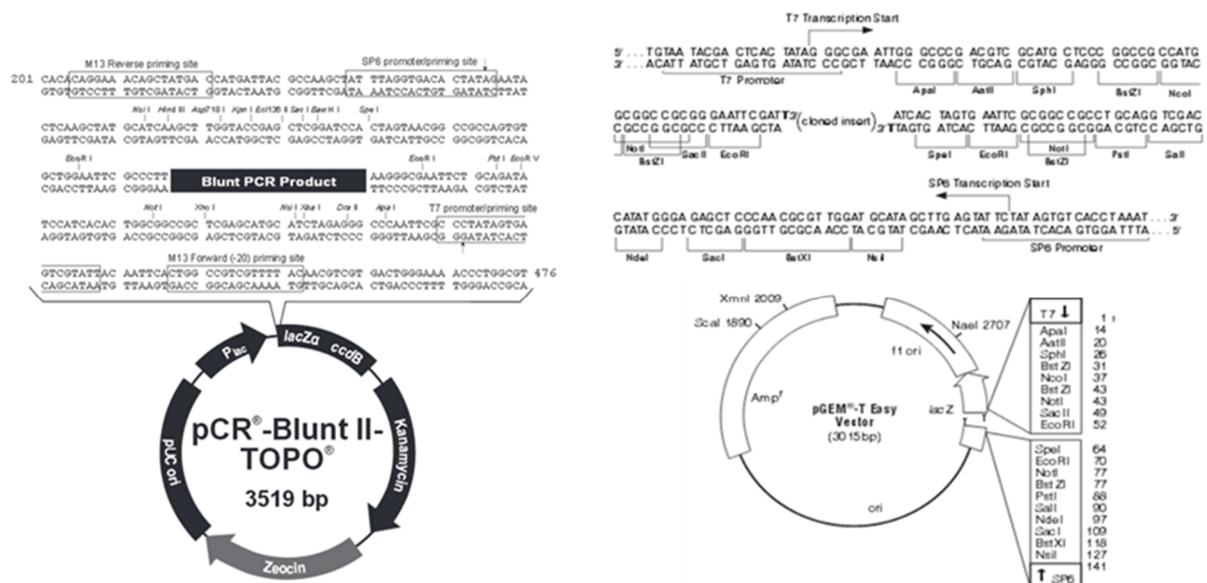


Abbildung 2-31: Klonierungsvektoren pCR-Blunt II-TOPO [Lifetechnologies] und pGEM-T-Easy [Promega]

Beide Vektoren dienen der Zwischen-Klonierung von PCR-Produkten. Diese Technik hat eine sehr hohe Effizienz und erleichtert die Klonierung vieler, auch hartnäckiger Konstrukte [„Quelle: lifetechnologies.com / promega.com“].

Oligonukleotide wurden bei den Firmen Invitrogen, Eurofins MWG und Metabion in gewünschter Konzentration und überprüfter Qualität bestellt.

Tabelle 2-7: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Konstrukt	Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
ZO1		
PDZ2-Mutante Schritt 1	MUT1-5'	CCATGGCGGCATATTTGTAAAGGAAATTC
	MUT1-3'	CAAATATGCCGCCATGGCTGGCCAATC
PDZ2-Mutante Schritt 2	MUT2-5'	CCATGGCGCCGGTGCAATATTTGTAAA
	MUT2-3'	CAAATATTGCACCGCCGCCATGGCTG
	Mut2.2-5'	GGTGCAATATTTGTAAAGGAAATTCAC
	MUT2.2-3'	TGCACCGCCGCCATGGCTGGC
N-terminaler Part von ZO1	ZO1-Nter-5'	CGGGATCCATGTCCGCCAGAGCTG
	ZO1-Nter-3'	CCCTCGAGTCAACCATACCAACCATCATT
	ZO1-N-Term-5'	CCCCATATGGAGGAAACAGCTATATGGG
	ZO1-N-Term-3'	CCGGATCC ^T CACTGTTGCTGCTGAATGGC
PDZ2	ZO1-PDZ2-5'	GCCATATGACCAAGGTCACATTGGTGAAGT
	ZO1-PDZ2-3'	CCGGATCC ^T CACTCATCTCTCTTTGCACTAC
PDZ2 bis PDZ3	P2/P3-5'	GTGGATCCCCGGCTACCTTATTGAATG
	P2/P3-3'	GTCTCGAG ^T CAGGGCCTAAGAATCCC
	P2-P3 pet-5'	GCACATATGAAGGTCACATTGGTGAAG
	P2-P3 pet-3'	GCAGGATCC ^T CACTTCTGAGCCCATATGG
PDZ3	PDZ3 pet-5'	GCCCATATGAAACTGGTAAAATTCAGAAAA
	PDZ3pet-3'	GCCGGATCC ^T CACTTCTGAGCCAATATGGTCACTTC
SH3	SH3-pet-5'	GCACATATGGGAGACTCGTTCTATATT
	SH3-pet-3'	GCAGGATCC ^T CAGGCTAACTGCTCGGC
AF6		
RA 1	AF6(1-141)-5'	CGCCATATGTCGGCGGGCGCCCG
	AF6(1-141)-3'	CGGGATCC ^T CACTGAGCCTTCTTGC
RA 1	AF6(1-141)-5'	CGCCATATGTCGGCGGGCGCCCG
	AF6(1-141)-3'	GCGGATCCCTGAGCCTTCTTGGCAG
RA	AF6 RA-5'	CGGGATCCATGTCGGCGGGCGG
	AF6 RA-3'	CCCTCGAGCTTTGGGATGTGGTCTG
Prolinreiche Re- gion	(1353-1713)-5'	CGCCATATGCCAGCAGCTGTGCTCC
	(1353-1713)-3'	GCGGATCC ^T CAAGGTGGGGAGGAGG
	AF6 Pro-5'	CGGGATCCGGCCGTTGGAAAACAC
	AF6 Pro-3'	GCCTCGAG ^T CACTGGTTGGCGGAAG
	AF6 PR12-5'	CCCTCGAGCCTCCACCTAGACCTG
	AF6 PR12-3'	CGGGATCC ^T CAAGGAGGAGGTGGG
	AF6 PR12pet-5'	GCCCATATGCCTCCACCTAGACCTGAAGCC
	AF6 PR12pet-3'	GCCGGATCC ^T CAAGGAGGAGGTGGGAGGG
Rap1A		
1-164	Rap1a his-5'	CCGCATATGCGTGAGTACAAGCTAGTG
	Rap1a his-3'	CCGGATCC ^T CACTGTCTGACCAGGTCATA
	Rap1a pgex-5'	CCGGATCCCGTGAGTACAAGCTAGTG
	Rap1a pgex-3'	CCCTCGAG ^T CACTGTCTGACGAGGTCATA
Nde I (CATATG) / BamH I (GGATCC) / Xho I (CTCGAG) = Restriktionsenzyme und Schnittstellen Stop-Codon TCA/CTA		

Konstrukt	Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
Mutationen		
Anti-Cys	Forw-5'	GTGCAAAGAGATGAGTGAGGATCCGGCTGC
	Rev-3'	TTAGCAGCCC <u>GGATCC</u> TCCTCACTGAGCCTTCTT
	Rev-3'	TTAGCAGCC <u>GGATCC</u> TCCTCACTCATCTCTTTG
Phosphorylierungs-Mutationen (Imitation einer Phosphorylierung) ZO1 PDZ2 / MUT2		
	T188E-5'	CATATGACCAAGGTCGAGTTGGTGAAGTCT
	T188E-3'	CCGAGACTTCACCAACTCGACCTTGGTCAT
	S192E-5'	GTCACATTGGTGAAGGAGCGGAAAAATGAA
	S192E-3'	TTCTTCCATTTTTCCGCTCCTTACCAATGT
	Y198E-5'	CGGAAAAATGAAGAAGAGGGTCTTTTCGATTG
	Y198E-3'	GGCCAATCGAAGACCCTCTTCTTCATTTTT
	S204E-5'	GGTCTTCGATTGGCCGAGCATATATTTGTA
	S204E-3'	CTTTACAAATATATGCTCGGCCAATCGAAG
	TT-EE -5'	GAAAATATGTCCTGGAGGATGCAAAGAGTTGATAG- AAAGGTCT
	TT-EE-3'	AGACCTTTCTATCAACTCTTTTGCATCCTCCAGTGACATA- TTTTC
	S252E-5'	ACATTGATAGAAAGGGAGAAAGGCAAGTAAAA
	S252E-3'	TTTTAACTTGCCTTTCTCCCTTTCTATCAATGT
pETSumo und pTac Klonierung		
AF6(1-141)	AF6 forw-5'	<u>GGATCC</u> CATGTGCGCGGGCGG
	AF6 Rev-3'	<u>CTCGAG</u> TCCTGAGCCTTCTTGGCAGGAAT
PDZ2	PDZ2 forw-5'	<u>GGATCC</u> CACCAAGGTCACATTGGTGAAGTCT
	PDZ2 Rev-3'	<u>CTCGAG</u> TCCTCATCTCTTTGCACTACCCTT
MUT2	Mut2 forw-5'	<u>GGATCC</u> CACCAAGGTCACATTGGTGAAGTCT
	Mut2 rev-3'	<u>CTCGAG</u> TCCTCATCTCTTTGCACTACCCTT
Rap1A	Rap1a forw-5'	<u>GGATCC</u> CATGCGTGAGTACAAGCTAGTGGTC
	Rap1a rev-3'	<u>CTCGAG</u> TCATCTGTCTGACCAGGTCATACTC
Nde I (<u>CATATG</u>) / BamH I (<u>GGATCC</u>) / Xho I (<u>CTCGAG</u>) = Restriktionsenzyme und Schnittstellen Stop-Codon TCA/CTA		

2.5 Software / Bioinformatik

Tabelle 2-8: Übersicht über verwendete Programme und bioinformatische Tools

Programm	Hersteller/URL	Verwendung
Gold Chromatography Data System V1.7	Beckman	HPLC Steuerung und Auswertung
UNICORN Control System	Amersham	ÄKTA-FPLC Steuerung
TopSpin3.2	Bruker	NMR-Spektrometer Software
AUREMOL 2.4.1beta (22.7.2014)	Uni-Regensburg / Kalbitzer	NMR-Spektren Auswertung
MestReNova 10.0	Mestrelab Research	¹ D-Spektren Visualisierung
GENTle	http://gentle.magnusmanske.de/	DNA und Protein Sequenzbearbeitung
PyMol	https://www.pymol.org/	Protein Visualisierung
MolMol	http://www.mol.biol.ethz.ch/groups/wuthrich_group/software	Protein Visualisierung
Chimera 1.9	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/	Protein Visualisierung (bevorzugt)
Notepad++v6.6.7	http://notepad-plus-plus.org/	Editor
SigmaPlot 10.0	http://www.sigmaplot.com/	Statistische Auswertung und Datenanalyse
Origin 6.0	http://www.originlab.de/	Statistische Auswertung und Datenanalyse
Office 2013	Microsoft	Datenbearbeitung
Gimp 2.8	http://www.gimp.org/	Graphikprogramm
Online Tool/Datenbanken	Hersteller/URL	Verwendung
ExpASY Bioinformatic Resource Portal	http://www.expasy.org/	Proteomics-Tools jeglicher Art (sehr hilfreich)
Worldwide PDB Datenbank	http://www.wwpdb.org/	Sammlung sämtlicher PDBs
UniProt Datenbank	http://www.uniprot.org/	High-Quality Proteindatenbank
NetPhos 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	Phosphorylierungsvorhersage
GPS 3.0	http://gps.biocuckoo.org/	
Swiss-Model	http://swissmodel.expasy.org/	<i>Homology-modelling</i>

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium	LB-Agar
10 g/l NaCl	10 g/l NaCl
10 g/l Baktotrypton	10 g/l Baktotrypton
5 g/l Hefeextrakt	5 g/l Hefeextrakt
	10-15 g/l Agar

➔ In ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) lösen, autoklavieren und Lagerung bei 4 °C

Antibiotika Stocklösungen:

Antibiotikum	Lösemittel	Konzentration	Verwendung	Lagerung
Ampicillin	ddH ₂ O	50 mg/ml	1:1000	-20 °C
Carbenicillin	ddH ₂ O	50 mg/ml	1:1000	-20 °C
Chloramphenicol	Ethanol	34 mg/ml	1:1000	-20 °C
Kanamycin	ddH ₂ O	50 mg/ml	1:1000	-20 °C

E. coli Bakterien können optimal in flüssigen Kulturen herangezogen werden. Dazu überführt man eine geringe Menge an Bakterien in das gewünschte Volumen *lysogeny broth* Medium (LB-Medium) und inkubiert diese bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) in einem Inkubator.

E. coli können auch auf festen Nährböden (LB-Medium mit 10-15 g/l Agar) kultiviert werden. Um erfolgreich veränderte *E. coli* Kulturen dauerhaft lagern zu können, fertigt man von ihnen Glycerinkulturen an. Dazu nimmt man 700 µl einer hochgewachsenen Kultur und versetzt diese mit 300 µl 87% Glycerin. Glycerin dient hierbei als Frostschutz und verhindert das die Zellen beim schockgefrieren in flüssigem Stickstoff zerstört werden. Solche Glycerinkulturen lassen sich über Jahre hin weg bei -80 °C lagern. Um eine erneute Kultur heranzuziehen inokuliert man ein kleines Volumen LB_{Antibiotika} mit einer Spatelspitze einer solchen Glycerinkultur und inkubiert bei 37 °C und 200 rpm. Bei Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen muss stets steril und sauber gearbeitet werden. Die Konzentration einer *E. coli* Kultur kann über den sogenannten OD₆₀₀-Wert bestimmt werden. Hierzu misst man photometrisch die Optische Dichte einer Kultur bei 600 nm Wellenlänge. LB-Medium ohne Bakterienkultur dient hierbei als Referenzlösung. Bei einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Absorption von 1, einer Bakterienkonzentration von 8x10⁸ Zellen/ml.

3.1.2 Herstellung von Plasmid-Konstrukten

Um Untersuchung an Proteinen oder Teilen dieser durchzuführen, müssen diese Konstrukte auf DNA-Ebene hergestellt werden, um sie daraufhin rekombinant im gewünschten Expressionssystem (*E. coli*, Hefen, humanen Zellen, etc.) zu exprimieren. Kommt das Protein beispielsweise in humanen Leberzellen vor, so benötigt man cDNA (*complementary DNA*) aus Leberzellen des zu untersuchenden Organismus. Diese cDNA ist die komplette mRNA der Zellen, die mittels Reverser Transkription in stabile cDNA übersetzt wurde und enthält somit die komplette Information, welche Proteine zum Zeitpunkt der Probennahme in der Zelle exprimiert wurden. Alternativ kann man sich heutzutage auch sogenannte Gencluster / Fragmente mit bis zu 1000 Basenpaaren innerhalb von einer Arbeitswoche nach eigenen Wünschen auf Vorlage der gewünschten DNA-Sequenz synthetisieren und sogar für *E. coli* optimieren lassen (Bsp.: GeneArt® Strings™ DNA Fragments). Das entspricht Proteinfragmenten mit einer Länge von nahezu 330 AS und lässt einige Schritte der klassischen Klonierung hinfällig werden.

3.1.3 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Nukleinsäure	Absorption 260 nm	Absorption 260 nm / 280 nm *	Absorption 260 nm / 230 nm *
DNA	50 ng / μ l	1,8 \geq	2,2 \geq
RNA	40 ng / μ l	2 \geq	2,2 \geq
Oligonukleotid	33 ng / μ l	1,8 \geq	2,2 \geq

(*) die Probe hat eine gute Reinheit wenn der Wert größer als der aufgelistete Wert ist.

Die Nukleinsäure Konzentration wird an einem herkömmlichen UV (Vis)-Spektrometer bestimmt. Als Referenzprobe dient immer der verwendete Puffer ohne Nukleinsäuren. Gemessen wird die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der Reinheitsgrad der DNA wird durch das Absorptionsverhältnis bei 260 nm zu 280 nm und bei 260 nm zu 230 nm angegeben. DNA absorbiert bei 260 nm, die aromatischen AS der Proteine bei 280 nm, organische Verbindungen, Phenole und Thiocyanate bei 230 nm.

Verunreinigungen durch Phenole führen fälschlicherweise häufig zu einer Erhöhung DNA-Konzentration. Die Verunreinigung von DNA durch Proteine ist weniger signifikant als die Verunreinigung der Proteine durch DNA.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasen-Kettenreaktion gehört mittlerweile zu den Standard-Methoden gentechnischen Arbeitens und wird deshalb nicht detailliert erklärt. Mit Hilfe der PCR lassen sich DNA Fragmente vervielfältigen. Hierzu benötigt man eine hitzebeständige DNA-Polymerase die mit spezifischen Primern der 3` und 5` flankierende Region des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, und den Bausteinen der DNA, den Desoxyribonukleotidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP, in einem sich zyklisch wiederholenden Prozess die gewünschte DNA-Region vermehrt. Die verwendeten Primer sind kritisch für den Erfolg der PCR-Reaktion und müssen exakt komplementär sein. Sie dürfen nicht hybridisieren oder intermolekulare Schleifen bilden. Hierbei hat sich die PCR-Reaktion, basierend auf dem PhusionTM-System von Fermentas als sehr effektiv erwiesen. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

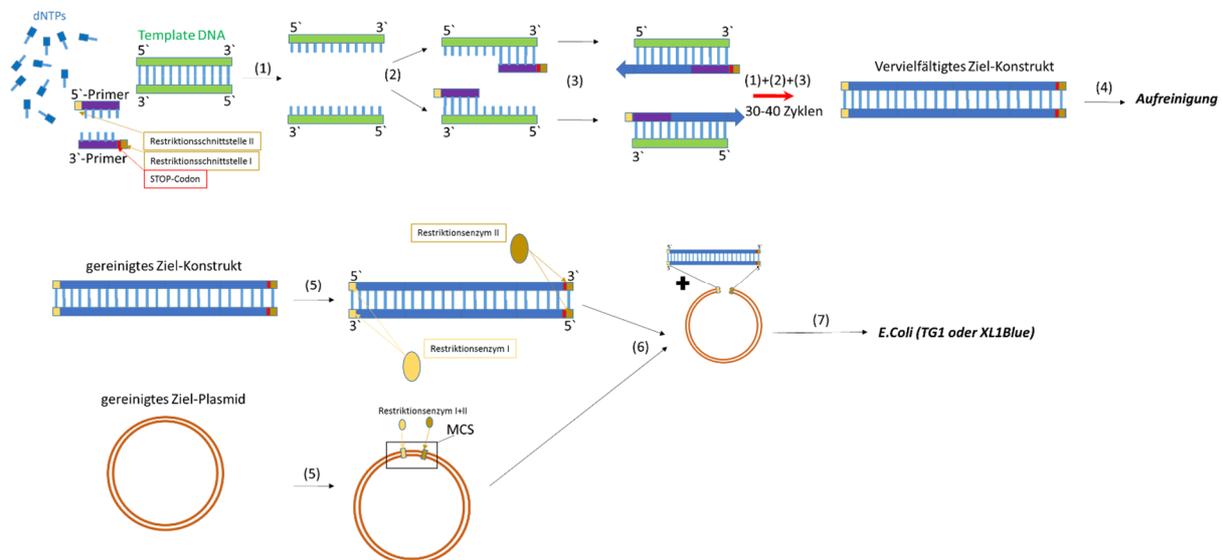


Abbildung 3-1: Schematischer Überblick über die Herstellung eines neuen Konstruktes (Erläuterung im nachfolgenden Text)

Start mit der PCR-Reaktion des gewünschten Inserts (Abb. 3-1). Template-DNA, dNTPs und Primer werden erhitzt ca. 98 °C (*melting*) → (1) Doppelstränge DNA teilt sich → (2) Anlagerung der Primer bei typischerweise 60-68 °C (*annealing*) → (3) Die hitzestabile DNA-Polymerase (*PhusionTM*) erkennt die Primer und verlängert den DNA-Strang bei 72 °C (*elongation*) → Dieser Zyklus ((1) bis (3)) wird bis zu 40 mal wiederholt, wobei es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Inserts kommt. Das Insert wird mittels Wizzard-PCR-Kit nach Hersteller Angaben aufgereinigt. Das gereinigte Insert und das Ziel-Plasmid werden getrennt voneinander mit den zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen (5) verdaut (siehe Fermentas Fast-Digest) und

erneut mittels Wizard-Kit aufgereinigt. Daraufhin werden Insert und Plasmid in einem Verhältnis von 3 zu 1 vereint und durch Ligation (6) (siehe Herstellerangaben Fermentas T4-DNA Ligase) verbunden. Im vorerst letzten Schritt (7) wird das nun wieder zirkulär geschlossenen Plasmid in kompetente *E. coli* Klonierungsstämme wie XL1Blue oder TG1 transformiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Selektion durch das richtige Antibiotikum ist nur ein Indiz, dass das gewünschte Plasmid in *E. coli* transformiert wurde und zeigt nicht, ob das Konstrukt tatsächlich die gewünschte fehlerfreie Sequenz trägt. Um dies zu gewährleisten, muss das Plasmid aus *E. coli* isoliert und sequenziert werden.

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

SB-Puffer *	10 mM NaOH in ddH ₂ O Zugabe von Borat bis pH 8,0 eingestellt ist Als 20-fach Puffer hergestellt
TAE-Puffer	4,84 g Tris 1,14 ml Eisessig 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) Auf 1 l mit ddH ₂ O aufgefüllt
6x DNA-Ladepuffer	0,125 g Bromphenolblau 0,125 g Xylencyanol 17,2 ml 87% Glycerin Auf 50 ml mit ddH ₂ O aufgefüllt

(*) SB-Puffer ermöglicht eine stärkere Spannung und somit ein schnelleres Laufverhalten der Proben.

Die DNA besitzt auf Grund ihrer vielen Phosphatgruppen eine negative Ladung und wandert in einem elektrischen Feld in Richtung des Pluspols. Kombiniert man diese Eigenschaft mit einer polymeren Matrix (Agarose-Gel), ermöglicht das Laufverhalten der DNA-Probe qualitative Aussagen über die Größe der DNA Fragmente, sowie quantitative Aussagen über die Menge der aufgetragenen DNA. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde zu Beginn Ethidiumbromid (0,5 µg / ml) mit in das Agarosegel gegeben, später dann *Midori Green*, welches unproblematischer in der Handhabung ist. Ethidiumbromid und *Midori Green* sind Farbstoffe, die sich quantitativ zwischen die Basen der DNA lagern und nach Anregung durch UV-Licht (Ethidiumbromid indirekt bei 254 nm, direkt bei 366 nm und *Midori Green* bei 490 nm) fluoreszieren. Zur Visualisierung der Banden, wird das Gel nach der Elektrophorese (100 V bei TAE-Puffer /200 V bei SB-Puffer, Dauer ca. 30 min) mit ultraviolettem Licht der gewünschten Wellenlänge bestrahlt und so detektiert. Folgt eine Aufreinigung der DNA-Banden aus dem

Gel, so muss auf eine möglichst kurze UV-Belichtung der Probe geachtet werden. Hierzu werden die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des Promega Wizard Kits aufgereinigt und in 30 µl ddH₂O eluiert. Die Agarose-Gelelektrophorese wird verwendet um PCR-Konstrukte zu überprüfen, sowie PCR-Fragmente oder durch Restriktionsenzyme geschnittene Konstrukte zu reinigen.

3.1.6 Restriktionsverdau

Um die in der PCR amplifizierte DNA Fragmente gerichtet in ein Plasmid integrieren zu können (Abb. 3-1), muss das Insert und das gewünschte Plasmid mit Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Setzt man 2 verschiedene Restriktionsenzyme ein, ist ein gerichteter Einbau möglich und die Wahrscheinlichkeit einer Religation (ungewollter Ringschluss ohne Insert) des Plasmids ist unwahrscheinlich.

Standard Ansatz eines Insert-Verdaus

30 µl PCR-Produkt
5 µl 10 x Puffer
1 µl Fast-Digest Restriktionsenzym I
1 µl Fast-Digest Restriktionsenzym II
13 µl ddH₂O

Standard Ansatz eines Plasmid-Verdaus

5 µg Plasmid
2 µl 10 x Puffer
1 µl Fast-Digest Restriktionsenzym I
1 µl Fast-Digest Restriktionsenzym II
11 µl ddH₂O

→ Der Verdau erfolgt bei 37 °C für 5-120 min (nach oben hin offen, da so gut wie keine Star-Aktivität (=ungewollte Fragmentierung der Konstrukte) vorhanden ist).

3.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

TSS

100 ml LB-Medium
10% (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 8000
5% (v/v) DMSO
40 mg MgSO₄

→ pH auf 6,5 einstellen, sterilfiltrieren und Lagerung bei -20 °C.

E. coli Bakterien sind in der Lage ringförmige DNA, sogenannte Plasmide stabil in sich aufzunehmen, wohingegen lineare DNA schnell abgebaut wird. Das kann man sich zu Nutze machen und Plasmide mit der genetischen Information für gewünschte Proteine, oder Teile dieser Proteine, in *E. coli* einzuschleusen um diese von den Bakterien produzieren zu lassen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transformation. Diese transformierten *E. coli* Bakterien sind daraufhin in der Lage, die genetische Information auf dem Plasmid in Proteine zu transkribieren.

Diese hergestellten Proteine bezeichnet man als rekombinant, da sie durch gentechnisch veränderte Organismen (GVOs) hergestellt wurden. Diese Technik ermöglicht es ebenso, genetische Informationen anderer Organismen in *E. coli* zu transkribieren, was wiederum als *transgen* bezeichnet wird, da die genetische Information artfremder Organismen eingeschleust wurde. So lassen sich zum Beispiel humane Proteine transgen im Labor herstellen und untersuchen, ohne dass dabei auf humanes Material zurückgegriffen werden muss.

Ein effektives Verfahren Plasmide in die *E. coli* Bakterien einzuschleusen, basiert auf chemisch kompetenten *E. colis* [Chung 1998]. Hierbei wird die Lipiddoppelschicht des Bakteriums temporär modifiziert. Das PEG der *Transformation and storage solution* (TSS) hat hierbei die Aufgabe sich in die Membran einzulagern. 100 ml LB werden mit dem gewünschten *E. coli* Stamm angeimpft und bis zu einer OD_{600} von ca. 0,4 herangezogen. Daraufhin wird die Kultur bei 4 °C und 3000 g für ca. 10 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 ml eiskaltem TSS zügig resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden zu je 100 µl Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Ein Aliquot dieser Zellen wird auf Eis aufgetaut, mit dem gewünschten Plasmid versetzt (50-200 ng) und durch invertieren gemischt. Nach ca. 60 min Inkubation auf Eis versetzt man der Kultur einen 30-60 s dauernden Hitzeschock bei 42 °C. Durch diesen Hitzeschock steigt die Fluidität in der Zellmembran, PEG verlässt diese und hinterlässt eine perforierte Membran. Durch diese künstlich geschaffenen Poren können Plasmide in die Zelle eindringen. Nach diesem Hitzeschritt muss die Membran für ca. 2 min auf Eis regeneriert werden. Die Bakterien werden 1 h bei 37 °C unter schütteln inkubiert, 2-3 min bei 3000 rpm pelletiert, 80% des Überstandes verworfen, das Pellet in den verbleibenden 20% resuspendiert und auf LB_{Antibiotika}-Platten ausgestrichen.

3.1.8 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* und DNA Sequenzierung

Kleine Mengen an Plasmid DNA, die beispielsweise für eine DNA-Sequenzierung benötigt werden, reinigt man mit dem QIAprep Miniprep Spin Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben auf. Die Konzentrationen dieser DNA-Aufreinigungen liegen meist im Bereich von 50-150 ng/μl. Größere Mengen (um die 600 ng/μl) werden mit Midi Kits (ebenfalls Qiagen) aufgereinigt. Für eine Standard-Sequenzierung (Bsp.: GenArt AG / Life Technologies Regensburg) benötigt man 7 μl Probenvolumen mit 150-350 ng Plasmid-DNA. Die Sequenzierung solcher kleiner Konstrukte (bis zu 900 Bp) erfolgt nach der Didesoxymethode nach Sanger. Man benötigt einen passenden Primer der meist vom 5'-Ende in das Konstrukt „hinein“ sequenziert. Ist das Konstrukt größer als die 900 Bp, muss die Sequenz durch schrittweise Sequenzierung mit unterschiedlichen überlappenden Primern vom 5'- und 3'-Ende aus erfolgen.

3.1.9 Gerichtete Mutagenese

Um eine gerichtete Mutagenese durchzuführen (Abb. 3-2) wird das *Site Directed Mutagenesis Kit* (Life Technologies/Finnzymes) verwendet. Hat man ein gewünschtes Konstrukt des zu untersuchenden Proteins erfolgreich in das gewünschte Plasmid kloniert, so kann man dieses Konstrukt mittels gerichteter Mutagenese (*site directed mutagenesis*) weiter modifizieren. Es können neue Abschnitte eingefügt (Insertion), bestehende Abschnitte entfernt (Deletion) oder einzelne AS punktuell werden (Punktmutation).

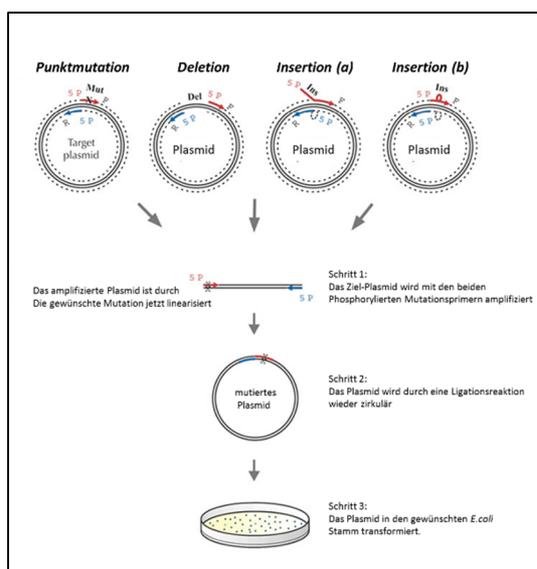


Abbildung 3-2: Ablauf einer gerichteten Mutagenese. [„User Guide: The Phusion Site-Directed Mutagenesis Protocol Lifetechnologies“]

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele

Trenngel	8%	10%	12%	15%	18%	5% Sammelgel
Lösung A	2,5 ml	3,125 ml	3,75 ml	4,5 ml	4,8 ml	1,5 ml
Lösung B	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	2,55 ml Lösung D
20% SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED*	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
ddH ₂ O	2,35 ml	1,7 ml	1,05 ml	0,35 ml	50 µl	5,85 ml

(*) Nach Zugabe von TEMED startet die Polymerisierung und man hat ca. 5-10 min Zeit das Gel zu gießen.

Tabelle 3-2: SDS-PAGE Lösungen

Lösung A	Lösung B	Lösung D	SDS-Probenpuffer
30% (w/v) Acrylamid	1,5 M Tris/HCl	0,5 M Tris/HCl	10 ml 1,5 M Tris pH 6,5
0,8% (w/v) Bisacrylamid	pH 8,8	pH 6,8	6 ml 20% SDS
Jeweils in ddH ₂ O gelöst			30 ml Glycerol
SDS-Lösung	APS-Lösung	Laufpuffer	15 ml β-Mercaptoethanol
20% (w/v) SDS	20% (w/v) APS	6 g/l Tris/HCl	1,8 mg Bromphenolblau
		28,8 g/l Glycin	→ Mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen
		1 g/l SDS	und zu je 2ml Aliquots bei -20 °C lagern.

→ Jeweils in ddH₂O gelöst.

Tabelle 3-3: Standard SDS-Färbelösungen

Coomassie-Färber*	Entfärber*	Kolloidales Coomassie
0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250	20% (v/v) Ethanol	0,12% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250
40% (v/v) Methanol	10% (v/v) Essigsäure	10% (w/v) Ammoniumsulfat
8% (v/v) Essigsäure		10% (v/v) Phosphorsäure
		20% (v/v) Methanol
		Siehe Anleitung im Text.

→ Jeweils in ddH₂O gelöst.

(*) Coomassie-Färber und Entfärber können wiederverwendet werden (Entfärber jedoch durch Aktivkohle filtern).

Mit Hilfe einer SDS-Page können Proteine unterschiedlicher molekularer Masse aufgetrennt und durch Färbung sichtbar gemacht werden. Hierzu werden die Protein-Proben in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das in dem Probenpuffer enthaltene SDS lagert sich in die entfaltete Polypeptidkette und verleiht ihr, proportional zu ihrer molekularen Masse, eine negative Ladung. Hierbei wandern kleine Moleküle schneller durch

das Polyacrylamid-Netzwerk zum Pluspol, als große Moleküle. Da durch die Denaturierung, die Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine zerstört und Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol aufgelöst werden, beeinflussen diese nicht das Laufverhalten der Proteine im Gel. Es werden meist Trenngele mit 15% Polyacrylamid (pH 8,8), in Kombination mit einem 5%igen Sammelgel (pH-Wert 6,8) verwendet. Die gewählte Quervernetzung des Trenngels richtete sich nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Je kleiner das Protein, umso hochprozentiger muss das Trenngel gewählt werden. Die Gele werden mit Hilfe einer Minigel-Apparatur hergestellt, wobei das Trenngel bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet wird. Dies hat eine gleichmäßige Grenze zwischen den beiden Gelen zur Folge und schirmt die Polymerisation vor störendem Sauerstoff ab. Nach der Polymerisationsreaktion wird das Isopropanol entfernt, das Sammelgel eingegossen und ein Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach Auspolymerisierung des Gels kann es in die Elektrophorese Apparatur eingespannt und diese mit Lauf-Puffer gefüllt werden. Jede Kammtasche kann mit maximal 20 μ l Probe bzw. Größenstandard beladen werden. Die SDS-Page wird bei einer konstanten Stromstärke von 30 - 48 mA für ca. 1-1,5 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um einen kolloidalen Coomassie-Färber herzustellen [Candiano, 2004], werden 10% Phosphorsäure in 1/10 des Endvolumens (ddH₂O) vorgelegt. Anschließend werden 10% Ammoniumsulfat unter Rühren zugegeben und aufgelöst. Danach gibt man 0,12% Coomassie Brilliant Blue G250 dazu, füllt mit ddH₂O bis auf 80% des Endvolumens auf und rührt die Lösung bis alle Feststoffe gelöst sind. Im letzten Schritt gibt man 20% wasserfreies Methanol hinzu. Die Lösung wird dabei dunkelgrün und enthält Schwebstoffe, die nicht abfiltriert werden dürfen. In einer lichtundurchlässigen Flasche ist die Lösung bis zu 6 Monate stabil.

Um ein SDS-Gel zu färben, wird es in die Coomassie-Färbelösung überführt, kurz in der Mikrowelle aufgeköcht und ca. 30 min inkubiert. Danach wird das Gel in den Entfärber überführt und ebenfalls kurz aufgeköcht. Diese Prozedur (mit ca. 20 min Inkubationszeit) wird so lange wiederholt bis die einzelnen Banden klar zu erkennen sind. Im Fall des kolloidalen Coomassie-Färbers wird das SDS-Gel in den Färber überführt und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Färbung ist effektiver (färbt Banden mit bis zu 10-50 ng) und intensiver als durch den Standard Coomassie-Färber (färbt Banden mit 100-300 ng). Entfärbt wird das kolloidale Coomassie durch mehrmaliges waschen in ddH₂O, bis die gewünschte Intensität erreicht ist.

3.2.2 Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli*

3.2.2.1 Expression unmarkierter (^{14}N / ^{12}C) Proteine

Um rekombinant Proteine in *E. coli* herzustellen, muss die gewünschte, für das Protein kodierende Sequenz, im korrekten Leseraster in das gewünschten Plasmid (siehe Kapitel 2.4) integriert sein und unter dem Einfluss eines T7- oder *E. coli*-Promotors stehen. Des Weiteren muss dieses Plasmid erfolgreich in einen Expressionsstamm (siehe Kapitel 2.3) transformiert vorliegen (siehe Kapitel 3.1.7).

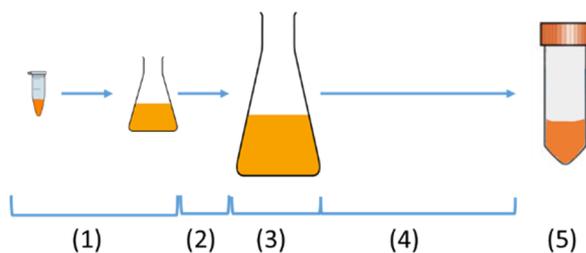


Abbildung 3-3: Schematischer Ablauf einer 2,5 l Proteinexpression in *E. coli*

Zu Beginn (1) werden 1:20 des Endvolumens (für 2,5 l = 125 ml) LB-Medium mit dem notwendigen Antibiotikum, durch eine sterile Pipette mit dem gewünschten *E. coli* Stamm angeimpft. Diese sogenannte Übernachtskultur (ÜNK) wird bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag (2) wird die ÜNK in das auf 37 °C vorgewärmte LB_{Antibiotikum} Medium der Hauptkultur (maximal 2,5 l in einem 5 l Erlenmeyerkolben) überführt und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,8 für ca. 1-3 h bei 37 °C und 200 rpm herangezogen (3). Hat die Hauptkultur die gewünschte OD₆₀₀ erreicht wird die Expression des gewünschten Proteins durch Zugabe von 50-500 µM (Endkonzentration) Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), einem künstlichen Induktor des Lac-Operons, induziert. Die Temperatur (30 °C - 37 °C) und Dauer (2-24 h) der Expression richtet sich nach den Eigenschaften des Proteinkonstrukts und muss für jedes einzelne Konstrukt eigens bestimmt werden (4). Nach Ablauf der Expressionsdauer (5), wird die Kultur bei 3000 g und 4 °C für ca. 30 min in großen 800 ml Zentrifugen Gefäßen portionsweise pelletiert. Der Überstand wird daraufhin verworfen und das Zellpellet bei -80 °C gelagert. Je nach Charakter des Proteins, die Expressionsbedingungen für jedes einzelne Konstrukt getestet und optimiert werden. Das betrifft den Expressionsstamm, die Expressionsdauer, die IPTG-Konzentration der Induktion, die Expressionstemperatur, das Expressionsmedium, und wenn nötig das Konstrukt an sich.

3.2.2.2 Expression markierter(¹⁵N / ¹³C) Proteine zur NMR-Spektroskopie

Tabelle 3-4: Lösungen für Minimalmedium nach Neidhardt

10x-Salze		1000x-Spuren	
0,482 g	K ₂ SO ₄	0,96 g	Titriplex 1
29,20 g	NaCl	0,28 g	FeSO ₄ x7 H ₂ O
1,796 g	KH ₂ PO ₄	100 µl	CaCl ₂ (0,5 M)
1,074 g	MgCl ₂ x6H ₂ O	100 µl	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ (43 mM)
→ mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen.		100 µl	H ₃ BO ₃ (0,4 M)
		100 µl	CoCl ₂ (30 mM)
		100 µl	CuSO ₄ (10 mM)
		100 µl	MnCl ₂ (80 mM)
		100 µl	ZnSO ₄ (10 mM)
		→ mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen.	
→ sterilfiltrieren, vor Licht schützen und bei 4 °C lagern.			

MOPS/KOH (1 M) pH 7,4

20,93 g MOPS in ddH₂O lösen, pH mit KOH auf 7,4 einstellen.

Thiamin/HCl x H₂O (1 M)

3,37 g Thiamin/HCl

→ jeweils auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen und bei 4 °C lagern.

Tabelle 3-5: Zusammensetzung Minimalmedium nach Neidhardt

100 ml	10x-Salze
1 ml	1000x-Spuren
4 g	0,4%(w/v) Glucose (¹³ C oder ¹² C)
1ml	Thiamin/HCl
80 ml	MOPS/KOH
1 g	Ammoniumchlorid (¹⁵ N oder ¹⁴ N)
1 ml	Antibiotika Stocklösung (1:1000)
→ mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern.	

Tabelle 3-6: Lösungen für Neues Minimalmedium

5x Spurenelemente		10x EDTA Eisensulfat	SL-Mix
500 mg	ZnSO ₄ x7 H ₂ O	250 mg	EDTA
150 mg	MnCl ₂ x4 H ₂ O	100 mg	FeSO ₄ x7 H ₂ O
1500 mg	H ₃ BO ₃	→ in ddH ₂ O lösen, auf 45 ml	
1000 mg	CoCl ₂ x6 H ₂ O	auffüllen. Lösung immer	
50 mg	CuCl ₂ x2 H ₂ O	frisch herstellen.	
100 mg	NiCl x6 H ₂ O		
150 mg	Na ₂ MoO ₄ x2 H ₂ O		
→ mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen, sterilfiltrieren und lichtgeschützt bei 4 °C lagern.			
		5x Spurenelemente	
		0,2 ml	
		0,9 ml	
		10x EDTA Eisensulfat	
		→ mit ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen und bei 4 °C lagern.	

Tabelle 3-7: Zusammensetzung Neues Minimalmedium**Neues Minimalmedium NMM**

7,5 g	Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O
3,0 g	KH ₂ PO ₄
0,5 g	NaCl
0,25 g	MgSO ₄ x7 H ₂ O
0,014 g	CaCl ₂ xH ₂ O
→ in 900 ml ddH ₂ O lösen.	
10 ml	SL-Mix
1 ml	Antibiotika Stocklösung (1:1000)
1-2 g	Glucose (¹³ C oder ¹² C)
1 g	Ammoniumchlorid (¹⁵ N oder ¹⁴ N)
1 ml	Thiamin/HCl
→ mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen und bei 4 °C lagern.	

Um mehrdimensionale NMR-Spektren der Proteine aufnehmen zu können, müssen die Proteine mit Isotopen markiert werden, welche einen Kernspin besitzen und somit ein Signal im NMR-Spektrum liefern. Zu diesem Zweck werden die *E. coli* in einem Minimalmedium angezogen, welches ausschließlich eine Quelle für das gewünschte Isotop enthält, zum Beispiel ¹⁵N-Ammoniumchlorid und / oder ¹³C-Glucose. Zur Auswahl stehen hierfür zwei verschiedene Medien, zum einen das „Minimalmedium nach Neidhardt“, zum anderen das „Neue Minimal Medium“ (NMM). Da stabile Isotopen teuer sind, wird die Expressionsstrategie bestimmt, indem vom gewünschten Konstrukte eine „markierte“-Expression simuliert wird. Die Zusammensetzung der Minimalmedien ist gleich, nur die Isotopenquellen sind ¹⁴N-Ammoniumchlorid und / oder ¹²C-Glucose. Somit kann die Expression in Minimalmedium optimiert werden bevor die Isotopen eingesetzt werden. Das ist notwendig, da die Expression in Minimalmedien meistens limitiert ist und schlechtere Ausbeuten liefert als in LB-Medium. Lässt sich das Konstrukt unproblematisch herstellen folgt Strategie (A), ist das Wachstum der Bakterien in Minimalmedium stark verlangsamt folgt Strategie (B). (A) Eine ÜNK wird bereits in Minimalmedium angesetzt und im Verhältnis 1:20 am nächsten Tag in die vorgewärmte Hauptkultur überführt. (B) Um ein schnelles Wachstum der Hauptkultur zu gewährleisten, wird eine ÜNK angefertigt. Mit dieser Vorkultur wird am nächsten Tag eine Übergangskultur im Verhältnis 1:100 an geimpft. Diese Übergangskultur hat stets das gleiche Endvolumen wie die eigentliche Hauptkultur, jedoch werden hier lediglich die Zellen in LB-Medium bis kurz vor die gewünschte OD₆₀₀ kultiviert. Bei Erreichen dieser OD₆₀₀ (0,4-0,5) werden die Zellen bei Raumtemperatur und maximal

3000g für ca. 30 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in vorgewärmtem Minimalmedium resuspendiert und ca. 1 h bis zur gewünschten Induktions-OD₆₀₀ von 0,5-0,6 kultiviert. Zellaufschluss und Aufreinigung der markierten Proteine erfolgt nach dem gleichen Prinzip, wie das unmarkierter (¹⁴N / ¹²C-)Proteine. Je nach Konstrukt können die Medien variiert werden, beide haben sich als effektiv herausgestellt.

3.2.3 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Um biochemische, biophysikalische Untersuchungen an Proteinen durchführen zu können, bedarf es je nach Messmethode einige Nanogramm bis hin zu mehreren Milligramm an gewünschtem Protein mit sehr hohem Reinheitsgrad. Man kann die gewünschten Proteine aus ihrem ursprünglichen Gewebe heraus isolieren, was aber teilweise immense Probleme mit sich bringt. Zum einen ist der Zugang zu gewissen Geweben aus ethischen Gründen limitiert, zum anderen werden Proteine in ihrer natürlichen Umgebung je nach Aufgabe, in sehr unterschiedlichen, teils sehr geringen Mengen exprimiert und können nur anhand ihrer biochemischen Charakteristika aufgereinigt werden. Aus diesen Gründen wählt man den eleganten Umweg über die rekombinante (transgene) Expression in speziellen, dafür optimierten Bakterien (Kapitel 2.3), Hefen oder Zelllinien. Mitunter kann die Expression auch als zellfreie Synthese, das heißt entkoppelt von der Kultur der Organismen durchgeführt werden [Freischmidt, 2011]. Diese Methode liefert aber nur einen Bruchteil der mittels rekombinanter Expression erreichten Ausbeute. Nachteil der Expression eukaryotischer Proteine in *E. coli* ist die Tatsache, dass *E. coli* Bakterien im Gegensatz zu Eukaryonten keine posttranslationalen Modifikationen an den Proteinen durchführt. Diese finden in Eukaryonten nach der Expression der Proteine statt und können diverse Modifikationen bewirken. Unter anderem die Abspaltung gewisser Teile des Proteins wie Signalsequenzen, die Kopplung anorganischer Gruppen wie Phosphorylierung, Hydroxylierung, Sulfatierung. Ebenso die Kopplung organischer Gruppen wie Glykosylierung, Formylierung, oder die Kopplung organischer Lipide wie Farnesylierung, Geranylgeranylierung. Außerdem kann die korrekte Faltung durch Chaperone sowie die Ausbildung von Disulfidbrücken reguliert werden. Diese Modifikationen können für die Aufgabe des Proteins von gravierender Bedeutung sein und müssen in die Erforschung dieser mit einbezogen werden. Absoluter Vorteil der Expression in *E. coli* ist die einfache Handhabung der Kulturen, der vergleichsweise geringe Zeitaufwand und die teilweise sehr große Ausbeute an rekombinantem Protein.

3.2.3.1 Zellaufschluss

Da die Proteine nicht in das umgebende Medium sezerniert werden, müssen die *E. coli*-Zellen einem Zellaufschluss unterzogen werden. Werden die Proteine von *E. coli* in *inclusion bodies* verpackt, kann eine denaturierende Aufreinigung zum Ziel führen. Da die Proteine jedoch ihre native Faltung beibehalten sollen, kommt primär ein nativer Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall zum Einsatz. Hierzu wird das Zellpellet (Kapitel 3.2.2) langsam auf Eis im gewünschten Lysepuffer unter Rühren gelöst (ca. 15-20 ml Puffer pro 2,5 l Kultur). Ist das Zellpellet homogen gelöst, wird die Suspension in 50 ml Falcons überführt und einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Die durch den Ultraschallimpuls erzeugten Schwingungen führen dazu, dass Scherkräfte die Zellen zum Platzen bringen, DNA der Zellen wird bei diesem Schritt ebenfalls geschert. Um die Proteine nicht zu stark zu erhitzen, werden sie dem Ultraschallimpuls (Stufe I) nur jeweils 10 s ausgesetzt, kurz geschwenkt und auf Eis abgekühlt. Dieser Vorgang wird je nach Dichte der Zellsuspension zwischen 3- und 5-mal wiederholt. Um die löslichen Proteine vom unlöslichen Rest wie Membranbestandteile, Lipide, *inclusion bodies*, etc., zu trennen, wird das Zelllysate bei 4 °C und 12000 g für ca. 1 h zentrifugiert. Der Überstand wird in einen frischen Erlenmeyerkolben überführt und, um DNA-Verunreinigungen zu entfernen, mit einer Spatelspitze DNase1 versetzt. Diese benötigt mindestens 2µM MgCl₂ für ihre Aktivität und wird für 1h bei 298 K inkubiert. Eine Alternative hierfür ist der Aufschluss durch die enzymatische Zerstörung der Zellmembran. Letzteres kann bei *E. coli* auch zusätzlich vor dem Aufschluss durch Ultraschall mittels Lysozym (1 mg / ml) erfolgen (ca. 30 min auf Eis). Nach dem Zellaufschluss sollte direkt die Aufreinigung der Proteine erfolgen.

3.2.3.2 GST-Affinitätschromatographie

Tabelle 3-8: GST-Puffer

Puffer für die Aufreinigung GST-getaggtter Proteine (pGEX4T1 Plasmid) [nativ]

GSH-Bindepuffer (GSH-BP)*	GSH-Elutionspuffer (GSH-EP)
10 mM Na-Phosphat	10 mM Na-Phosphat
150 mM NaCl	150 mM NaCl
2 mM DTT/oder DTE	2 mM DTT/oder DTE
→ pH 7,4	10 -20 mM reduziertes Glutathion
	→ pH erst nach Zugabe des Glutathions auf 7,4 einstellen

(*) GSH-BP = Lysepuffer.

Das pGEX4T1 Plasmid (siehe Kapitel 2.4) ermöglicht die kovalente Fusion eines Glutathion-S-Transferase-Tags (GST-Tag) an die N-terminale Position des Zielproteins. Dieser GST-Tag hat eine hohe Affinität an Glutathion (GSH), welches kovalent an die Säulenmatrix einer GSH-Chromatographie Säule gekoppelt ist. Dadurch kann das Protein mit dem N-terminalen GST-Tag temporär an die Säule koordiniert werden und Störfaktoren wie zusätzliche Proteine, Pufferkomponenten, etc., können ohne großen Proteinverlust von der Säule gewaschen werden. Des Weiteren wirkt sich die Größe des GST-Tags mit 25 kDa positiv auf den Faltungszustand und die Löslichkeit des Zielproteins aus. Bevor die Chromatographie gestartet wird, muss die 20%-ige EtOH-Lösung, die der Lagerung der Säule dient, von der Säule gewaschen daraufhin mit mindestens zwei Säulenvolumen GSH-BP equilibriert werden. Die Affinitätschromatographie wird, um ein degenerieren der Proteine zu vermeiden, immer direkt im Anschluss an einen Zellaufschluss und stets bei 4 °C durchgeführt. Das Zelllysate wird mit einer Flussrate von 1-2 ml / min auf die Säule aufgetragen, kann aber auch für eine effektivere Beladung für mehrere Stunden über die Säule zirkulieren. Anschließend werden die Verunreinigungen mit mindestens dem 3 fachen des Säulenvolumens (GSH-BP, 2 ml/min) von der Säule gewaschen. Abschließend wird das Zielprotein mit 1,5 fachen Säulenvolumen GSH-EP (stets frisch) von der Säule verdrängt. Die Wasch-, Equilibrierungs- und Beladungsschritte können mit einer Tischpumpe durchgeführt werden. Die Elution des Zielproteins erfolgt nach Einbau der Säule in ein ÄKTA™-Chromatographie-System (Abb. 3-4) mit Fraktionierer. Anhand des Chromatogramms können die gewünschten Fraktionen vereint und die Ausbeute der Reinigung durch die Stärke der Absorption bei 280 nm abgeschätzt werden.

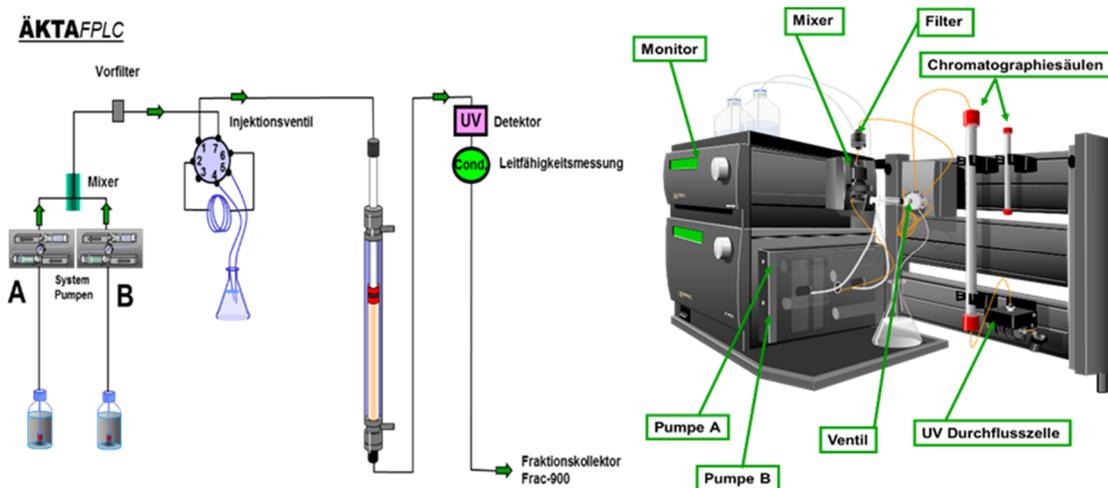


Abbildung 3-4: Übersicht über das ÄKTA-FLPC System [Quelle „GE imagination at work“]

3.2.3.3 His₆-Affinitätschromatographie

Tabelle 3-9: His₆-Puffer

Puffer für die Aufreinigung His₆-getagter Proteine (pET14b Plasmid)

	Native Bedingungen	Denaturierende Bedingungen
Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM imidazol pH 8,0	8 M Harnstoff 10 mM Tris-HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20m M imidazol pH 8,0	8 M Harnstoff 10 mM Tris-HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6,3
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM imidazol pH 8,0	8 M Harnstoff 10 mM Tris-HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ pH 4,5
Neutralisierungspuffer	keiner notwendig	1 M Tris/HCl pH 9,5

Das pET14b Plasmid (siehe Kapitel 2.4) ermöglicht die kovalente Fusion eines His₆-Tags an die N-terminale Position des Zielproteins. Dieser His₆-Tag hat eine hohe Affinität an Ni²⁺ welches an die Säulenmatrix einer NTA Super-Flow (*nitrilotriacetic acid*) Chromatographie Säule koordiniert ist. Die Wasch-, Equilibrierungs- und Beladungsschritte erfolgen wie bei der GST-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 3.2.3.2) und können ebenfalls mit einer Tischpumpe durchgeführt werden. Das an die Säule gebundene His₆-Protein wird mit dem 2 fachen Säulenvolumen an Waschpuffer gereinigt. Die Elution des Zielproteins erfolgt wiederum nach

Einbau der Säule in ein ÄKTA™ Chromatographie-System mit Fraktionierer. Anhand des Chromatogramms können erneut die gewünschten Fraktionen vereint und die Ausbeute der Reinigung durch die Stärke der Absorption bei 280 nm abgeschätzt werden. Im Falle der nativen Aufreinigung wird das Zielprotein durch die hohe Imidazolkonzentration von der Säule verdrängt, dieses konkurriert um die Ni²⁺ Bindung, während das His₆-Protein bei der denaturierenden Aufreinigung auf Grund des niedrigen pH-Wertes verdrängt wird.

3.2.3.4 Ionenaustauschchromatographie

Tabelle 3-10: Rap1A Puffer

Rap1A-Puffer	Hochsalz Rap1A-Puffer	Puffer A(1) Rap1A-Puffer	Puffer A(2) Rap1A-Puffer
50 mM Tris/HCl	+ 300 mM NaCl	ohne Mg ²⁺	ohne Mg ²⁺
2 mM DTE		+ 10 mM EDTA	+ 200 mM Ammoniumsulfat
2 mM Mg ²⁺			
→ pH 7,4	→ pH 7,4	→ pH 7,4	→ pH 7,4

Tabelle 3-11: Übersicht über verwendeten Ionenaustauscher

Anionen Austauscher	Stärke der Bindung	Funktionelle Gruppe
Q-Sepharose	Stark	-O-CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃
DEAE-Sepharose	Schwach	-O-CH ₂ CH ₂ N ⁺ H(CH ₂ CH ₃) ₂
Kationen Austauscher		
SP-Sepharose	Stark	-O-CH ₂ CHOHCH ₂ OCH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
S-Sepharose	Stark	-O-CH ₂ CHOHCH ₂ OCH ₂ CHOHCH ₂ SO ₃ ⁻
CM-Sepharose	Schwach	-O-CH ₂ COO ⁻

Proteine können, wie im Fall der kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras, auch ohne Affinitäts-tag, basierend auf ihren biochemischen Eigenschaften aufgereinigt werden. Hierbei macht man sich die Ladung und die Größe des Proteins zu Nutze. Je nach gewähltem Puffersystem und dessen pH-Wert, variieren die Nettoladungen der Proteine (je nach isoelektrischem Punkt pI des Proteins). Mithilfe von sogenannten Ionenaustauschern können die Proteine mittels ihrer Ladung temporär an eine Matrix koordiniert werden während anders geladene Proteine durch die Säule gewaschen werden. Je nach Stärke der Ladung können die gebundenen Proteine dann über einen Salzgradienten entsprechend ihrer Bindungsstärke wieder von der Säule verdrängt werden. Anschließend folgt für eine Verbesserung der Reinheit, meist eine SEC-Chromatographie (Kapitel 3.3.1).

3.2.4 Konzentrieren proteinhaltiger Lösungen

Um nach einer erfolgreichen Aufreinigung kleine Probenvolumina mit hoher Proteinkonzentration zu bekommen nutzt man das Prinzip der Ultrafiltration. Mit Hilfe von VivaSpin-Konzentratoren (Sartorius Biotech) kann durch Zentrifugalkraft (siehe Hersteller Angaben), Probenpuffer durch eine Ultrafiltrationsmembran mit gewünschter Porengröße, aus der proteinhaltigen Lösung entfernt werden. Diese VivaSpin-Konzentratoren gibt es mit unterschiedlichsten Porengrößen, je nach Größe des Proteins und für diverse Volumina. Das Konzentrieren der Probe erfolgt schrittweise bei 4 °C, die Geschwindigkeit der Zentrifugation ist von der Größe und Art des Konzentrators abhängig (siehe Herstellerangaben) Zusätzlich muss das Proteinkonzentrat im Reservoir des Konzentrators resuspendiert oder schrittweise abgenommen werden, um ein Verstopfen der Membran zu verhindern. Proteinhaltige Lösungen können auch nicht nach Belieben aufkonzentriert werden, da sie sonst aggregieren und ausfallen können. Daher muss die maximal mögliche Konzentration für jedes Protein einzeln bestimmt werden. Die auf diese Weise konzentrierten Proteinproben können, falls sie nicht direkt weiter verwendet werden, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden.

3.2.5 Dialyse proteinhaltiger Lösungen

Nach Aufreinigung der Proteine müssen diese häufig in geeignete Puffer für nachfolgende Experimente überführt werden. Das geschieht mit Dialyseschläuchen, bei der die Porengröße in der Dialysemembran stets von der Größe des zu dialysierenden Proteins abhängt. Je nach Durchmesser des Dialyseschlauches und dem eingesetzten Probenvolumen schneidet man die benötigte Länge ab. Die Dialyseschläuche sind steril und getrocknet und müssen vor der Dialyse in ddH₂O (ca. 10 min) und danach in dem gewünschten Puffer (20 min) equilibriert werden. Anschließend wird die Proteinlösung in den Dialyseschlauch gefüllt, dieser verschlossen und 1-2 h gegen 2 l des gewünschten Puffers (großer Maßstab) bei 4 °C dialysiert. Für kleinere Mengen eignen sich sogenannte Dialyse Kassetten mit einem Volumen von 0,5 ml – 3 ml und weitaus geringere Mengen an Dialysepuffer.

3.2.6 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Da die exakte Bestimmung der Proteinkonzentration mit nur einer Nachweismethode meist zu ungenau und fehleranfällig ist, werden stets alle möglichen Bestimmungsmethoden kombiniert und gemittelt.

Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford, wird Roti®-Quant (5x Konzentrat) benutzt. Bevor die Proteinkonzentration bestimmt werden kann, muss für jede neu angesetzte Bradfordlösung eine Eichung am Photometer durchgeführt werden. Die Eichung erfolgt anhand einer BSA-Konzentrationsreihe (0,5 mg/ml bis 20 mg/ml), bei der jeweils 1 µl der BSA-Lösung zu 1 ml der Bradfordlösung gegeben wird, gründlich gemischt wird, für 5 min bei 298 K inkubiert und dann die Absorption bei 595 nm am Photometer gemessen wird. Mit diesen Werten bildet man eine Eichgerade und kann nun die unbekannte Proteinkonzentration einer Lösung bestimmen. Zur Ermittlung dieser mischt man 1-10 µl der Proteinlösung mit 1 ml der Bradfordlösung, inkubiert 5 min bei 298 K und ermittelt die OD_{595} am Photometer. Das Prinzip dieses photometrischen Nachweises ist die Bindung von Coomassie Brilliant Blau G250 an die positiven und unpolaren Seitenketten des Proteins. Daraufhin verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm welches man dann am UV-VIS Photometer detektieren kann. Nachteil dieser Messmethode ist ihre Ungenauigkeit. Die Aminosäurezusammensetzung jedes Proteins variiert stark und somit auch die Anwesenheit von positiv geladenen und unpolaren Seitenketten in der Primärsequenz. Proteine mit vielen reaktiven Seitenketten liefern zu hohe, mit wenig reaktiven Seitenketten zu niedrige Konzentrationswerte.

UV-Absorption

Die aromatischen AS Tryptophan, Tyrosin und in geringem Maße auch Phenylalanin absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm. Dabei orientiert sich die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV_{280} maßgeblich an Tryptophan, welches die höchste Absorptionseffizienz in diesem Bereich aufweist. Besitzt das zu untersuchende Protein kein Tryptophan, so steigt der Fehler dieser Konzentrationsmessung. Mithilfe des Programms ProtParam können die physikalischen und chemischen Parameter seines Proteins berechnet werden. Unter anderem auch der Absorptionskoeffizienten UV_{280} für 1 g/l bei einer Absorption von 0,1%. Hiermit lassen sich klare, durchsichtige Proteinlösungen am UV-VIS Photometer vermessen

und die Konzentrationen bestimmen. Auch eine Absorption der Peptidbindung bei 205 nm kommt in Frage, jedoch sind hier die Interferenzen mit einer Vielzahl von Puffersubstanzen zu hoch.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bindet das Zielprotein Nukleotide wie die GTPasen H-Ras oder Rap1A, so können diese mittels C18-reverse-phased HPLC quantifiziert werden. Hierbei ist die C18-Säule die hydrophobe stationäre Phase, die mit der mobilen, polaren Phase wechselwirkt (Laufpuffer= 100 mM Kaliumphosphat, 10 mM Tetrabutylammoniumbromid und 4-7% Acetonitril). Je mehr Phosphatgruppen das Nukleotid trägt, umso größer ist seine Retentionszeit (GTP > GDP > GMP). Die Eichung der HPLC erfolgt mit einer Nukleotidlösung bekannter Konzentration und deren Absorption bei 254 nm. Da die GTPasen nur in der Lage sind genau ein Nukleotid zu binden, entspricht die gemessene Absorption somit der Konzentration des Nukleotids, sowie der Konzentration der GTPase.

Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR)

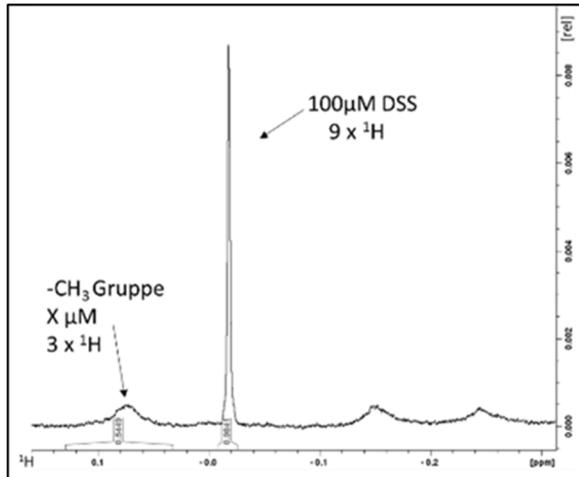


Abbildung 3-5: Konzentrationsbestimmung mittels ^1H -NMR

Auch anhand eines entkoppelten 1D-NMR-Spektrums (noesygppr1d) kann man die Konzentration der Proteinprobe bestimmen. Die Konzentration und die Anzahl der Protonen des internen Standards beispielsweise der 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) mit 9 Protonen ist bekannt. Hat das 1D-NMR-Spektrum des Proteins eine charakteristische Methylgruppe (einzeln und „freistehend“) so kann über das relative Integral der Methylgruppe die Konzentration bestimmt werden (siehe Abb. 3-5).

3.2.7 Proteaseverdau

Teilweise sind die Affinitätstags der Proteinkonstrukte für die weiteren Experimente, wie Western Blot oder Pulldown, von Bedeutung. Meist stellen sie nach der erfolgreichen Reinigung aber eine ungewollte Verlängerung des eigentlich gewünschten Proteins dar. Daher sind die Affinitätstags meist über Protease-Schnittstellen an das Konstrukt gekoppelt. Verdaut man nun das aufgereinigte Protein mit der spezifischen Protease, so lässt sich der Tag abspalten und über Gelfiltration oder erneute Aufreinigung über Affinitätschromatographie, hierbei bindet das Zielprotein bindet nun nicht mehr und fließt durch, entfernen. Je nach verwendetem Plasmid kodiert die Schnittstelle für verschiedene Proteasen. Im Falle der pGEX4T1 und pET14b Plasmide ist das die Serin-Protease Thrombin. Die Dauer, Temperatur und Konzentration an zugegebener Protease müssen für jedes Protein empirisch ermittelt werden.

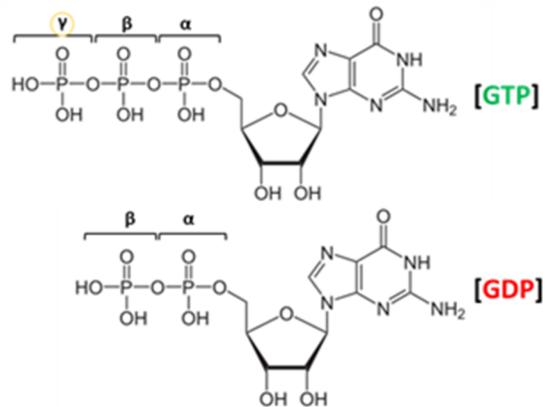
Um das Thrombin wieder aus dem System zu entfernen eignet sich eine 1 ml HiTrap Benzamidin Säule (Amersham) oder Benzamidin-*Beads* für einen Batch-Ansatz. Benzamidin bindet hierbei spezifisch Serin-Proteasen. Da die Effektivität des Benzamidins mit der Zeit abnimmt und somit eine vollständige Entfernung der Protease nicht möglich ist, muss sichergestellt werden, dass kein ungewollter Verdau der Proteine durch verschleppte Proteasen stattfinden kann.

3.2.8 Nukleotidaustausch

Im Falle der Guaninnukleotid bindenden Proteinen (GNB-Protein) H-Ras und Rap1A, ist die Beladung des Proteins mit dem speziellen Nukleotid (Abb. 3-6) von entscheidender Bedeutung für die Aktivität des Proteins. Daher muss diese aktiv definiert und eingestellt werden. Der aufgereinigten GTPase muss das Mg^{2+} Ion des aktiven Zentrums entzogen werden, um den Protein-Nukleotid-Komplex zu destabilisieren (Puffer A (1 und 2) Tab. 3-10). Daraufhin wird die Konzentration der Nukleotidbeladung des Proteins mittels HPLC gemessen und der Austausch durch den 50-fachen Überschuss des gewollten Nukleotids forciert. Dieser geschieht bei 4 °C über Nacht unter Schwenken. Am nächsten Tag wird Mg^{2+} zugegeben, erneut für 30 min bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Danach werden die überschüssigen Nukleotide durch mehrmalige Größenausschlusschromatographie (SEC / Kapitel 3.3.1) über kleine PD10 G25 Säulchen aus der Probe entfernt. Die tatsächliche Beladung wird stets nach dem Nukleotidaustausch überprüft, die Proteine auf die gewünschte Konzentration eingestellt und bei -80 °C

gelagert. Bei GTP-Analoga kann zusätzlich noch mit einer alkalischen Phosphatase gearbeitet werden. Diese hydrolysiert die natürlichen Guaninnukleotide, nicht aber das GTP-Analogon, und ermöglicht so einen noch effektiveren Austausch.

Natürliche Guaninnukleotide:



Guaninnukleotid Analoga:

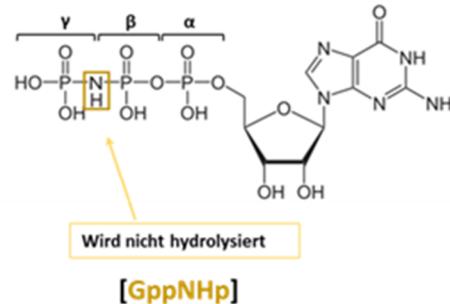


Abbildung 3-6: Verwendete Guaninnukleotide GDP und GTP sowie dessen Analoga GppNHp

3.2.9 Semi-Dry Western Blot

Tabelle 3-12: Lösungen für Western Blot

WB-Puffer

20% (v/v) Methanol
48 mM Tris
38 mM Glycin

Jeweils in ddH₂O gelöst.

PVDF-Färber

0,2% (w/v) Coomassie R250
50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig

Jeweils in ddH₂O gelöst

Strip-Puffer 1

100 mM Glycin

Jeweils in ddH₂O gelöst.

→ pH 2,5

(*) wiederverwendbar.

TBST-Puffer

10 mM Tris/HCl
150 mM NaCl
0,1% (v/v) Tween 20
pH 7,4

PVDF-Entfärber

50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig

Strip-Puffer 2

100 mM Tris/Hcl
2% (w/v) SDS

→ pH 6,7

TBST-Milchpulver

10% (w/v) Milchpulver
In TBST lösen

5x Ponceau *

2% (w/v) Ponceau-Rot
30% (v/v) TCA
30% (w/v) Sulfosalicylsäure

Mittels Western Blot Technik kann man auch kleinste Proteinmengen (Picogramm-Bereich) nachweisen. Dabei werden Proteine aus einer SDS-PAGE auf eine Membran transferiert (Abb. 3-7) und anschließend über die entsprechenden Antikörper detektiert. Das SDS-Gel darf hierzu vorher nicht gefärbt werden, da durch die Essigsäure des Färbers bzw. Entfärbers die Proteine im SDS-Gel fixiert werden und somit ein anschließender Transfer der Proteine auf eine Membran verhindert wird. Ist ein Western Blot geplant, so tauscht man den normalen Größenstandard (PageRuler) gegen einen *prestained* Standard, da bei diesem die einzelnen Protein-Banden gefärbt sind. Somit ist nach der SDS-Page die Orientierung des SDS-Gels bekannt und der Erfolg des Transfers nach dem Western Blot kann direkt abgeschätzt werden. Transferiert werden die Proteine auf unterschiedlichste Membranen, die je nach Größe des zu transferierenden Proteins und Zweck des Blots variieren. Beispielsweise für eine Antikörperdetektion auf Nitrozellulose, für Massenspektrometrie oder einen Edman-Abbau auf eine PVDF-Membran.

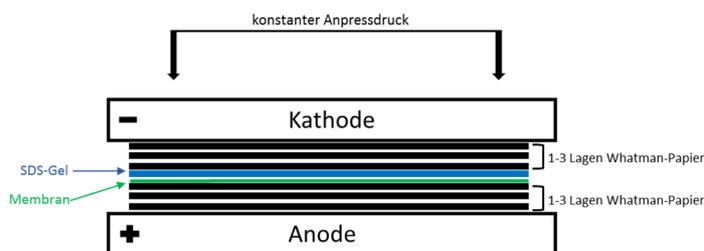


Abbildung 3-7: Klassischer Aufbau einer Semi-Dry Western Blot Apparatur

Nach der SDS-PAGE wird zu Beginn das Sammelgel entfernt, das Trenngel in Westernblotpuffer (WB-Puffer) getränkt und 10 min inkubiert was ein leichtes Aufquellen des Gels zur Folge hat. Danach werden Whatman-Papier und die gewünschte Membran auf die passende Größe zugeschnitten und ebenfalls in WB-Puffer getränkt. Handelt es sich um eine PVDF-Membran (diese ist hydrophob), so muss diese erst mit Methanol für den WB-Puffer zugänglich gemacht werden. Um einen vollständigen Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran zu garantieren muss das *Sandwich* (Abb. 3-7: Whatman-Papier / SDS-Gel / Membran / Whatman-Papier) passgenau und luftblasenfrei übereinander liegen. Zudem ist darauf zu achten, dass nur das *Sandwich* mit Transferpuffer getränkt ist. Um einen optimalen Stromfluss zu gewährleisten muss überschüssiger Puffer werden. Der Transfer wird bei Raumtemperatur mit einer konstanten Spannung von 15 V für 45 min durchgeführt. Die Kontrolle des Transfers erfolgt durch Färbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau-Rot. Nach ca. 3-5-minütiger Färbung wird die Membran mehrmals mit ddH₂O entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards werden markiert und die Membran wird

in TBST/Milchpulver über Nacht bei 4 °C blockiert. Am nächsten Tag wird der Blot auf Raumtemperatur erwärmt, die Blockierlösung entfernt und die Membran 3-4mal mit TBST je 15 min gewaschen. Im nächsten Schritt wird der Blot mit dem primärem Antikörper inkubiert. Dieser ist in 10 ml TBST/Milchpulver, je nach optimaler Konzentration, verdünnt. Dieser primäre Antikörper richtet sich spezifisch gegen das Epitop des gesuchten Proteins oder dessen Affinitäts-Tag. Es folgt ebenfalls eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Der Blot wird anschließend 2mal mit TBST gespült, 15 min in TBST unter Schwenken gewaschen und erneut drei kurzen Waschschritten mit TBST unterzogen. Daraufhin wird der sekundäre Antikörper zugegeben, der sich wiederum gegen den primären Antikörper richtet und eine gekoppelte Nachweismöglichkeit mittels Peroxidase-Aktivität trägt. Der Blot wird für 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert und daraufhin erneut gewaschen. Die Detektion des Proteins erfolgt über die Peroxidase-Aktivität des zweiten Antikörpers und wird durch das Enhanced-Chemilumineszenz-System (ECL-System, Amersham) nachgewiesen. Hierzu wird der Blot nach dem letzten Waschschriff mit einer 40:1 Mischung der Lösungen A zu B, des ECL-Systems mehrfach benetzt und in eine Plastikfolie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wird dann ein Röntgenfilm aufgelegt und belichtet. Der Film wird 5 min in Entwicklerlösung (Kodak) geschwenkt, kurz gewaschen und in Fixierer (Kodak) konserviert, so dass die Banden sichtbar werden und der Röntgenfilm nicht überbelichtet wird. Um weitere Proteine auf der gleichen Membran nachweisen zu können kann die Membran *gestrippt* werden. Hierfür wird der Blot nach der ECL-Detektion direkt in TBST überführt und kann sofort oder am nächsten Tag (ÜN / 4 °C) *gestrippt* werden. Der Blot wird dafür in einer ausreichenden Menge an Strip-Puffer 1 für 30 min inkubiert. Daraufhin wird er 30 min in ausreichend Strip-Puffer 2 geschwenkt, bevor er 5-10 min in TBST gewaschen wird. Der Blot kann nun erneut blockiert und mit weiteren Antikörpern inkubiert werden. Für den Nachweis von Proteinen mit gekoppeltem His₆-Tag wurde das Universal His Western Blot Kit 2.0 (Clontech) oder das SuperSignal West HisProbe™ Kit verwendet. Hierbei bindet der an Biotin gekoppelte TALON® *Metal Affinity Resin* den His₆-Tag ähnlich der Affinitätsbindung des Tags an Ni²⁺-NTA. Die sekundäre Reaktion verläuft über eine Peroxidase die an Streptavidin gekoppelt ist und so an das Biotin bindet. Detektiert wird ebenfalls über eine ECL-Detektion, die jedoch in den Kits enthalten ist.

3.2.10 N-terminaler Edman-Abbau und Massenspektrometrie

Da man bei einer SDS-PAGE nur durch die Größe der Bande auf die Identität des Proteins schließen kann, eignet sich die N-terminale Sequenzierung durch einen Edman-Abbau um Proteine eindeutig zuzuordnen zu können. Hierzu werden die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert und immobilisiert. Nitrocellulose eignet sich hierfür nicht, da sie einem Edman-Abbau nicht standhält. Nach dem Western-Blot wird die Membran in PVDF-Färbemittel geschwenkt (ca. 60 min), anschließend durch PVDF-Entfärbemittel entfärbt (ca. 60 min) und über Nacht in ddH₂O inkubiert. Die Banden von Interesse werden dann ausgeschnitten und in Eppendorf Cups überführt. Die eigentliche Sequenzierung (N-terminaler Edman-Abbau) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Deutzmann (Universität Regensburg) übernommen, später dann von der Firma Proteome Factory in Berlin durchgeführt. Die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Deutzmann führte auch die Massenbestimmung der Proteine mittels MALDI-TOF/TOF durch. Durch diese massenspektrometrische Methode, konnte die molekulare Masse der Proteine exakt bis auf 0,1 Da bestimmt werden.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Analytische Gelfiltration (SEC)

Um die molekularen Massen von Makromolekülen zu bestimmen gibt es mittlerweile eine Vielzahl von analytischen Methoden wie die Massenspektrometrie, Dynamische Lichtstreuung, Analytische Ultrazentrifugation, Gelfiltration, und viele mehr. Da die analytische SEC leicht in einem Labor mit einem ÄKTA™ Chromatographie-System zu etablieren ist, wird diese im Zuge der Protein Aufreinigungen automatisch integriert. Sie bietet die Möglichkeit Protein-Protein Interaktionen zu studieren, den Polymerzustand eines Moleküls und dessen Größe abzuschätzen. Bei dieser Methode wandern die Moleküle mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit durch die Matrix einer SEC-Säule und werden dabei auf Grund ihrer Größe aufgetrennt. Große Moleküle eluieren hierbei zuerst. Der erste Schritt ist stets die Eichung (Abb. 3-8) der gewünschten Säule, die zuvor gereinigt und mit dem vorhergesehenen Puffer equilibriert wurde. Zur Eichung der Säule dient das *LMW Gel Filtration Calibration Kit* (GE Healthcare). Wichtig ist hierbei, die auf die Eichung folgenden SEC-Läufe stets unter exakten Bedingungen in Bezug auf die Probenbeladung, Fließgeschwindigkeit, und Pufferbedingungen durchzuführen, da sich sonst ungewollte Verschiebungen im Retentionsvolumen zeigen.

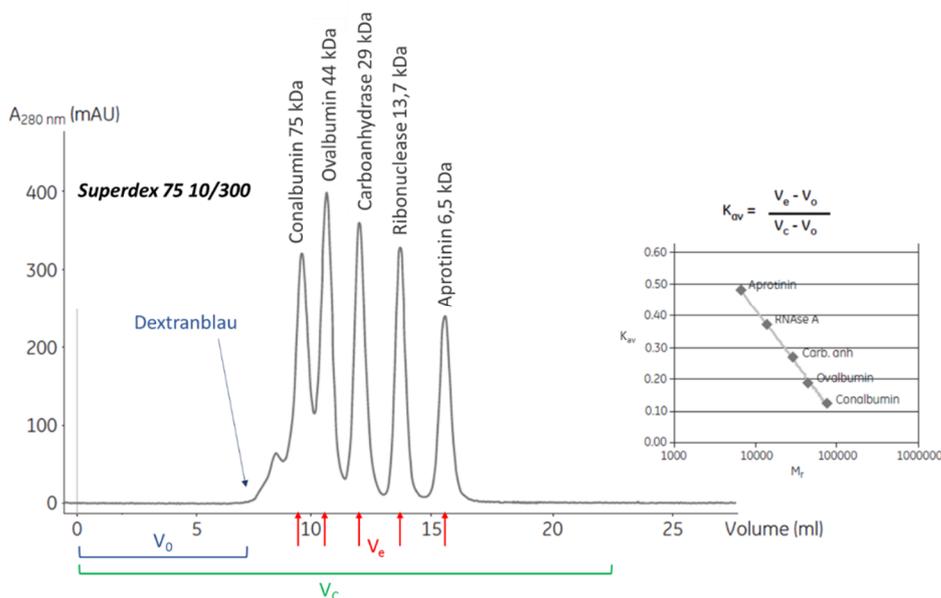


Abbildung 3-8: Eichspektrum einer Superdex 75 10/300 Gelfiltrationssäule und der mittels K_{av} angefertigte Eichgerade [LMW Gel Filtration Calibration Kit]

Detektiert werden die Proteine bei 280 nm, V_0 wird mittels Dextranblau bestimmt und ist das sogenannte Nullvolumen der Säule, V_c ist hierbei das Gesamtvolumen der Säule und V_e das Elutionsvolumen der einzelnen Proteine. Mittels dieser Werte kann K_{AV} berechnet werden und halblogarithmisch gegen das Molekulargewicht aufgetragen, ergibt sich die Eichgerade (rechts im Bild).

3.4.2 Pulldown Experimente

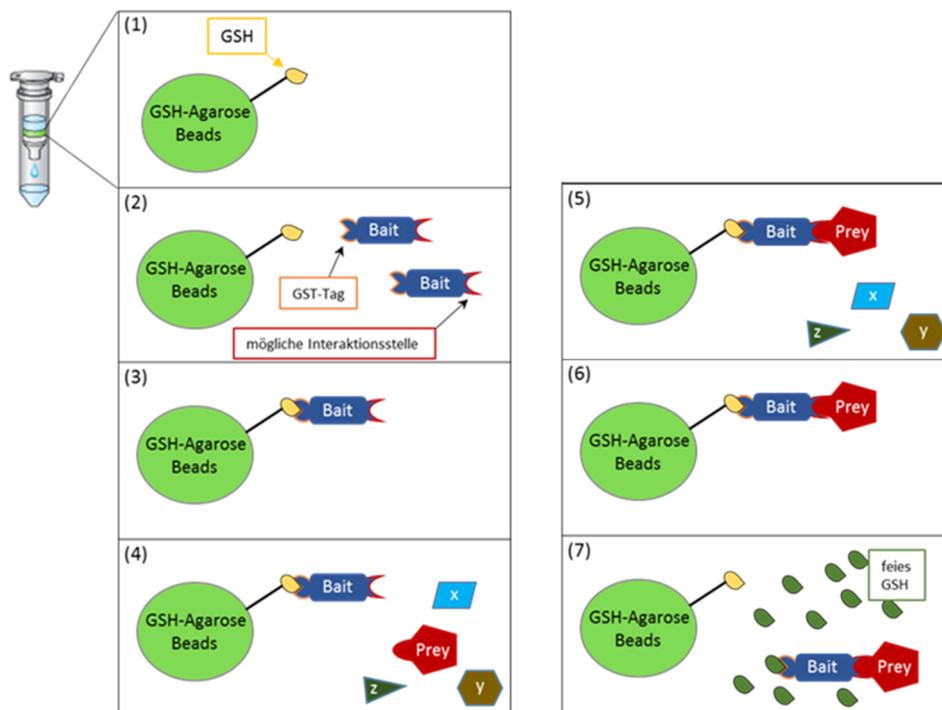


Abbildung 3-9: Schematische Übersicht über den Ablauf eines GST-Pulldowns

Das Pulldown-Verfahren entspricht im Prinzip einer Affinitätschromatographie (Abb. 3-9). Ein Protein wird mittels Affinitätstag an eine equilibrierte Matrix (1) koordiniert (2) (*Bait*-Protein) und gewaschen (3). Eine Lösung aus möglichen Bindepartnern (*Prey*-Protein) wird zugegeben (4) und einen gewissen Zeitraum inkubiert (5). Kommt es zu einer Interaktion des *Bait*-Proteins mit einem *Prey*-Protein aus der Lösung (5), so wird dieses im folgenden Waschschrift nicht von der Matrix eluiert (6). Erst durch die Verdrängung des Affinitätstags löst sich der *Bait-Prey*-Komplex von der Matrix und wird eluiert. Diese Methode erlaubt es nach unbekanntem Protein-Protein-Interaktionen zu suchen, oder bereits bekannte Interaktionen zu charakterisieren. Ähnlich funktioniert auch die Methode der Co-Immunopräzipitation, bei der jedoch mit Antikörpern statt Affinitätstags gearbeitet wird. Sehr einfach und funktionell ist hierbei das Pierce™ GST-Spin-Purification Kit, jedoch kann die Technik auf jeden gewollten Maßstab übertragen werden. Zu Beginn wird das *Bait*-Protein in einer 200 ml *E. coli*-Kultur gemäß den etablierten Bedingungen exprimiert und die Bakterien-Pellets werden zu je 4 x 45 ml Aliquots weggefroren. Daraufhin erfolgt eine standardmäßige Affinitätsaufreinigung dieser exprimierten GST-Proteine über eine 0,2 ml GST-Spin-Säule, um die Bindungseigenschaften und die Beladungskapazität des *Bait*-Proteins an der GSH-Matrix zu bestimmen. Die *Prey*-Proteine, die durch einen GST-Pulldown auf eine Interaktion hin überprüft werden sollen, dürfen über keine

GSH-Affinität verfügen und werden mittels His₆-Affinität aufgereinigt. Das bietet wiederum den Vorteil eine schwache Interaktion auch durch einen Western Blot (SuperSignal West His-Probe™ Kit) detektieren zu können. Ansonsten erfolgt die Analyse einer Interaktion durch SDS-Page. Getestet wird hierbei die Interaktion zwischen zwei rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteinen. Bis hin zur Interaktionsreaktion können die einzelnen Schritte mit einer Tischzentrifuge durchgeführt werden, ab der Zugabe des Interaktionspartners erfolgen die Schritte nur noch mittels *gravity flow*. Die benötigte Anzahl an Spin-Columns (pro getesteter Interaktion eine Säule) müssen equilibriert werden. Hierfür wird durch Zentrifugation bei 300 g und 4 °C für ca. 60 s der Lagerungspuffer (20% EtOH) entfernt. Danach werden die Spin-Säulen, ebenfalls bei 300 g und 4 °C für 60 s; 2-mal mit dem gewünschten Puffer (GSH-BP) equilibriert. Daraufhin wird das Zellysate des *Bait*-Proteins (der weggefrorenen 45 ml Pellets) auf die Säule gegeben, das maximale Volumen der Säulchen beträgt 500 µl. Dieser Schritt kann wiederholt werden, bis die maximale Beladung der Säule erreicht ist. Infolgedessen wird die Säule 3-mal mit 500 µl des gewünschten Interaktionspuffers gewaschen. Die auf eine Interaktion hin zu testenden *Prey*-Proteine müssen, falls noch nicht der Fall, im passenden Interaktionspuffer vorliegen und werden dann in gewünschter Konzentration auf die entsprechenden Säulchen gegeben. Die Inkubation erfolgt für 30 min bis hin zu mehreren Stunden bei der gewünschten Temperatur (4 °C bis 37 °C). Im Anschluss an die Inkubationsphase lässt man den überschüssigen Puffer mittels *gravity flow* aus der Säule fließen und wäscht durch sanfte Zugabe des Puffers anschließend 3-5mal mit dem Interaktionspuffer. Im letzten Schritt werden die Proteine mit GSH-EB von der Säule verdrängt. Das Elutionsvolumen variiert je nach Konzentration zwischen 50 und 200 µl. Die Elution erfolgt wieder mittels Zentrifuge bei 300 g und 4 °C für ca. 60 s. Bei jedem einzelnen Schritt werden Proben entnommen und mittels SDS-Page oder Westen-Blot analysiert [Nature protocol, 2004 / Nature protocol, 2006 / Wissmueller, 2011].

3.4.3 Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance* / NMR)

3.4.3.1 Grundlagen der NMR

Das Phänomen der magnetischen Kernresonanz (*Nucleic Magnetic Resonance*) beruht auf der Wechselwirkung eines Atoms, welches einen Kernspin besitzt, mit einem externen magnetischen Feld. Zur vollständigen Erklärung eines Kernspins bedarf es der Quantenphysik. Der vorgestellte Exponent gibt die Massenzahl (Protonen und Neutronen) eines Kerns wieder.

Tabelle 3-13: Übersicht über die wichtigsten Kerne und Isotope der NMR

Protonenzahl Z	Neutronenzahl N	Kernspinquantenzahl I	Beispiel	Natürliche Häufigkeit [%]	Relative Empfindlichkeit
gerade (g)	ungerade (u)	1/2	¹ H	99,985	1,0
ungerade	ungerade	1	² H	0,015	
gerade	gerade	0	¹² C	98,90	
gerade	ungerade	1/2	¹³ C	1,108	0,0159
ungerade	ungerade	1	¹⁴ N	99,634	
ungerade	gerade	1/2	¹⁵ N	0,366	0,0000104

Vereinfacht sind sogenannte g,g Kerne kernresonanzinaktiv, u,g/g,u ($I = 1/2$) und u,u ($I = 1$) aktiv. (Daten aus „Bruker Almanac 2014“).

Zum Verständnis [Pascal, 2008] genügt es aber zu wissen, dass wenn I ungleich 0 ist, der Kern ein magnetisches Moment μ besitzt und daher mit einer Präzession (ν_0) des Kernspins um die Magnetfeldachse B_z des äußeren statischen Magnetfeldes B_0 rotiert (Abb. 3-10).

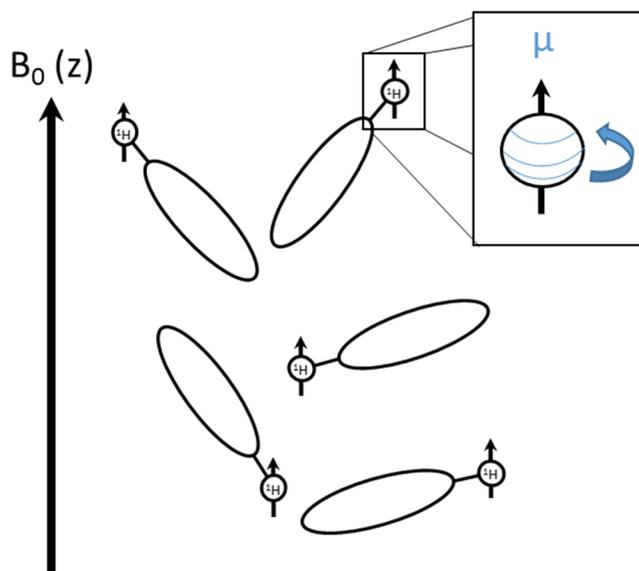


Abbildung 3-10: Schematische Darstellung des magnetischen Moments μ

Schematische Darstellung eines Moleküls mit nur einem einzigen Proton (¹H) und sein Verhalten in einem magnetischen Feld (B_0).

Das magnetische Moment (μ) wird durch den Drehimpuls L und eine Kernkonstant γ (Gyromagnetisches Verhältnis) charakterisiert (Abb. 3-11). γ beschreibt wie schnell die Kernspins auf Grund von μ um B_z des äußeren statischen Magnetfeldes B_0 präzidieren. Die einfachste Vorstellung ist, man hat eine Lösung aus 10^{20} Molekülen die nur ein einziges Proton (^1H) tragen. Alle Moleküle spüren quasi die gleiche Umgebung und es würde genau ein Signal im NMR-Spektrum erscheinen. Was passiert mit den Ohne ein äußeres Magnetfeld sind die Kernspins zufällig ausgerichtet, überführt man die Lösung in ein Magnetfeld, richten sich die Kernspins, (vereinfacht) wie Kompassnadeln mit dem Magnetfeld (B_0) in (z)-Ebene aus. Der Einfluss von Drehimpuls (L), Quantelung der Spin-Orientierung (in (+z) und (-z) Richtung) und der Einfluss thermischer Energie machen das ganze komplizierter. Anders als eine Kompassnadel rotieren die Kernspins im magnetischen Feld und deren Masse erzeugt einen Drehimpuls, ähnlich wie ein Kreisel mit einem konstanten Präzisionswinkel Θ bezogen auf B_0 .

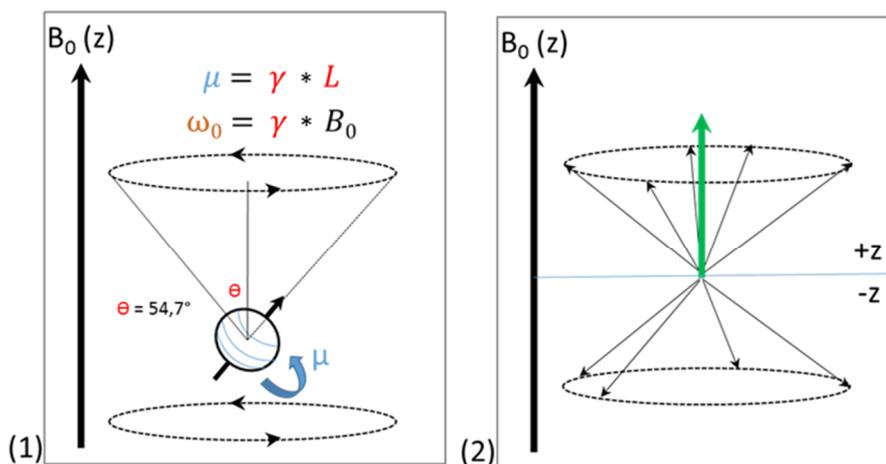


Abbildung 3-11: (1) Drehimpuls und (2) Zeeman-Effekt

Die Quantenmechanik gibt vor, dass ein Spin (1/2) zum Beispiel des ^1H , oder einfach Proton genannt, nur in einer von zwei Orientierungen gegenüber z: $54,7^\circ$ auftreten kann, *spin up* (+1/2 in der (+z) Richtung) oder *spin down* (-1/2 in der (-z) Richtung). Eine typische Probe enthält viele verschiedene Spins, wobei jeder von ihnen auf einer zufälligen Position eines nach oben (+z) oder eines nach unten (-z) gerichteten Kegels liegt (Abb. 3-11) und mit der Larmorfrequenz ω_0 rotiert. Die Spins in (+z) Richtung (*spin up*) repräsentieren jedoch die Konfiguration mit einem etwas niedrigerem Energielevel und sind daher etwas stärker besetzt, das bedeutet das einer aus einer Millionen mehr in (+z) Richtung orientiert ist. Dieses Verhältnis ist jedoch von γ abhängig. Die Präzision innerhalb dieser Kegel kann nicht gemessen werden und kein Spin richtet sich nach (z) aus, sondern die **Netto-Magnetisierung** richtet sich nach (+z) aus,

fast die Hälfte der Spins liegt in (-z) Richtung. In einem Spektrometer mit der Feldstärke von 18,8 Tesla, beträgt die Präzisionsrate für ein Proton ca. 800 MHz, daher auch die klassische Bezeichnung der NMR-Spektrometer. Um die Präzision messen zu können, muss das System aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Dazu kann man die Netto-Magnetisierung in die y-Ebene auslenken und die Präzision um die z-Achse messen. Diese ist im Normalfall etwas geringer als 800 MHz. Dieser Unterschied wird als chemische Verschiebung (*chemical shift*) bezeichnet und gibt einen Hinweis auf die chemische Umgebung des Protons. Diese chemischen Verschiebungen sind relativ klein, generell ein Millionstel der totalen Präzisionsrate und werden daher in *parts per million* (ppm) angegeben. Diese Einheit ist somit auch unabhängig von der Feldstärke des Spektrometers. 2 ppm entsprechen an einem 800 MHz Spektrometer $2 \cdot 800 \text{ Hz}$, also 1600 Hz.

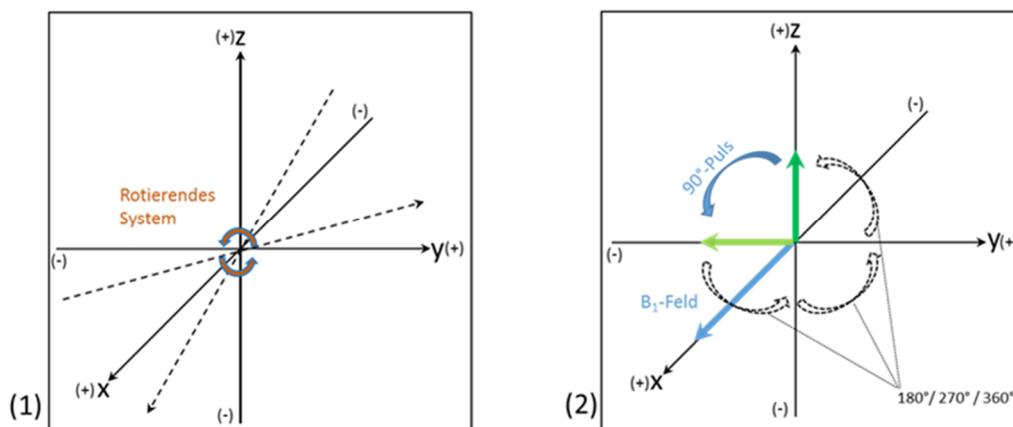


Abbildung 3-12: Veranschaulichung des rotierenden Systems (1) und der Auswirkungen eines 90°-Puls (2)

Betrachtet man das Koordinatensystem (x, y, z) als ein rotierendes System (*rotating frame*), wobei die x - und y -Achsen um die z -Achse mit exakt der Präzisionsrate des Protons rotieren (Abb. 3-12), so steht der Spin quasi still und B_0 kann ignoriert werden. Daraufhin wird kurzfristig durch einen elektromagnetischen Impuls quasi ein zweites magnetisches Feld B_1 rechtwinklig zu B_0 induziert, beispielsweise entlang der $(+z)$ -Achse. Legt man das B_1 -Feld entlang der x -Achse an, rotiert der Spin unabhängig von B_0 in der x -Ebene (in Richtung $-y/-z/+y/+z$). Legt man B_1 in die y -Ebene rotiert der Spin von $+x/-z/-x/$ nach $+z$. Die Dauer eines B_1 -Pulses bei dem $\frac{1}{4}$ der Kreisbewegung absolviert wird nennt man 90°-Puls. Bezogen auf den *laboratory frame* (= festes Koordinatensystem) rotiert der Spin mit 800 MHz. Im rotierenden System jedoch entspricht die Präzisionsrate dem chemischen *shift*. Sind mehr als ein Proton in der

Probe, gibt es mehr als eine Präzisionsrate und somit mehrere Signale (*Peaks*) im NMR-Spektrum. Ein 800 MHz B_1 -Puls hat aber nur einen Einfluss auf die Protonen, während ein 80 MHz B_1 -Puls nur Einfluss auf die ^{15}N -Kerne hat. Wird das B_1 -Feld wieder entfernt (Ende des Pulses), fangen die Spins (Netto-Magnetisierung) an, in ihren Gleichgewichtszustand (M_0) in der z-Ebene zurückzukehren = Relaxation. Diese Relaxation kann in zwei Klassen unterteilt werden. Im Gleichgewichtszustand gibt es eine Netto-Magnetisierung in z-Ebene (**1**) und keine Magnetisierung (**2**) in x und y-Ebene. Wurden die Spins durch einen 90° -Puls ausgelenkt, relaxieren sie in diesen Zustand zurück. Die Rate mit der die z-Magnetisierung in ihren Ursprung zurückkehrt ist R_1 und wird durch die Zeitkonstante T_1 charakterisiert. Die Rate mit der die x, y-Magnetisierung gegen Null geht heißt R_2 und wird durch die Zeitkonstante T_2 charakterisiert. Die T_1 -Relaxation wird auch als Longitudinale Relaxation, die T_2 -Relaxation als transversale-Relaxation bezeichnet. T_1 und T_2 sind nicht komplett unabhängig voneinander und ihre Beziehung kann ansatzweise so beschrieben werden, $T_2 \leq T_1$. Hat man nun zwei voneinander unabhängige Protonen in seiner Lösung, ergeben diese zwei unabhängige Signale mit gleicher Intensität. Sind die zwei Spinsysteme aber im gleichen Molekül über kovalente Bindung gekoppelt, so beeinflussen sich die beiden gegenseitig und die Signale spalten in ein Doublet. Dieses Phänomen bezeichnet man als J-Kopplung (Abb. 3-13).

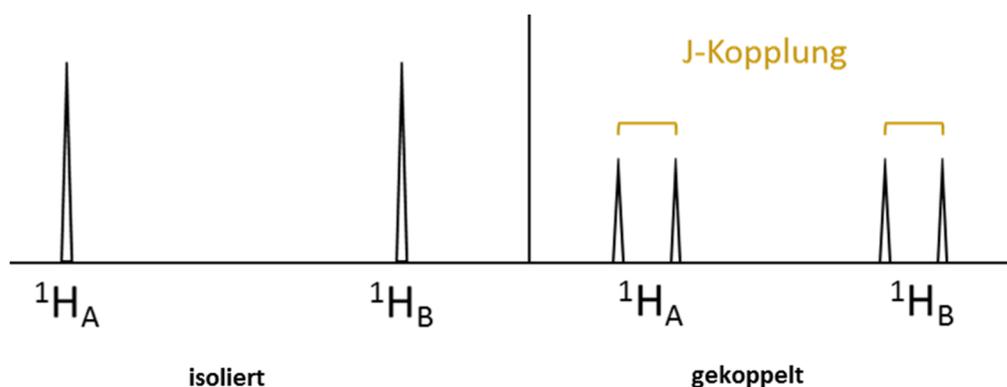


Abbildung 3-13: Beispiel einer einfachen J-Kopplung zwischen H_A und H_B

Der Zustand eines Kernspins hat ebenfalls einen Einfluss auf die Elektronen die ihn umgeben. Diese haben wiederum einen Einfluss auf die sie umgebenden Kernspins. Dieser Einfluss bezieht sich auf Systeme die sich Elektronen teilen und erstreckt sich über drei, maximal vier konjugierte Bindungen. Betrachtet man ein Amid-Proton, ein ^1H das kovalent an einem ^{15}N gebunden ist, beispielsweise in einer Peptidbindung, so liegen die Netto-Magnetisierungen beider im Gleichgewicht in der z-Ebene. Gibt man nun einen 800MHz / 90° Puls auf das System,

so wird nur die Netto-Magnetisierung der ^1H -Kerne ausgelenkt. Zu diesem Zeitpunkt gibt es zwei Populationen der γ -Magnetisierung der ^1H -Kerne. Eine, die an die ^{15}N -Kerne des oberen „Kegels“ assoziiert ist (A), und die andere, die an die ^{15}N -Kerne des unteren „Kegels“ assoziiert ist (B) (Abb. 3-11). Die Netto-Magnetisierung der ^{15}N -Kerne im oberen Kegel ist etwas größer als die im unteren Kegel, wodurch die ^1H -Kerne die an den oberen Kegel assoziiert sind ein etwas stärkeres Magnetfeld spüren und somit etwas schneller rotieren. Die ^1H -Kerne im unteren Kegel etwas langsamer. Das Resultat ist ein Doublet im Spektrum mit der chemischen Verschiebung von ^1H im Zentrum und die beiden Signalen links und rechts davon entsprechend den beiden Zuständen (± 46 Hz). Diese Trennung nennt man J-Kopplung. In diesem Fall eine Kopplung über eine Bindung zwischen ^1H und $^{15}\text{N} = {}^1J_{\text{HN}}$.

Diese ${}^1J_{\text{HN}}$ kann genutzt werden um eine Magnetisierung (via INEPT = *Insensitive Nucleus Enhanced by Polarisation Transfer Pulse Sequenz*) vom ^1H auf den ^{15}N zu transferieren. Effekte eines 180° -Puls der in der Hälfte der Wartetdauer der Evolutionszeit eingesetzt wird:

- 1) Die Evolution der chemischen Verschiebung wird für die Kerne für die der Puls bestimmt ist refokussiert.
- 2) Die Evolution der chemischen Verschiebung wird auf Grund von J-Kopplung zweier gekoppelter Kerne refokussiert.
- 3) Ein fixieren der Verschiebungs-Evolution mittels J-Kopplung, wenn für beide Kerne ein Puls gegeben wird.

Diese INEPT-Technik kann genutzt werden, um eine indirekte ^{15}N -Magnetisierung zu erzeugen und bietet zwei Vorteile. Erstens ist das gyromagnetische Verhältnis von ^1H zu ^{15}N ca. 10-mal größer. Das hat zur Folge, dass die Anregung der ^{15}N -Kerne ca. 10-mal stärker ausfällt. Zudem kommt es neben der Verstärkung der Präzisionsfrequenz auch zu einer unterschiedlichen Populationsverteilung. Im Gleichgewicht sind $1/1.000.000$ ^1H und $1/10.000.000$ ^{15}N im oberen Kegel. Wird die Netto-Magnetisierung von ^1H auf ^{15}N übertragen, so befinden sich danach 10-mal mehr ^{15}N im angeregten Zustand und die Signalstärke nimmt zu.

3.4.3.2 Probenpräparation

Die zu untersuchenden Protein Proben werden in möglichst hoher Konzentration und Reinheit hergestellt (Kapitel 3.2). Für eine Messung (Norell 5mm Probenröhrchen im TCI-Cryoprobenkopf / TXI-Cryoprobenkopf) benötigt man mindestens 500 µl, am besten jedoch 600 µl an Probenvolumen, um keine Interferenzen im Magnetfeld zu verursachen.

Tabelle 3-14: Probenzusammensetzung

Probenvolumen	Proteinprobe	Standard
500 µl	475 µl	25 µl
600 µl	570 µl	30 µl

Der Standard setzt sich aus 2,5 mM Natriumazid, gegen bakterielles Wachstum in der Probe, 50 - 100 µM DSS, dem interner Standard und 5-10% D₂O (Locksignal) zusammen.

Die Proben werden durch invertieren gut gemischt und durch kurzes zentrifugieren auf den Boden des Probenröhrchens gebracht. Danach werden sie (sauber) in den Spinner des Probenlifts, gemäß der Probenkopf-Spulenhöhe eingesetzt und können daraufhin in das Spektrometer platziert werden. Dort müssen sie sich zunächst 5 bis 10 min auf die eingestellte Temperatur equilibrieren, um dann vermessen werden zu können.

3.4.3.3 Messungen

Zu Beginn jeder neuen Messung, das bedeutet die Probe wird in das Spektrometer eingesetzt (auch wenn die Probe nur kurz entnommen wurde), müssen die Parameter des Spektrometers neu eingestellt und bestimmt werden. Zu Beginn wird das Locksignal (H₂O/D₂O 20:1) detektiert („ge-lockt“), dieses hält das Magnetfeld konstant. Daraufhin wird „ge-tuned“ und „ge-matched“, das bedeutet die Frequenzen für den verwendeten Kern werden justiert. Danach wird „ge-shimt“, somit wird das Magnetfeld des Probenkopfes durch magnetische Shim-Spulen so homogen wie möglich eingestellt. Nach diesen Einstellungen kann der B₁ -90° Puls für die folgenden Messungen bestimmt werden. Weitere Parameter müssen je nach verwendetem Pulsprogramm eingestellt werden.

Das einfachste NMR-Experiment ist ein 1D-Spektrum und besteht aus zwei Phasen, der Präparation und der Detektion (Abb. 3-14). Bei der Präparation wird das Spinsystem in einen definierten Zustand gebracht, die Antwort hierauf wird während der Detektions-Phase wahrgenommen. Nach dem 90°-Puls präzidieren die Kernspins mit ihrer Larmor-Frequenz um die z-Achse und induzieren in einer sogenannten Empfängerspule eine Spannung, die detektiert wird. Durch Relaxation nimmt diese Spannung ab und wird daher als freier Induktionsabfall

bezeichnet („free induction decay“ / FID). Das Experiment kann dann nach entsprechender Wartezeit wiederholt werden. Die Daten der einzelnen Messungen können zur Signalverbesserung aufaddiert werden. Die aufgenommenen FID-Daten können zusätzlich noch mit einer Fensterfunktion multipliziert werden, um die Auflösung oder die Empfindlichkeit des Spektrums zu erhöhen. Die Fourier-Transformation (FT) erzeugt dann aus der Zeitdomäne (FID) die Frequenzdomäne und somit das Spektrum.

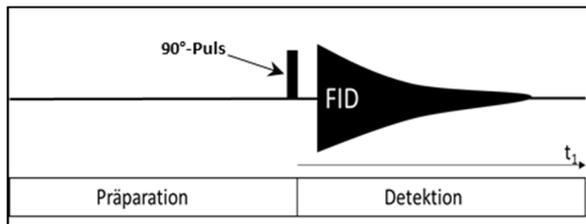


Abbildung 3-14: Schematische Darstellung eines 1D-NMR Experiments [Lottspeich, 2006]

Der 90°-Puls ist als schwarzer Balken gekennzeichnet, FID steht für *free induction decay* des Signals.

1D-Spektren

Für eindimensionale (1D-) Spektren werden die BRUKER-Pulsprogramme **zgpgw5**, welches eine Watergate Pulssequenz zur Unterdrückung des Wassersignals hat, sowie ein entkoppeltes **noesygpr1d** verwendet. Anhand der 1D-Spektren kann die Faltung des vorliegenden Proteins abgeschätzt, die Probe hin auf Verunreinigungen untersucht und auch die Konzentration validiert werden (Abb. 3-15).

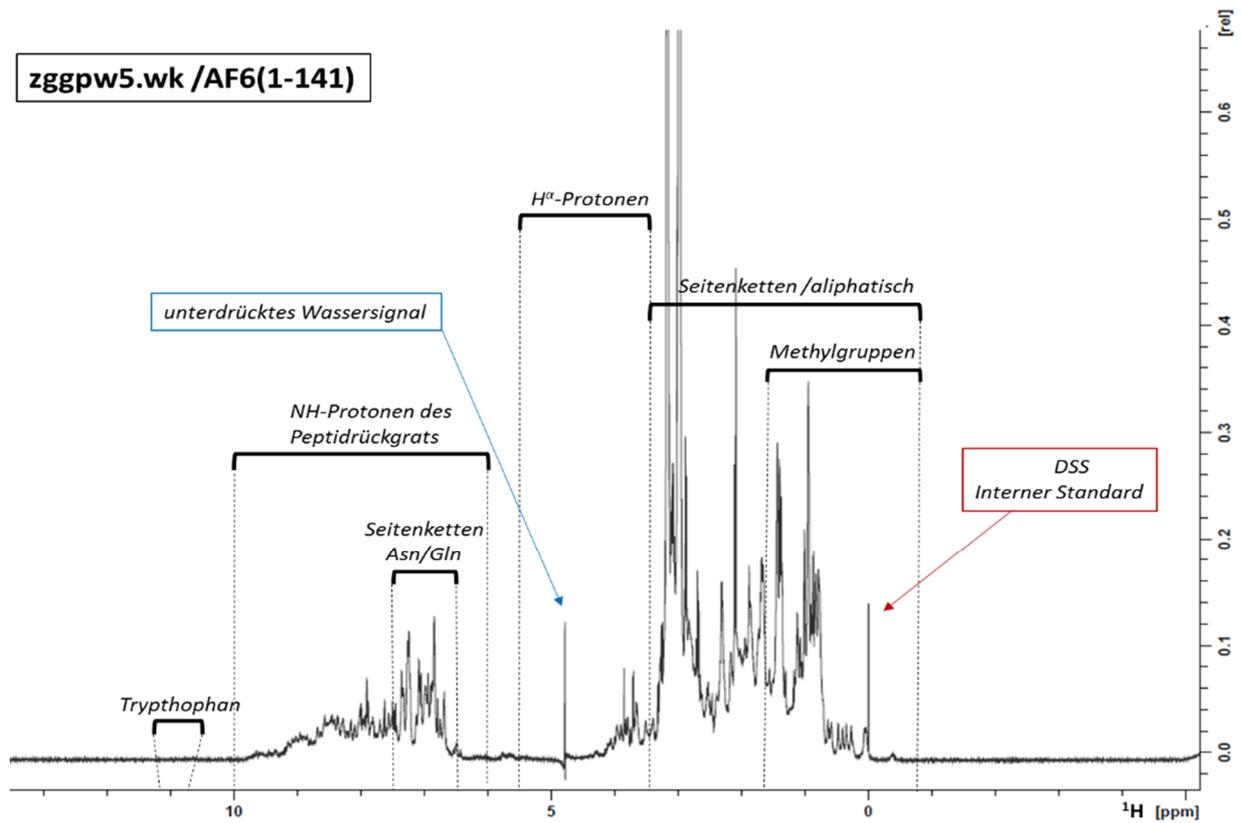


Abbildung 3-15: Übersicht über verschiedenen Bereiche eines 1D Spektrums von AF6(1-141)

Die einzelnen Signalbereiche und ihre Ursprünge sind teilweise markiert, das Wassersignal wird beim zggpw5 unterdrückt (blauer Kasten), die Eichung erfolgt über den internen Standard (roter Kasten).

2D-Spektren

Die Spins können nach der Präparation für eine bestimmte Zeit (t_1) frei präzidieren. Durch die Mischsequenz wird der Zustand der Magnetisierung am Ende von t_1 abgefragt und zusätzlich die Magnetisierung vom ersten Kern auf den zweiten übertragen. Nach FT in der t_2 -Richtung (direkte Dimension) erhält man mehrere gewöhnliche 1D-Spektren, die einer Momentaufnahme zur Zeit t_1 (indirekte Dimension) entsprechen.

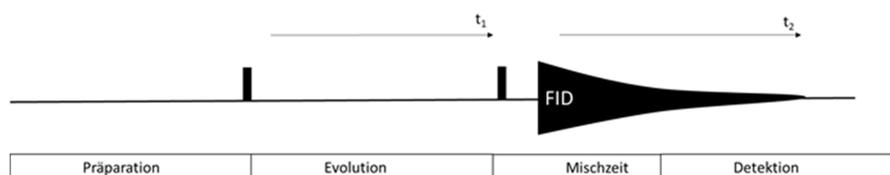


Abbildung 3-16: Schematische 2D-Pulsfolge [Lottspeich, 2006]

Der 90°-Puls ist als schwarzer Balken gekennzeichnet, FID steht für *free induction decay* des Signals.

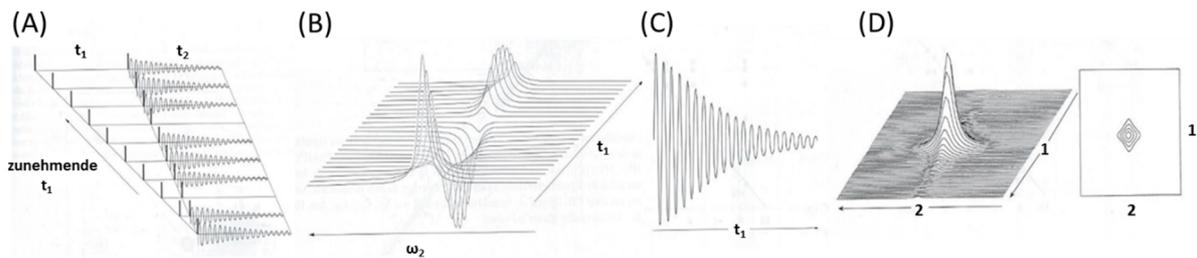


Abbildung 3-17: Entstehung eines 2D-Spektrums durch zweidimensionale Fourier-Transformation der Messdaten [Lottspeich, 2006]

Inkrementierung der t_1 -Zeit führt zu einem schrittweisen abtasten der indirekten Zeitdomäne (A). Nach FT in t_2 , entsteht eine Serie von 1D-Spektren, die durch t_1 moduliert sind (B). Einfacher FID in der indirekten Zeitdomäne (C). Nach FT auch der indirekten Zeitdomäne (t_1) entsteht eine zweidimensionale Absorptionslinie (Kreuzsignal) in dreidimensionaler Darstellung und als Konturplot mit Höhenlinien (D).

Für zweidimensionale (2D-) Spektren werden die BRUKER-Pulsprogramme *hsqcetfpf3gpsi*, *hsqcetf3gp* sowie *trosetf3gp* [Steiner, 2001] verwendet.

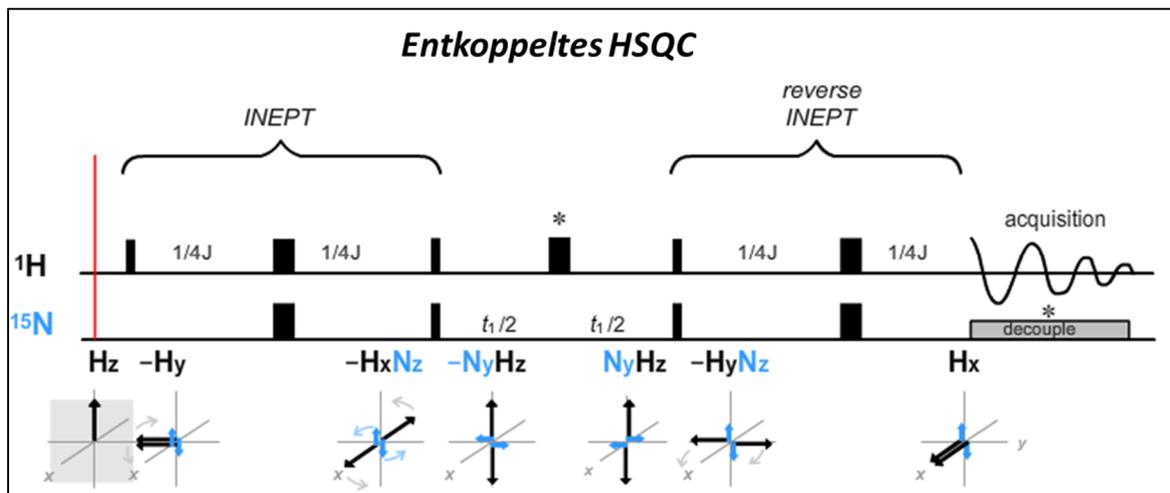


Abbildung 3-18: Überblick über die Pulsfolge eines entkoppelten HSQC-Spektrums [Pascal, 2008]

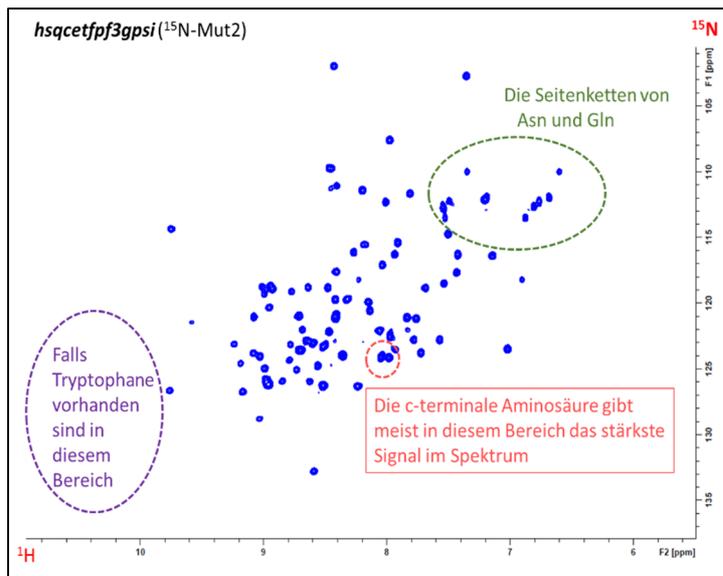


Abbildung 3-19: Übersicht eines HSQC-Spektrums von ^{15}N -MUT2

Charakteristische Signalverteilungen sind farblich markiert, die Seitenketten der Tryptophane (Trp/W), falls vorhanden in lila, die Seitenketten von Asparagin (Asn/N) und Glutamin (Gln/Q) in grün und die C-terminale Aminosäure in rot.

^1H - ^{15}N - Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) zeigen die Korrelationen zwischen allen ^1H - und ^{15}N -Kernen der Amidgruppen eines Proteins. Man erhält für fast alle Aminosäuren, außer den Prolinen des Proteins ein Signal. Auch die Seitenketten der Tryptophane, Asparagine, Glutaminen, Arginine und Lysine können im HSQC-Spektrum Signale liefern. Somit erhält man mit einem HSQC-Spektrum einen NMR-Fingerabdruck des entsprechenden Proteins in dem vorliegenden Puffer bei entsprechender Temperatur und Druck (Abb. 3-19). Legt man nun ein Isotopen-markiertes Protein (^{15}N) in einem Experiment vor und gibt Interaktionspartner oder reaktive Substanzen hinzu, so kann man die stattfindenden Ereignisse auf atomarer Ebene verfolgen. Bei der Durchführung eines Titrationsexperimentes wird zunächst ein Referenzspektrum des vorgelegten (^{15}N -markierten) Proteins (A) in der gewünschten Endkonzentration durchgeführt. Dieses dient als Ausgangsspektrum und spiegelt den ungebundenen Zustand des Proteins wieder. Eine zweite Probe mit der maximal gewünschten Konzentration an Bindepartner (B) und der eingestellten Konzentration (A) wird hergestellt und die Messreihe durch Verdünnung mit der eingestellten Proteinlösung (A) schrittweise durchgeführt und vermessen. Somit wird die Konzentration des detektierbaren Proteins (A) konstant gehalten und die Effekte des Bindepartners Schritt für Schritt verringert. Die beteiligten Proteine befinden sich stets im exakt gleichen Puffer (durch gemeinsame Dialyse gewährleistet) und

die Konzentrationen sind mittels NMR überprüft. Somit lassen sich Pufferartefakte und Verdünnungsartefakte während der Messreihe ausschließen.

Ein *Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy* (TROSY) NMR-Experiment ermöglicht es in starken Magnetfeldern (ab 800 MHz) auch große Proteine zu untersuchen. Im Falle eines HSQCs kommt es bei großen Molekülen, über 30 kDa, auf Grund der dipolaren Kopplung zu einer starken Linienverbreiterung und somit zum Verlust des Signals. Bei einer TROSY-Messung wird die Linienbreite bei großen Proteinen drastisch verkürzt. Durch die Wechselwirkung von Anisotropie der chemischen Verschiebung und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen entsteht eine kreuzkorrelierte Relaxation, welche auf die Relaxationsraten der einzelnen Multipllett-Komponenten zurückzuführen ist. Dadurch entsteht nur ein scharfes Signal im Spektrum, die restlichen 3 Signale des Multipletts sind verbreitert und werden nicht detektiert.

3D-Spektren

Durch die Einführung einer weiteren Dimension gelangt man zur 3D-NMR-Spektroskopie. Hierbei wird statt der Detektion nach der ersten Mischzeit, eine weitere indirekte Evolutionszeit, gefolgt von einer zweiten Mischzeit implementiert. Hierzu benötigt man jedoch drei NMR-sensitive Kerne, wie zum Beispiel ^1H , ^{13}C und ^{15}N . Mit Hilfe von Tripel-Resonanzexperimenten lassen sich wichtige Informationen für die Strukturaufklärung der Proteine sammeln. Für dreidimensionale (3D-) Spektren werden typischerweise die BRUKER-Pulsprogramme *hncogpwg3d*, *hncagpwg3d* und *cbcaconhgpwg3d* verwendet.

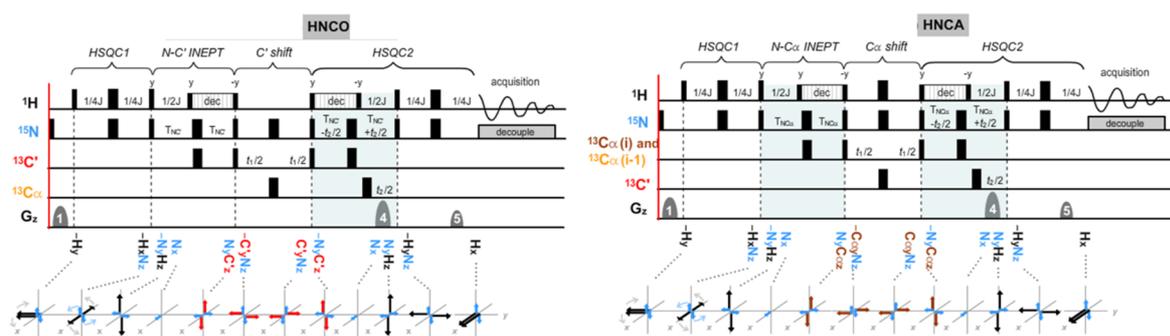


Abbildung 3-20: Überblick über die Pulsfolge eines HNC0 und HNCA [Pascal, 2008]

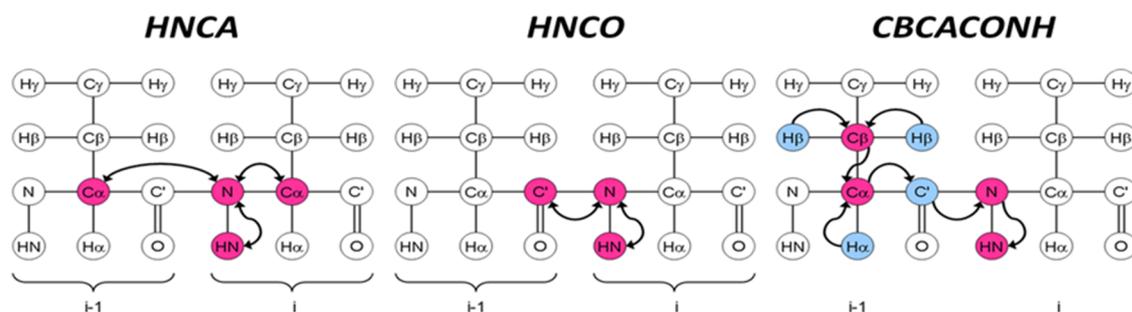


Abbildung 3-21: Übersicht über den Magnetisierungstransfer der Trippelresonanzexperimente [<http://www.protein-nmr.org/>]

Mit Hilfe dieser drei Experimente (Abb. 3-21) lassen sich die Signale der 2D-HSQC-Spektren sequentiell zuordnen. Das HNCA-Experiment dient der sequentiellen Zuordnung des Proteinerückgrats, bedarf aber meist noch zusätzlicher Experimente (HNCO und CBCACONH). Hierbei wird das N-Atom mit dem eigenen C α -Atom und meist auch mit dem der vorhergehenden Aminosäure verknüpft [Lottspeich, 2006]. Prolinreste unterbrechen zum Beispiel diese Kette, da sie keine Amidprotonen besitzen. Anhand des HNCA Datensatzes kann man sich quasi durch die Aminosäuresequenz hangeln. Mithilfe der HNCO Experimenten kann man Entartungen und Mehrdeutigkeiten lösen. Das CBCACONH-Experiment schränkt hierbei eventuell bereits den Aminosäuretyp des Signals ein. ^{15}N -NOESY-HSQC und ^{15}N -TOCSY-HSQC Experimente sind die Basis für die sequenzspezifische Zuordnung der NMR-Signale. Die ^{13}C -Variante des Experiments ist wichtig für die Zuordnung der Seitenketten und für die Identifikation von Nuclear-Overhauser-Effekten (NOE) der Seitenketten. NOEs entstehen durch dipolare Wechselwirkungen der Kernspins durch den Raum, in erster Näherung proportional zu $1/r^6$. Eine Übertragung der Magnetisierung kann jedoch nur detektiert werden, wenn die Kerne weniger als 5 Å voneinander entfernt sind.

3.4.3.4 Auswertung der NMR-Daten

Die Prozessierung und Eichung der Spektren erfolgt mit dem Programm TopSpin 3.2 der Firma Bruker, mit dem auch die Bedienung der NMR-Spektrometer erfolgt. Zuerst findet die Eichung über den internen Standard (Signal auf Position 0 ppm gesetzt), dann eine Korrektur der Phase und der Baseline statt. Die Prozessierung erfolgt spezifisch für die gewünschte Auflösung, jedoch meist mittels einem Gauß- (GM) Filter auf (*time domain* der F2 Ebene) TD(F2) 8192 x 4096 (*time domain* der F1 Ebene) TD(F1) oder TD(F2) 4096 x 4096 TD(F1). Anschließende Analysen der Spektren erfolgen mit dem Programm Auremol (2.4.1. beta 2014). Hierbei werden die Signale markiert und die Volumina, Intensitäten und Linienbreiten durch das Programm bestimmt und in einer „Peak-Liste“ gespeichert. Diese Peak-Liste muss mit dem Programm Notepad++ modifiziert werden, bevor die Daten schließlich mit Excel 2013 geöffnet und analysiert werden können. Die zusätzliche Bestimmung der kombinierten chemischen Verschiebung (^1H und ^{15}N) „ Δ combined“ und δ_0^{corr} wird stets nach Schumann (2007) durchgeführt. Eine Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf die 3-D-Struktur der Proteine (PDB-Files) erfolgt mit dem Programm Chimera 1.9.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der rekombinanten Proteine

4.1.1 Die Konstrukte des Afadin 6

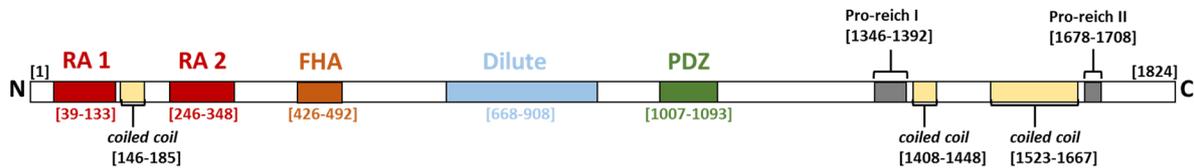


Abbildung 4-1: Schematischer Überblick über das Protein Afadin 6

Die einzelnen Domänen des Gerüstproteins sind farbig markiert und mit der zugehörigen Aminosäureposition versehen. RA = Ras-Assoziations-Domäne, FHA = *Fork head*-Domäne, Dilute = Dilution-Domäne, PDZ-Domäne und prolinreiche Regionen.

Das minimale, aktive Konstrukt der Ras-Assoziationsdomäne 1 wurde 1999 von Thomas Linnemann durch Yeast-2-Hybrid Experimente bestimmt und auf die Aminosäuren 1-141 eingegrenzt. Dieses Konstrukt wurde in der Arbeit von Guido Steiner aufgereinigt bezogen, später [Bäumel, 2008] in das pGEX4T1-Plasmid integriert und eigenständig exprimiert. Die Ausbeute des rekombinant hergestellten GST-AF6(1-141) Proteins, war zwar von hohem Reinheitsgrad, jedoch mit rund 2,4 mg/l für NMR Maßstäbe zu gering. Zusätzlich ergaben sich bei der gewählten Aufreinigungsmethode Probleme mit dem Abspalten des Affinitäts-Tags (GST-Tag) und der Entfernung des Tags aus der Probe. Daher wurde in dieser Arbeit das AF6 Konstrukt in das pET14b-Plasmid, ein modifiziertes pETSumo (optimierte *multiple cloning site*) Plasmid und ein modifiziertes pTac (ohne Sekretionssequenz) Plasmid kloniert. Jedoch zeigte nur das pET14b-System zufriedenstellende Ergebnisse. In den pETSumo und pTac-Ansätzen konnte keine Expression des gewünschten Konstruktes erzielt werden (daher im Weiteren nicht ausgeführt). Ebenso wurden die Prolin reichen Regionen I und II (Abb. 4-1) in pET14b kloniert, konnten jedoch nicht löslich exprimiert werden und waren daher für NMR-Interaktionsstudien nicht zugänglich.

4.1.1.1 Rekombinante Herstellung und Aufreinigung der Afadin 6 -Proteine

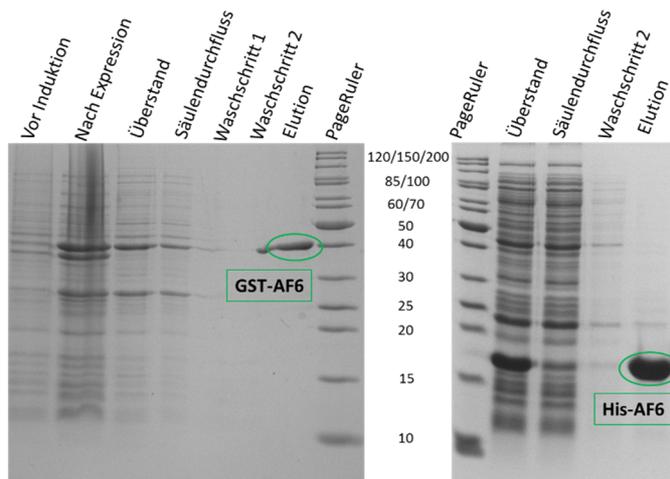


Abbildung 4-2: Vergleich der Expressionen von GST-AF6 (pGEX4T1) und His-AF6 (pET14b) eines 1 l-Ansatzes

Die gewünschte Bande des GST-/His₆-getaggten AF6 ist grün markiert. Der Größenstandard (kDa) ist mittig gelistet.

Die optimalen Expressionsbedingungen der einzelnen AF6-Konstrukte wurden durch Expressionstest ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass beide Konstrukte stabil bei 37 °C/ 180 rpm/über Nacht exprimiert werden konnten (100 µM/l IPTG). Beim GST-AF6-Konstrukt kommt es jedoch bei der Expression über Nacht zur Verpackung des Konstrukts in *Inclusion bodies*. Für unmarkierte ¹⁴N-Proben war dies kein Nachteil, da die Ausbeute durch die längere Expressionsdauer dennoch gesteigert werden konnte (5 mg/l), für markierte Proteine wurde jedoch nur maximal 6 h exprimiert. Die Ausbeute an His₆-AF6 war stets um ein Vielfaches größer, so dass bereits aus 1 l-Kulturvolumen millimolare Konzentrationen (unmarkiert > 30 mg/l, markiert ca. 15 mg/l) an His₆-AF6 aufgereinigt werden konnten. Auch die Methode der Aufreinigung konnte durch das Spin-Batch-Verfahren (Ni²⁺-NTA oder GSH-*Beads* in Spin-Säulen siehe Kapitel 3.2.3) in der Handhabung vereinfacht und in der Ausbeute maximal optimiert werden. Zusätzlich stellte sich während der Pulldown-Experimente heraus, dass das AF6-Konstrukt durch seine 5 zugänglichen Histidine über eine natürliche Affinität zu Ni²⁺-NTA verfügt und quasi frei vom His₆-Tag über dieses System aufgereinigt werden konnte.

4.1.1.2 Problematik des Thrombinverdaus des AF6-Konstruktes

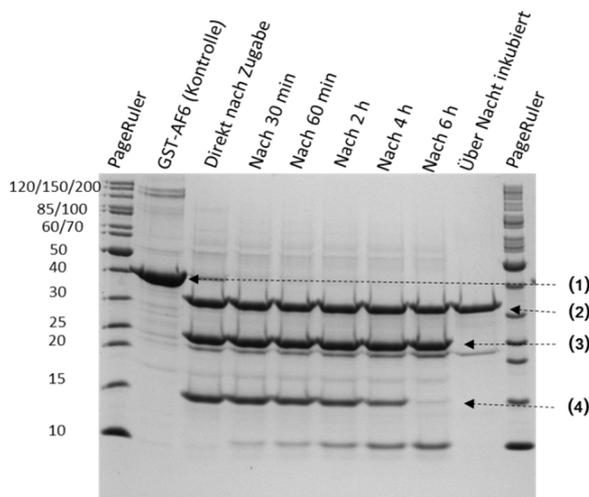


Abbildung 4-3: Verdautes des GST-AF6 Konstruktes mit einer überdosierten Thrombinlösung

Der Verdautes wurde bei Raumtemperatur (25 °C) mit einer Thrombinlösung = 2 Units/ μ l, ca. 200-fach stärker als üblich, durchgeführt und veranschaulicht die Degradation des AF6 Konstruktes durch die Serinprotease Thrombin oder deren Verunreinigungen. **(1)** GST-AF6 Kontrolle nach 24h Inkubation, **(2)** Thrombin, **(3)** GST-Tag (ca. 26 kDa) und **(4)** freies AF6 (ca. 16 kDa). Links ist der Größenstandard (kDa) angegeben.

Da der Affinitätstag bei einigen Experimenten störend war, musste dieser durch Abspaltung über eine Protease Schnittstelle vom Protein entfernt werden. Dies geschieht bei Proteinen, die durch die Plasmide pGEX4T1 und pET14b hergestellt werden, mittels Thrombin. Der Abverdaus des Affinitätstags geschah zuvor stets bei 4 °C über Nacht durch eine nicht exakt definierte Menge („eine Spatelspitze“) des Thrombins. Da es durch die ungewollte proteolytische Spaltung zu einer Zerstörung des AF6 Konstruktes während des Thrombinverdaus kam, musste der Verdaus genauer untersucht und optimiert werden. Hierzu wurden diverse Verdautes durchgeführt, unter anderem der Verdaus von GST-AF6 durch eine hochkonzentrierte Thrombinlösung (2 Units/ μ l = ca. 200-fach höher konzentriert als normal). Die Abbildung 4-3 zeigt deutlich, dass bereits direkt nach Zugabe der Protease ein Großteil der Proteolyse (Abspaltung des GST-Tags) stattgefunden hat und nach ca. 6 h das komplette, freie AF6 zerstört ist. Nach ca. 18 h (über Nacht) ist auch der GST-Tag proteolytisch zersetzt. Das GST-AF6- / His-AF6-Konstrukt besitzt jedoch nur eine einzige, spezifische Thrombin-Schnittstelle, wird aber multipel bis hin zur kompletten Proteolyse zerschnitten. Zu Beginn wird der GST-Tag abgetrennt (direkt nach Zugabe), bereits nach 30 min ist die ungewollte Proteolyse zu beobachten. Hierbei wird das AF6-Konstrukt zunächst nur an einer Position geschnitten, im Verlauf der Reaktion aber noch an diversen anderen. Die ungewollte Schnittstelle konnte infolgedessen mittels Edman-Abbau definiert und genauer untersucht werden. Hierzu wurden die Proben über

Semi-Dry-Western Blot auf eine Immobilon-P PVDF Membran überführt und anschließend durch die Firma Proteome Factory (Berlin) sequenziert.

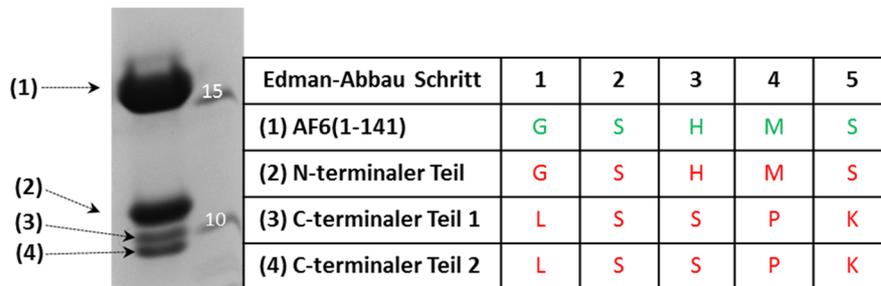


Abbildung 4-4: Edman-Abbau der Teilstücke des proteolytisch verdauten AF6 Konstruktes

Die SDS-PAGE Bande **(1)** entspricht dem gewünschten AF6 (1-141) Konstrukt, die Bande **(2)** dem N-terminalen Teil des Spaltproduktes, die Banden **(3)** und **(4)** dem C-terminalen Teil des Spaltproduktes. In grün (Zielkonstrukt) und rot (Abbauprodukte) sind die ersten fünf N-terminalen, durch den schrittweisen Edman-Abbau identifizierten AS markiert.

Die erste proteolytische Spaltung erfolgt vor der Aminosäure Lysin86, einer frei zugänglichen Schleife vor dem dritten β -Faltblatt des AF6. Diese Spaltung scheint durch eine sekundäre, eventuell faltungsbedingte, unspezifische Reaktion des Thrombins oder durch Verunreinigungen der bovinen Thrombinlösung Seitens des Herstellers verursacht zu werden. Durch Überprüfung der Schnittstelle durch das Programm PeptideCutter könnten hierfür zusätzliche Serin-Proteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin in Frage kommen. Diese ungewollte proteolytische Reaktion war wohl bereits 1999 Linnemann bekannt, scheint das AF6-Konstrukt in seiner nativen dreidimensionalen Struktur jedoch nicht zu zerteilen, seine Aktivität aber erheblich zu inhibieren. Aus diesem Grund wurden diverse Methoden getestet, um die ungewollte Proteolyse zu verhindern bzw. zu umgehen. Letztendlich diente der Einsatz von Protease-Cocktails (Pierce 10x ohne EDTA) während der Aufreinigung dazu, ein Verschleppen von *E. coli* Proteasen zu verhindern. Das Abfangen des überschüssigen Thrombins nach dem Verdau durch stets frische Benzamindin-Beads und spezifische Inhibierungen der Serinproteasen durch AEBSF in der finalen Proteinlösung konnten zu einem Teilerfolg führen. Die Stabilität der Proben konnte so für ca. 21 Tage bei konstanten 25 °C gewährleistet werden. Nach Ende dieses Zeitraums konnte dennoch eine erneut einsetzende Degradation beobachtet werden. Die genaue Ursache konnte leider nicht aufgeklärt werden. Der Einsatz der Protease wurde daraufhin hinsichtlich der Konzentration, Dauer und Temperatur für jede neue Aufreinigung in einem kleinen Ansatz getestet und auf die Hauptprobe übertragen. Im Anschluss an die Abspaltung des Affinitätstags wurde stets eine SEC durchgeführt.

4.1.1.3 Chromatographische Charakterisierung der Afadin 6-Konstrukte

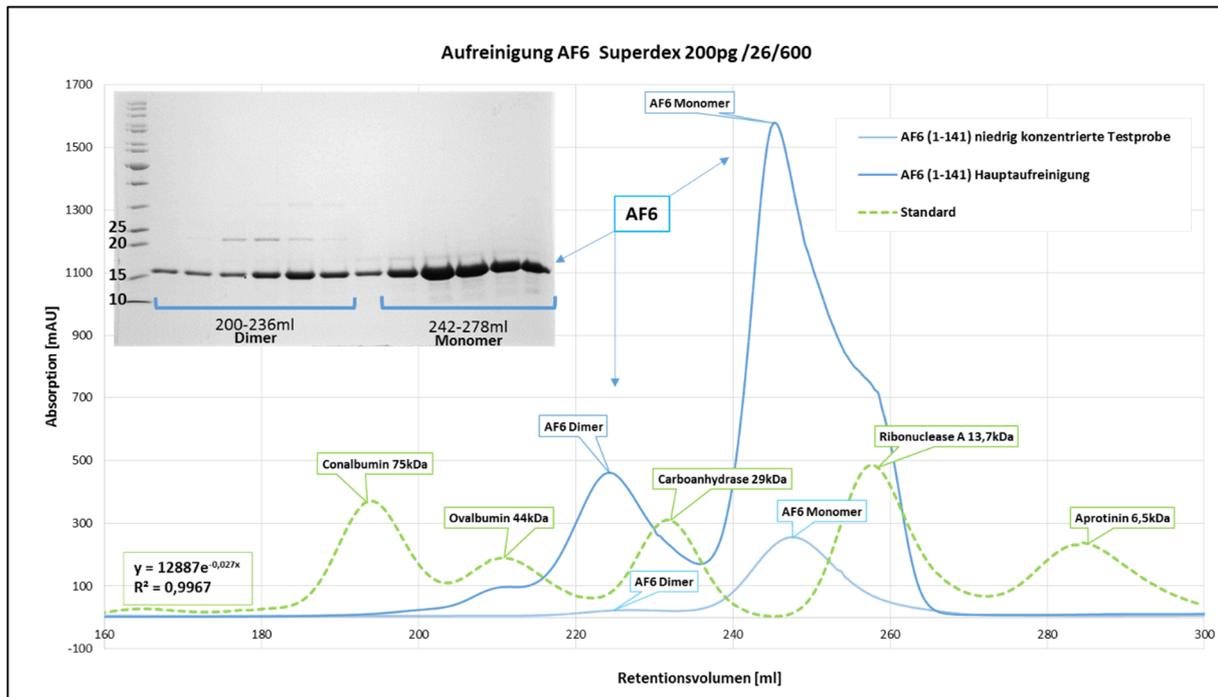


Abbildung 4-5: Säulenchromatographische (SEC) Aufreinigung des AF6-Konstruktes mit bereits abgespaltenem His₆-Affinitätstag

In blau ist das Retentionsverhalten des AF6 Konstruktes von einer Superdex 200pg/26/60 SEC-Säule zu sehen (jeweils hochkonzentriert dunkelblau und niedrigkonzentriert hellblau). Grün ist das Retentionsvolumen der kombinierten Eichproteine mit der Gleichung der Eichgerade dargestellt. Zusätzlich ist eine SDS-Page der Fraktionen (je 6 ml) von 200 ml - 278 ml dargestellt (linke Seite zeigt den Größenstandard 10 - 25 kDa). Beispiel einer Aufreinigung des His₆-AF6-Konstruktes aus 2,5 l Expressionskultur konzentriert auf 3,5 ml Probenvolumen in PIPES Puffer (20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl₂ / pH 6,9).

Im Zuge der Optimierung der Expression und Aufreinigung des AF6 Konstruktes konnte festgestellt werden, dass das AF6-Konstrukt in der Lage ist ein Homodimer auszubilden. Dies konnte sowohl anhand von SDS-PAGE, als auch durch SEC gezeigt werden (Abb. 4-5). Diese Polymerisierung scheint sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen dem dimeren und monomeren Zustand zu befinden, mit Schwerpunkt auf Seiten des Monomers. Hierzu wurde eine Probe (Mischung aus Dimer und Monomer) einer analytischen SEC unterzogen (Abb. 4-6). Die Hauptfraktionen (die stärkste Fraktion des monomeren ① und des dimeren ② Retentionspeaks) wurden direkt im Anschluss aufkonzentriert und unter exakt gleichen Bedingungen erneut einer analytischen SEC unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass sich die dimere Fraktion aufteilt und sich das Gleichgewicht auf die Seite des Monomers verschiebt. Die erneut vermessene monomere Fraktion hingegen bleibt Monomer und es kommt zu keinem dynamischen Ausgleich der Verhältnisse. Scheinbar ist das Dimer in der Lage in die monomere Form

überzugehen, der umgekehrte Weg aber energetisch ungünstig ist. Der Grund hierfür könnte konzentrationsbedingt und auch pH-abhängig sein, da der Isoelektrische Punkt (pI) des AF6 bei pH 6,24 liegt.

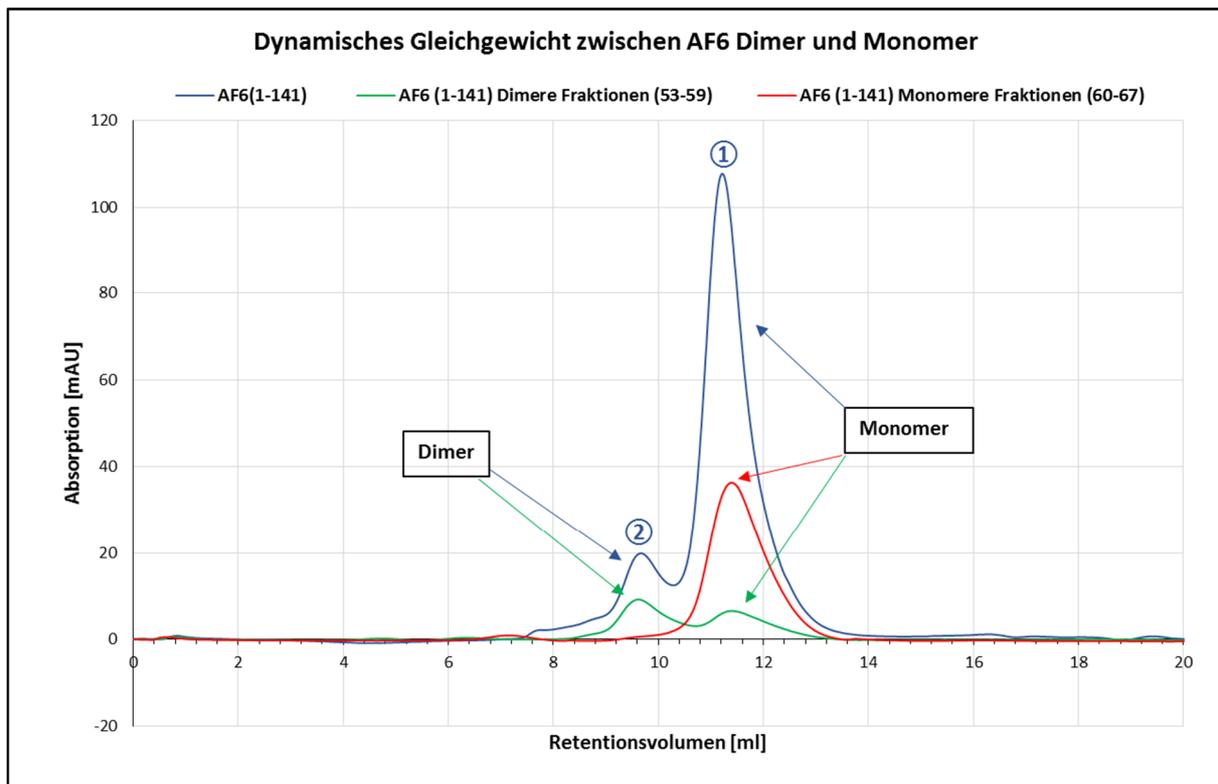


Abbildung 4-6: Analytische SEC (Superdex 75 /10 /300) des AF6-Konstruktes in Bezug auf das dynamische Monomer- / Dimer-Gleichgewicht

In blau das Retentionsspektrum der Ausgangsprobe von AF6, die Fraktionen ① und ② wurden separiert, eingengt und erneut einer SEC unterzogen. In grün die erneute analytische SEC der dimeren Fraktion ② und in rot die erneute analytische SEC der monomeren Fraktion ①. PIPES Puffer (20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl₂ / pH 6,9).

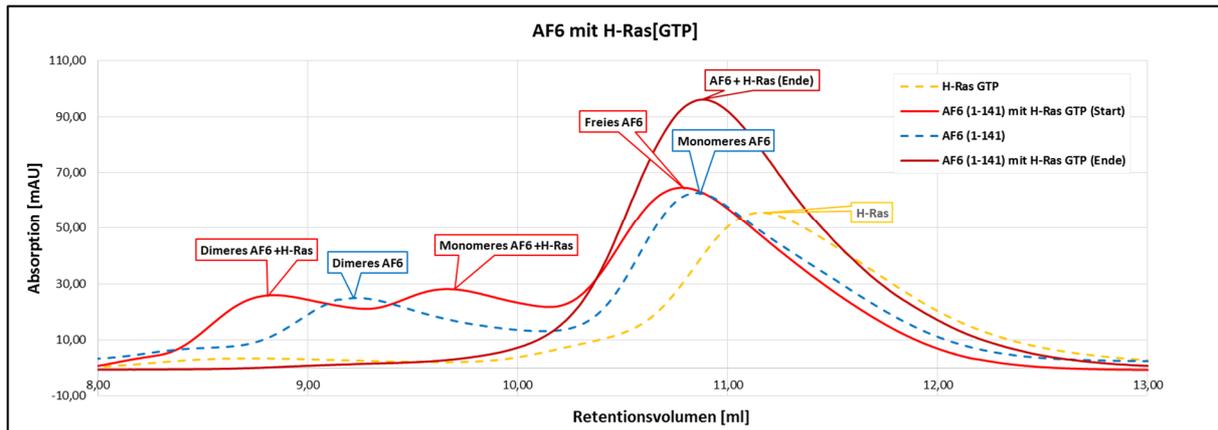


Abbildung 4-7: Aktivitätstest des dynamischen AF6 Monomer-, Dimer-Gleichgewichts mit GTP beladenem H-Ras

In blau Retentionsspektrum der Ausgangsprobe von AF6, in gelb die Ausgangsprobe von 85% GTP-beladenem H-Ras, in hellrot die vereinte AF6-H-Ras[GTP]-Probe und in dunkelrot die gleiche AF6-H-Ras-Probe nach Inkubation über Nacht bei 37 °C. Na-Phosphat Puffer (20 mM NaH₂PO₄ / 100 mM NaCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl₂ / pH 6,9). Markiert sind die mittels SDS-PAGE überprüften und anhand einer Eichung verifizierten Retentionssignale.

Um die Aktivität des AF6-Konstruktes zu testen (Abb. 4-7), wurde dieses (molares Verhältnis ca. 1:1) mit aktivem H-Ras[GTP] für 30 min bei 298 K inkubiert und anschließend einer analytischen SEC unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass sowohl das AF6-Monomer als auch das AF6-Dimer mit aktivem H-Ras interagieren. Diese Interaktion konnte anhand der Eichgerade auf jeweils ein H-Ras Molekül eingegrenzt werden. Nach vollständiger intrinsischer Hydrolyse des GTPs durch die Inkubation über Nacht bei 37 °C kommt es zu einer vollständigen Inaktivierung des H-Ras und eine Interaktion zwischen AF6 und H-Ras[GDP] konnte nicht mehr mittels SEC nachgewiesen werden. Eine dimere AF6-Population wurde nach diesem Zeitraum jedoch auch nicht mehr detektiert, der Grund dafür konnte leider nicht aufgeklärt werden.

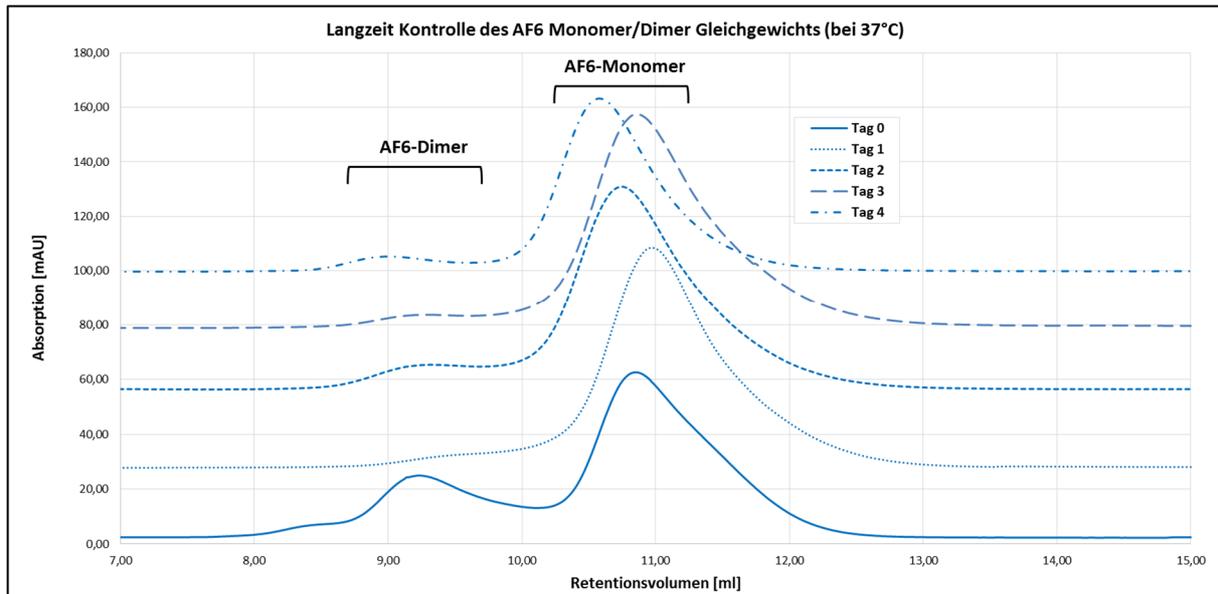


Abbildung 4-8: Langzeitbeobachtung des AF6 Monomer/Dimer Gleichgewichts mittels analytischer SEC (Superdex 75 /10 /300)

Die AF6-Probe (100 μM / 700 μl) wurde für 4 Tage bei 37 $^{\circ}\text{C}$ (mit NaN_3 und PMSF) inkubiert und es wurden jeden Tag ein Aliquot (100 μl) der Probe durch SEC vermessen. Na-Phosphat Puffer (20 mM NaH_2PO_4 / 100 mM NaCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl_2 / pH 6,9). Die Signale der dimeren und monomeren Population sind gekennzeichnet.

Langzeitmessungen des AF6-Gleichgewichts zeigten jedoch ein stabiles Verhältnis der monomeren und dimeren Fraktionen, abgesehen von einer leichten Intensitätsabnahme über einen Zeitraum von 4 Tagen bei 37 $^{\circ}\text{C}$ (Abb. 4-8). Zusätzlich durchgeführte Fluoreszenzmessungen (nicht gezeigt) und 1D-, sowie 2D-NMR Messungen konnten den guten Faltungszustand und die Stabilität des AF6-Konstruktes belegen. Hinsichtlich der NMR-Interaktionsstudien wurde stets die monomere AF6-Fraktion eingesetzt (Kapitel 4.3 / 4.4).

4.1.1.4 Charakterisierung der 3D-Struktur des Afadin 6-Konstruktes

Die dreidimensionale Struktur des AF6-Konstruktes (1-141) wurde von Guido Steiner bereits 2000 mittels NMR-Experimenten gelöst und in der späteren Arbeit von Ralph Elsner [2006] verfeinert. Der Name des finalen PDB-Files lautet „AF6(1-141)“. Durch diese Vorarbeit konnten die Oberflächeneigenschaften und die Ladungseigenschaften des Konstruktes errechnet werden. Diese sind besonders für die Auswertung der NMR-Messungen von großer Bedeutung, da sie als eines der wichtigsten Ausschlusskriterien dient, direkt an einer Interaktion beteiligte Aminosäuren von verdeckten Aminosäuren zu unterscheiden.

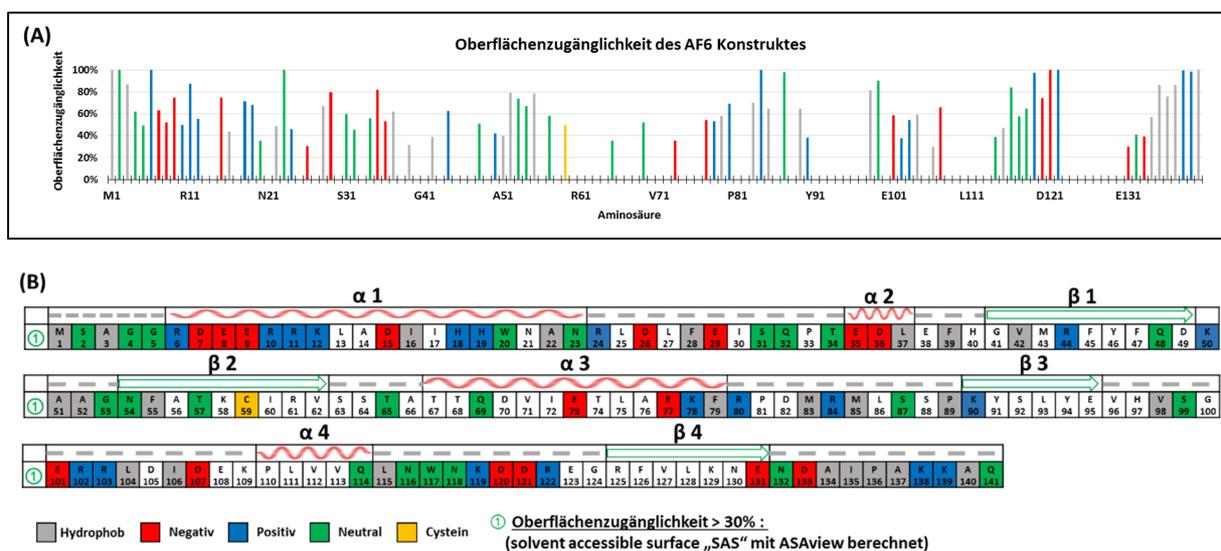


Abbildung 4-9: Darstellung der mit ASAView berechneten Oberflächenzugänglichkeit des AF6-Konstruktes

(A) Aminosäure 1-141 des AF6 -Konstruktes als Säulendiagramm **(B)** Darstellung der Aminosäuren 1-141 als Primärsequenz. Die farbige Markierung gibt die biochemischen Eigenschaften der Aminosäuren wieder, die eine Oberflächenzugänglichkeit von > 30% aufweisen, alle Aminosäuren mit einer Oberflächenzugänglichkeit < 30% sind weiß dargestellt (oder fehlen in (A)). Grau ist hydrophob, rot ist negativ geladen, blau ist positiv geladen, grün ist neutral und gelb entspricht einem Cystein.

Die farblich hervorgehobenen Aminosäuren der Abbildung 4-9 sind auf Grund ihrer Oberflächenzugänglichkeit in der Lage, direkt an einer Interaktion beteiligt zu sein. Die nicht markierten Aminosäuren sind durch die dreidimensionale Faltung verdeckt und sind somit wahrscheinlich nur an intramolekularen Umlagerungen beteiligt.

4.1.2 Die Konstrukte des Zonula occludens 1

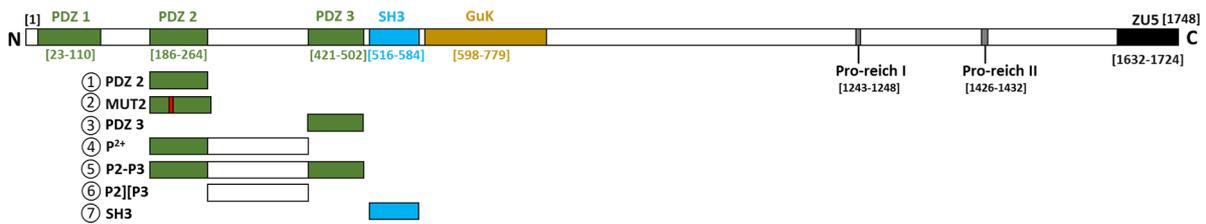


Abbildung 4-10: Schematischer Überblick über das Protein Zonula occludens 1 und seine Konstrukte

Die einzelnen Domänen des Gerüstproteins sind farbig markiert und mit der zugehörigen Aminosäureposition versehen. PDZ-Domäne, SH3-Domäne, GuK-Domäne, die ZU5 Domäne, sowie die prolinreichen Regionen. ①-⑦ hebt die hergestellten ZO1 Konstrukte bezüglich ihrer Position und mit ihrem verwendeten Namen hervor.

Tabelle 4-1: Übersicht über die hergestellten ZO1 Konstrukte

Name des Konstruktes	Plasmidsystem pGEX4T1	Plasmidsystem pET14b	Expression	theoretischer pI des Konstruktes
① PDZ2	ja	ja	erfolgreich	9,06
② MUT2	ja	ja	erfolgreich	9,06
③ PDZ3	ja	ja	erfolgreich	4,86
④ P ²⁺	ja	nein	mangelhaft*	6,23
⑤ P2-P3	ja	nein	erfolgreich	5,75
⑥ P2][P3	ja	ja	erfolgreich	5,82
⑦ SH3	ja	ja	schlecht**	9,06

*Das Konstrukt P²⁺ zeigt eine ungewollte proteolytische Spaltung nach His 304.

** Das SH3 Konstrukt lässt sich nur denaturierend aus *Inclusion bodies* mittels Rückfaltung gewinnen und zeigt eine sehr schlechte Faltung in der NMR. ④ und ⑤ wurden von Gerald Bäumel konstruiert.

Das Augenmerk lag in dieser Arbeit hauptsächlich auf der homodimeren PDZ2-Domäne und ihrer künstlich, durch Insertion der 4 Aminosäuren „GGGA“, erzeugten monomeren Mutante (MUT2), da diese als Kandidaten für die Interaktion zwischen ZO1 und AF6 in Frage kamen. Durch die Insertion der 4 Aminosäuren in das Zentrum des β_2 -Faltblattes kommt es zu einer Streckung des Faltblattes, daraufhin zu einer Distanzierung der hauptsächlich für die Dimerisierung der PDZ2-Domäne verantwortlichen Kontakte und somit erfolgreich zu einer Monomerisierung der Domäne (Abb. 4-11 und 4-12).

```

① ---TKVTLV KSRKNEEYGL RLASH---I FVKEISQDSL AARDGNIQEG DVVLKINGTV TENMSLTDK TLIERSKGKL KMWVQRDELE HHHHHH
② GSHM.....
③ GSHM.....GGGA.....
*****
[Alignment: GENTle V 1.9.4]

```

Abbildung 4-11: Alignment der Aminosäuresequenzen von ① PDZ2 (PDB-Files „2JWE“), ② eigenes PDZ2-Konstrukt im pET14b Plasmid und ③ MUT2 Konstrukt ebenfalls im pET14b Plasmid

Das Konstrukt ① verfügt über einen nicht abspaltbaren C-terminalen His₆-Tag. Der N-terminale Überhang „GSHM“ der Konstrukte ② und ③ entspricht dem Rest der Thrombinschnittstelle. Ein Strich steht für eine Lücke, ein Stern für eine absolute Übereinstimmung.

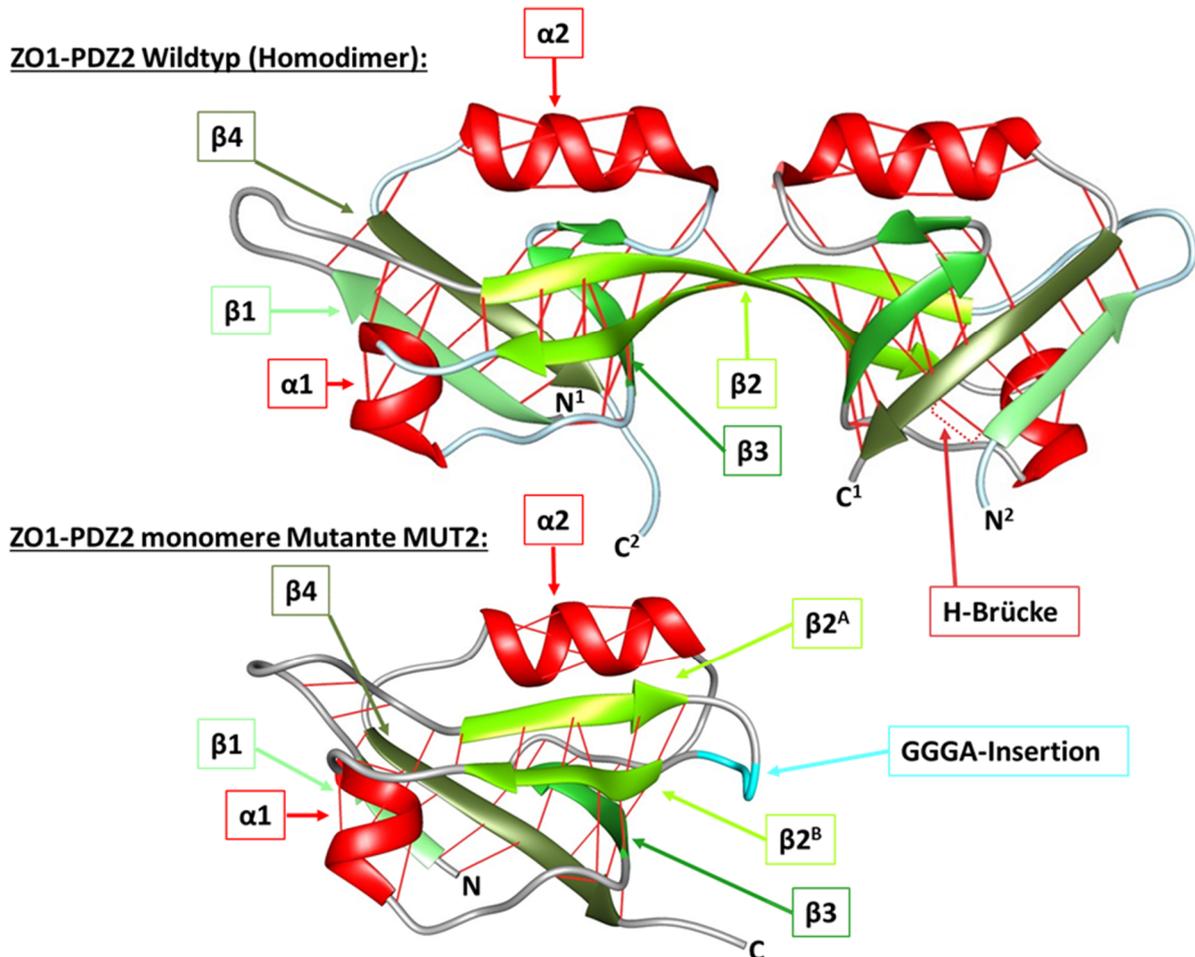


Abbildung 4-12: 3D-Struktur der PDZ2-Domäne (PDB-File „2JWE“) und der monomeren Variante MUT2 (homology model [PDB-File „4OAJ“]) des Zonula occludens 1 Proteins

Die monomere Struktur des MUT2 wurde mittels *homology-modelling* basierend auf dem PDB-File „4OAJ“ der monomeren SAP97-PDZ2 Domäne mit dem Programm Swiss-Modell erzeugt. In Cyan ist der Bereich der GGGA-Insertion markiert.

Eine Monomerisierung durch Variation des pH-Bereichs von pH 5 bis pH 10, durch Veränderung der Ionenstärke von 250 mM – 50 mM Natriumphosphat / Kaliumphosphat der Tris- oder PBS-Puffer, oder durch Entfaltung und anschließende Rückfaltung mittels SOURCE-RPC-Säule

(*reversed phase column*) waren leider erfolglos. Da eine „natürliche“, monomere Variante nicht erzeugt werden konnte, stellte das MUT2-Konstrukt die einzige Möglichkeit dar, den unter physiologischen Bedingungen möglichen monomeren Zustand zu untersuchen.

4.1.2.1 Rekombinante Herstellung und Aufreinigung der Zonula occludens 1-Proteine.

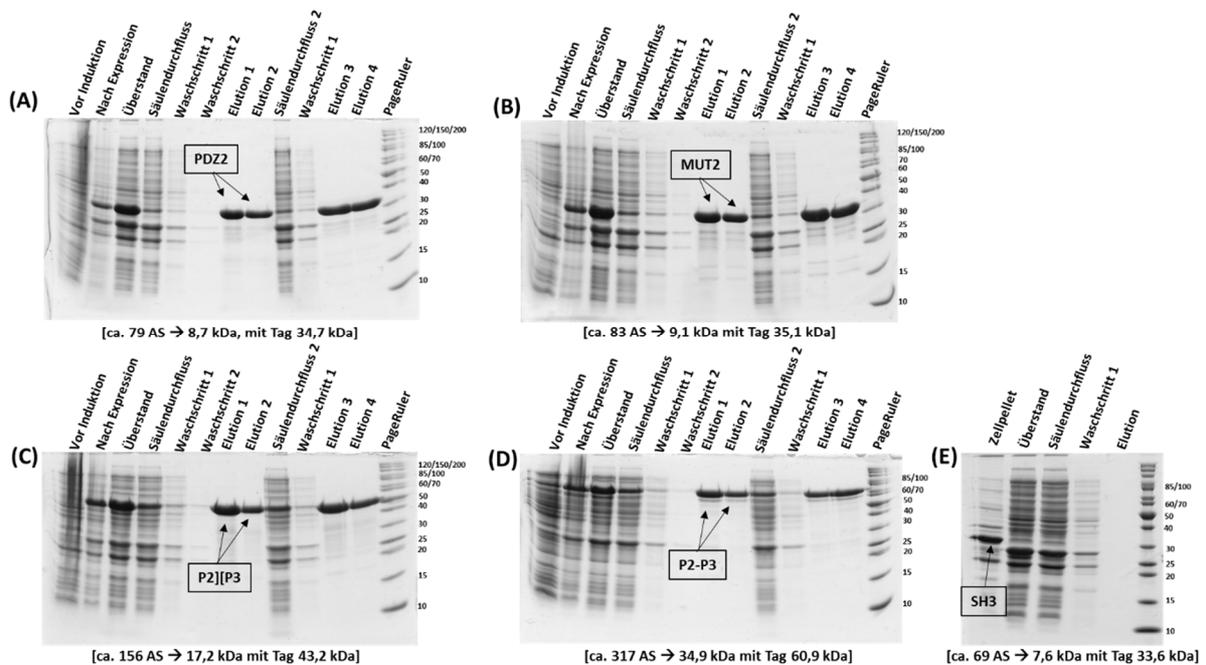


Abbildung 4-13: GST-Spin Aufreinigung einiger ZO1 Konstrukte

(A) PDZ2 Domäne, (B) MUT2 der PDZ2 Domäne, (C) Linker zwischen PDZ2 und PDZ3, (D) von PDZ2 bis Ende PDZ3 und (E) SH3-Domäne. Die Kennzeichnung der einzelnen Laufspuren befindet sich über jedem einzelnen Gel, rechts davon befindet sich der Größenstandard und die gewünschten rekombinanten Proteine sind markiert.

Abgesehen vom P²⁺- und SH3-Konstrukt ließen sich alle ZO1-Konstrukte gut im pGEX4T1-System exprimieren (Abb. 4-13), jedoch brachte die nachfolgende Aufreinigung und Entfernung des GST-Tags viele ungewollte Probleme mit sich. Zum einen erfordert die Herstellung des relativ großen Tags Ressourcen, die im Falle einer markierten Expression limitiert sind. Zum anderen zeigten sich große Probleme bei dem Abverdau des GST-Tags durch Thrombin, da die Schnittstelle teilweise durch die Faltung verdeckt zu sein scheint und auch der Prozess den abgespaltenen GST-Tag wieder effektiv aus dem System zu entfernen gestaltete sich aufwendig. Daher wurden die meisten Konstrukte in das pET14b-System kloniert und die Expression und Aufreinigung wurde für jedes Konstrukt optimiert. Teilweise kam es zu einer Verpackung der Proteine in *Inclusion bodies*, wenn die Expression über Nacht durchgeführt wurde, daher

wurde bei simultaner Expression der verschiedenen Konstrukte stets mit 100 μ M IPTG maximal 6 h bei 37 °C und 180 rpm exprimiert. Die Problematik der ungewollten Proteolyse trat hier nur beim P^{2+} -Konstrukt auf, wohingegen alle anderen Konstrukte gegenüber der Serin-Proteasen (in normaler Konzentration) stabil waren. Wie in Abbildung 4-13 zu erkennen ist, konnten alle Konstrukte außer die SH3-Domäne löslich in guter Menge mittels GST-Affinität aufgereinigt werden. Die SH3-Domäne wurde von *E. coli* in *Inclusion bodies* verpackt und konnte nur durch eine denaturierende Aufreinigung mit anschließender Rückfaltung aufgereinigt werden. Hierbei zeigten sich jedoch, eine unsauberer Faltung und immer noch eine sehr schlechte Löslichkeit des Konstruktes. Daher stand es für NMR-Interaktionsstudien leider nicht zu Verfügung. PDZ3 (hier nicht aufgeführt) lässt sich ähnlich effektiv wie die PDZ2-Domäne aufreinigen, das P^{2+} -Konstrukt (ebenfalls nicht aufgeführt) nur mit sehr schlechter Ausbeute. Die Säulen wurden nach der Elution gewaschen, neu equilibriert und wieder verwendet. Somit war eine mehrfache Beladung (Säulendurchfluss 2) und Aufreinigung (Elution 2 und 3) möglich. Die Aufreinigung der Konstrukte mittels pET14b-System war effektiver und demnach meist das Mittel der Wahl, es sei denn der GST-Affinitätstag war von Nutzen (Beispiele der Ni^{2+} -NTA Aufreinigung siehe Phosphorylierungsmutanten).

4.1.2.2 Chromatographische Charakterisierung der PDZ2- und MUT2-Konstrukte

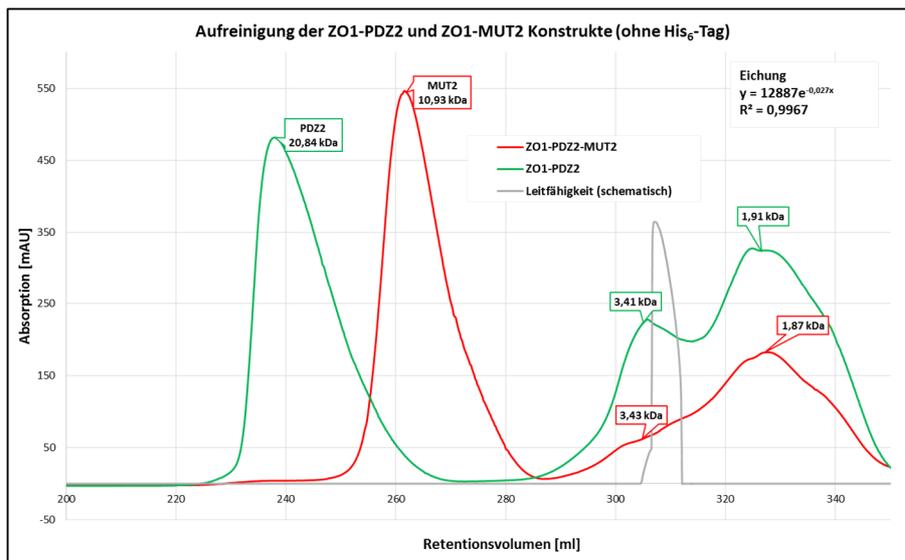


Abbildung 4-14: SEC der ZO1-PDZ2- und der ZO1-MUT2-Konstrukte (Superdex 200pg / 26 / 600)

In grün ein Chromatogramm der PDZ2-Domäne (ohne Tag) / in rot ein Chromatogramm der MUT2-Domäne (ohne Tag) in PIPES Puffer (20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl₂ / pH 6,9).

Anhand einer geeichten SEC konnte über das Retentionsverhaltens der Proteine ihre relative Größe bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass die native PDZ2-Domäne, wie erwartet, ein Homodimer ausbildet und dass das MUT2 Konstrukt die gewünschte Monomerisierung der Domäne herbeiführt. Auch bei MUT2 zeigte sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer (3 Tage bei 4 °C führt zu ca. 10% dimerer Population), jedoch weniger stark ausgeprägt als bei AF6 (Abb. 4-5 / 4-6). Die Aufreinigung erfolgte mittels Ni²⁺-NTA und einem Na-Phosphatpuffer, die anschließende SEC wurde zum Entfernen der ungewollten Spuren von Thrombin und zum Pufferwechsel in PIPES-Puffer (20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl₂ / pH 6,9) durchgeführt. Hierbei zeigten sich stets nach ca. 290 ml zwei weitere große Elutionspeaks (zwischen 3,5 und 2 kDa Größe). Diese wurden zusätzlich mit Phosphor-NMR (Ergebnisse nicht dargestellt) untersucht und weisen daraufhin, dass die ZO1-PDZ2/MUT2-Konstrukte phosphatgekoppelte Substanzen durch den Pufferwechsel freisetzen. Diese absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm und werden so durch das ÄKTA-System detektiert.

4.1.2.3 Herstellung der PDZ2- und MUT2- basierten Phosphorylierungsmutanten

Zusätzlich zu den Bindungsstudien mit den Wildtyp-Konstrukten, wurde die Möglichkeit einer posttranslationalen Modifikation im physiologischen Kontext des Proteins mittels Phosphorylierungsimitierung untersucht. Hierbei wurden die Sequenzen der PDZ2-Domäne hinsichtlich möglicher Phosphorylierungspositionen mit den Programmen NetPhos2.0 und GPS 2.1.2 überprüft (mit dem Kriterium der höchsten Signifikanz). Die Ergebnisse dieser Vorhersage sind in Abbildung 4-15 zusammengefasst.

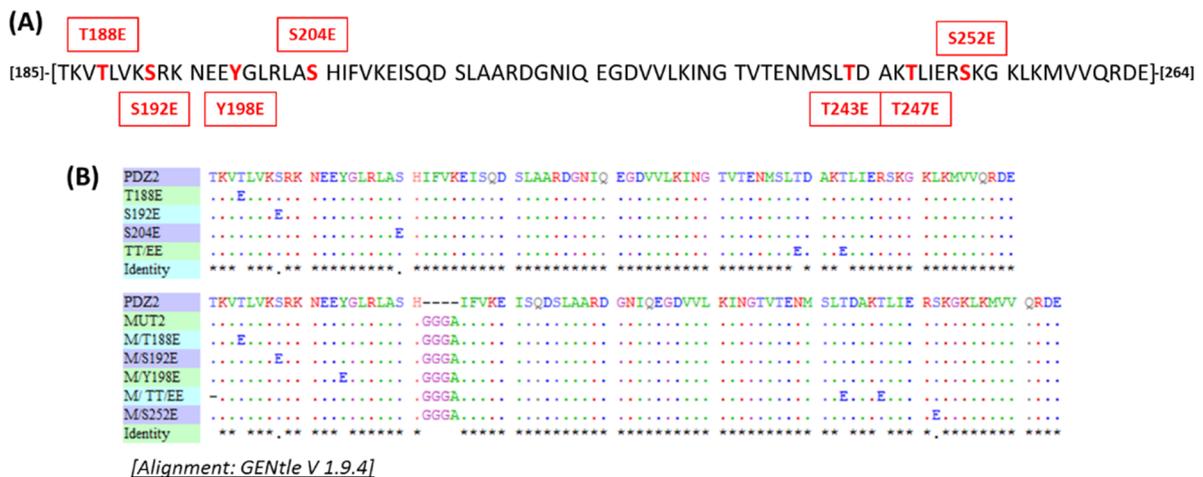


Abbildung 4-15: (A) Übersicht über die signifikantesten Phosphorylierungsvorhersagen der ZO1-PDZ2 Domäne und (B) Sequenzalignment der erfolgreich durchgeführten Mutationen

Die „Identity“-Zeile entspricht der ClustalW Übereinstimmung. Ein Stern steht für eine Übereinstimmung, ein Doppelpunkt für eine konservierte Untereinheit und ein einfacher Punkt für eine halb-konservierte Untereinheit.

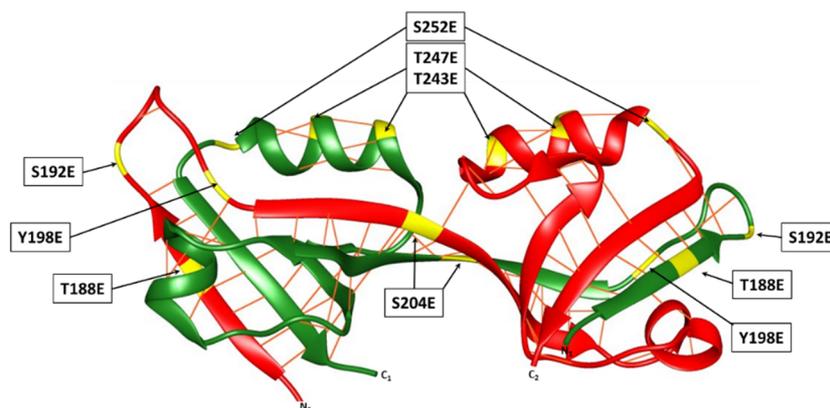


Abbildung 4-16: Übertragung der Phosphorylierungspositionen auf die 3D-Struktur des PDZ2-Homodimers (PDB-File „2JWE“)

In gelb sind die Phosphorylierungspositionen auf dem PDZ2-Homodimer markiert und beschriftet, die H-Brücken sind in orange hervorgehoben.

Die beiden Konstrukte PDZ2 und MUT2 lagen bereits korrekt in das pET14b-Plasmid integriert vor. Somit war es nach anfänglicher Etablierung der Punktmutationsstrategie relativ einfach,

die vorhergesagten Phosphorylierungspositionen von einem Serin (S), Threonin (T) und Tyrosin (Y) in ein Glutamat (E) oder Aspartat (D) zu konvertieren. Diese Punktmutationen simulieren durch die eingebrachte negative Ladung und die dazu passende Distanz, eine aktiv phosphorylierte Aminosäure. Es wurde für alle ausgewählten Positionen eine Punktmutation hin zu einem Glutamat gewählt, auch wenn sich für Serine ein Aspartat, auf Grund einer realistischen Seitenkettenlänge, eventuell besser geeignet hätte.

Tabelle 4-2: Übersicht über die erfolgreich durchgeführten Phosphorylierungsmutationen

Mutation	T188E	S192E	Y198E	S204E	TT/EE*	S252E
PDZ2	ja	ja	nein	ja	ja	nein
MUT2	ja	ja	ja	nein	ja	ja

* Die TT/EE entspricht der Doppelmutation von T243E und T247E.

Bei der Expression der Mutanten kam es teilweise zu einer Verpackung der Proteine in *Inclusion bodies* wenn die Expression über Nacht durchgeführt wurde. Daher wurde bei simultaner Expression der verschiedenen Konstrukte stets mit 100 μ M IPTG maximal 6 h bei 37 °C und 180 rpm exprimiert.

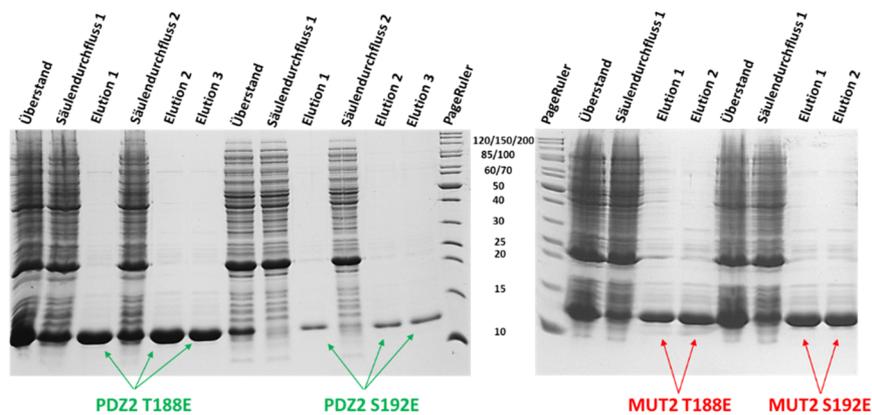


Abbildung 4-17: Beispiel für die Ni²⁺-NTA-Spin Aufreinigung der Phosphorylierungsmutanten T188E und S192E der PDZ2- und MUT2-Konstrukte und Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE

Die Kennzeichnung der einzelnen Laufspuren befindet sich über jedem einzelnen Gel, in der Mitte befindet sich der Größenstandard und die gewünschten rekombinanten Proteine sind farblich markiert.

Die Säulen konnten wie die GST-Spin-Säulen nach der Elution gewaschen, neu equilibriert und wieder verwendet werden, somit war eine mehrfache Beladung (Säulendurchfluss 2) und Aufreinigung (Elution 2 und 3) möglich. Je nach Stärke der Expression konnte das Kulturvolumen und das Spin-Säulenvolumen variiert werden, brachte aber bereits mit den kleinsten Spin-Säulchen bei gerade einmal 45 ml Expressionskultur meist gute Ausbeuten (Abb. 4-17).

4.1.2.4 Chromatographische Charakterisierung der Phosphorylierungsmutanten

Auch hier konnten anhand einer geeichten SEC über das Retentionsverhaltens der Proteine ihre relative Größe und ihr Polymerisierungsgrad bestimmt werden. Dies geschah direkt nach der Elution von der Affinitätsäule im Zuge einer weiteren Aufreinigung und wies so noch ungewollte zusätzliche Proteine rechts und links der eigentlichen PDZ2/MUT2-Retentionspeaks auf. Diese konnten anhand der anschließenden SDS-PAGE auf Grund ihrer Größe, als monomerer oder polymerer Zustand der Ziel-Konstrukte ausgeschlossen werden. Eine weitere Überprüfung dieser flankierenden Proteine erfolgte nicht. Die Konstrukte zeigten im direkten Vergleich mit den Ausgangs-Konstrukten PDZ2 und MUT2, durch die imitierte Phosphorylierung keine Veränderung ihres dimeren oder monomeren Zustandes (Abb. 4-18).

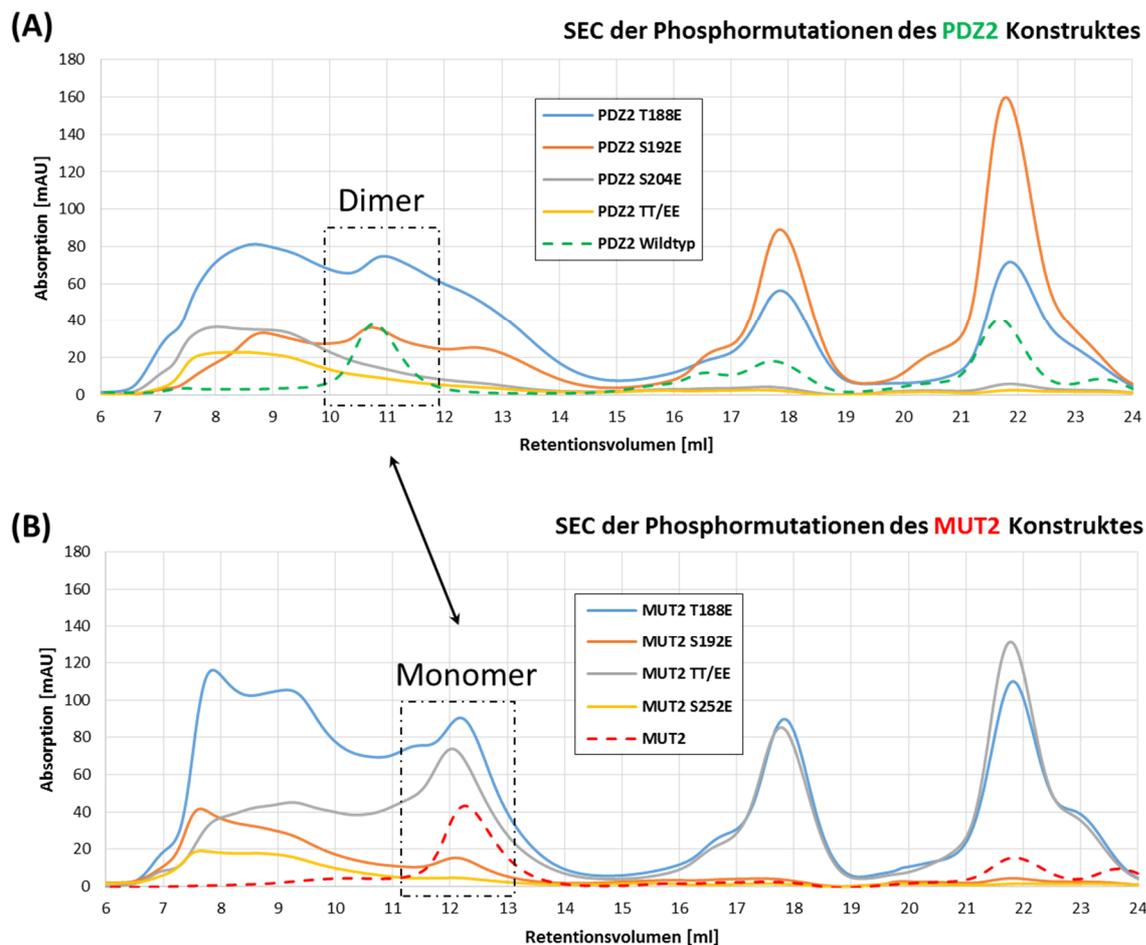


Abbildung 4-18: Darstellung der einzelnen SEC-Experimente des Großteils der Phosphorylierungsmutanten (A) PDZ2-basiert, (B) MUT2-basiert

Die SEC wurde direkt im Anschluss an die Ni²⁺-NTA Affinitätsaufreinigung durchgeführt. **(A)** T188E/S192E/S204E und TT/EE des PDZ2-Konstruktes im direkten Vergleich mit PDZ2 (schwarzer Kasten) **(B)** T188E/S192E/ TT/EE und S252E des MUT2-Konstruktes im direkten Vergleich mit MUT2 (schwarzer Kasten). PIPES Puffer (20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl₂ / pH 6,9) / (Superdex 75/10/300). Das nicht mutierte Konstrukt ist jeweils als Referenz mit aufgeführt (gestrichelte Linie).

4.1.3 Die kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras

4.1.3.1 Herstellung der GTPase Konstrukte

```

H-Ras MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRIGEGFLC VFAINNPKSF EDIHQYREQI KRVKDSDVVP
Rap1A .R.....L. S.....V.FV.GI..E K.....EV.CQQ .M.E.....T.QFT....L ..KN.Q..AL .YS.TAQST. N.LQDL....L....TE...
Identity * *****: ***** :*:*. **: :***** **** * : *:*:***** *::***** **:.*:** *::*. .:* :*::: **** *****:***

H-Ras MVLVGNKCDL A-ARTVESRQ AQDLARSYG- IPYIETSAKI RQGVEDAFYT LVREI-RQHK LRKLNPPDES GPGCMSCKCV LS
Rap1A .I.....EDE.V.GKE. G.N..QWCN CAPL.S...S KIN.NEI..D ...Q.N.KTP VE.KK.KKK. -----L .L
Identity *:***** *.*.*.*:*****: :*:*****: :*: ** ***** * : :.* :.*.* *:*

```

Abbildung 4-19: Aminosäuresequenz Alignment der GTPasen H-Ras und Rap1A

Die „Identity“-Zeile entspricht der ClustalW Übereinstimmung, ein Stern steht für eine Übereinstimmung, ein Doppelpunkt für eine konservierte Untereinheit und ein einfacher Punkt für eine halb-konservierte Untereinheit. Rap1A weist gegenüber H-Ras 57% identische Aminosäuren auf.

Die GTPase H-Ras wurde freundlicherweise im Zuge des biophysikalischen Großpraktikums von unserer Technischen Angestellten Sabine Ruppel hergestellt und in großem Maßstab aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte im Prinzip wie die Aufreinigung des Rap1A, jedoch konnte bei H-Ras nach der Q-Sepharosesäule eine Amoniumsulfatfällung durchgeführt werden, um einen Teil der ungewollten Proteine der Lösung zu entfernen. Dieser Schritt war bei Rap1A nicht möglich. Die GTPase Rap1A war als pTac-System in einem CK600K *E.coli*-Stamm inklusive GroEL-Chaperon (Rap1A Δ C'1-167 GroEL CK600K) am Lehrstuhl vorhanden. Die Aufreinigung musste jedoch auch hier optimiert werden, da die Ausbeute weit unter der erhofften Menge lag. Hierzu wurden diverse Konstrukte des Rap1A (1-167) in verschiedenen Plasmid-Systemen (pET14b / pETSumo / pGEX4T1) und Expressionsstämmen (BL21 / BL21(DE3) / BL21(DE3)pLysS / Rosetta (DE3) / Rosetta (DE3) pLysS) erzeugt und getestet. Keine der neuen Systeme war in der Lage die schlechte Expressionsrate des bisherigen Systems zu verbessern. Daher konnte nur der Maßstab der Expressionskulturen stark erhöht und die Aufreinigungsprozesse optimiert werden. Dies ermöglichte es jedoch nicht, ^{13}C - oder ^{15}N -markiertes Rap1A für 2-3D-NMR-Experimente herzustellen.

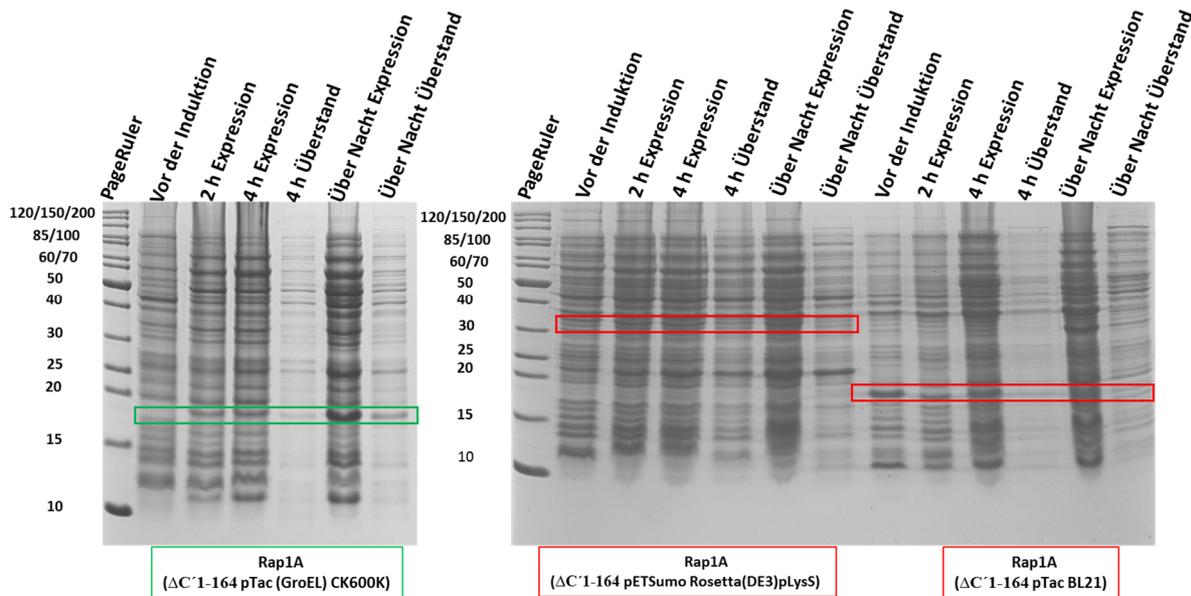


Abbildung 4-20: Expressionstest der unterschiedlichen Rap1A Expressionssysteme

In grün ist das, bereits vorhandene Konstrukt dargestellt. In rot zwei der Versuche die Expression durch ein neues System zu optimieren. Im pETSumo-System ist keine Überexpression nachweisbar, im pTac BL21 System wird bereits basal so viel Rap1A exprimiert, dass bereits kurze Zeit nach der Induktion das komplette Rap1A in *Inclusion bodies* verpackt wird. Inkubation bei 30 °C, 180 rpm und 100 μM IPTG. Die Kennzeichnung der einzelnen Laufspuren befindet sich über jedem einzelnen Gel, links und in der Mitte befindet sich der Größenstandard und die gewünschten Laufhöhen der rekombinanten Proteine sind markiert.

4.1.3.2 Optimierung der Herstellung und Aufreinigung der Rap1A GTPase

Um ca. 1 ml einer 1 mM Rap1A-Proteinlösung zu erhalten, mussten 40 l Expressionskultur (16 x 2,5 l) aufgereinigt werden, daher musste die Aufreinigung so effektiv wie möglich verlaufen. Optimal hat sich die Trennung des Proteingemischs nach dem Aufschluss mittels selbstgepackter 125 ml Q-Sepharosesäule erwiesen, da diese ohne Probleme, im Gegensatz zur herkömmlich verwendeten Säule, in das ÄKTA-System eingebaut werden konnte und somit ein kontrollierter Gradientenlauf möglich wurde. Nach Beladung und Waschen der Säule im Kühlraum konnte die Elution des Proteins über einen Stufengradienten mit Rap1A-Hochsalzpuffer durchgeführt werden (1 ml / min Flussrate/ 62,5 ml Volumen der Gradientenstufe) (Abb. 4-21).

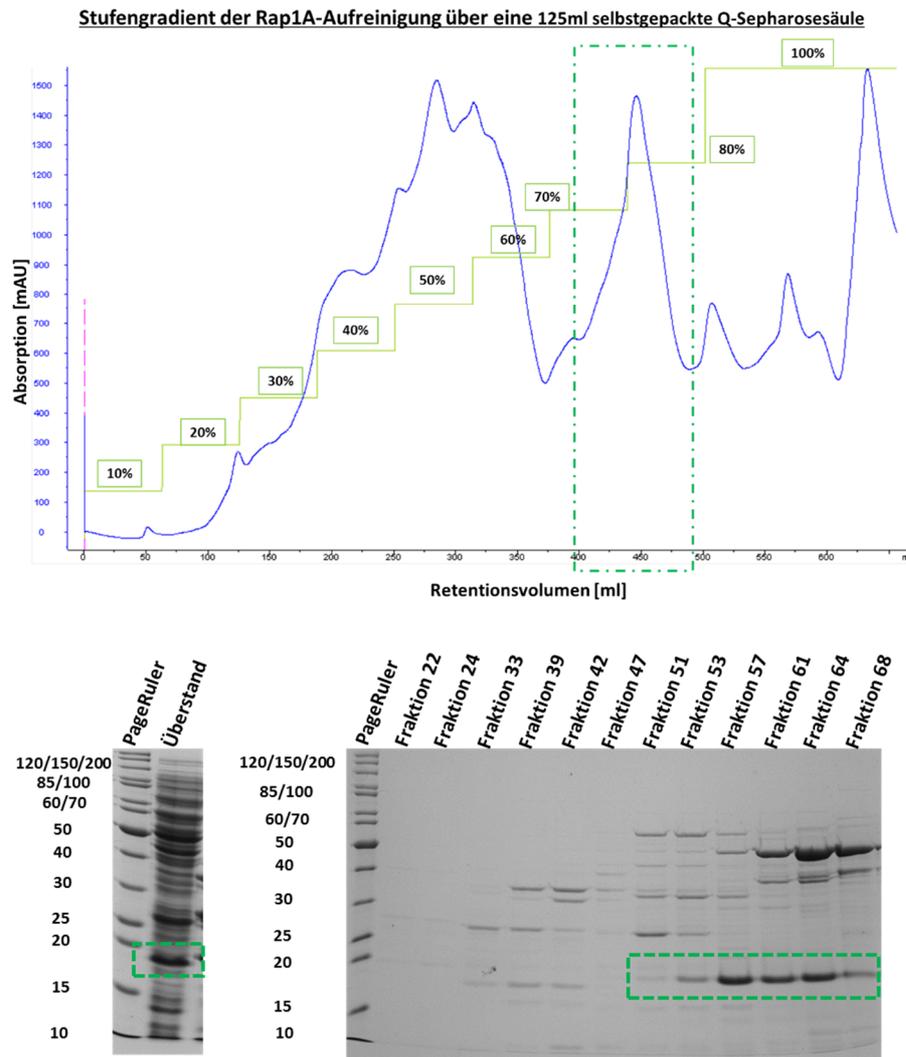


Abbildung 4-21: Hochsals-Stufengradient der Rap1A Aufreinigung über eine selbstgepackte Q-Sepharosesäule und SDS-PAGE Kontrolle der Aufreinigung

Der grüne Kasten markiert die Position des Rap1A, links im Chromatogramm der Anionenaustausch-Chromatographie und rechts in der SDS-PAGE (jeweils links davon der Größenstandard).

Die Fraktionen des gewünschten Rap1A-Peaks wurden mittels SDS-PAGE auf die Fraktionen 51 bis 68 eingegrenzt, vereint und konzentriert. Da der Reinheitsgrad noch nicht ausreichend war und die ungewünschten Proteine sich charakteristisch in ihrer Größe unterschieden wurde das Rap1A direkt im Anschluss über eine SEC noch weiter aufgereinigt (Abb. 4-22).

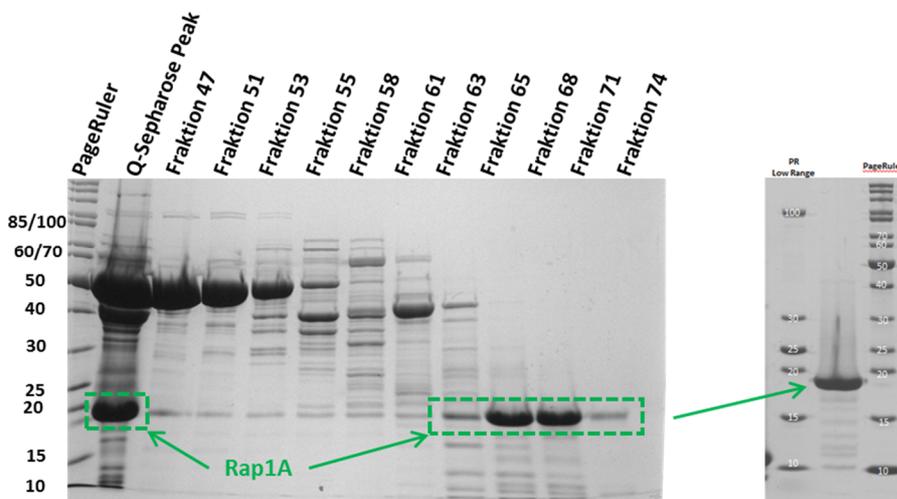
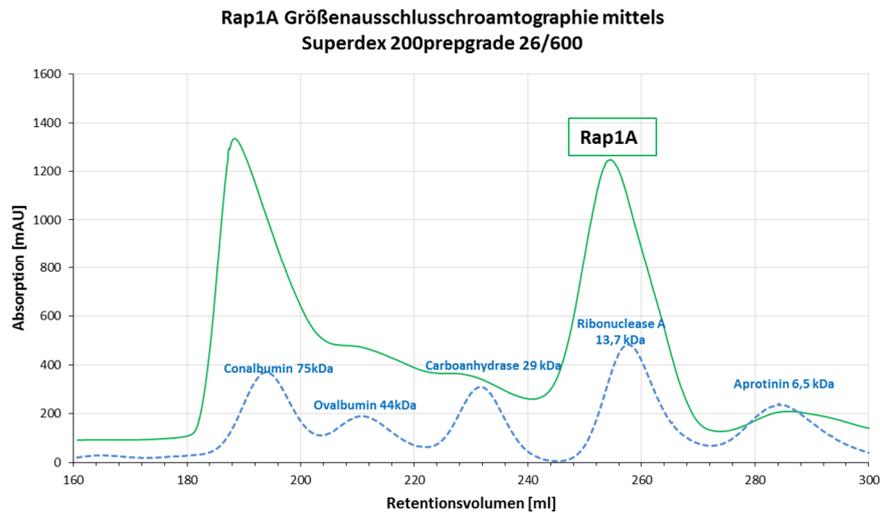
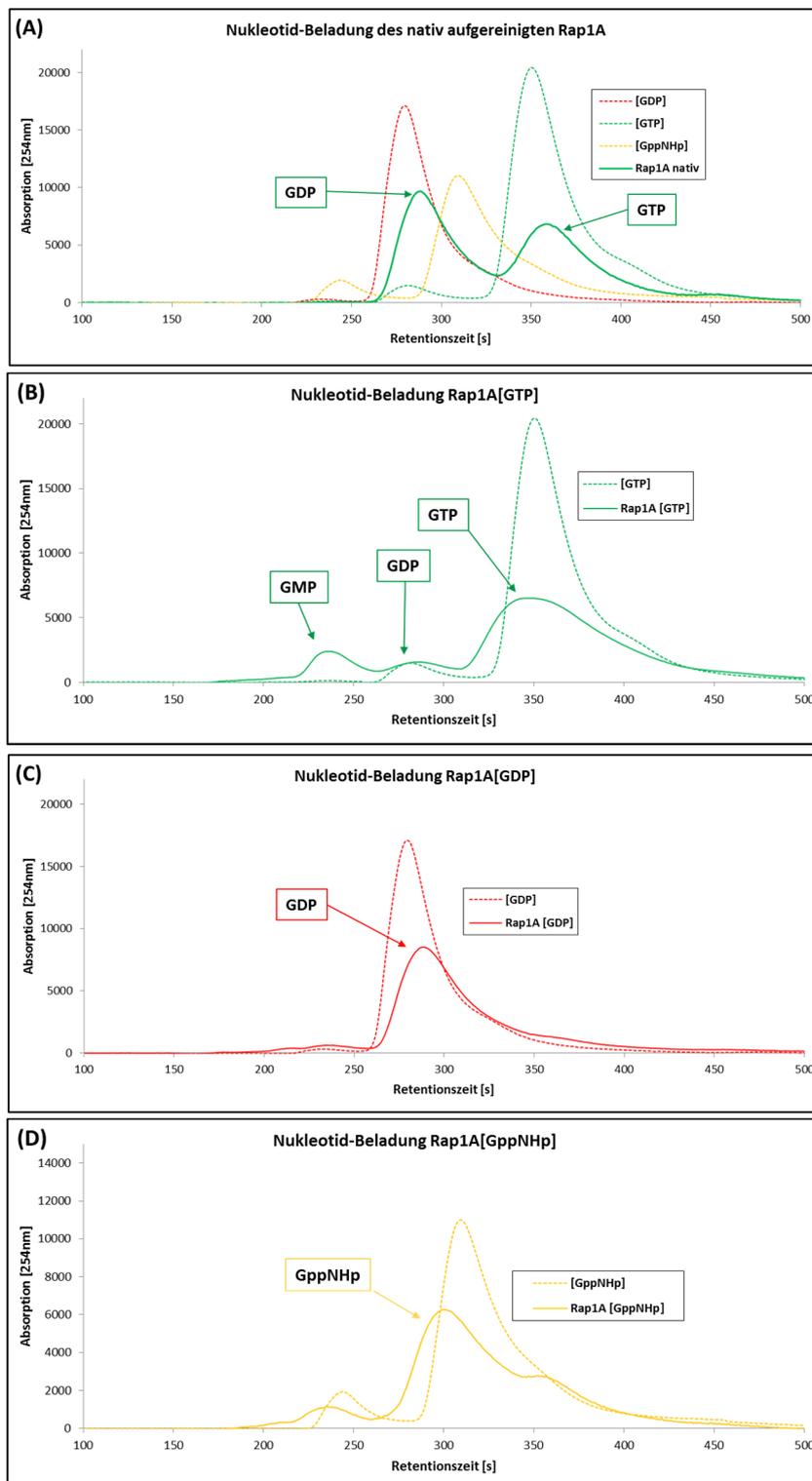


Abbildung 4-22: SEC des konzentrierten Rap1A-Proteingemischs über eine Superdex 200pg 26/600 Säule und Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE

Oben das Chromatogramm der SEC mit Rap1A in grün und der Standard in blau, darunter die SDS-PAGE (Größenstandard links neben dem Gel) des SEC-Laufes und rechts daneben die SDS-PAGE der finalen Rap1A-Probe. Die Kennzeichnung der einzelnen Laufspuren befindet sich über dem Gel, rechts befindet sich der Größenstandard und das gewünschte rekombinanten Rap1A ist grün markiert.

Im Anschluss an den Gelfiltrationslauf wurde die Rap1A-Probe konzentriert und konnte daraufhin mit dem gewünschten Nukleotid beladen werden (Kapitel 3.2.8).

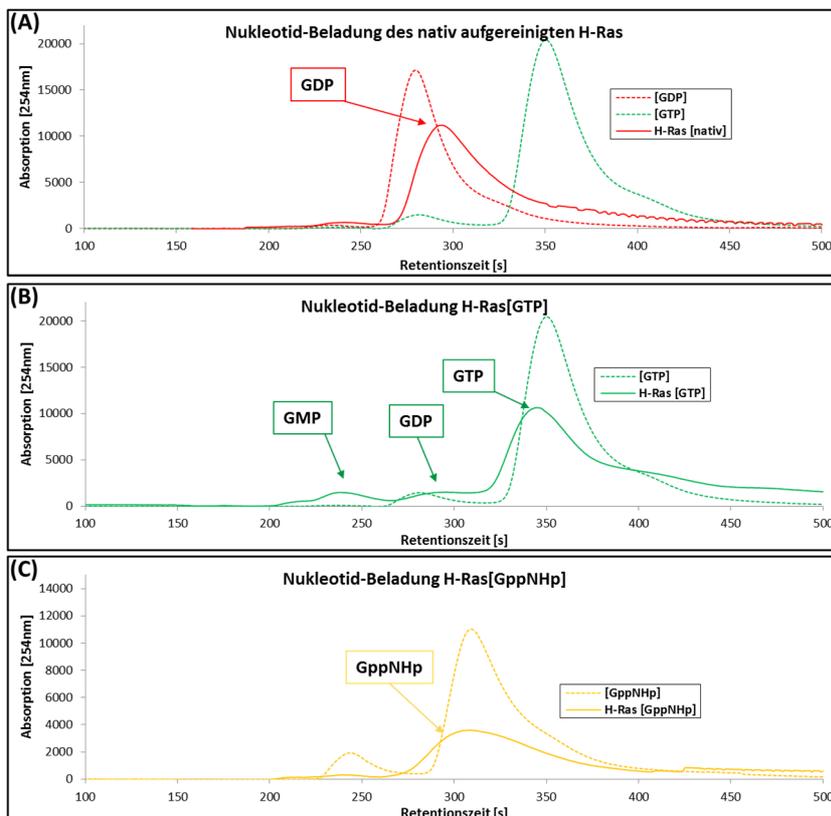
4.1.3.3 Nukleotidbeladung der kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras

Abbildung 4-23: Beladungszustände der Rap1A-Proben mittels *reversed phase* HPLC überprüft

Die Eichläufe der gewünschten Nukleotide (GTP/GDP/GppNHp) sind stets durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet, der Beladungszustand der Probe durch eine durchgehende Linie. **(A)** Zustand des nativ aufgereinigten Rap1A, **(B)** Rap1A[GTP]-Probe, **(C)** Rap1A[GDP]-Probe und **(D)** Rap1A-[GppNHp]-Probe. Die exakte Probenbeladung kann der Tabelle 4-3 entnommen werden.

Tabelle 4-3: Detaillierte Übersicht der Nukleotid-Beladungszustände der Rap1A-Proben

	Retentionszeit [s]	Volumen	Nukleotid	Anteil
Eichung GDP	233	11074	GMP	1,70%
	278	641470	GDP	98,30%
Eichung GTP	235	3884	GMP	0,42%
	280	47812	GDP	5,14%
	349	879361	GTP	94,45%
Eichung GppNHp	243	53071	?	8,84%
	308	547422	GppNHp	91,16%
Rap1A [<i>nativ</i>]	287	363305	GDP	50,9%
	358	346400	GTP	49,08%
Rap1A [GDP]	234	2014	GMP	0,58%
	287	286268	GDP	89,94%
	358	59533	GTP	9,48%
Rap1A [GTP]	236	84642	GMP	11,91%
	284	37058	GDP	5,21%
	349	589035	GTP	82,88%
Rap1A [GppNHp]	234	67225	?	11,13%
	310	536970	GppNHp	88,9%

Abbildung 4-24: Beladungszustände der H-Ras Proben mittels *reversed phase* HPLC überprüft

Die Eichläufe der gewünschten Nukleotide (GTP/GDP/GppNHp) sind stets durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet, der Beladungszustand der Probe durch eine durchgehende Linie. **(A)** Zustand des nativ aufgereinigten H-Ras, **(B)** H-Ras[GTP]-Probe, **(C)** H-Ras[GppNHp]-Probe siehe Tabelle 4-4.

Tabelle 4-4: Detaillierte Übersicht der Nukleotid-Beladungszustände der H-Ras-Proben

	Retentionszeit [s]	Volumen	Nukleotid	Anteil
Eichung GDP	233	11074	GMP	1,70%
	278	641470	GDP	98,30%
Eichung GTP	235	3884	GMP	0,42%
	280	47812	GDP	5,14%
	349	879361	GTP	94,45%
Eichung GppNHp	243	53071	?	8,84%
	308	547422	GppNHp	91,16%
H-Ras [<i>nativ</i>]	240	45493	GMP	5,63%
	293	762366	GDP	94,37%
	0	0	GTP	0%
H-Ras [<i>GTP</i>]	237	44712	GMP	11,36%
	295	41201	GDP	10,47%
	344	307656	GTP	78,17%
H-Ras [<i>GppNHp</i>]	239	14894	?	5,11%
	307	276642	GppNHp	94,89%

Die Beladung der GTPasen mit dem entsprechenden Nukleotid war essenziell für die Aktivität des Proteins. Daher musste die Beladung mittels *reversed phase* HPLC überprüft werden. Rap1A liegt bei nativer Aufreinigung mit ca. 50% aktiver[GTP]- und 50% inaktiver [GDP]- Beladung vor. Bei H-Ras liegt bei nativer Aufreinigung kein aktiver [GTP]-beladener Zustand vor. Diese Tatsache beruht allem Anschein nach auf der unterschiedlichen intrinsischen Hydrolyse Eigenschaft der beiden GTPasen. Um eine bessere Beladung der kleinen GTPasen zu erreichen, kann das gewünschte Nukleotid auch zusätzlich in den Aufreinigungspuffer gegeben werden, was bei der durchgeführten Aufreinigung jedoch nicht der Fall war. Eine absolute Beladung von 100% konnte nie erreicht werden. Die Nukleotide GDP und das Analoga GppNHp können gut ausgetauscht werden, bei GTP hingegen war die Beladung maximal bei 82,88% des Rap1A und 78,17% des H-Ras und musste stets durch einen 50-fachen Überschuss während des Austauschs forciert werden.

4.1.3.4 Intrinsische Hydrolyse Aktivität der GTPasen Rap1A und H-Ras

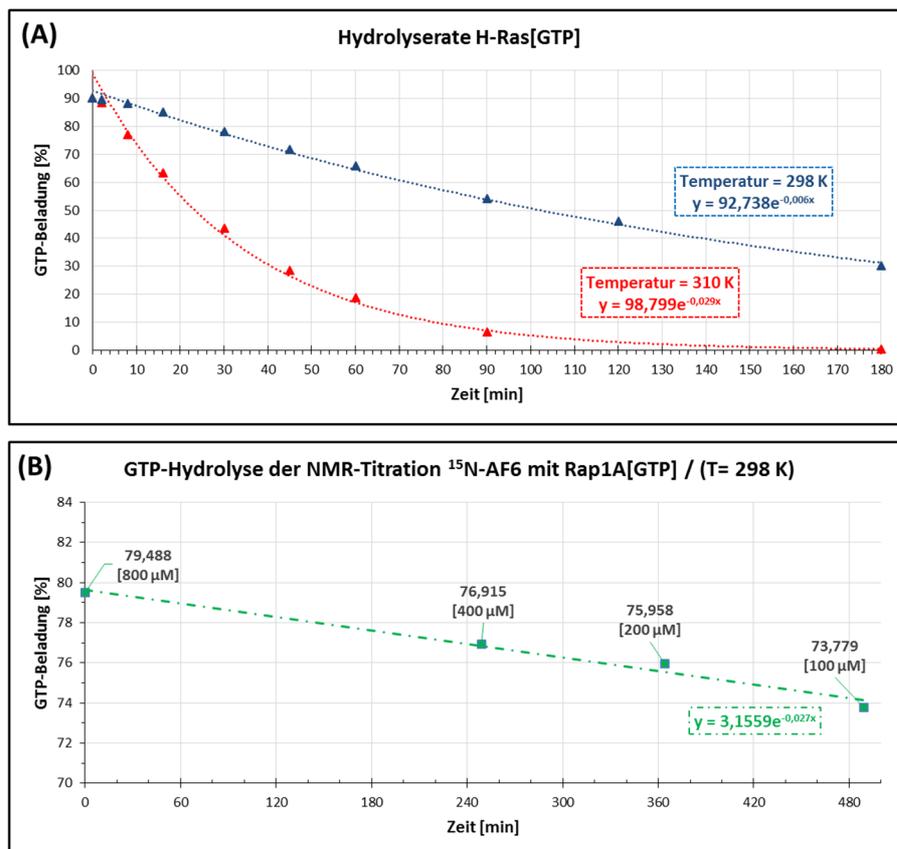


Abbildung 4-25: Bestimmung der intrinsischen GTP-Hydrolyse Aktivität der GTPasen Rap1A und H-Ras mittels HPLC

(A) Hydrolyserate des H-Ras[GTP] bei 298 K (25 °C) in blau und bei 310 K (37 °C) in rot sowie **(B)** die im Zuge der NMR-Titrationsexperimente AF6 mit Rap1A[GTP] bestimmte Hydrolyserate des Rap1A[GTP].

Die bestimmte GTP-Hydrolyserate des H-Ras (entspricht 0,028/min bei 310 K) führt zu einer schnellen intrinsischen *on/off*-Wechselwirkung des kleinen molekularen Schalters, wohingegen Rap1A in einem kurzen Zeitfenster von ein paar Stunden, quasi über so gut wie keine aktive Hydrolyse Eigenschaft verfügt. Dennoch macht sich dieser Effekt, beispielsweise über den langen Zeitraum einer TROSY-NMR-Titrationsreihe stark bemerkbar.

4.1.4 Pulldown-Analyse des GST-Afadin 6 mit Zonula occludens 1, H-Ras und Rap1A

Um einen klassischen Pulldown durchzuführen (Kapitel 3.4.2) bedarf es eines Affinitätstags. In diesem Fall standen zwei Affinitätstags zur Verfügung. Der GST-Tag des pGEX4T1 Plasmids und der His₆-Tag des pET14b Plasmids. Da AF6 eine natürliche Affinität an Ni²⁺-NTA aufweist, war es jedoch nur möglich GST-AF6 als *Bait* an die GSH-*Beads* zu koppeln und mit den His₆-getaggten Prey Proteinen zu inkubieren. Die Anwesenheit des His₆-Tags ist für den Pulldown nicht notwendig, ermöglicht aber den Nachweis auch geringer Spuren einer Interaktion mittels Western Blot. Zusätzlich bietet der Pulldown-Ansatz die Möglichkeit alle entwickelten Konstrukte unter gleichen Bedingungen auf eine Interaktion mit AF6 hin zu testen.

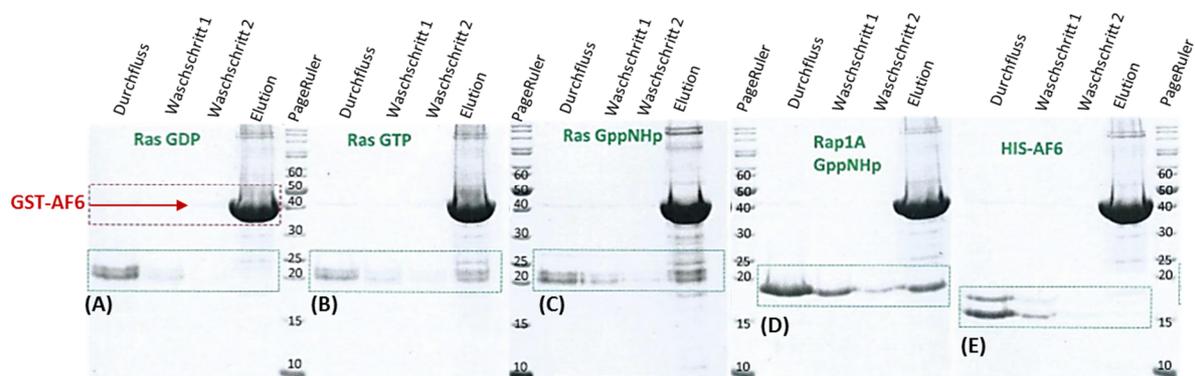


Abbildung 4-26: SDS-Page der ersten GST-Pulldown-Experimente

Es wurden 5 verschiedene Protein-Kombinationen getestet und jeweils der Durchfluss der Säule, die zwei aufeinanderfolgenden Waschschrte und die Elution des *Bait*-Proteins GST-AF6 mittels SDS-PAGE überprüft. **(A)** GST-AF6 mit inaktivem H-Ras[GDP], **(B)** GST-AF6 mit aktivem H-Ras[GTP], **(C)** GST-AF6 mit dauerhaft aktivem H-Ras[GppNHp], **(D)** GST-AF6 mit dauerhaft aktivem Rap1A[GppNHp] und **(E)** GST-AF6 mit His₆-AF6. Eingesetzte *Bait/Prey*-Konzentrationen (μ M Bereich). Das GST-AF6 Protein ist links in rot neben der SDS-PAGE markiert. Der Bereich der *Prey*-Konstrukte ist mit einem Kasten markiert.

In den ersten Pulldown-Experimenten wurde zunächst GST-AF6 auf die bereits bekannte Interaktion mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A, sowie einer Homodimerisierung des AF6 selbst, getestet. Findet eine Interaktion zwischen den *Bait*- und *Prey*-Proteinen statt, so sind beide Proteine in der Eluatfraktion nachweisbar. Dies ist für die kleinen GTPase H-Ras und Rap1A der Fall. Ebenso entspricht die Intensität der detektierten Proteinbanden auch dem Affinitätsverhältnis der unterschiedlich beladenen GTPasen. Eine Dimerisierung des GST-AF6 mit His₆-AF6 konnte unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Grundsätzlich muss der Pulldown kritisch betrachtet werden, da die Interaktion meist nur bei starken und

nicht transienten Bindungen nachgewiesen werden kann. Es wurde daher darauf geachtet, dass so wenige Kräfte (Zentrifugation, Bewegung, etc.) wie möglich auf das Pulldown-System einwirken konnten, welche die Interaktion hätten hemmen können.

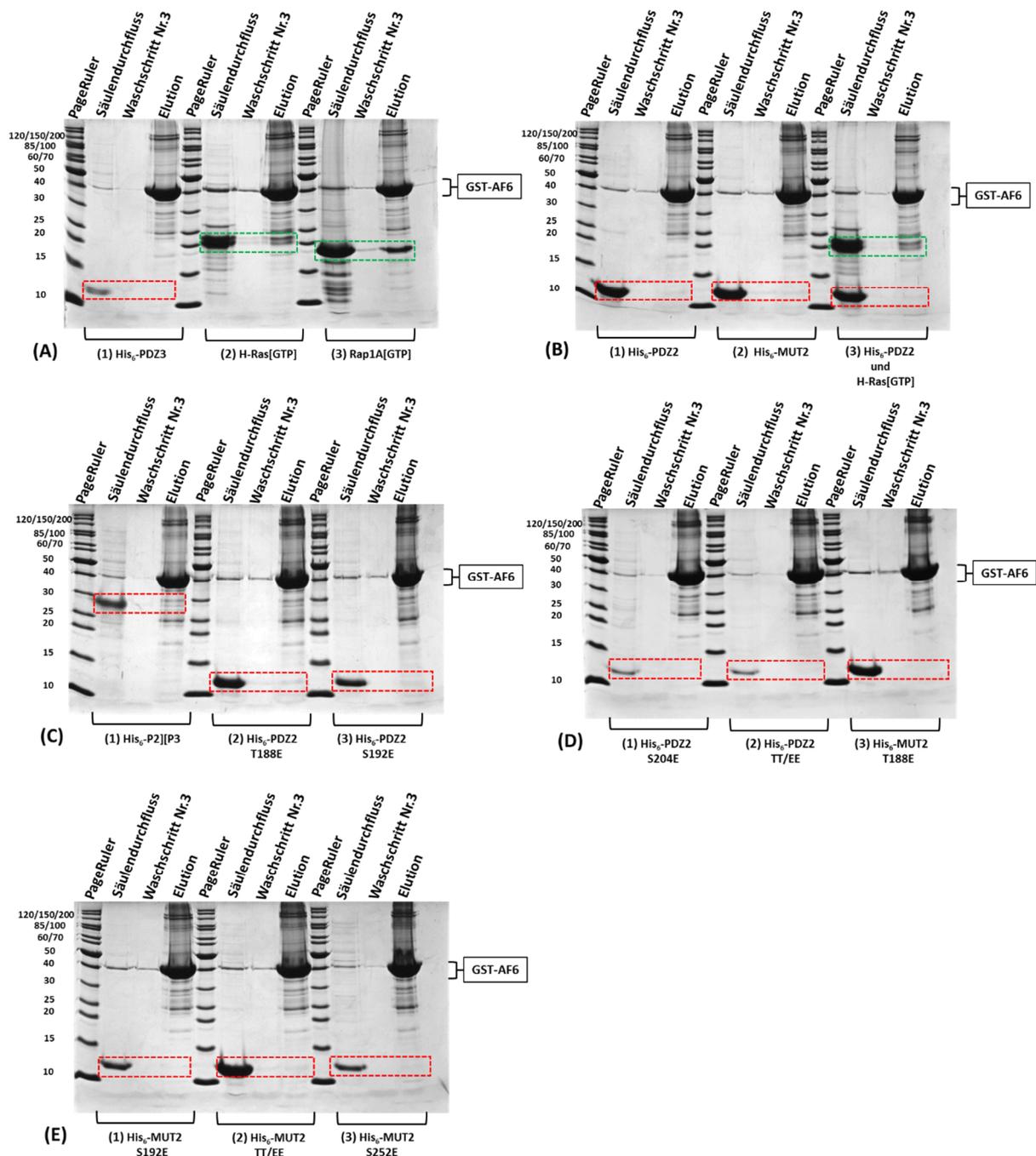


Abbildung 4-27: SDS-Page der nachfolgenden GST-Pulldown-Experimente

GST-AF6 dient als *Bait*-Protein und wurde an GSH-*Beads* gekoppelt. Eingesetzte *Bait/Prey*-Konzentrationen (μM Bereich) schwankten, wurden aber in maximal möglicher Konzentration eingesetzt. Das GST-AF6 Protein ist rechts jeder Seite neben SDS-PAGE markiert, positive Interaktionen sind mit einem grünen Kasten umrandet, nicht nachweisbare Interaktionen mit einem roten Kasten. Die Kennzeichnung der einzelnen Laufspuren befindet sich über dem Gel, links befindet sich jeweils der Größenstandard. (Beschreibung der Proben siehe nächste Seite)

Negativkontrolle: His₆-PDZ3 (A1)

Positivkontrolle: H-Ras[GTP] (A2)

Rap1A[GTP] (A3)

Zonula occludens Konstrukte: His₆-PDZ2 (B1)

His₆-MUT2 (B2)

His₆-PDZ2 mit aktivem H-Ras als kombinierter Interaktionstest (B3)

His₆-P2][P3 (C1)

ZO1-PDZ2 Phosphorylierungsmutanten: His₆-PDZ2 T188E (C2)

His₆-PDZ2 S192E (C3)

His₆-PDZ2 S204E (D1)

His₆-PDZ2 TT/EE (D2)

ZO1-MUT2 Phosphorylierungsmutanten: His₆-MUT2 T188E (D3)

His₆-MUT2 S192E (E1)

His₆-MUT2 TT/EE (E2)

His₆-MUT2 S252E (E3)

Die durchgeführten Pulldown-Experimente zeigten eine Interaktion des GST-AF6 Konstruktes mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A. Diese konnten in aktiver [GTP] und inaktiver [GDP] Beladung positiv auf eine Interaktion hin getestet werden, Abb. 4-26 (A-D), sowie Abb. 4-27 (A2) und (A3). Eine Interaktion des GST-AF6 Konstruktes mit der homodimeren PDZ2 Domäne, deren künstlich durch Mutation erzeugten monomeren Version MUT2, sowie dem Linkerbereich P2][P3 zwischen der PDZ2- und PDZ3-Domäne Abb.4-27 (B1 und B2) sowie (C1), konnte nicht gezeigt werden. Eine gekoppelte Interaktion des AF6 mit ZO1 durch H-Ras Abb. 4-27 (B3) ist nicht erkennbar. Ebenso konnte kein positiver Effekt einer Phosphorylierungsmutation hinsichtlich einer Bindung an das GST-AF6 Konstrukt gezeigt werden Abb. 4-27 (C2) bis (E3). Die SDS-PAGE wurden mittels kolloidalem Coomassie sensitiv eingefärbt. Ein Antikörperspezifischer Nachweis mittels Westernblot (SuperSignal West HisProbe™ Kit) konnte leider nur einmalig in unzureichender Qualität durchgeführt werden und ließ keine Interaktion erkennen. Da die Affinität von ZO1 an AF6 zu binden sehr schwach zu sein scheint und sich die Proteinkonzentrationen im µmolaren Bereich bewegen, war ein positiver Nachweis auf dieser Detektionsebene durch kolloidale Coomassiefärbung der SDS-PAGE wohl nicht möglich. Eine Detektion mittels monoklonalen AF6 und ZO1 Antikörpern oder eine radioaktive Markierung wären hier effizienter gewesen.

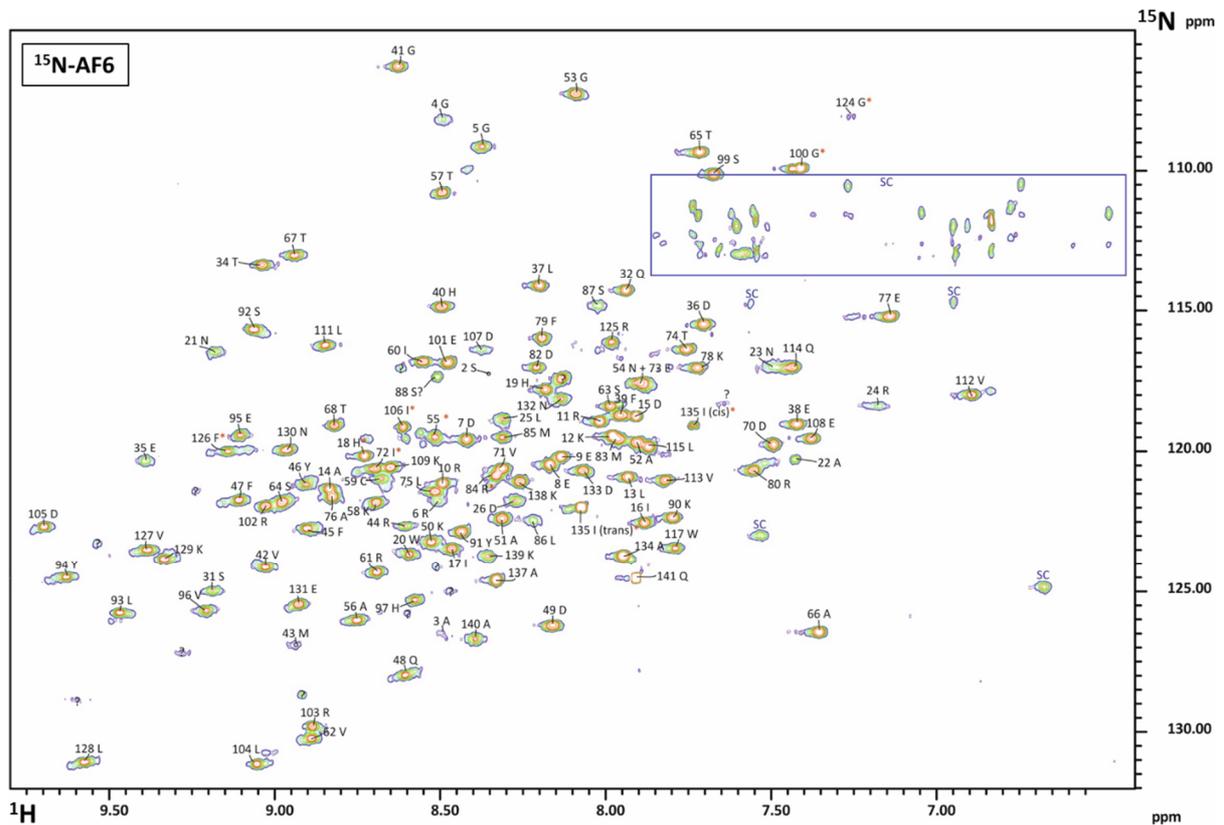


Abbildung 4-29: Neu prozessierte ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum des AF6-Konstrukts [Steiner, 2001]

Die Seitenketten des Proteins wurden nicht zugeordnet und sind in blau als SC einzeln im Spektrum und in der blauen Box gekennzeichnet. **Protein:** ca. 700 μM ^{15}N -AF6(1-141). Puffer: 20 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 6,9/ 2mM DTT / 0,2 mM EDTA/ 1 mM NaN_3 . **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / T 303 K / 800 MHz Bruker Spektrometer. **AcquPars:** TD(F2) 8192 x 800 TD(F1) / DS 16 / NS 8. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

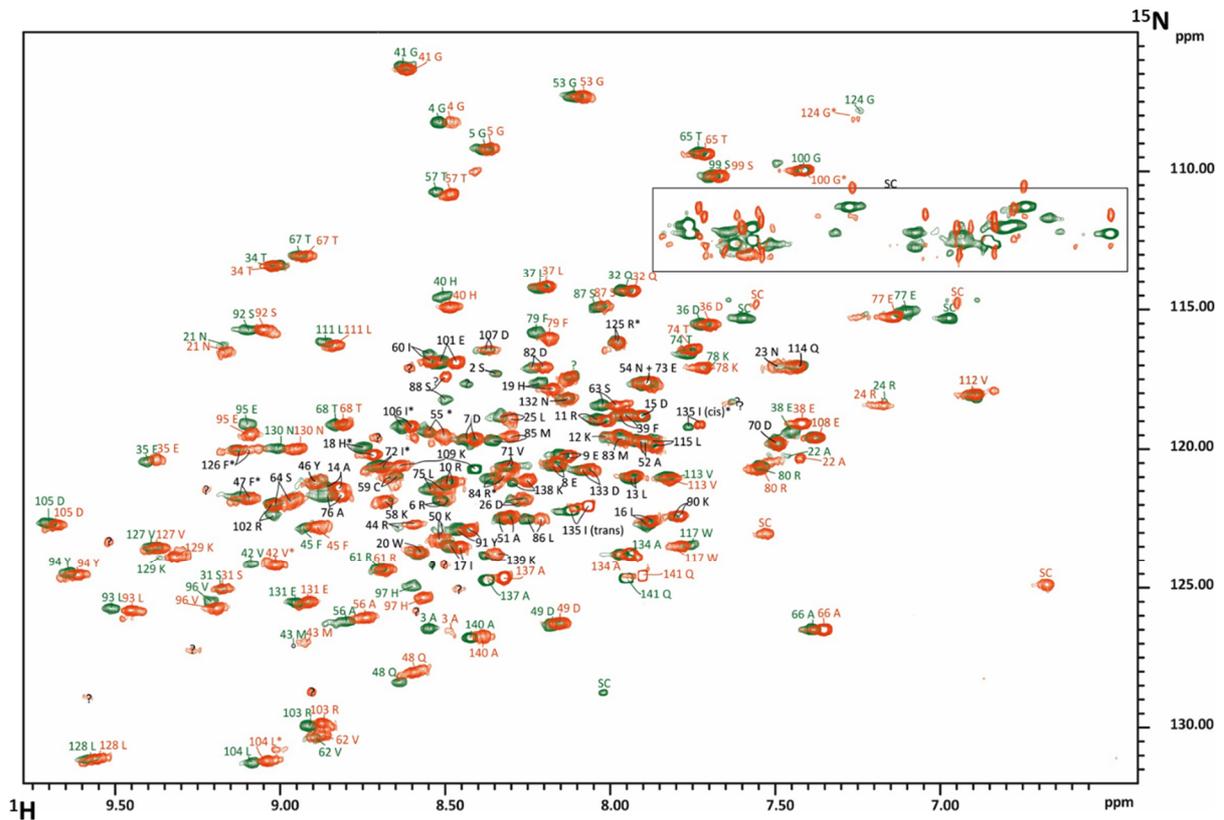


Abbildung 4-30: Überlagerung des ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrums [Steiner, 2001] und des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von AF6(1-141)

Überlagerung des HSQC-Spektrums (Abb. 4-28) des AF6-Konstruktes in grün mit dem neu prozessierten TROSY-Spektrum des gleichen Konstruktes (Abb. 4-29) in rot.

Da bereits Interaktionsstudien zwischen AF6 und den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A [Steiner, 2001] durchgeführt wurden, mussten die damals durchgeführten TROSY Messungen, um mit den neu angefertigten Messreihen verglichen werden zu können, exakt gleich prozessiert und ausgewertet werden. Da sich auf Grund der unterschiedlichen Messmethoden auch die chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren unterscheiden, wurden in Abbildung 4-30 die Spektren der Anschaulichkeit halber über die Aminosäure D70 geeicht und überlagert. Somit sind die Unterschiede basierend auf einer anderen Temperatur (303 K) und eines anderen Puffersystems (Kalium-Phosphatpuffer pH 6,9) gut zu erkennen. Diese wurden im Fall der neuen Messreihen für geplante Verdrängungsexperimente (AF6 + GTPase + ZO1) analysiert und optimiert (Messungen bei 298 K, Puffer: 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 0,1 mM AEBSF / pH 6,9). Trotz dieser Unterschiede ist ein Vergleich der Messreihen in Bezug auf die Interaktionsflächen des AF6-Konstruktes, durch die exakte Neuauswertung, möglich.

4.2.2 Die Zonula occludens 1 Konstrukte

Mit Hilfe der Trippelresonanzexperimente HNCO, HNCA, CBCACONH und durch Unterstützung von Prof. Dr. Claudia Munte (Lehrstuhl für physikalische Biochemie Universität Regensburg), konnten die Signale des ZO1-PDZ2 -Konstruktes zugeordnet werden. Diese konnten mit den Daten der BMRB-Datenbank (16871, PDB-File „2JWE“), die die Informationen der mittels NMR aufgeklärten Struktur der ZO1-PDZ2-Domäne bei unterschiedlicher Temperatur (310 K statt 298 K) und abweichendem Puffer (in 20 mM Phosphatpuffer mit 50 mM NaCl pH 6,5) enthält, abgeglichen und vervollständigt werden. Hierbei zeigte sich ein ungewollter, aber nicht interferierender „G-S-G-C“-Überhang der PDZ2/MUT2 Konstrukte am C-terminalen Ende (C'-GSGC), der durch einen Sequenzierfehler des Stoppcodons entstand und daraufhin behoben wurde. Die Zuordnung konnte daraufhin auf die Spektren der 800 MHz-Messreihe übertragen werden.

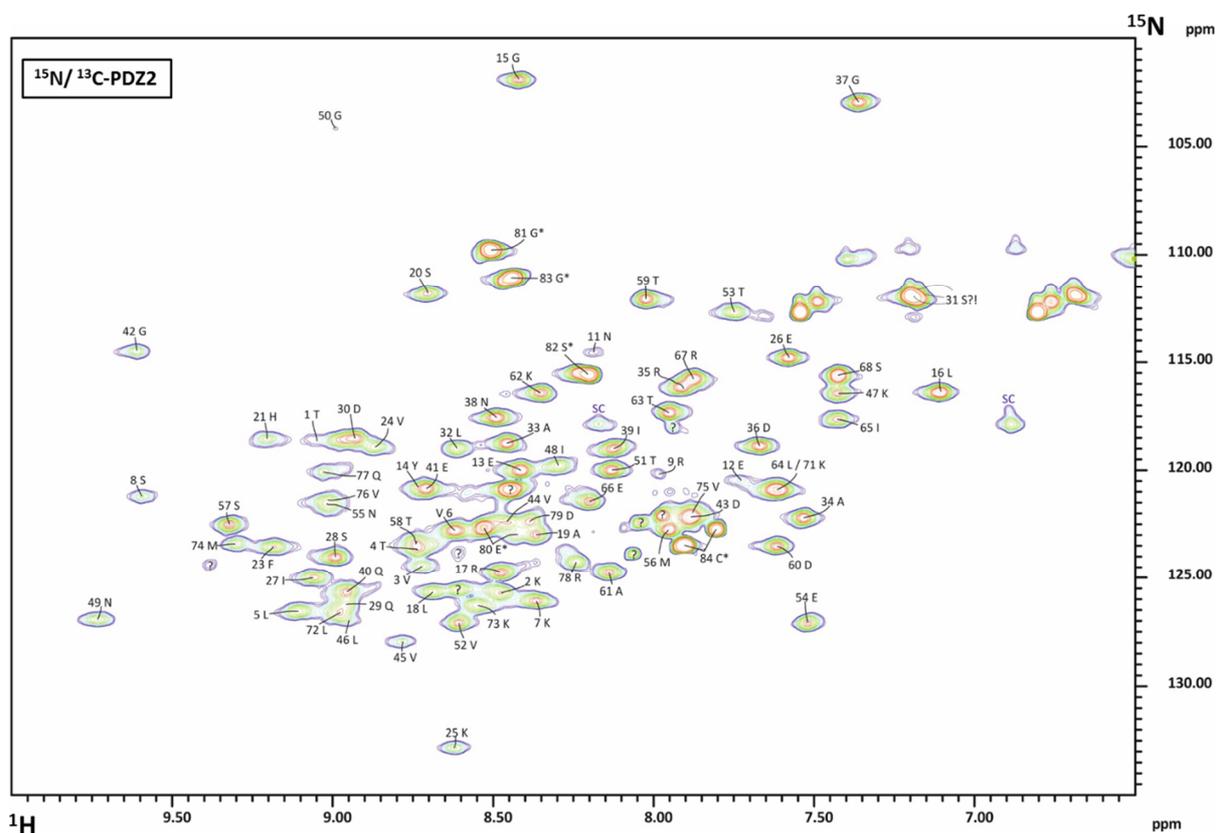


Abbildung 4-31: 600 MHz HSQC-Spektrum des $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -PDZ2-Konstruktes

Protein: 1 mM $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -PDZ2, [mit C'-GSGC Terminus]. **Puffer:** 10 mM Na-Phosphat / 100 mM NaCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / pH 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 600 MHz Bruker Spektrometer. **AcquPars:** TD(F2) 2048 x 128 TD(F1) / DS 4 / NS 4. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

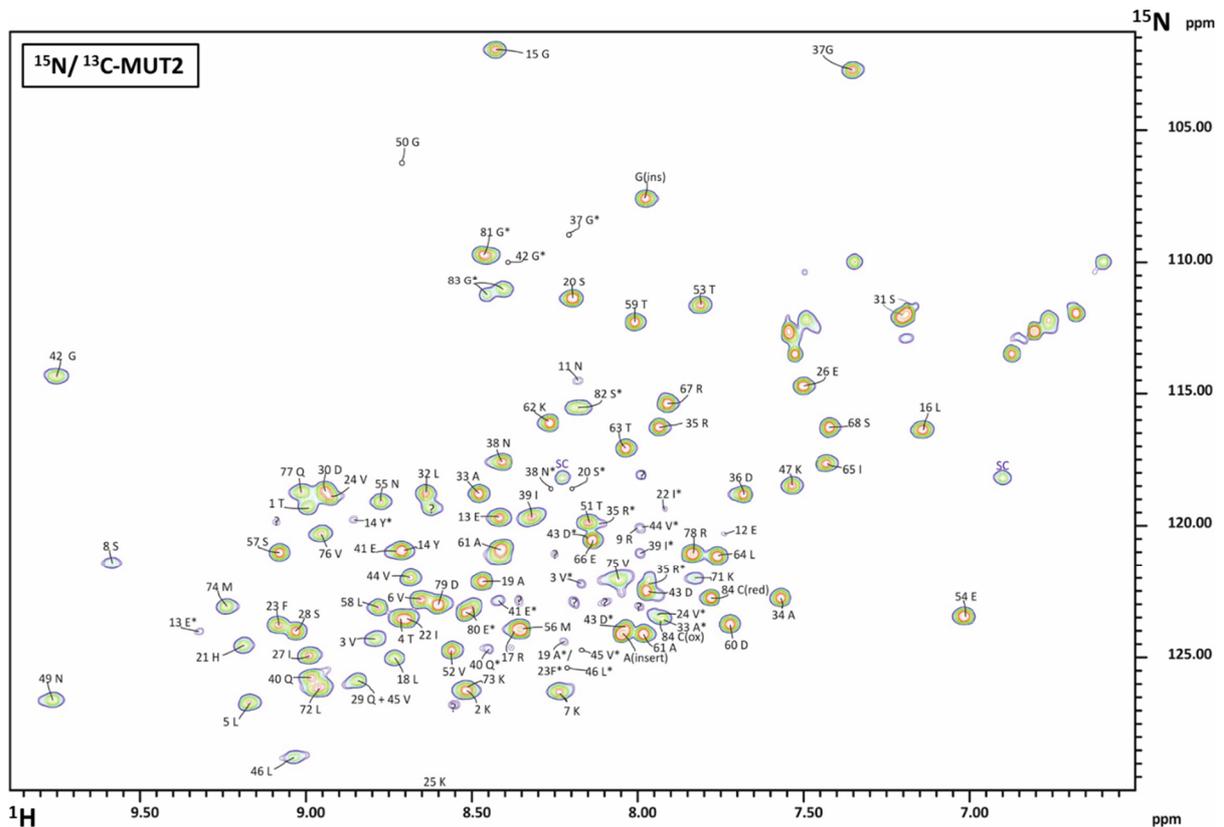


Abbildung 4-33: 600 MHz-HSQC-Spektrum des $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -MUT2-Konstruktes

Protein: 1,2 mM $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -MUT2, (C⁻-GSGC). **Puffer:** 10 mM Na-Phosphat / 100 mM NaCl / 2 mM DTT / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / pH 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / T 298 K / 600 MHz. **AcquPars:** TD (F2) 2048 x 128 TD (F1) / DS 4 / NS 4. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

Tabelle 4-5: Die chemischen Verschiebungen der sequentiellen Zuordnungen des PDZ2- und MUT2-Konstruktes

	HN		N		CA		CB	
	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2
T-1	9.05	9.08	118.7	119.4	61.8	62.1	71.2	71.1
K-2	8.56	8.60	125.8	126.4	55.8	55.7	33.1	33.2
V-3	8.8	8.87	124.5	124.4	61.1	61.0	35.8	35.9
T-4	8.82	8.80	123.7	123.6	61.5	61.7	70.2	70.2
L-5	9.18	9.25	126.6	126.8	53.0	53.0	43.9	43.9
V-6	8.70	8.74	122.9	123.0	61.2	61.4	34.3	34.3
K-7	8.45	8.32	126.2	126.4	56.9	56.8	33.6	33.6
S-8	9.67	9.67	121.3	121.5	58.9	58.9	65.0	65.2
R-9	8.07	8.10	120.3	120.4	55.4	55.4	n	n
K-10	n	n	n	n	58.4	58.5	32.3	32.4
N-11	8.28	8.27	114.7	114.6	53.3	53.3	37.2	37.2
E-12	7.82	7.82	120.6	120.4	56.7	56.7	31.1	31.2
E-13	8.49	8.50	120.1	119.8	54.3	54.2	31.5	31.5
Y-14	8.80	8.79	120.8	121.1	62.2	62.4	37.8	37.6
G-15	8.50	8.51	102.0	102.1	45.5	45.6	n	n

	HN		N		CA		CB	
	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2
L-16	7.19	7.22	116.5	116.5	53.8	53.8	43.9	44.1
R-17	8.56	8.44	124.9	124.0	55.2	54.9	31.0	31.2
L-18	8.77	8.82	125.8	125.2	53.4	53.3	43.6	43.9
A-19	8.45	8.55	123.1	122.3	51.1	51.0	24.3	23.3
S-20	8.79	8.28	111.9	111.5	56.9	56.7	67.9	n
H-21	9.29	9.27	118.7	124.7	53.3	55.4	n	n
(G)	-	n	-	n	-	n	-	n
(G)	-	n	-	n	-	45.7	-	n
(G)	-	8.06	-	107.7	-	45.0	-	n
(A)	-	8.13	-	124.2	-	53.0	-	19.6
I-22	n	8.78	n	123.7	57.3	60.1	37.7	39.2
F-23	9.27	9.17	123.6	123.9	54.8	54.3	43.3	43.7
V-24	8.95	9.01	119.0	119.1	63.0	62.7	31.2	31.2
K-25	8.71	8.67	132.9	132.9	56.7	57.1	33.6	33.8
E-26	7.66	7.59	114.9	114.8	54.9	54.7	34.7	34.6
I-27	9.14	9.08	125.1	125.0	59.5	59.4	39.9	39.8
S-28	9.07	9.11	124.1	124.1	58.6	58.7	63.5	63.5
Q-29	9.04	9.03	126.3	126.2	57.7	57.8	28.7	28.7
D-30	9.02	9.02	118.6	118.8	55.5	55.6	39.7	39.8
S-31	7.26	7.29	112.2	112.2	57.5	57.6	66.8	66.6
L-32	8.69	8.72	119.1	118.9	58.2	58.1	42.7	42.7
A-33	8.54	8.56	118.9	118.9	55.2	55.2	18.9	18.9
A-34	7.62	7.65	122.3	122.9	54.9	55.0	18.5	18.5
R-35	8.00	8.02	116.3	116.4	58.4	58.4	31.7	30.7
D-36	7.75	7.76	119.0	118.9	57.1	57.1	43.8	43.9
G-37	7.44	7.44	103.1	102.8	46.2	46.3	n	n
N-38	8.57	8.49	117.7	117.7	55.4	55.8	40.0	40.1
I-39	8.21	8.40	119.1	119.8	60.5	60.8	39.7	39.3
Q-40	9.04	9.07	125.8	125.9	53.5	53.5	31.7	31.6
E-41	8.79	8.79	121.0	121.1	58.9	58.9	28.8	28.8
G-42	9.69	9.83	114.6	114.5	44.9	44.9	n	n
D-43	7.97	8.06	122.3	122.6	56.0	56.0	40.6	40.7
V-44	8.54	8.77	122.5	122.1	62.7	62.4	33.0	33.4
V-45	8.87	8.93	128.1	126.0	61.8	62.6	n	32.0
L-46	9.04	9.12	127.1	128.9	56.0	56.0	43.7	43.5
K-47	7.51	7.62	116.5	118.6	55.6	56.2	39.0	38.3
I-48	8.38	8.50	119.9	121.2	61.1	61.0	40.7	40.8
N-49	9.82	9.85	127.0	126.7	54.2	54.3	36.8	36.9
G-50	9.07	8.98	104.2	105.0	45.4	45.5	n	n
T-51	8.22	8.23	120.1	120.0	62.5	62.2	69.6	69.7
V-52	8.69	8.64	127.2	124.9	63.5	62.7	32.6	32.4
T-53	7.83	7.89	112.8	111.8	61.8	61.5	68.7	68.6
E-54	7.60	7.10	127.2	123.6	59.0	58.5	29.6	29.8
N-55	9.10	8.86	121.9	119.2	55.1	54.3	36.5	33.0
M-56	8.04	8.43	122.8	124.1	55.7	55.3	35.6	36.1
S-57	9.40	9.16	122.6	121.1	57.8	57.0	64.5	65.2
L-58	8.83	8.86	123.5	123.2	58.1	58.1	41.6	41.3
T-59	8.11	8.09	112.2	112.4	66.4	66.4	68.6	68.6
D-60	7.70	7.81	123.6	123.9	57.6	57.6	39.4	39.7
A-61	8.22	8.06	124.8	124.2	55.7	55.7	18.2	18.5

	HN		N		CA		CB	
	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2	PDZ2	MUT2
K-62	8.43	8.35	116.5	116.2	60.4	60.3	32.2	32.5
T-63	8.04	8.12	117.4	117.2	66.7	66.6	68.5	68.6
L-64	7.70	7.84	121.0	121.3	58.3	58.3	41.9	42.2
I-65	7.51	7.51	117.8	117.8	65.6	65.8	37.4	37.7
E-66	8.28	8.22	121.6	120.7	59.3	59.3	29.6	29.7
R-67	7.96	8.00	115.9	115.5	56.7	56.6	30.3	30.4
S-68	7.51	7.51	115.7	116.4	59.6	59.6	63.2	n
K-69	8.69	n	123.9	n	56.8	n	n	n
G-70	n	n	n	n	46.5	46.6	n	n
K-71	7.70	7.91	121.0	122.1	55.8	55.8	35.1	35.2
L-72	9.06	9.05	126.7	126.3	53.7	53.7	45.0	45.4
K-73	8.63	8.60	126.4	126.3	55.0	54.8	33.7	34.1
M-74	9.39	9.32	123.5	123.2	53.8	53.8	38.1	38.2
V-75	7.97	8.14	122.2	122.2	62.0	62.0	33.4	33.2
V-76	9.10	9.04	121.6	120.4	58.8	58.3	35.7	36.1
Q-77	9.11	9.10	120.2	118.8	54.6	54.2	41.2	38.2
R-78	8.32	7.92	124.4	121.2	55.0	55.4	32.3	32.1
D-79	8.47	8.69	122.5	123.1	54.3	54.3	41.9	41.7
E-80	8.50	8.58	123.0	123.3	56.7	56.8	30.3	30.3
G-81	8.58	8.55	109.9	109.8	45.5	45.5	n	n
S-82	8.31	8.27	115.6	115.6	58.6	58.6	64.0	63.9
G-83	8.55	8.54	111.3	111.4	45.4	45.5	n	n
C-84	7.89	7.86	122.8	122.9	59.5	59.5	n	n

n = nicht zugeordnete Resonanzen

Die Insertion *GGGA* der Mutante ist kursiv hervorgehoben

Angaben in [ppm]

Die Linienbreiten der HSQC-Signale kann zusätzlich Auskunft über die relative Größe eines Proteins geben. Ansatzweise führt eine Verdoppelung der molekularen Masse des Proteins auch zu einer Verdoppelung der Linienbreite dieser Signale, daher eignet sich eine Linienbreitenanalyse um die Monomerisierung der PDZ2-Domäne durch die GGGA-Insertion zu untersuchen. Die Analyse der Linienbreite von 15 isolierten, über das gesamte Proteine verteilte Signale, der PDZ2- und MUT2-Spektren (Tab. 4-6, Abb. 4-31 / 4-33) mit dem Programm Auremol, ergab eine Abnahme der Linienbreite [Hz] um den Faktor 2,05 in Bezug auf die Linienbreiten des PDZ2-Spektrums. Zusätzlich wurden die chemischen Verschiebungen des CA, CB, HN, und N des Proteinrückgrats (Prof. Dr. Claudia Munte) einer Sekundärstrukturvorhersage, durch das Programm CSI 2.0 (<http://csi.wishartlab.com/cgi-bin/index.py>) unterzogen (Abb. 4-34). Diese belegen eine strukturelle Veränderung der Mutante im Bereich der Mutation selbst (β 2-Faltblatt), sowie im Bereich vor und nach dem β 3-Faltblatt. Diese Veränderungen führen dazu, dass die stabile β 2- β 2' Interaktion, die hauptsächlich für die Stabilität des Homodimeres verantwortlich ist, auf Grund der räumlichen Entfernung nicht vollzogen werden kann. Somit konnte eine Monomerisierung der PDZ2-Domäne durch die Mutation zu MUT2, bewiesen werden (Abb. 4-35).

Tabelle 4-6: Auswertung der Linienbreite der PDZ2- und MUT2-Spektren (Abb.4-33)

Isoliertes Signal		PDZ2			MUT2			
Aminosäure	Position	N [ppm]	HN [ppm]	(A) L2 [Hz]	N [ppm]	HN [ppm]	(B) L2 [Hz]	(A)/(B)
S	8	121,3	9,69	17,90	121,5	9,68	9,51	1,88
G	15	102,0	8,50	11,53	102,1	8,52	5,52	2,09
L	16	116,5	7,19	7,49	116,5	7,23	5,22	1,43
S	20	111,9	8,79	10,08	111,5	8,29	5,23	1,93
K	25	132,9	8,69	15,78	132,9	8,68	5,64	2,80
D	36	118,9	7,75	11,34	118,9	7,78	5,16	2,20
G	37	103,0	7,44	11,70	102,8	7,45	8,09	1,44
G	42	114,6	9,70	14,70	114,5	9,84	5,45	2,70
K	47	116,5	7,51	15,62	118,6	7,63	8,99	1,74
N	49	127,0	9,83	12,84	126,7	9,86	6,92	1,86
T	53	112,8	7,83	10,77	111,8	7,90	8,03	1,34
E	54	127,2	7,61	17,06	123,6	7,11	6,79	2,51
T	59	112,2	8,11	11,08	112,4	8,11	5,00	2,21
I	65	117,7	7,51	15,83	117,8	7,52	6,16	2,57
S	68	115,6	7,51	19,04	116,4	7,53	5,26	1,88
Linienbreitenverhältnis PDZ2-Homodimer (A) zum monomeren MUT2 (B) \rightarrow 2,05 : 1								2,05

Die Prozessierung der HSQC-Spektren erfolgte in beiden Ebenen mit einem EM Filter (+5,0 Hz).

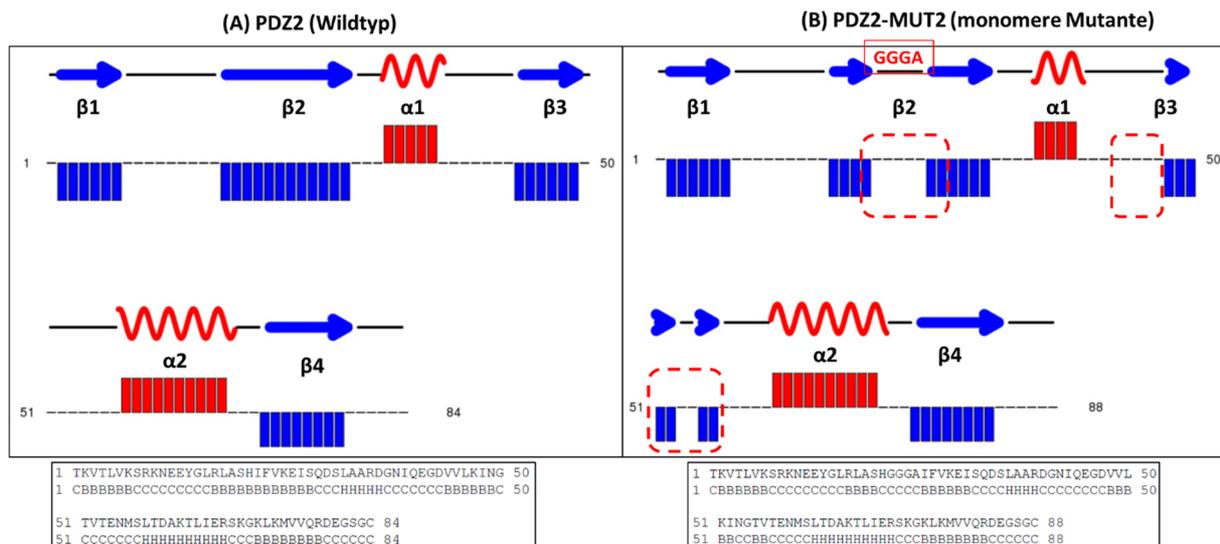


Abbildung 4-34: CSI 2.0-Graphik der PDZ2 (Wildtyp) Domäne (A) und ihrer künstlich durch GGAA-Insertion erzeugten Mutante (B)

Die Sekundärstrukturelemente sind farblich markiert (β -Faltblatt blau, α -Helix rot) und beschriftet. Unter der Graphik befindet sich jeweils die Aminosäuresequenz des Konstruktes und seine vorhergesagte Sekundärstruktur (C = coiled, B = Beta-Faltblatt, H = Helix). Rot umrandet sind die Unterschiede die durch die Insertion des GGGA in das β 2-Faltblatt entstehen.

Die monomere Struktur des MUT2 in Abbildung 4-35 wurde durch *homology-modelling*, basierend auf der monomeren PDZ2-Domäne des SAP97 Proteins, mit dem Programm Swiss-Modell erzeugt. Ein Vergleich der einzelnen chemischen Verschiebungen zwischen dem MUT2- und PDZ2-Konstrukt (Abb. 4-36) zeigt die Veränderungen jeder einzelnen Aminosäure, in Folge der GGGA-Insertion. Hierbei ist der Bereich der Insertion selbst (ZO1-S204, -H205, -I206), entspricht jeweils dem PDZ2-S20, -H21, -I22) starken Veränderungen unterworfen, aber auch markante Änderungen wie beispielsweise das Aufbrechen der essentiellen Salzbrücke im Fall des ZO1-E238 (PDZ2-Konstrukt E54) mit K209 (PDZ2-Konstrukt K25) wie in Abbildung 4-37 dargestellt sind zu erkennen. Diese im speziellen, könnten als Nachweis einer Monomerisierung der PDZ2-Wildtyp-Domäne (Abb. 4-35) unter natürlichen Bedingungen, für nachfolgenden Experimente dienen.

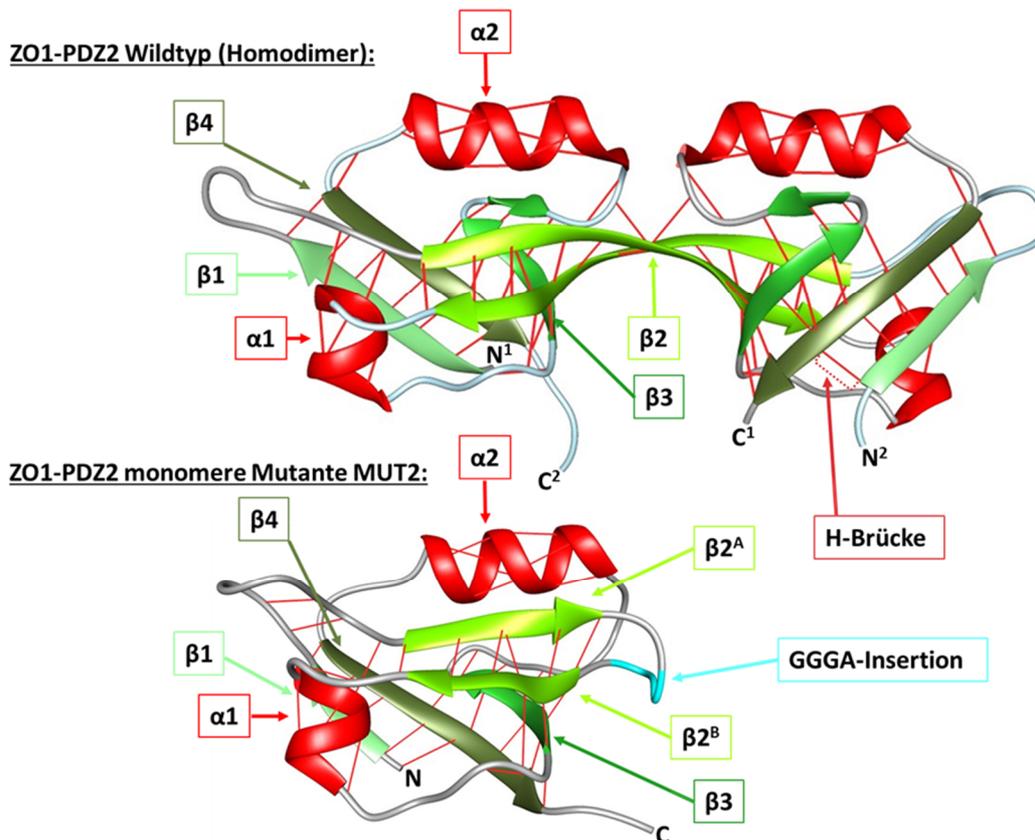


Abbildung 4-35: 3D-Struktur der PDZ2-Domäne (PDB-File „2JWE“) und der monomeren Variante MUT2 (homology model [PDB-File,„4OAJ“]) des Zonula occludens 1 Proteins

Die monomere Struktur des MUT2 wurde mittels *homology-modelling*, basierend auf dem PDB-File „4OAJ“ der monomeren SAP97-PDZ2 Domäne, mit dem Programm Swiss-Modell erzeugt.

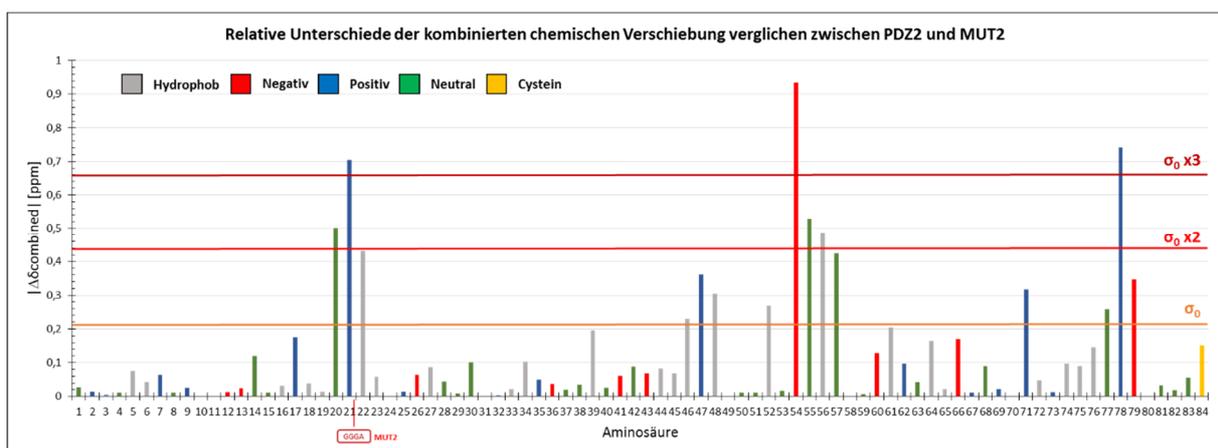


Abbildung 4-36: Übersicht über die Effekte der Monomerisierung mittels GGGA-Insertion auf die einzelnen chemischen Verschiebungen im direkten Vergleich mit der Wildtyp PDZ2-Domäne

Dargestellt sind die einzelnen Aminosäuren der PDZ2 (C'-GSGC) Primärsequenz, farbig hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften hervorgehoben. Aufgetragen ist der Betrag der relativen Veränderung der kombinierten chemischen Verschiebung (Wildtyp PDZ2 dient als Referenz) jeder einzelnen Aminosäure der monomeren Mutante ($|\Delta\delta_{combined}| = \delta_{combined_{Mutante}} - \delta_{combined_{Wildtyp}}$). Das Signifikanzkriterium der Gewichtung bezieht sich auf σ_0 .

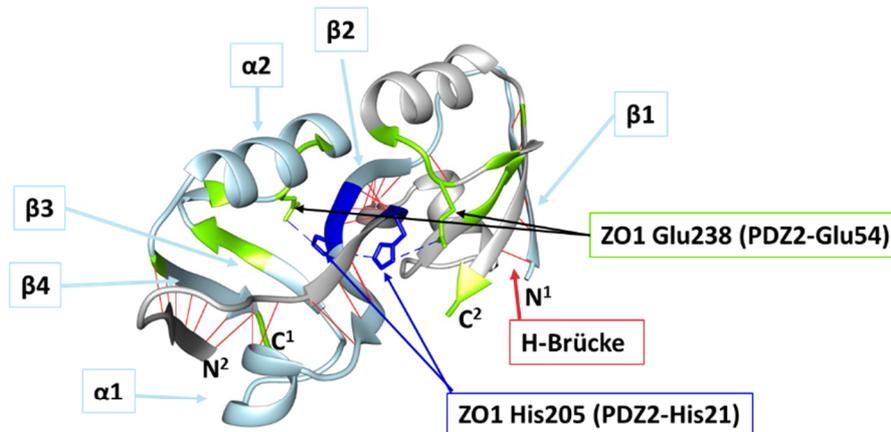
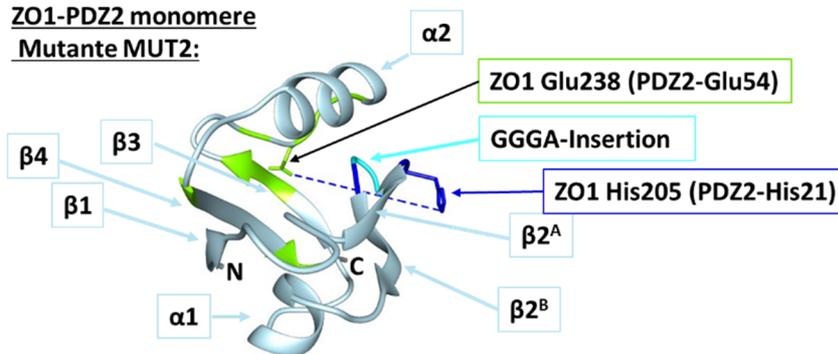
ZO1-PDZ2 Wildtyp (Homodimer):**ZO1-PDZ2 monomere
Mutante MUT2:**

Abbildung 4-37: Monomerisierungseffekte des MUT2-Konstruktes im direkten Vergleich mit der Wildtyp PDZ2-Domäne, übertragen auf ihre 3D-Strukturen

In hellem grün sind die stärksten Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungen (Abb. 4-36) auf die jeweiligen 3D-Strukturen der Konstrukte übertragen. In dunklem blau ist der flankierende Bereich der Mutationsregion markiert, die GGGA-Insertion selbst ist in Cyan hervorgehoben. Die markanten Aminosäure Glu(E)238 und His(H)205 sind im speziellen markiert.

Auffällig war ebenfalls, dass in den Trippelresonanz-Experimenten unterschiedliche Konformationen einzelner Aminosäuren der untersuchten Konstrukte festgestellt werden konnten. Vor allem das MUT2-Konstrukt zeigte eine Vielzahl dieser Konformationen, wohingegen das PDZ2-Konstrukt diese Effekte lediglich im C-terminalen Bereich erkennen ließ. Zum einen könnte es sich hierbei um unterschiedliche Konformationen des MUT2 auf Grund des GGGA-Inserts, oder aber auch um ungewollte Fragmentierung des Konstrukts durch proteolytisch aktive Verunreinigungen handeln. Der Einfluss des C`-GSGC Überhangs ist hierbei auch noch ungeklärt. Die chemischen Verschiebungen sind im Anhang mit aufgeführt.

4.3 NMR-Interaktionsexperimente des AF6 mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A

Um die Interaktion des AF6 mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A auf atomarer Ebene zu charakterisieren, wurden verschiedene NMR-Titrationsexperimente durchgeführt. Hierbei wurde stets AF6 als ^{15}N -markiertes Protein in gewünschter ($200\ \mu\text{M}$) Konzentration vorgelegt und als Referenz ohne den Bindepartner vermessen. Dieses Spektrum spiegelt den freien Zustand des AF6-Proteins wieder. Daraufhin wurde der Bindepartner (Bsp.: Rap1A) in maximaler, gewünschter Konzentration mit solch einer $200\ \mu\text{M}$ ^{15}N -AF6 Probe gemischt (maximales Probenvolumen war hier $500\ \mu\text{l}$) und durch schrittweise Verdünnung mit dem restlichen Volumen der definierten $200\ \mu\text{M}$ ^{15}N -AF6 Proteinlösung vom Komplex hin zum freien AF6 überführt (Kapitel 3.4.3). Mit dieser Technik konnte die Lage des chemischen Gleichgewichts zunehmend auf die Seite des freien AF6 verschoben und die auftretenden Effekte auf das AF6 verfolgt werden. Hierzu zählen die Änderungen der chemische Verschiebung, Intensität und Volumina der Signale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum, mit deren Hilfe die Protein-Protein-Interaktion analysiert werden konnte.

4.3.1 HSQC-Interaktionsexperiment des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP]

4.3.1.1 Titrationsreihe des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP]:

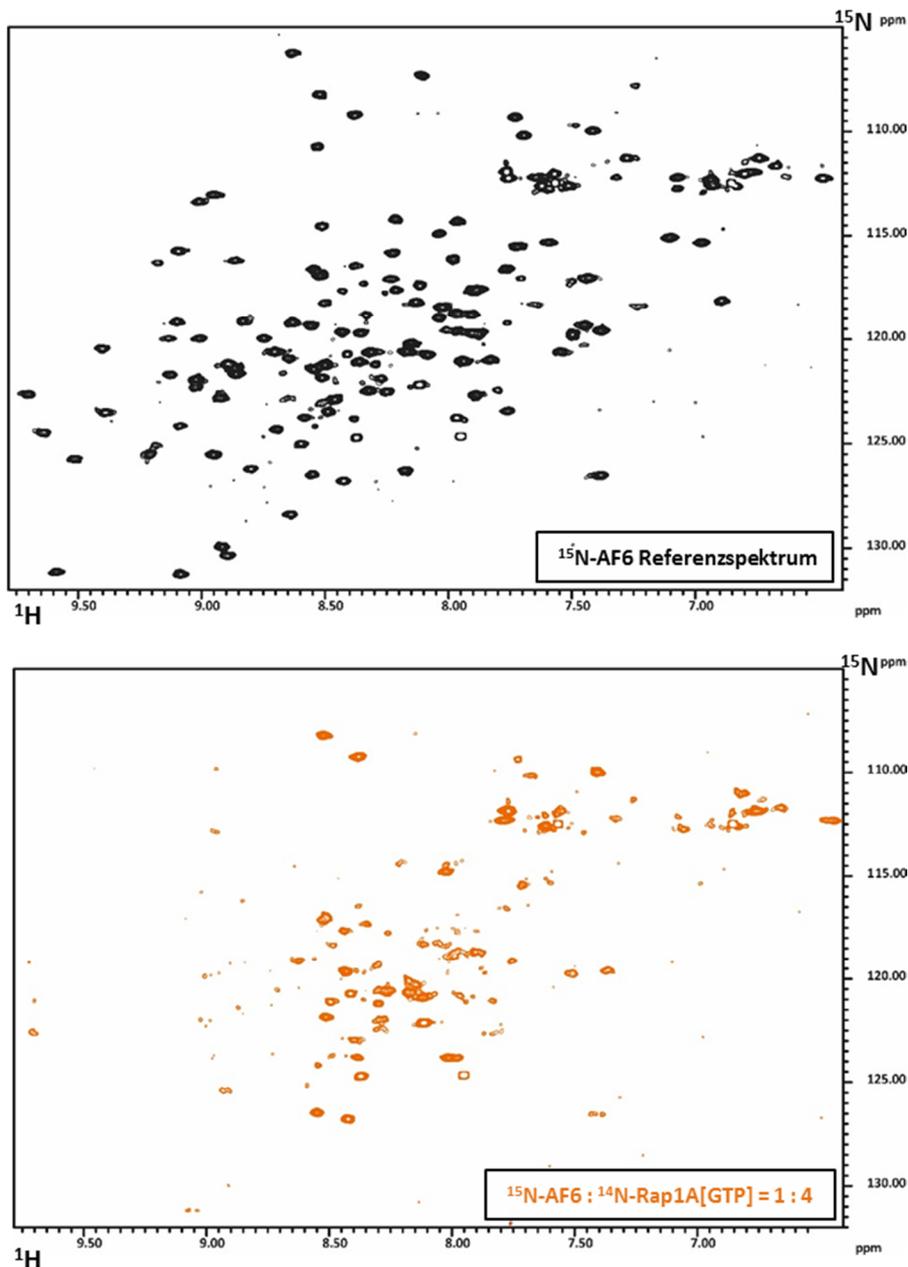


Abbildung 4-38: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP] Titration

Das AF6-Referenzspektrum ist schwarz, der letzte Titrationschritt (AF6:Rap1A = 1:4) ist orange dargestellt. **Proteine:** 200 μM ^{15}N -AF6 vorgelegt, mit ^{14}N -Rap1A[GTP] von 0 μM bis maximal 800 μM titriert. **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBSF / pH 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / HSQC-Spektrum. **AcquPars:** TD(F2) 2048 x 256 TD(F1) / DS 16 / NS 16. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

In Abbildung 4-38 ist die Durchführung einer NMR-Titrationsreihe des ^{15}N -markierten AF6 mit GTP beladenem Rap1A bis zu einem molaren Verhältnis des AF6 zu Rap1A von 1:4 gezeigt. Durch visuelle Auswertung des Verlaufs der Titration, lässt sich bereits erkennen, dass viele Signale des freien AF6 in den HSQC-Spektren durch die Komplexbildung verschwinden (Abb. 4-38 und 4-39). Um diese experimentellen Daten interpretieren zu können wurden alle Spektren gleich prozessiert und mit dem Programm Auremol ausgewertet. Hierbei erhält man Informationen über die chemischen Verschiebungen in ^1H - und ^{15}N -Dimension, sowie die Intensitäten und Volumina der einzelnen Signale. Die kombinierte chemische Verschiebung wurde nach Schumann [2007] errechnet und mit in die Auswertung einbezogen.

4.3.1.2 Chemische Verschiebungs- und Volumenänderung der Interaktion von AF6 mit Rap1A[GTP] im Überblick



Abbildung 4-39: Kombinierte ^1H - und ^{15}N -Verschiebungseffekte $|\Delta\delta|$ der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum während der vollständigen Titrationsreihe

Dargestellt ist der Betrag der relativen Signal-Differenz des Komplexes, jedes einzelnen Titrations-schrittes, in Bezug auf die Signale des freien AF6 Referenzspektrums ($\Delta\delta = \delta_{\text{AF6+Rap1A[GTP]}} - \delta_{\text{AF6 Referenz}}$). Dargestellt sind die Effekte jeder einzelnen Aminosäure (Position 1-141) des AF6-Konstruktes mit der darunter abgebildeten Sekundärstruktur. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Linienverbreiterung des Komplexes zurückzuführen. Die molaren Verhältnisse der Titrationschritte sind farblich markiert: Hellgrün = 1:0,25 / dunkelgrün = 1:0,5 / blau = 1:1 / rot = 1:2 / gelb = 1:4.

In Abbildung 4-39 ist deutlich zu erkennen, dass ein Großteil der Signale im Verlauf der kompletten HSQC-Titrationsreihe des AF6 mit aktivem Rap1A[GTP] eine starke Linienverbreiterung durch die Komplexbildung erfährt und die Signale somit nicht durchgehend verfolgt werden können. Da die verfolgbaren Signale als ungebundene Konformation des AF6 angesehen werden können, dessen komplexierte Konformation auf Grund der Linienbreite nicht detektierbar ist, kann über die Auswertung ihrer Volumina diese Informationslücke teilweise geschlossen werden (Abb. 4-40).

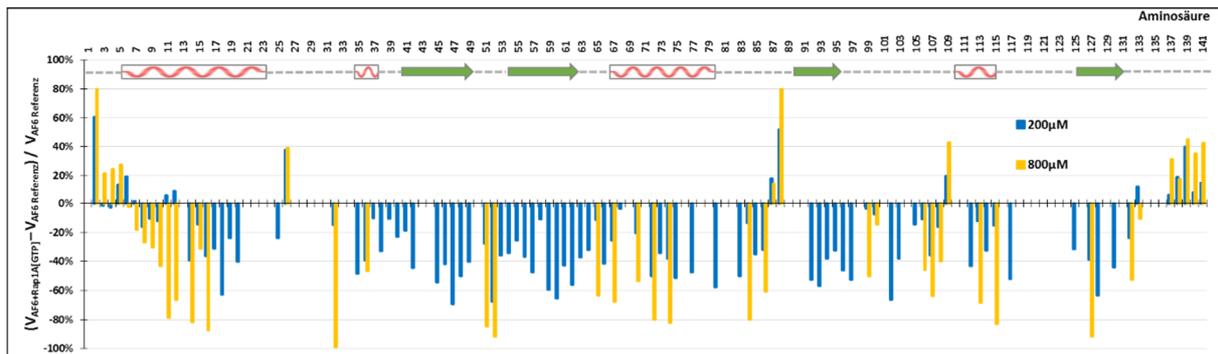


Abbildung 4-40: Volumen Effekte der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum der Titrationschritte 1:1 und 1:4 (AF6 zu Rap1A[GTP])

Dargestellt sind die relativ zum Referenzspektrum (freies AF6) auftretenden Veränderungen der Signalvolumina $[(V_{AF6+Rap1A[GTP]} - V_{Referenz}) / V_{Referenz}]$ jeder einzelnen Aminosäure des AF6-Konstruktes durch die Komplexbildung mit Rap1A[GTP]. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Die molaren Verhältnisse (AF6 zu Rap1A[GTP]) der Titrationschritte sind farbig markiert: Blau = 1:1 / gelb = 1:4.

4.3.1.3 Langsame Austauschprozesse der Interaktion des AF6 mit Rap1A[GTP] im Überblick

Neben den bereits beschriebenen Veränderungen der chemischen Verschiebung und der Änderung der Signalvolumina auf Grund der Komplexbildung, gibt es auch das Phänomen des langsamen Austauschprozesses, welches beispielsweise Bei K13 oder A134 im HSQC-Spektrum beobachten werden konnten (siehe Abb. 4-41). Statt einem gemittelten Signal, wie bei einem schnellen Austausch typisch, sieht man bei langsamen Austauschprozessen zwei separate Signale im Spektrum. Eines dieser Signale entspricht dem freien, ungebundenen Zustand des AF6, das zweite Signal entsteht während der Komplexbildung und spiegelt die Aminosäure im gebundenen Zustand des Komplexes wider. Beide Signale vollziehen unter optimalen Bedingungen keine chemische Verschiebung, sondern ändern nur indirekt proportional zueinander ihre Signalvolumina. Das Signal des freien Zustandes nimmt im gleichen Verhältnis ab, wie das Signal des neu entstehenden gebundenen Zustandes zunimmt. Da beide Signale meist in

räumlicher Nähe anzutreffen sind (nicht zwangsläufig) und ihre Volumina in indirektem Verhältnis zueinander stehen, lassen sich die Zustände der gebundenen Aminosäure gut zuordnen. Im Fall der HSQC-Titrations mit markiertem AF6 zeigte nur die Aminosäure I135 des AF6 auf Grund des nachfolgenden P136 bereits ohne Anwesenheit eines Bindepartners eine zweite Konformation (Cis- und Trans-Konformation) [Steiner, 2001]. Alle weiteren beschriebenen Aufspaltungen der Resonanzlinien einzelner Signale der HSQC-Messreihen sind das Resultat der Komplexbildung mit dem Bindepartner. Da diese Aufspaltungen nicht ohne weiteres in die Auswertung der chemischen Verschiebung und der Volumenänderung der Titrationsreihe zu integrieren sind, benötigten sie eine explizite Analyse. Zusätzlich lieferten die Aminosäuren die im Verlauf der Titrationsreihe auf Grund der Linienverbreiterung verschwinden, nützliche Informationen für die Interaktionsanalyse (Abb. 4-42).

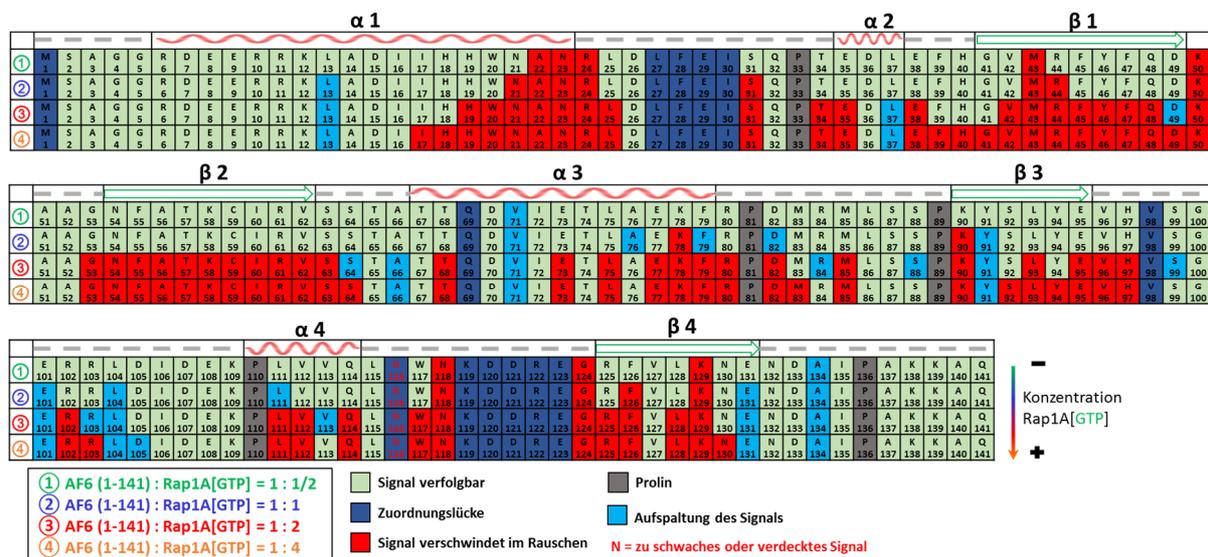


Abbildung 4-41: Signal Aufspaltungen und verschwinden vieler Signale des ¹⁵N-AF6 durch die AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung im ¹H-¹⁵N HSQC-Spektrum der Titrationschritte 1:0,5 bis 1:4 (AF6 zu Rap1A[GTP])

Dargestellt sind die Aminosäuresequenz des AF6-Konstruktes der einzelnen Titrationschritte (① bis ④) und das Verhalten jeder einzelnen Aminosäure in Bezug auf eine Aufspaltung (hellblau) bzw. ein Verschwinden des Signals (rot) durch die Komplexbildung mit Rap1A[GTP]. Signale die über die gesamte Titration verfolgt werden können sind hellgrün dargestellt.

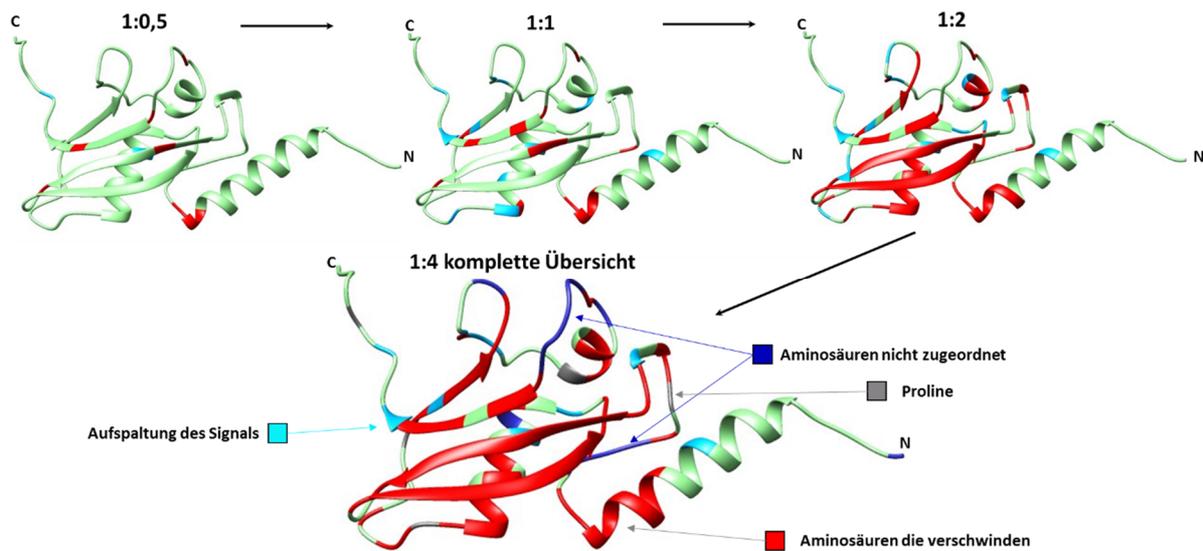


Abbildung 4-42: Übertragung der Signalaufspaltungen der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung auf die 3D-Struktur des AF6-Konstruktes (PDB-File „AF6(1-141)“)

Betrachtet man die kombinierte chemischen Verschiebungen (Abb. 4-39), die Volumenabnahme (Abb. 4-40), die langsamen Austauschprozesse und das Verschwinden vieler Signale (Abb. 4-41 und 4-42) im Verlauf der kompletten Titrationsreihe so stellt man fest, dass die Komplexbildung bei einem molaren Verhältnis von 1:1 noch nicht gesättigt ist und sich erst bei einem Verhältnis von ca. 1:2 des AF6 zu Rap1A[GTP] einem Sättigungs-Plateau nähert. Da der Interaktionsschritt 1:1 im gleichen molaren Verhältnis vorliegt wie die TROSY-Messungen von Guido Steiner, wurde dieser einer expliziteren Analyse unterzogen. Dabei ist zu beachten, dass auf Grund der HPLC-Überprüfung nur 75,94% des Rap1A mit GTP beladen vorliegt. Die kombinierte chemische Verschiebung ($\Delta_{combined}$ von ^1H und ^{15}N) und das Signifikanzkriterium σ_0^{corr} werden stets nach Schumann [2007] bestimmt.

4.3.1.4 Auswertung der chemischen Verschiebungen und der Volumenänderung des HSQC-Titrationschrittes AF6 mit Rap1A[GTP] im molaren Verhältnis 1:1 (200 μM : 200 μM)

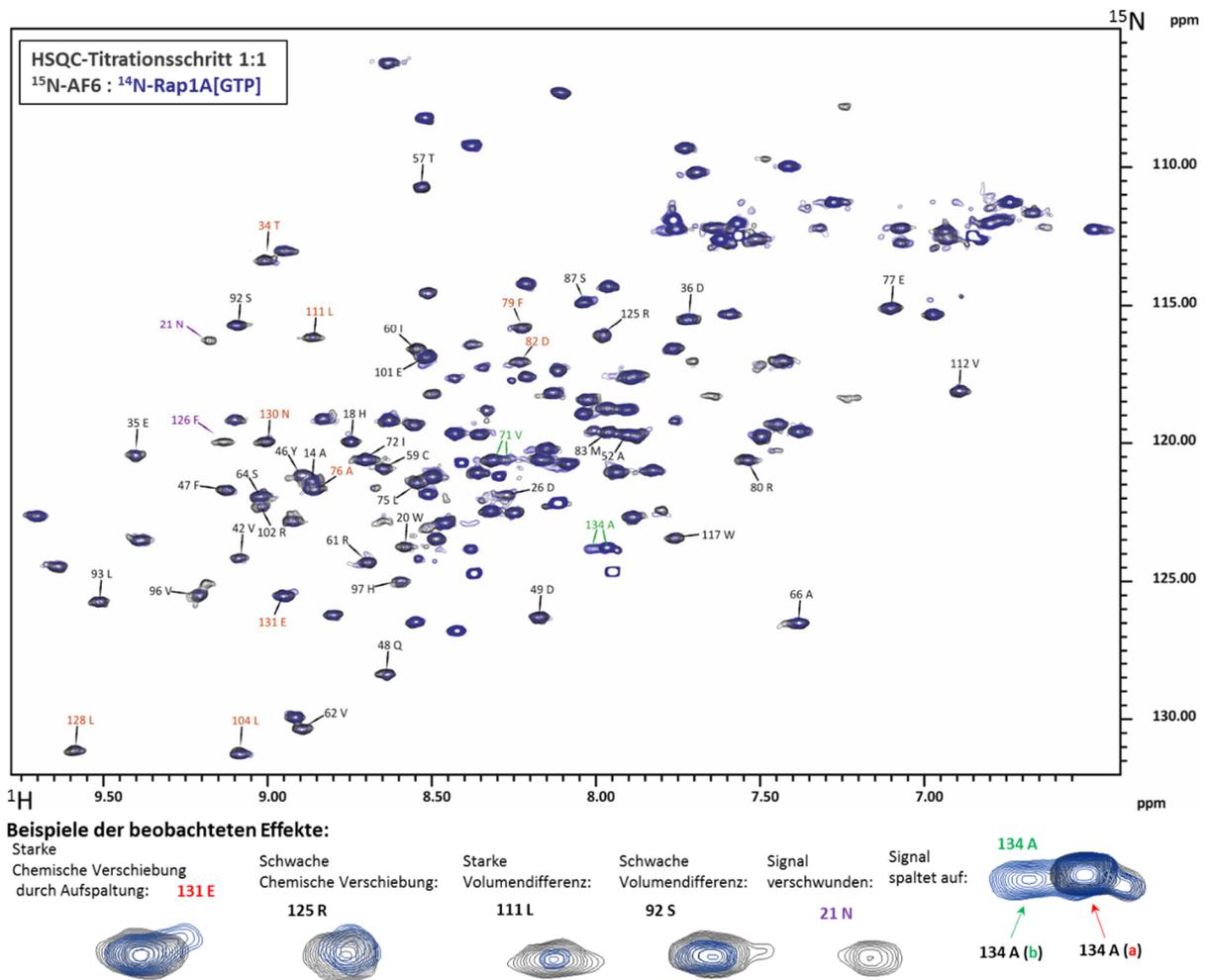


Abbildung 4-43: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP], Titrationschritt 1:1.

Das Referenzspektrum des freien AF6 ist schwarz, das des Komplexes mit Rap1A[GTP] (1:1) blau dargestellt. Zusätzlich sind unterhalb des Spektrums Beispiele für die beobachteten Effekte hervorgehoben. **Proteine:** 200 μM ^{15}N -AF6 mit 200 μM ^{14}N -Rap1A[GTP] (absolute Proteinkonzentration). **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBSF / pH 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / HSQC-Spektrum. **AcquPars:** TD(F2) 2048 x 256 TD(F1) / DS 16 / NS 16. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

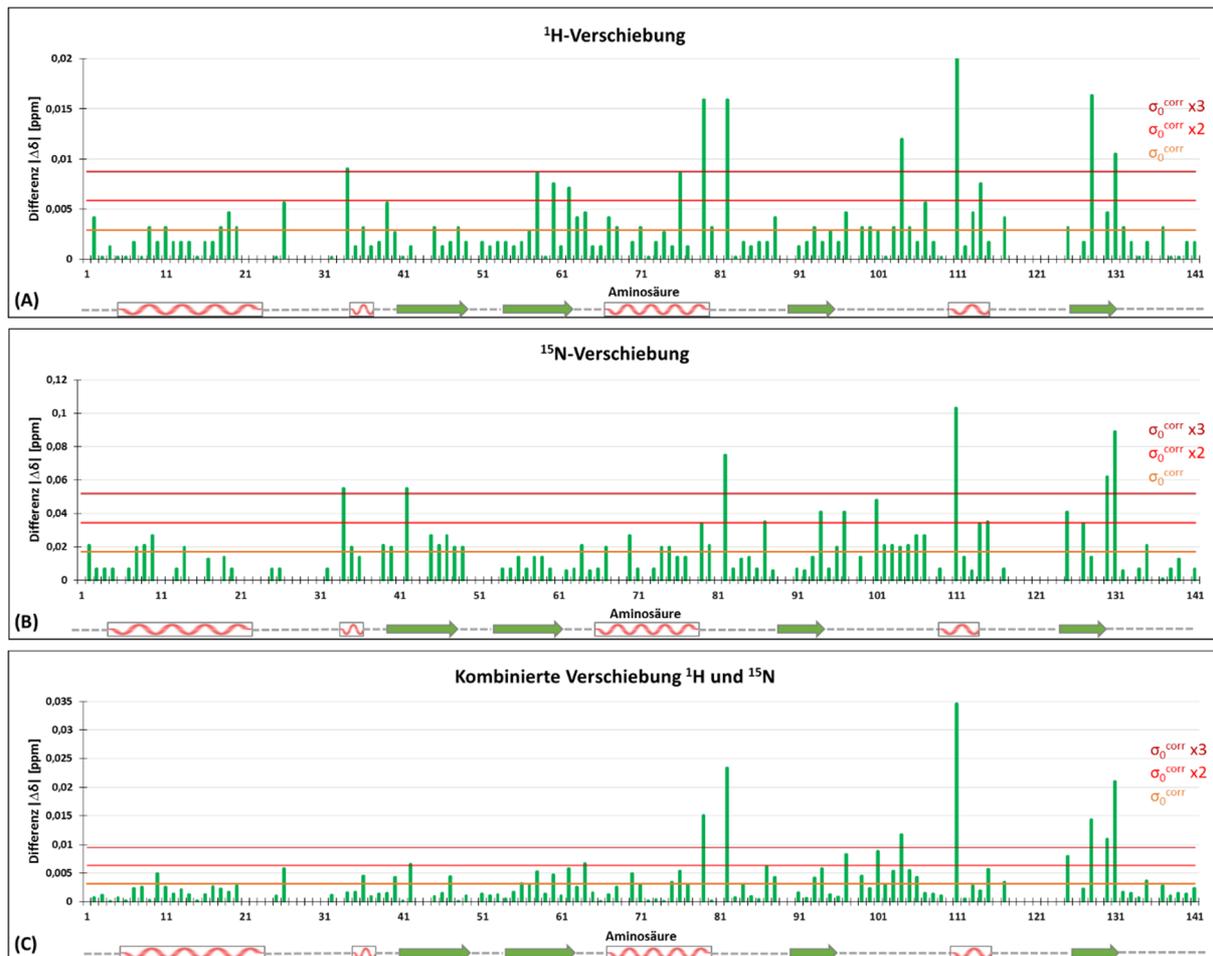


Abbildung 4-44: Chemische Verschiebungseffekte $|\Delta\delta|$ der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung (1:1) auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum

Dargestellt sind die Effekte der chemischen Verschiebungsänderung der AF6-Signale durch Komplexbildung mit Rap1A[GTP] im molaren Verhältnis 1:1 (bezogen auf die absolute Proteinkonzentration). **(A)** in ^1H -Dimension **(B)** in ^{15}N -Dimension **(C)** in kombinierter ^1H - und ^{15}N - Dimension (Δ combined). Die Signifikanzlevels σ_0^{corr} sind markiert.

In Abbildung 4-45 ist der Betrag der relativen Signaldifferenz des Komplexes aus 200 μM AF6 mit 200 μM Rap1A[GTP] (absolute Proteinkonzentration) in Bezug auf die Signale des freien AF6 200 μM Referenzspektrums ($|\Delta\delta| = \delta_{\text{AF6+Rap1A[GTP]}} - \delta_{\text{AF6 Referenz}}$) dargestellt. Zu erkennen sind die Stärke der chemischen Verschiebungseffekte jeder einzelnen Aminosäure (Position 1-141) des AF6-Konstruktes mit der darunter abgebildeten Sekundärstruktur. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Alle Aminosäuren die einen Effekt stärker als σ_0^{corr} aufweisen werden als signifikant eingestuft und werden in den nachfolgenden Analysen weiter untersucht.

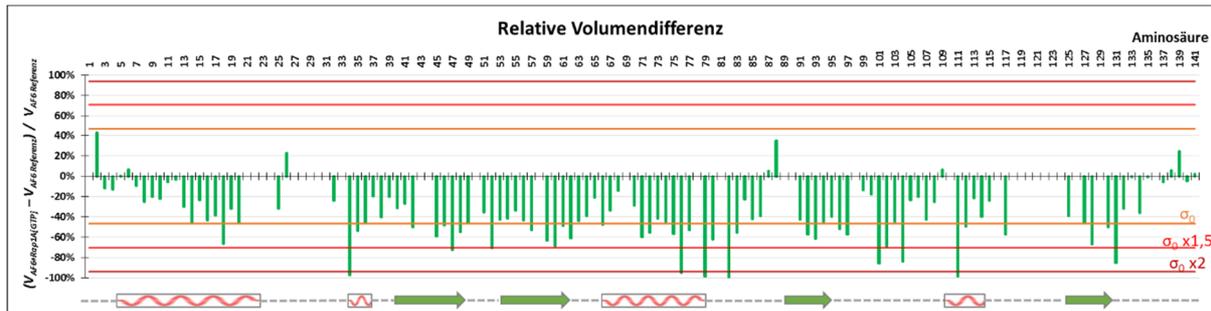


Abbildung 4-45: Effekte der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung (1:1) auf die Volumina der Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum

Dargestellt sind die Effekte der Volumenänderung der AF6-Signale durch Komplexbildung mit Rap1A[GTP] im molaren Verhältnis 1:1 (bezogen auf die absolute Proteinkonzentration). Die Signifikanzlevels σ_0 sind markiert.

In Abbildung 4-46 sind die relativ zum Referenzspektrum (freies AF6 200 μM) auftretenden Veränderungen der Signalvolumina $[(V_{\text{AF6+Rap1A[GTP]}} - V_{\text{AF6 Referenz}}) / V_{\text{AF6 Referenz}}]$ jeder einzelnen Aminosäure des AF6-Konstruktes durch die Komplexbildung mit 200 μM Rap1A[GTP] (absolute Proteinkonzentration) dargestellt. Hierbei diente die einfache Standardabweichung σ_0 als Signifikanzkriterium. Da man die durch die Komplexbildung im HSQC-Spektrum auftretenden Veränderungen nicht eindeutig einer direkten Bindung (C_1) bzw. einer strukturellen Umlagerung (C_2) zuordnen kann, mussten die auftretenden Effekte gefiltert werden. Dies geschah mit Hilfe des Signifikanzkriteriums σ_0^{corr} das sich nach Schumann [2007] bestimmen lässt und die Aminosäuren in zwei Klassen unterteilt. C_1 ist dabei die Klasse der Aminosäuren, die direkt an einer Bindung beteiligt sind und C_2 die Klasse der Aminosäuren, welche nicht an der Bindung beteiligt sind aber konformationelle Änderungen wahrnehmen können. Das Signifikanzkriterium σ_0 der Volumenänderung ist nicht so stringent wie σ_0^{corr} , da es durch die Komplexbildung im Allgemeinen bereits zu einer Abnahme der gesamten Volumina kommt. Daher ist die Signifikanzgrenze der Volumenauswertung auf über σ_0 bzw. bei massiven Volumenänderungen auf $> 90\%$ angehoben.

4.3.1.5 Übertragung der chemischen Verschiebungseffekte des AF6 mit Rap1A[GTP] (1:1) auf die Primärstruktur des AF6-Konstruktes

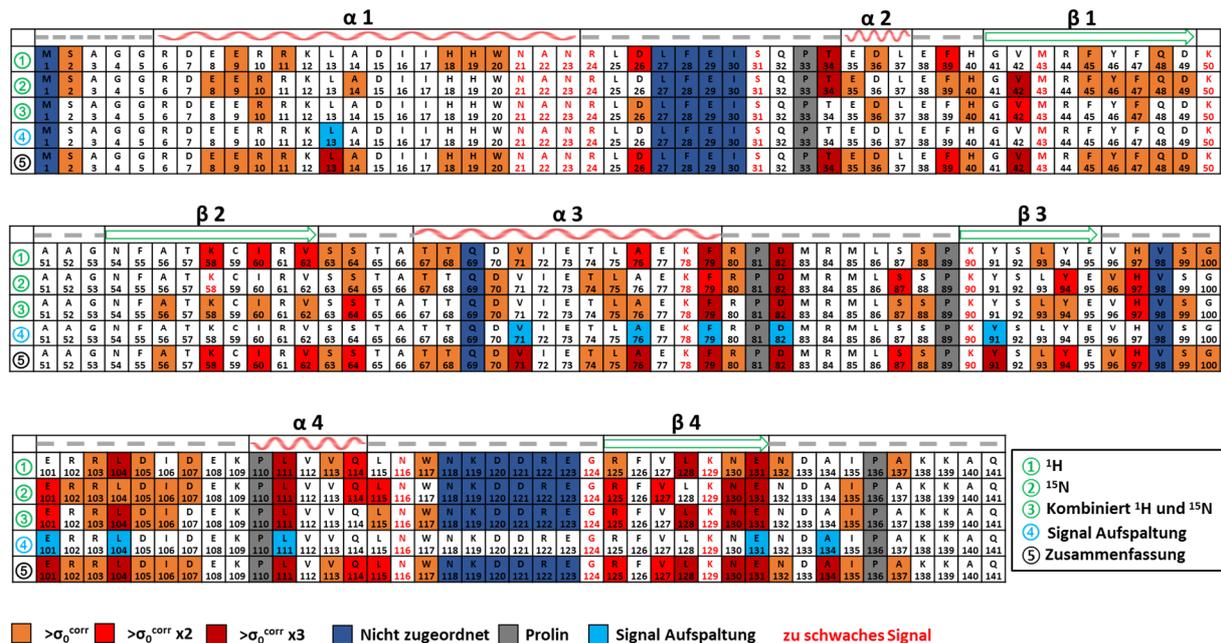


Abbildung 4-46: Übertragung der signifikanten chemischen Verschiebungsänderungen der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung (1:1) auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes

Auswertung der chemischen Verschiebungen (δ) in ^1H / ^{15}N und beide kombiniert (Δ_{combined}), sowie die gesonderte Auswertung der langsamen Austauschprozesse. Farblich markierte Aminosäuren sind gemäß der Kriterien signifikant, weiße Aminosäuren zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Differenzen der chemischen Verschiebung mit Werten zwischen σ_0^{corr} und $\sigma_0^{\text{corr}} \times 3$ werden der Population C_1 zugeordnet und sind daher mögliche direkte Bindestellen des Komplexes. Differenzen die unter σ_0^{corr} liegen, zählen zu der Population C_2 und sind daher eher intramolekularen Wechselwirkungen oder konformationellen Änderungen zuzuschreiben. Die farbliche Kodierung in Abbildung 4-46 erfolgt nach den zuvor bestimmten Signifikanzkriterien (Abb. 4-44 und 4-45). Die Auswertung der kombinierten chemischen Verschiebungen alleine, gibt bereits einen guten Überblick über aktive und inaktive Aminosäuren, ein Teil der vorhandenen Information geht dadurch aber auch verloren. Daher wurde der Einfluss jeder einzelnen chemischen Verschiebung ^1H -, ^{15}N - und kombinierte Verschiebung in die nachfolgenden Analysen mit einbezogen. Zusätzlich fließen gesondert ausgewertete langsame Austauschprozesse in die Zusammenfassung mit ein. Diese wurden, wenn als signifikant erachtet (durch visuelle Überprüfung der Signale jeder einzelnen Aminosäure), als starke chemische Verschiebung gewertet. Eine Zusammenfassung der Effekte (⑤) erfolgt durch Auswahl des jeweils stärksten Effekts der verschiedenen chemischen Verschiebungen (① bis ④) (Abb. 4-46).

4.3.1.6 Kombination der Daten aus Volumen- und chemischer Verschiebungsauswertung

Wie schon in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben stellt die Volumenveränderung der Signale eine wichtige zusätzliche Informationsquelle dar und wird im Folgenden mit der Auswertung der chemischen Verschiebungen (Kapitel 4.3.1.5) kombiniert (Abb. 4-47).

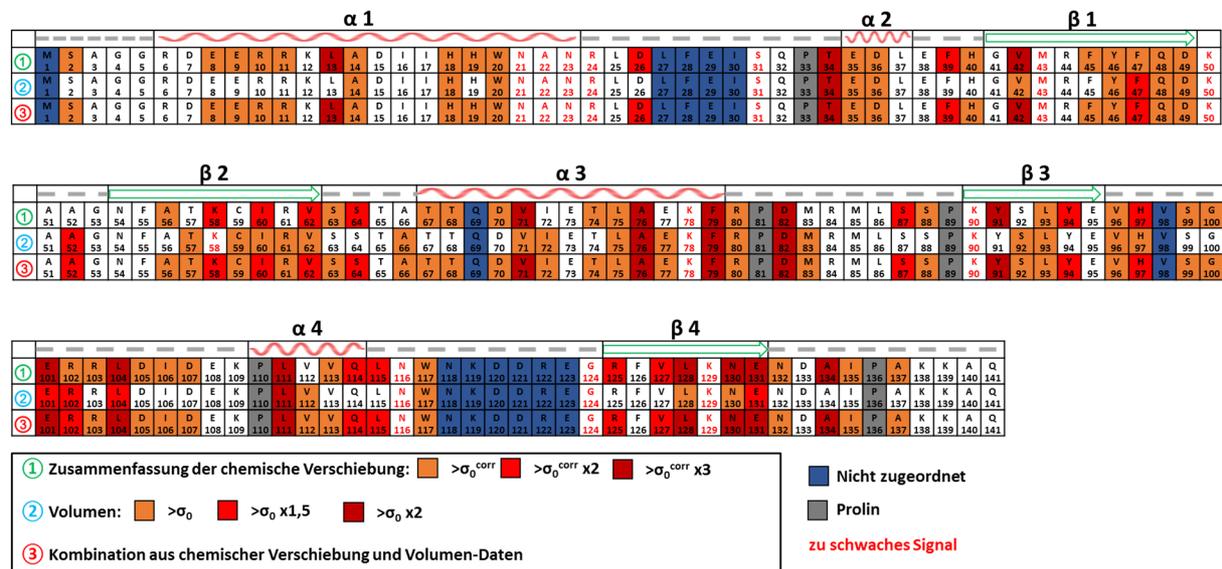


Abbildung 4-47: Kombination der chemischen Verschiebung und der Volumenänderungen der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung (1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes

Die Kombination aus ① Zusammenfassung der chemischen Verschiebung mit den Werten der Volumenänderungen ② führt zu einer Komplettierung der Interaktionseffekte ③. Farbige markierte Aminosäuren sind gemäß der Kriterien signifikant, weiße Aminosäuren zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Die Auswertung der NMR-Daten liefert durch die Kombination der gesamten chemischen Verschiebung inklusive der Volumenveränderungen ein sehr detailliertes Bild der Interaktion von AF6 mit Rap1A[GTP] in seiner natürlichen, aktiven Beladung (Abb. 4-47). Um die exakte Interaktionsfläche letztendlich einzugrenzen, müssen die Filterkriterien der Oberflächenzugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren und ihre relativen Signalintensitäten, mit in die Auswertung einbezogen werden (Kapitel 4.3.1.7).

4.3.1.7 Eingrenzung der Kontaktfläche mittels Oberflächenzugänglichkeit und Signalintensität

Aminosäuren, die nicht zugänglich für den Bindepartner sind, da sie zum Beispiel im hydrophoben Kern des Proteins liegen, können auf Grund ihrer Abschottung als aktiver Interaktionsbereich ausgeschlossen werden. Das Kriterium für eine mögliche Bindungsaktivität wurde auf > 30% Oberflächenzugänglichkeit (☉) festgelegt [Elsner, 2006] (Kapitel 4.1.1.4). Ebenso spielt die relative Signalstärke (Θ) jeder einzelnen Aminosäure eine entscheidende Rolle. Ist diese bereits im Referenzspektrum des freien AF6 schwächer als 15% des stärksten Signals (bei AF6 die Aminosäure Q141), so muss diese kritisch betrachtet und gegebenenfalls aus der Bewertung der Interaktionsfläche ausgeschlossen werden (Abb. 4-48).

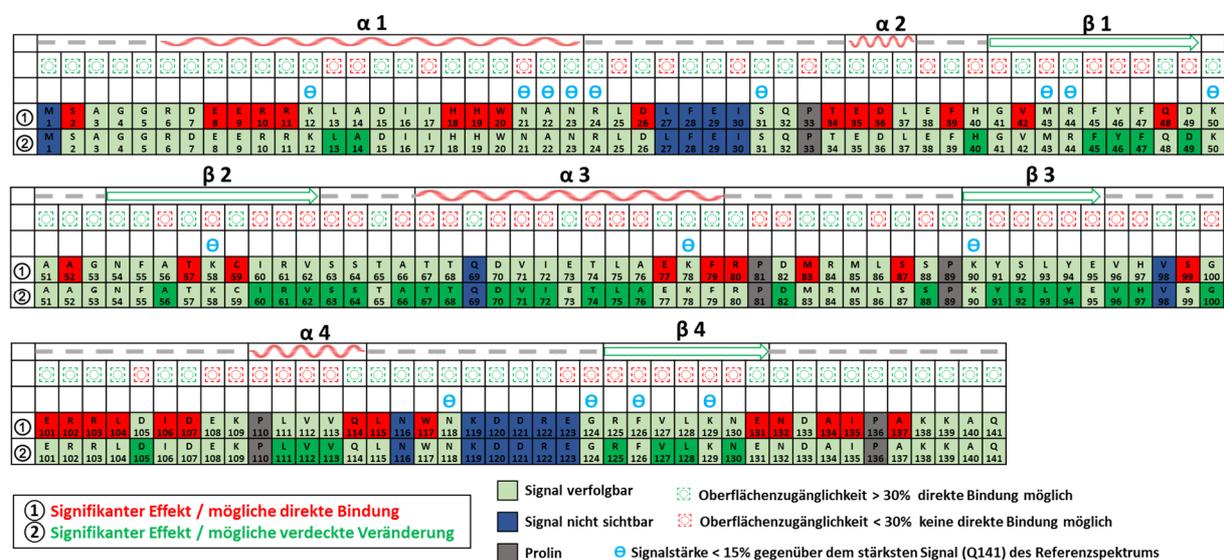


Abbildung 4-48: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche des AF6 mit aktivem Rap1A[GTP] anhand des Kriteriums der Oberflächenzugänglichkeit und der relativen Signalstärke

In rot sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die auf Grund ihrer Oberflächenzugänglichkeit und ihrer signifikanten Effekte während der Komplexbildung direkt an einer Bindung beteiligt sein können. In grün sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die ebenfalls signifikante Effekte durch die Komplexbildung zeigen, aber durch ihre Abschottung eher intramolekularen Prozessen zuzuschreiben sind. Zu schwache Signale, die teils massive Effekte vortäuschen können sind durch das Kriterium der Signalstärke eliminiert.

Das Filtern der Interaktionseffekte mittels der Kriterien der Oberflächenzugänglichkeit (☉) und der relativen Signalstärke (Θ) lässt die aktive Interaktionsfläche des AF6 eingrenzen und zusätzliche die konformationellen Veränderungen des Proteins zusammenfassen (Abb. 4-48). Durch die Übertragung der Ergebnisse auf die 3D-Struktur des AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“) lassen sich die zusammenhängenden Bindebereiche erkennen (Abb. 4-49). Dies dient als letztes Filterkriterium um die Interaktionsfläche zu definieren.

Neben dem kanonischen Bindebereich (grauer Kreis Abb. 4-49) scheinen auch die α 1-Helix und der C-terminale Anteil des AF6 bindungsrelevant zu sein. Eine explizite Auswertung der Ergebnisse erfolgt in der Diskussion (Kapitel 5.3.2).

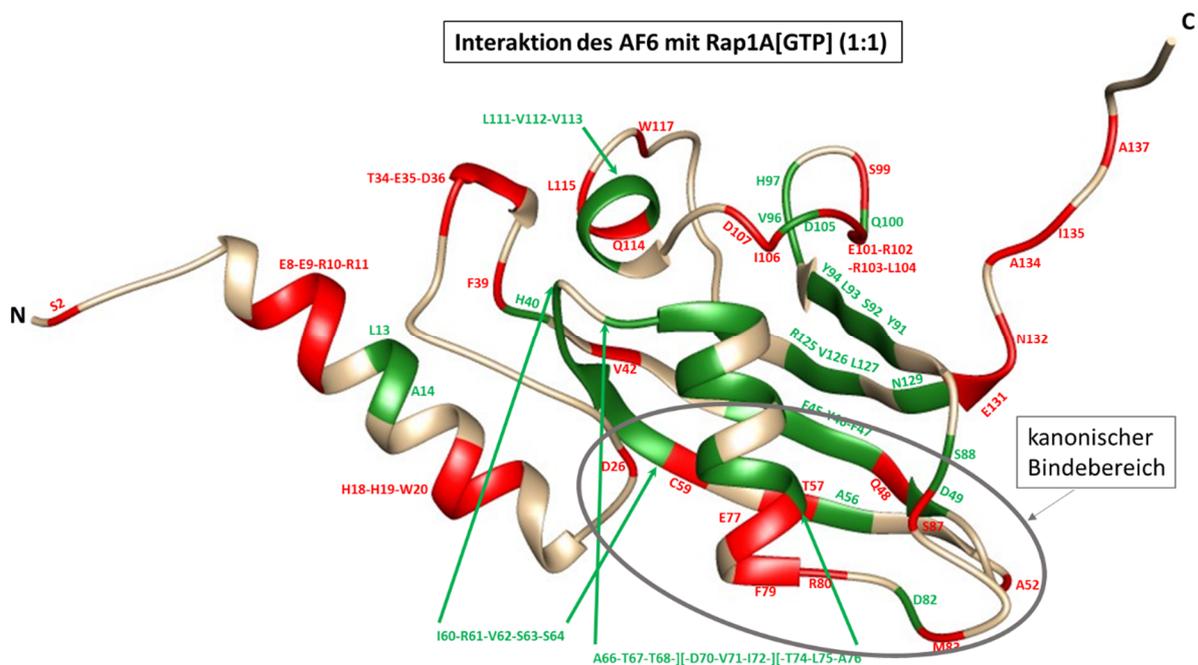


Abbildung 4-49: Übertragung der Interaktionsauswertung AF6 mit Rap1A[GTP] (1:1) auf die 3D-Struktur von AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“)

Dargestellt ist die Interaktion von Seiten des ^{15}N -AF6 (200 μM) mit aktivem ^{14}N -Rap1A[75,94 %GTP](200 μM). Die beteiligten Aminosäuren die signifikante Effekte zeigen sind farblich markiert. In rot mit einer Oberflächenzugänglichkeit > 30%, in grün < 30%, Lücken in einer Aminosäure-Teilsequenz sind mit][gekennzeichnet.

4.3.1.8 Kontrolle der experimentellen Bedingungen während der NMR-Titrationsexperimente des AF6 mit Rap1A[GTP]

Um Artefakte in der Auswertung zu vermeiden, wurden zusätzlich die Nukleotidbeladung der GTPase mittels HPLC und ihr effektives molares Verhältnis während der Titration anhand ihrer 1D-Spektren überprüft. Die Proben (20 μ l) für die HPLC-Messung wurden direkt nach der NMR-Messung für jeden einzelnen Titrationsschritt entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die HPLC-Messungen der Proben erfolgten unter Ausgleich der, durch die Titrationsreihe entstandenen Verdünnung. Die NMR-Messungen wurden durch die Probenentnahme nicht beeinflusst. Die Integration der Signale erfolgte direkt an der HPLC durch das Programm Gold Chromatography Data System V1.7.

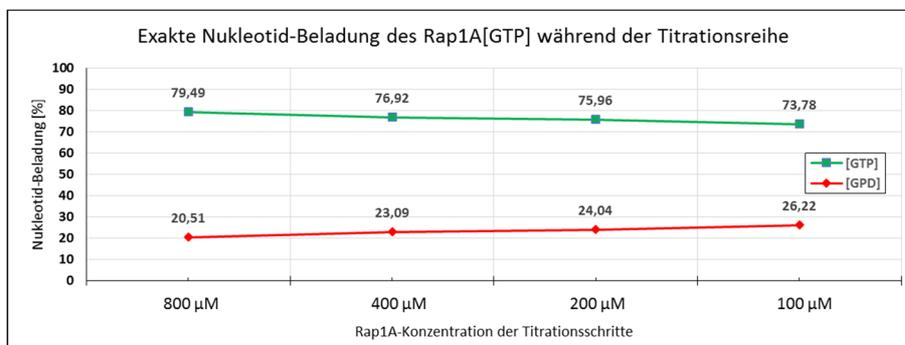


Abbildung 4-50: GTP/GDP-Beladung des Rap1A während der AF6-Rap1A[GTP] Interaktionsmessung

In grün ist die leichte Abnahme der GTP-Beladung während der gesamten Titrationsdauer bei 25 °C dargestellt. Reziprok dazu in rot die Zunahme der GDP-Beladung durch die intrinsische Hydrolyse des GTPs.

Anhand der HPLC-Daten kann eine leichte Abnahme der GTP-Beladung (-5,71%) durch intrinsische Hydrolyse des GTPs zu GDP+P_i festgestellt werden. Diese Abnahme dürfte jedoch keinen größeren Einfluss auf die Titrationsmessung gehabt haben. Dennoch muss die effektive Beladung der GTPase mit maximal 79,49% stets mit bedacht werden (Abb. 4-50).

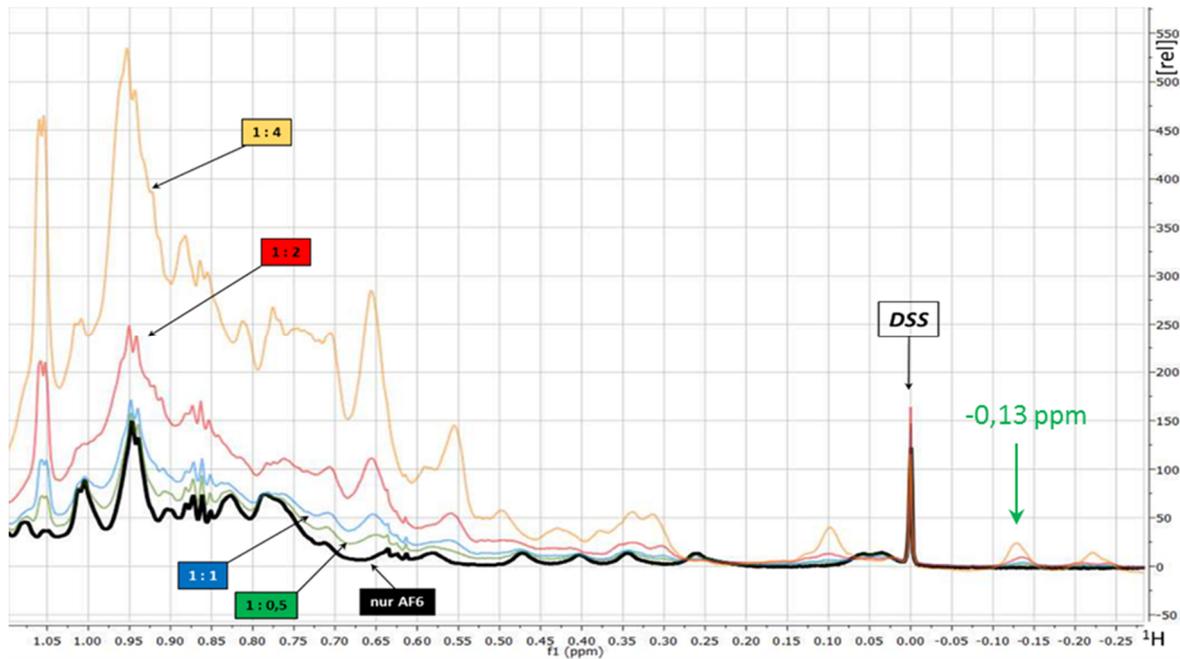


Abbildung 4-51: Ausschnitt aus den ^1H -Spektren der einzelnen ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP] Titrationschritte

Die Aufnahme dieser 1D-Spektren erfolgte stets vor der eigentlichen HSQC-Messung. In grün ist eine nur für Rap1A charakteristische Methylgruppe (-0,13 ppm) gekennzeichnet. **Proteine:** 200 μM ^{15}N -AF6 vorgelegt, mit ^{14}N -Rap1A[GTP] von 0 μM bis maximal 800 μM titriert (entsprechend der gängigen Farbkodierung). **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBSF / pH 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / zggpw5.

Die Titrationsreihe des AF6-Proteins mit aktivem GTP-beladenem Rap1A zeigt auch in den 1D-Spektren der einzelnen Titrationschritte (Abb. 4-51), dass die zuvor bestimmten molaren Konzentrationsverhältnisse des Rap1A für jeden Titrationschritt korrekt waren. Hierzu wurde das für Rap1A charakteristische Methylgruppensignal an Position -0,13 ppm genauer untersucht und die einzelnen Titrationschritte auf dieses Signal skaliert. Mit einer Abweichung von +/- 0,96% konnte das zuvor ausgewählte molare Verhältnis für jeden einzelnen Titrationschritt eingehalten werden.

4.3.2 HSQC-Interaktionsexperiment des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GDP]

4.3.2.1 Titrationsreihe des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GDP]

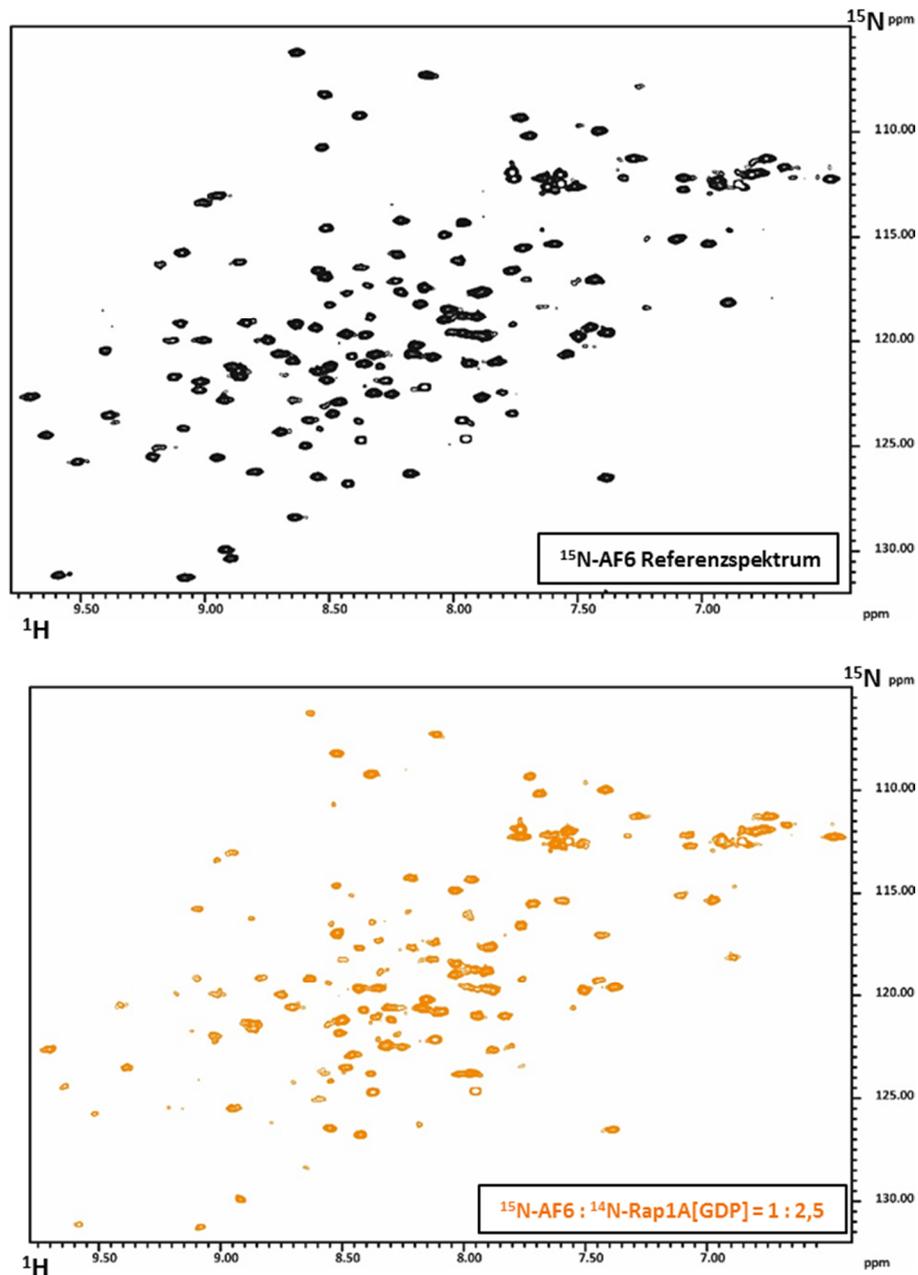


Abbildung 4-52: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GDP] Titration

Das AF6-Referenzspektrum ist schwarz, der letzte Titrationschritt (AF6:Rap1A = 1:2,5) ist orange dargestellt. **Proteine:** 200 μM ^{15}N -AF6 vorgelegt und mit ^{14}N -Rap1A[GDP] von 0 μM bis maximal 500 μM titriert. **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBSF / pH 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / HSQC-Spektrum. **AcquPars:** TD(F2) 2048 x 256 TD(F1) / DS16 / NS16. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

In Abbildung 4-52 ist die Durchführung einer NMR-Titrationsreihe des ^{15}N -markierten AF6 mit GDP beladenem Rap1A bis zu einem molaren Verhältnis des AF6 zu Rap1A von 1:2,5 gezeigt. Im Vergleich zur Rap1A[GTP] mit $0,25\ \mu\text{M}$ (K_d), ist die Rap1A[GDP] Affinität zu AF6 um das ca. 100-fache geringer [Linnemann, 1999]. Die beobachteten Effekte während der Titrationsreihe fallen dementsprechend schwächer aus. Die Auswertung der einzelnen Titrationschritte erfolgte entsprechend der AF6-Rap1A[GTP] Titration. Da sich die Signifikanzkriterien durch die Messwerte selbst definieren, zeigt sich trotz des gravierenden Unterschieds in den Affinitäten auch bei sehr schwachen Bindungen ein hochauflösender Einblick in die Interaktion selbst. Dass die Beladung nicht zu 100% aus GDP bestand und noch Anteile der aktiven GTP-Beladung vorhanden waren, muss in die Auswertung einbezogen werden (Kapitel. 5.3.2).

4.3.2.2 Chemische Verschiebungs- und Volumenänderung der Interaktion des AF6 mit Rap1A[GDP] im Überblick



Abbildung 4-53: Kombinierte ^1H - und ^{15}N -Verschiebungseffekte $|\Delta\delta|$ der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum während der vollständigen Titrationsreihe

Dargestellt ist der Betrag der relativen Differenz der Signale des Komplexes jedes einzelnen Titrationschrittes in Bezug auf die Signale des freien AF6 Referenzspektrums ($|\Delta\delta| = \delta_{\text{AF6+Rap1A[GDP]}} - \delta_{\text{AF6 Referenz}}$). Dargestellt sind die Effekte jeder einzelnen Aminosäure (Position 1-141) des AF6-Konstruktes mit der darunter abgebildeten Sekundärstruktur. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Die molaren Verhältnisse der Titrationschritte sind farbig markiert: Dunkelgrün = 1:0,5 / blau = 1:1 / rot = 1:2 / gelb = 1:2,5.

In Abbildung 4-53 ist deutlich zu erkennen, dass im Gegensatz zur HSQC-Titrationsreihe des AF6 mit Rap1A[GTP] die Signale keine starke Linienverbreiterung durch die Komplexbildung erfahren und der Großteil der Signale durchgehend verfolgt werden kann. Ganz allgemein bestätigt sich die auf die bereits bekannten Affinitäten bezogene Annahme, dass die inaktive Rap1A[GDP] Form wesentlich weniger Einfluss auf das AF6-Konstrukt ausübt. Da die verfolgbareren Signale auch in diesem Fall als ungebundene Konformation des AF6 angesehen werden können, dessen komplexierte Konformation auf Grund der Linienbreite nicht detektierbar ist, können über die Auswertung ihrer Volumina zusätzlich Information gewonnen werden (Abb. 4-54).

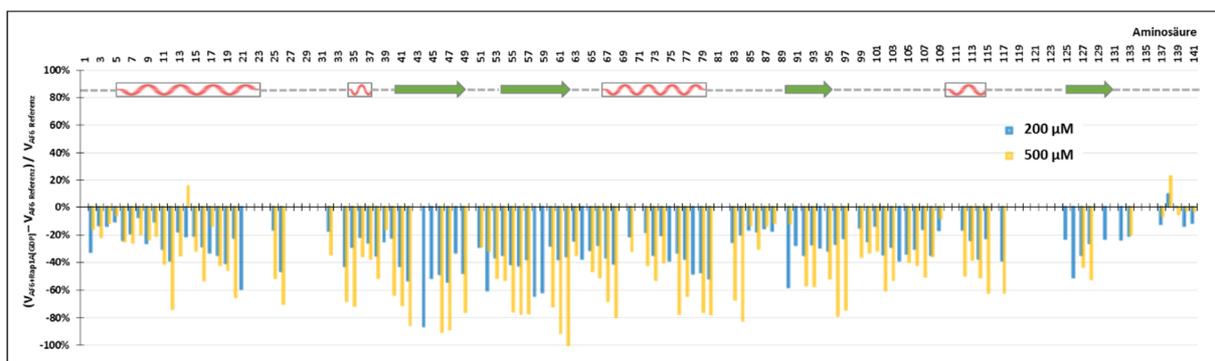


Abbildung 4-54: Volumen Effekte der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum der Titrationschritte 1:1 und 1:2,5 (AF6 zu Rap1A[GDP])

Dargestellt sind die relativ zum Referenzspektrum (freies AF6) auftretenden Veränderungen der Signalvolumina $[(V_{AF6+Rap1A[GDP]} - V_{AF6\text{ Referenz}}) / V_{AF6\text{ Referenz}}]$ jeder einzelnen Aminosäure des AF6-Konstruktes durch die Komplexbildung mit Rap1A[GDP]. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Die molaren Verhältnisse (AF6 zu Rap1A[GDP]) der Titrationschritte sind farbig markiert: Blau = 1:1 / gelb = 1:2,5.

4.3.2.3 Langsame Austauschprozesse der Interaktion von AF6 mit Rap1A[GDP] im Überblick

Neben den bereits beschriebenen Veränderungen der chemischen Verschiebung und der Änderung der Signalvolumina auf Grund der Komplexbildung, gibt es auch in diesem Fall das Phänomen der langsamen Austauschprozesse, welche beispielsweise bei V71, oder wie in der GTP-beladenen Komplexbildung auch, bei A134 im HSQC-Spektrum beobachten werden konnten (siehe Abb. 4-55).

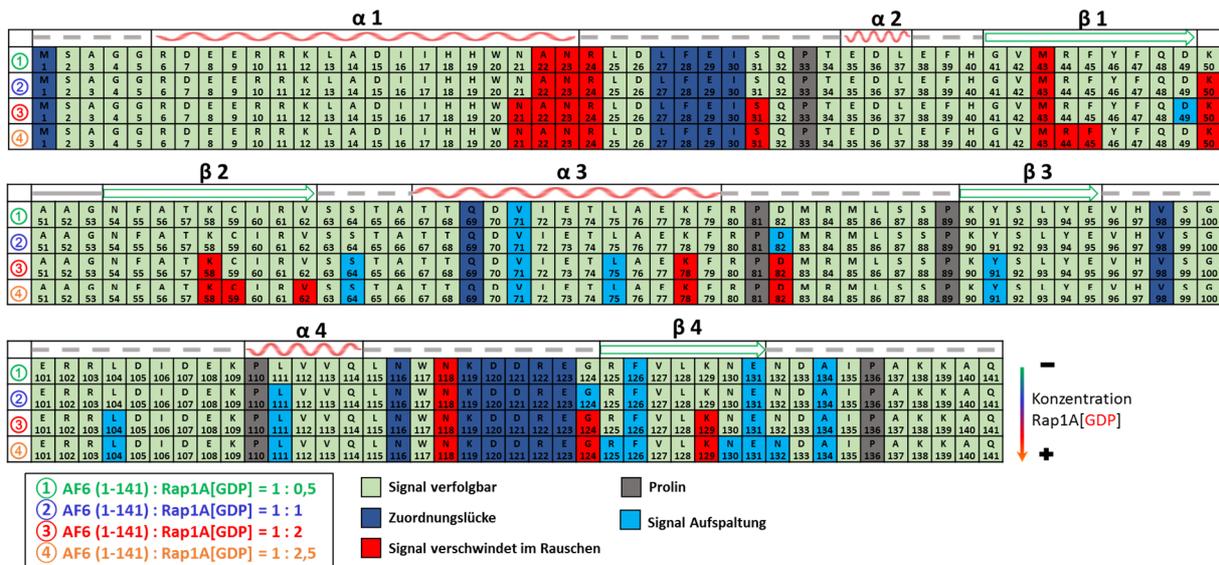


Abbildung 4-55: Langsame Austauschprozesse der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum der Titrationschritte 1:0,5 bis 1:2,5 (AF6 zu Rap1A[GDP])

Dargestellt sind die Aminosäuresequenz des AF6-Konstruktes der einzelnen Titrationschritte und das Verhalten jeder einzelnen Aminosäure in Bezug auf langsame Austauschprozesse bzw. ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung mit Rap1A[GDP].

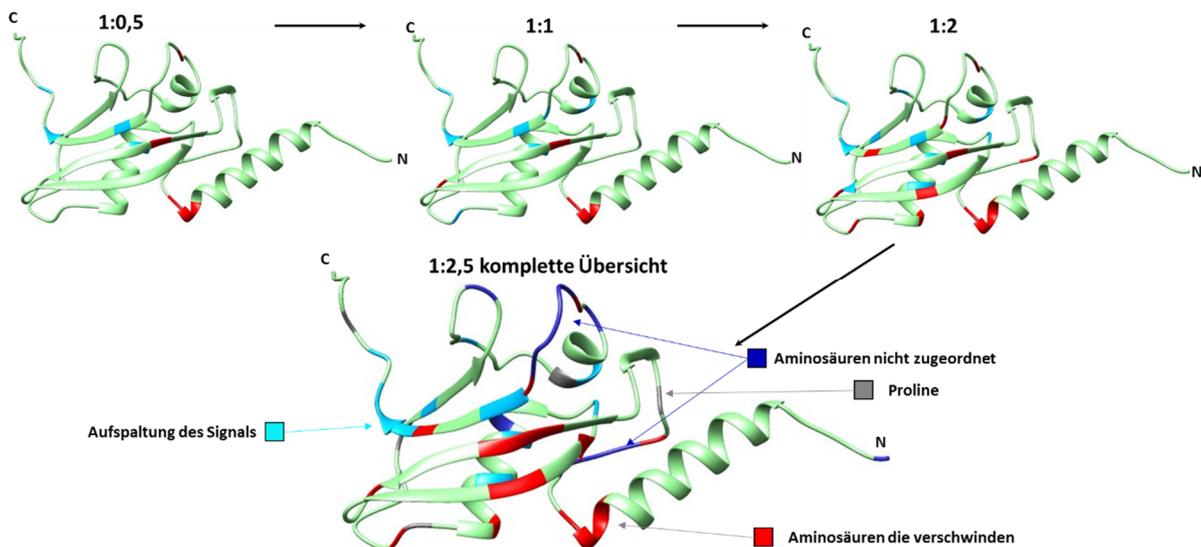


Abbildung 4-56: Übertragung der langsamen Austauschprozesse der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung auf die auf die 3D-Struktur des AF6-Konstruktes (PDB-File „AF6(1-141)“)

Betrachtet man auch hier die chemischen Verschiebungen (Abb. 4-53), die Volumenänderungen (Abb. 4-54), die langsamen Austauschprozesse und das Verschwinden vieler Signale (Abb. 4-55 und 4-56) im Verlauf der kompletten Titrationsreihe so stellt man fest, dass die Komplexbildung auch bei einem maximalen Verhältnis von 1:2,5 (AF6 zu Rap1A[GDP]) noch kein Plateau erreicht hat. Des Weiteren verschwinden weitaus weniger der Signale im HSQC-Spektrum. Da die Interaktion des GDP-beladenen Rap1A mit den TROSY-Messungen von

Guido Steiner und zusätzlich mit der Rap1A[GTP]-Titration verglichen werden soll, wurde auch der Titrationsschritt 1:1 einer expliziten Analyse (gemäß Kapitel 4.3.1) unterzogen.

4.3.2.4 Auswertung der chemischen Verschiebungen und der Volumenänderung des HSQC-Titrationsschrittes AF6 mit Rap1A[GDP] im molaren Verhältnis 1:1 (200 μ M : 200 μ M)

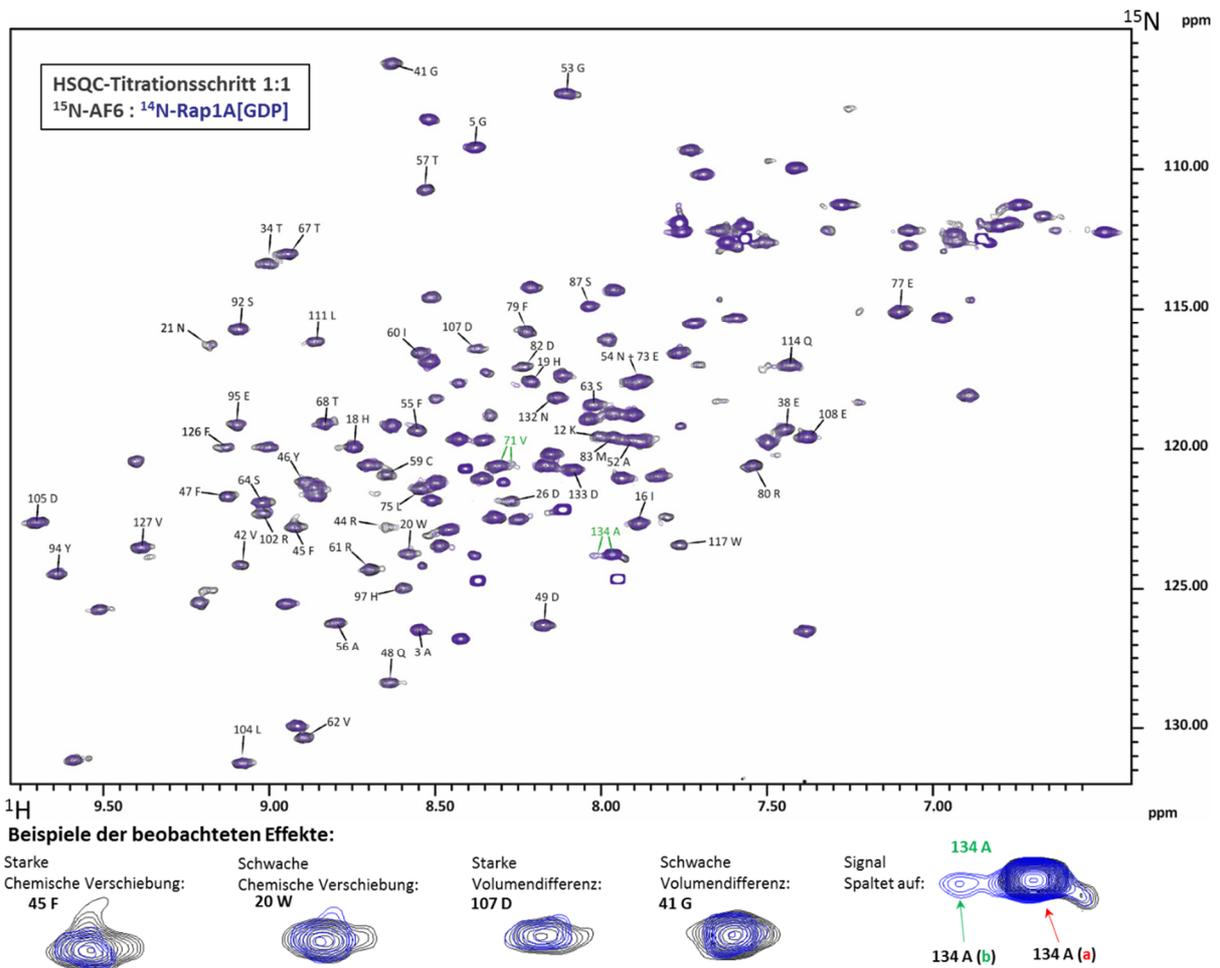


Abbildung 4-57: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GDP] Titrationsschritt 1:1

Das Referenzspektrum des freien AF6 ist schwarz, das des Komplexes mit Rap1A[GDP] (1:1) blau dargestellt. Zusätzlich sind unterhalb des Spektrums Beispiele für die beobachteten Effekte hervorgehoben. **Proteine:** 200 μ M ^{15}N -AF6 mit 200 μ M ^{14}N -Rap1A[GDP]. **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBSF / pH 6,9. **Messbedingungen:** 50 μ M DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / HSQC-Spektrum. **AcquPars:** TD(F2) 2048 x 256 TD(F1) / DS 16 / NS 16. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

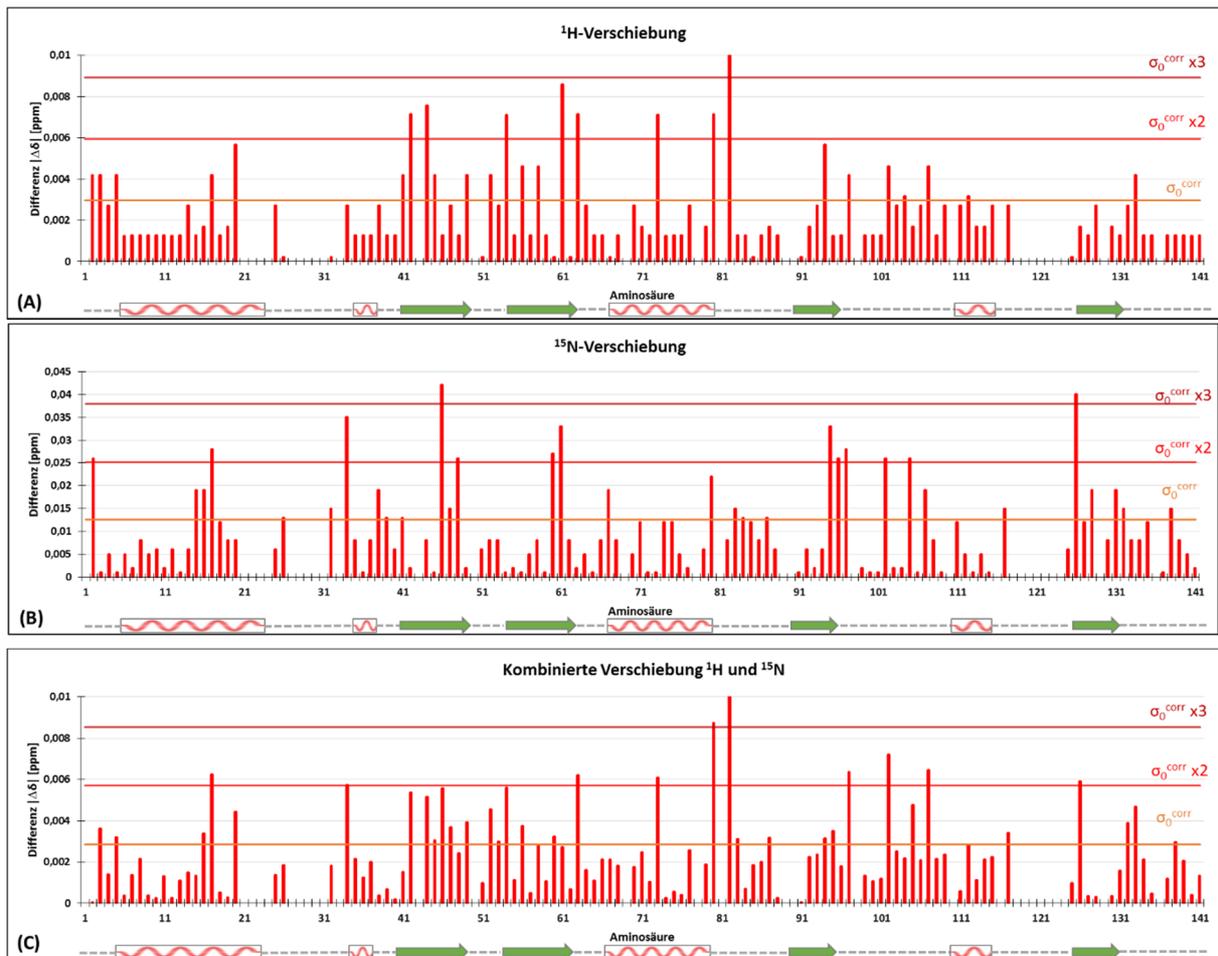


Abbildung 4-58: Chemische Verschiebungseffekte $|\Delta\delta|$ der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum

Dargestellt sind die Effekte der chemischen Verschiebungsänderung der AF6-Signale durch Komplexbildung mit Rap1A[GDP] im molaren Verhältnis 1:1 (bezogen auf die absolute Proteinkonzentration). **(A)** in ^1H -Dimension **(B)** in ^{15}N -Dimension **(C)** in kombinierter ^1H - und ^{15}N -Dimension (Δ_{combined}). Die Signifikanzlevels σ_0^{corr} sind markiert.

In Abbildung 4-58 ist der Betrag der relativen Signaldifferenz des Komplexes aus 200 μM AF6 mit 200 μM Rap1A[GDP] (absolute Proteinkonzentration) in Bezug auf die Signale des freien AF6 200 μM Referenzspektrums ($|\Delta\delta| = \delta_{\text{AF6+Rap1A[GDP]}} - \delta_{\text{AF6 Referenz}}$) dargestellt. Zu erkennen sind die Stärke der chemischen Verschiebungseffekte jeder einzelnen Aminosäure (Position 1-141) des AF6-Konstruktes mit der darunter abgebildeten Sekundärstruktur. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Alle Aminosäuren die einen Effekt stärker als σ_0^{corr} aufweisen werden als signifikant eingestuft und werden in den nachfolgenden Analysen weiter untersucht.

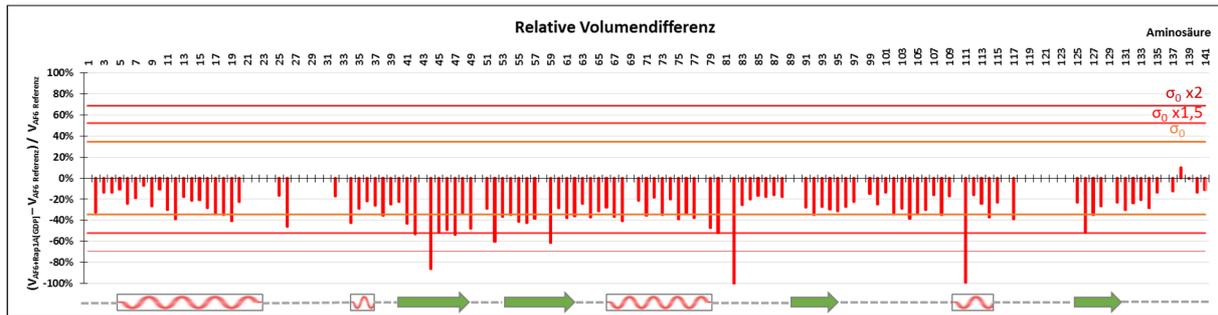


Abbildung 4-59: Effekte der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung (1:1) auf die Volumina der Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum

Dargestellt sind die relativ zum Referenzspektrum auftretenden Veränderungen der Signalvolumina jeder einzelnen Aminosäure des AF6-Konstruktes durch die Komplexbildung mit Rap1A[GDP]. Die Signifikanzlevels σ_0 sind markiert.

In Abbildung 4-59 sind die relativ zum Referenzspektrum (freies AF6 200 μM) auftretenden Veränderungen der Signalvolumina $[(V_{\text{AF6+Rap1A[GDP]}} - V_{\text{AF6 Referenz}}) / V_{\text{AF6 Referenz}}]$ jeder einzelnen Aminosäure des AF6-Konstruktes durch die Komplexbildung mit 200 μM Rap1A[GDP] (absolute Proteinkonzentration) dargestellt. Da man die durch die Komplexbildung im HSQC-Spektrum auftretenden Veränderungen nicht eindeutig einer direkten Bindung (C_1) bzw. einer strukturellen Umlagerung (C_2) zuordnen kann, mussten die auftretenden Effekte erneut gefiltert werden. Dies geschah im Fall der chemischen Verschiebungen wieder mit Hilfe des Signifikanzkriteriums σ_0^{corr} das sich nach Schumann [2007] bestimmen lässt und die Aminosäuren in zwei Klassen unterteilt. Das Signifikanzkriterium σ_0 der Volumenänderung ist nicht so stringent wie σ_0^{corr} , da es durch die Komplexbildung im Allgemeinen bereits zu einer Abnahme der gesamten Volumina kommt. Hierbei diente die einfache Standardabweichung (σ_0) als Signifikanzkriterium.

4.3.2.5 Übertragung der chemischen Verschiebungseffekte des AF6 mit Rap1A[GDP] (1:1) auf die Primärstruktur des AF6-Konstruktes

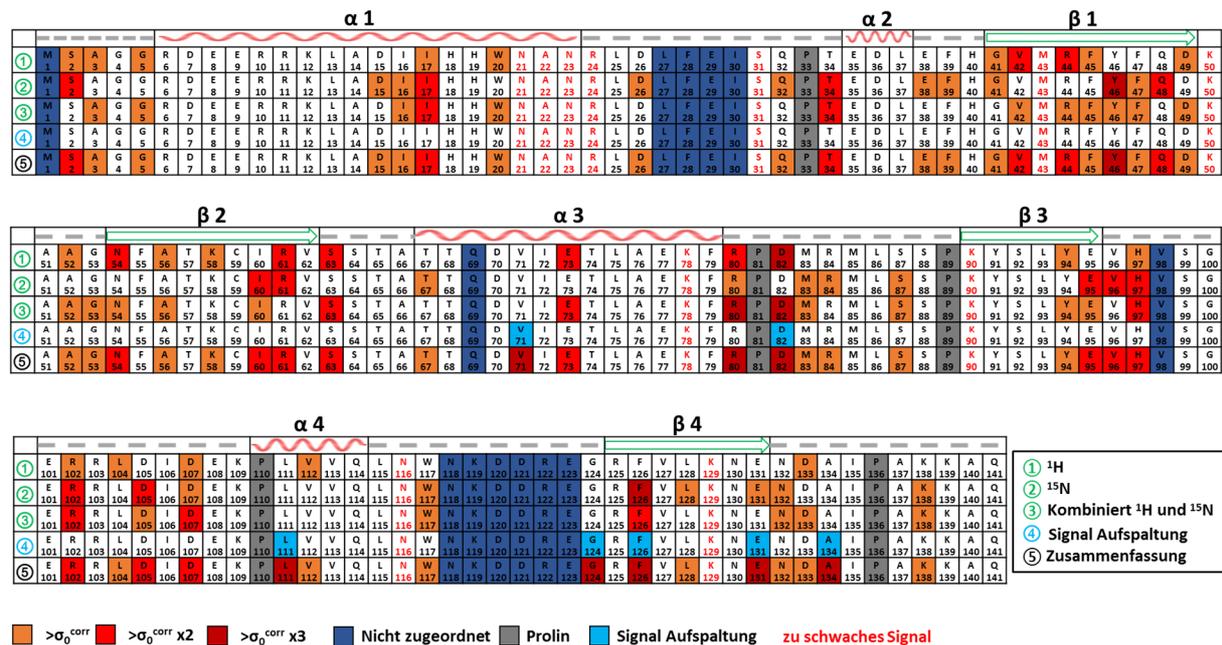


Abbildung 4-60: Chemische Verschiebungsänderungen der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung (1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes

Dargestellt sind die Ergebnisse der Auswertung der chemischen Verschiebungen (δ) in ¹H / ¹⁵N und beide kombiniert (Δ combined), sowie die gesonderte Auswertung der langsamen Austauschprozesse (Aufspaltung einiger Signale). Farbig markierte Aminosäuren sind gemäß der Kriterien signifikant, weiße Aminosäuren zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Differenzen der chemischen Verschiebung mit Werten zwischen σ₀^{corr} und σ₀^{corr} x3 werden der Population C₁ zugeordnet und sind daher mögliche direkte Bindestellen des Komplexes. Differenzen die unter σ₀^{corr} liegen, zählen zu der Population C₂ und sind daher eher intramolekularen Wechselwirkungen oder konformationellen Änderungen zuzuschreiben. Die farbliche Kodierung in Abbildung 4-60 erfolgt nach den gängigen Signifikanzkriterien (Abb. 4-58 und 4-59). Es wurde der Einfluss jeder einzelnen chemischen Verschiebung ¹H, ¹⁵N und kombinierte Verschiebung in die Analyse mit einbezogen. Zusätzlich fließen gesondert ausgewertete langsame Austauschprozesse in die Zusammenfassung mit ein. Diese wurden, wenn als signifikant erachtet (durch visuelle Überprüfung der Signale jeder einzelnen Aminosäure), als starke chemische Verschiebung gewertet. Eine Zusammenfassung der Effekte (⑤) erfolgt auch hierdurch die Auswahl des jeweils stärksten Effekts der verschiedenen chemischen Verschiebungen (① bis ④) (Abb. 4-60).

4.3.2.6 Kombination der Daten aus Volumen- und chemischer Verschiebungsauswertung

Wie schon in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben stellt die Volumenveränderung der Signale eine wichtige zusätzliche Informationsquelle dar und wird im Folgenden ebenfalls mit der Auswertung der chemischen Verschiebungen kombiniert (Abb. 4-61).

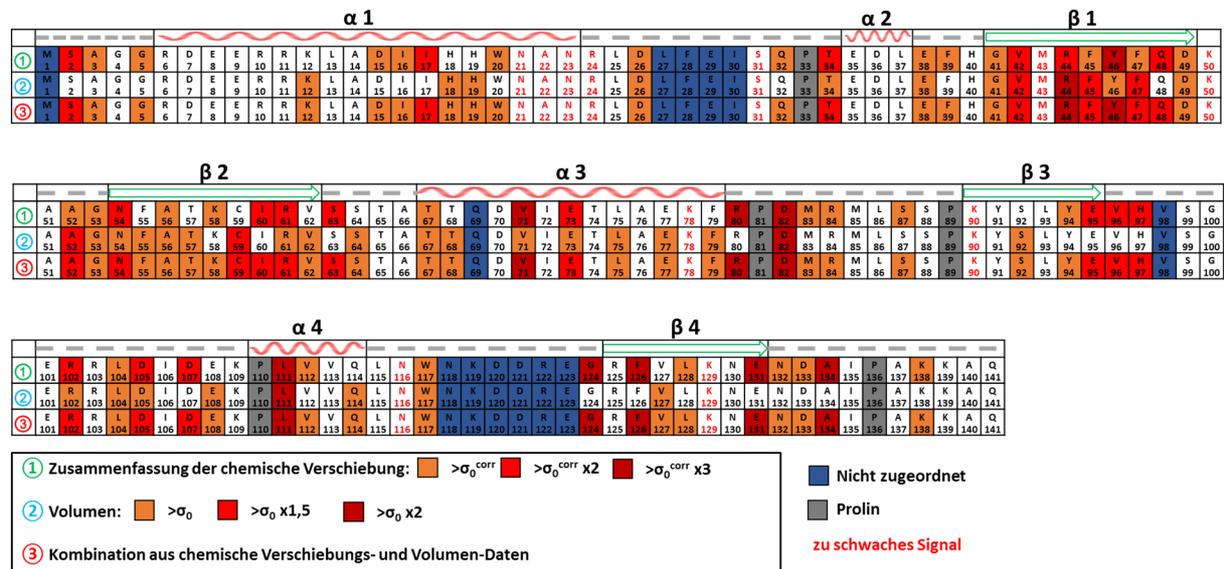


Abbildung 4-61: Kombination der chemischen Verschiebung und der Volumenänderungen der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung (1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes

Die Kombination aus ① Zusammenfassung der chemischen Verschiebung mit den Werten der Volumenänderungen ② führt zu einer Komplettierung der Interaktionseffekte ③. Farblich markierte Aminosäuren sind gemäß der Kriterien signifikant, weiße Aminosäuren zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Die Auswertung der NMR-Daten liefert durch die Kombination der gesamten chemischen Verschiebungen inklusive der Volumenveränderungen auch ein sehr detailliertes Bild der Interaktion von AF6 mit inaktivem Rap1A[GDP] (Abb. 4-61). Um die exakte Interaktionsfläche auch in diesem Fall letztendlich einzugrenzen, mussten wieder die Filterkriterien der Oberflächenzugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren und ihre relativen Signalintensitäten, mit in die Auswertung einbezogen werden (siehe Kapitel 4.3.1.7).

4.3.2.7 Eingrenzung der Kontaktfläche mittels Oberflächenzugänglichkeit und Signalintensität

Das Kriterium für eine mögliche Bindungsaktivität wurde auf > 30% Oberflächenzugänglichkeit (☉) festgelegt [Elsner, 2006] (siehe Kapitel 4.1.1.4). Ebenso spielt die relative Signalstärke (Θ) jeder einzelnen Aminosäure eine entscheidende Rolle. Ist diese bereits im Referenzspektrum des freien AF6 schwächer als 15% des stärksten Signals (bei AF6 die Aminosäure Q141), so muss diese kritisch betrachtet und gegebenenfalls aus der Bewertung der Interaktionsfläche ausgeschlossen werden (Abb. 4-62).

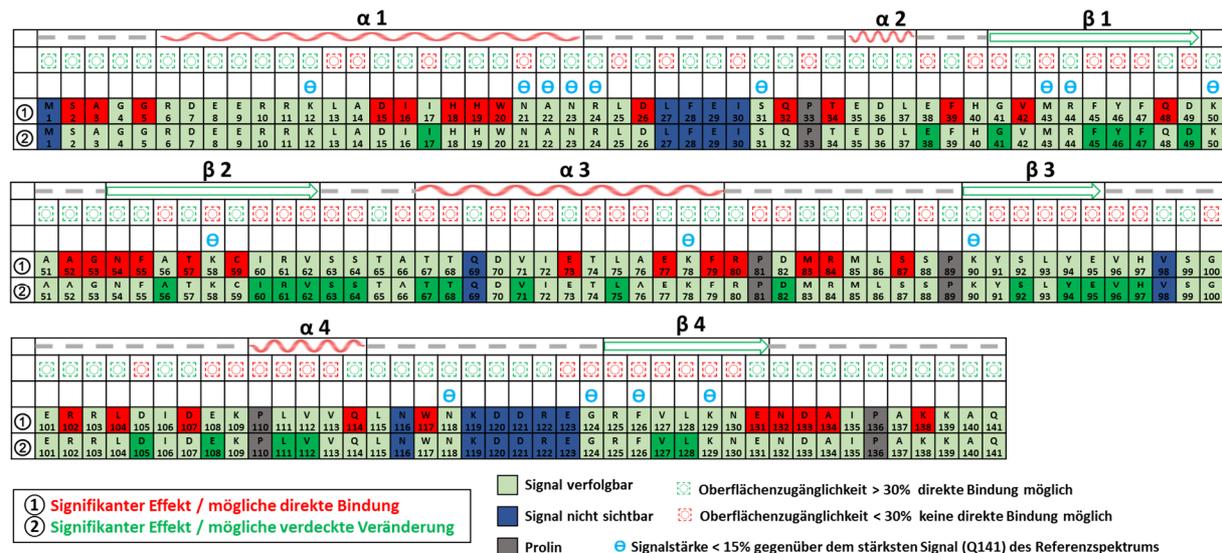


Abbildung 4-62: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche zwischen AF6 und inaktivem Rap1A[GDP] anhand des Kriteriums der Oberflächenzugänglichkeit und der relativen Signalstärke

In rot sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die auf Grund ihrer Oberflächenzugänglichkeit und ihrer signifikanten Effekte während der Komplexbildung direkt an einer Bindung beteiligt sein können. In grün sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die ebenfalls signifikante Effekte durch die Komplexbildung zeigen, aber durch ihre Abschottung eher intramolekularen Prozessen zuzuschreiben sind. Zu schwache Signale, die teils massive Effekte vortäuschen können sind durch das Kriterium der Signalstärke eliminiert.

Das Filtern der Interaktionseffekte mittels der Kriterien der Oberflächenzugänglichkeit (☉) und der relativen Signalstärke (Θ) lässt auch im Fall des AF6-Rap1A[GDP] Komplexes die aktive Interaktionsfläche des AF6 eingrenzen und zusätzliche die konformationellen Veränderungen des Proteins zusammenfassen (Abb. 4-62). Durch die Übertragung der Ergebnisse auf die 3D-Struktur des AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“) lassen sich die zusammenhängenden Bindebereiche erkennen (Abb. 4-63). Dies dient als letztes Filterkriterium um die Interaktionsfläche zu definieren. Hierbei zeigen sich starke Übereinstimmungen der Bindebereiche durch die

Rap1A[GTP] und Rap1A[GDP] Komplexbildung. Eine explizite Auswertung der Ergebnisse erfolgt in der Diskussion (Kapitel 5.3.2).

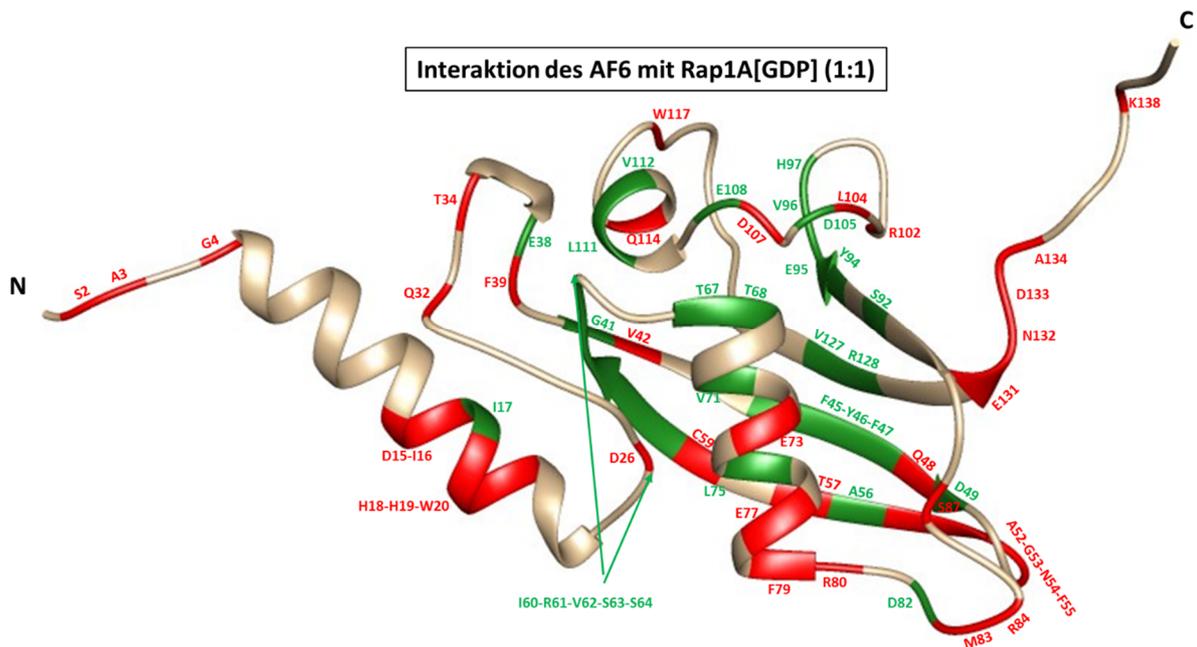


Abbildung 4-63: Übertragung der Interaktionsauswertung AF6 mit Rap1A[GDP] (1:1) auf die 3D-Struktur von AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“)

Dargestellt ist die Interaktion von Seiten des ^{15}N -AF6 (200 μM) mit inaktivem ^{14}N -Rap1A[94,35% GDP](200 μM). Die beteiligten Aminosäuren die signifikante Effekte zeigen sind farbig markiert. Die beteiligten Aminosäuren die signifikante Effekte zeigen sind farbig markiert. In rot mit einer Oberflächenzugänglichkeit > 30%, in grün < 30%.

4.3.2.8 Kontrolle der experimentellen Bedingungen während der NMR-Titrationsexperimente des AF6 mit Rap1A[GDP]

Die Untersuchung der Nukleotidbeladung wurde wie bereits beschrieben (Kapitel 4.3.1.8) durchgeführt. Hier zeigte sich Anhand der HPLC-Daten eine leichte Zunahme der GDP-Beladung (+4,83%) durch intrinsische Hydrolyse des GTPs. Diese dürfte jedoch auf Grund ihrer keinen größeren Einfluss auf die Messung gehabt haben.

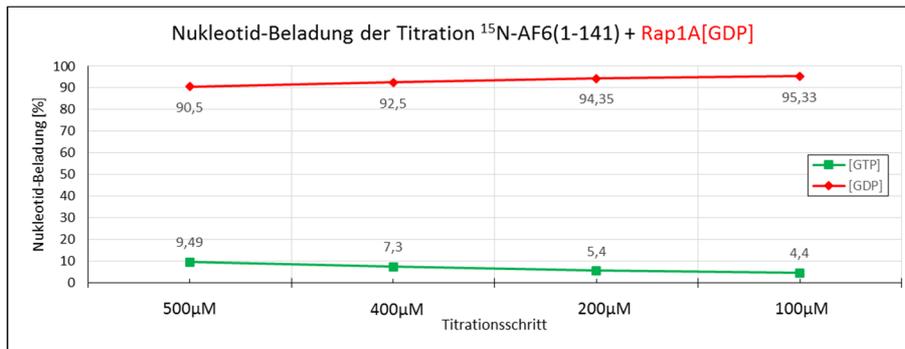


Abbildung 4-64: GTP/GDP-Beladung des Rap1A, während der AF6- Rap1A[GDP] Titrationsmessung

In grün ist die leichte Abnahme der GTP-Beladung während der gesamten Titrationsdauer bei 25 °C dargestellt. Reziprok dazu in rot die Zunahme der GDP-Beladung durch die intrinsische Hydrolyse des GTPs.

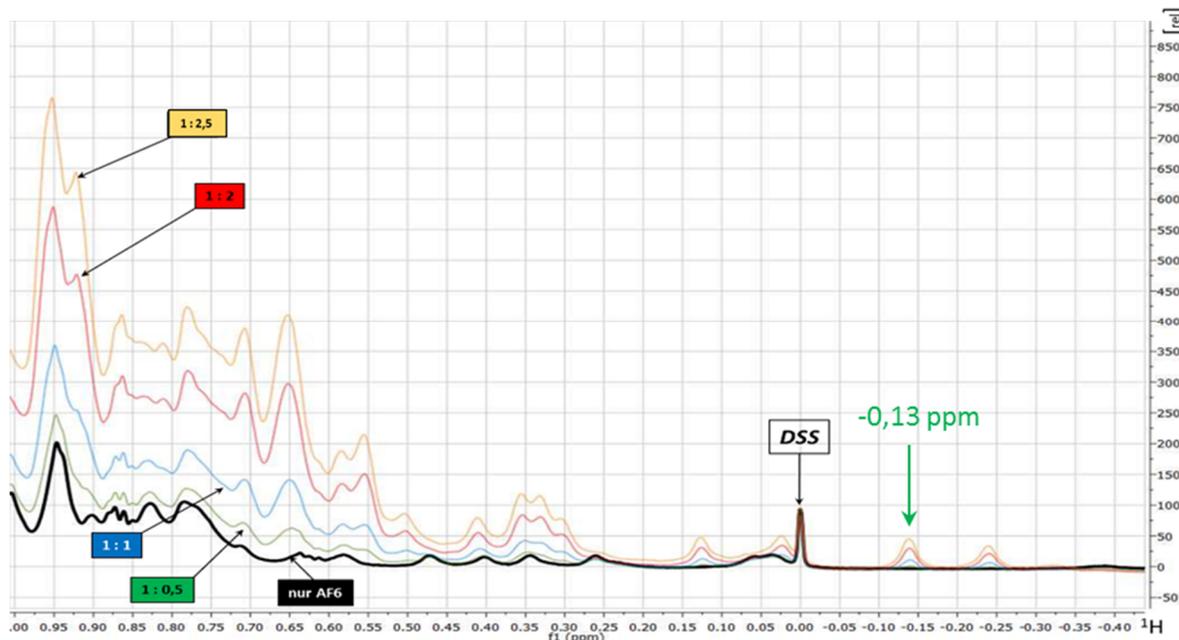


Abbildung 4-65: ^1H -Spektren der einzelnen ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GDP] Titrationschritte

Die Aufnahme dieser 1D-Spektren erfolgte stets vor der eigentlichen HSQC-Messung. In grün ist eine nur für Rap1A charakteristische Methylgruppe (-0,13 ppm) gekennzeichnet. **Proteine:** 200 μM ^{15}N -AF6 vorgelegt, mit ^{14}N -Rap1A[GDP] von 0 μM bis maximal 500 μM titriert (entsprechend der gängigen Farbkodierung) **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBSF / pH = 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / zgpgw5.

Die Titrationsreihe des AF6-Proteins mit GDP-beladenen Rap1A zeigt ebenfalls in den 1D-Spektren der einzelnen Titrationschritte (Abb. 4-65), dass die zuvor bestimmten molaren Konzentrationsverhältnisse des Rap1A für jeden Titrationschritt korrekt waren. Hierzu wurde erneut das für Rap1A charakteristische Methylgruppensignal an Position -0,13 ppm genauer untersucht und die einzelnen Titrationschritte auf dieses Signal skaliert. Mit einer Abweichung von $\pm 1,13\%$ konnte das zuvor ausgewählte molare Verhältnis für jeden einzelnen Titrationschritt eingehalten werden.

4.3.3. TROSY-Interaktionsmessungen [Steiner, 2001] neu prozessiert und analysiert

4.3.3.1 TROSY-Messung der Interaktion AF6 mit Rap1A[GppNHp] und H-Ras[GppNHp]

Um die 2001 von Guido Steiner durchgeführten TROSY-Interaktionsmessungen des AF6-Konstruktes mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A für den Vergleich mit den durchgeführten HSQC-Interaktionsmessungen des AF6 mit Rap1A[GTP/GDP] zugänglich zu machen, mussten diese neu prozessiert und ausgewertet werden.

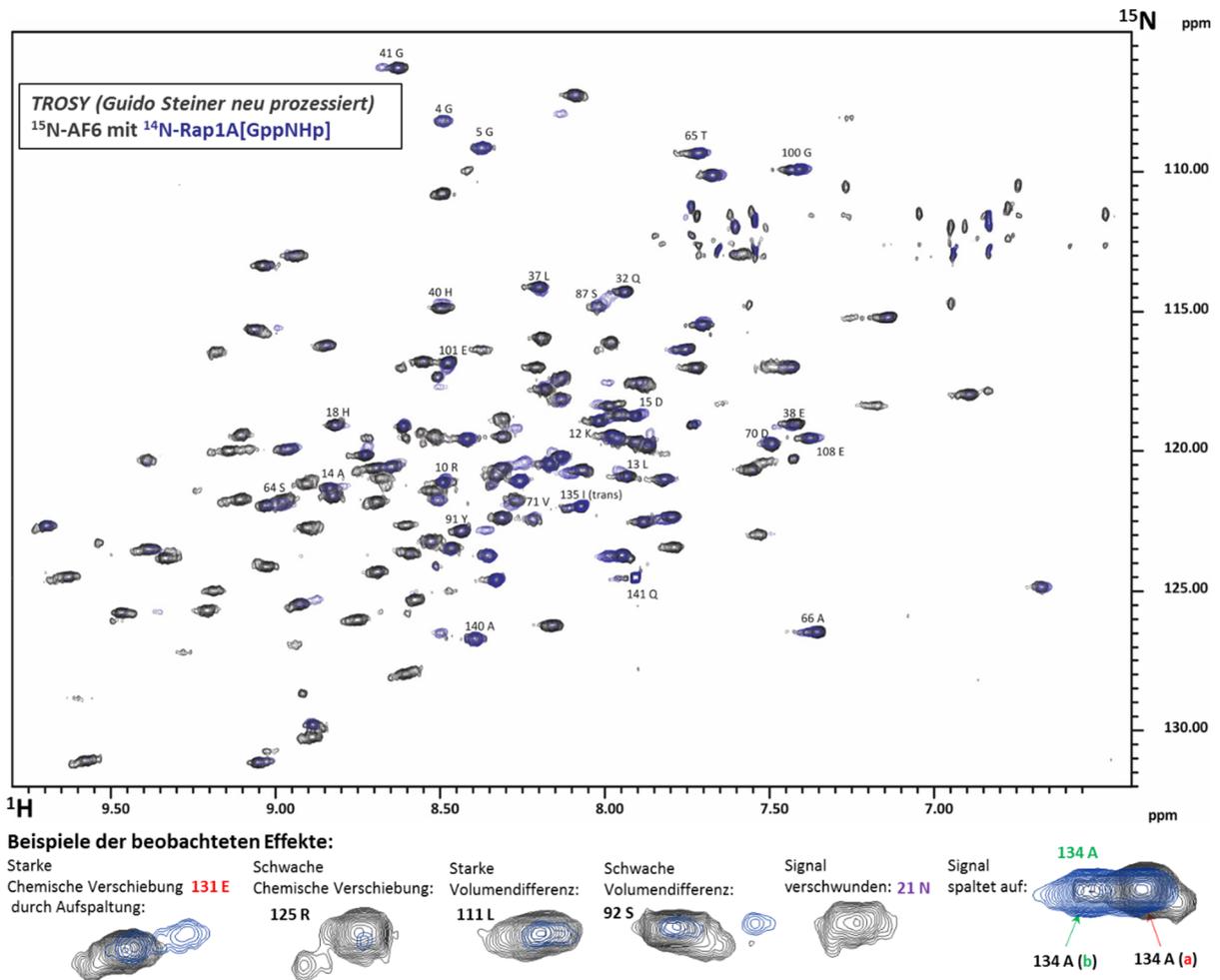


Abbildung 4-66: ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GppNHp] (1:1)

Das Referenzspektrum des freien AF6 ist schwarz, das des Komplexes mit Rap1A[GppNHp] ist blau dargestellt. Zusätzlich sind unterhalb des Spektrums Beispiele für die beobachteten Effekte hervorgehoben. Es wurden keine weiteren Titrationschritte durchgeführt. **Proteine:** vermeintlich 0,7 mM ^{15}N -AF6 mit 0,91 mM ^{14}N -Rap1A[GppNHp]. **Puffer:** 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,9 / 2 mM MgCl_2 / 0,2 mM EDTA. **Messbedingungen:** 303 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / TROSY-Spektrum. **AcquPars:** TD(F2) 8129x800 TD(F1) / DS 112/NS 56. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

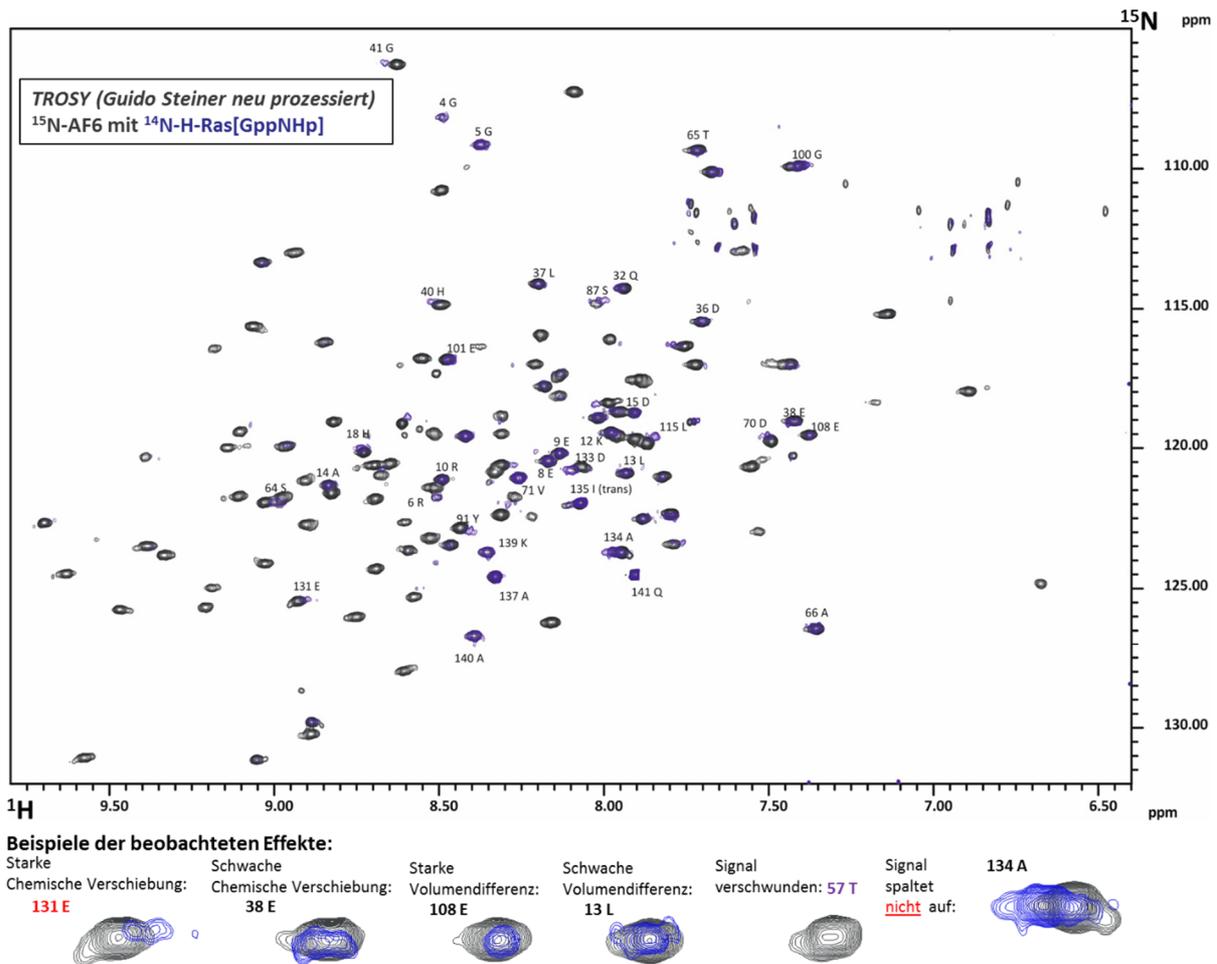


Abbildung 4-67: ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -H-Ras[GppNHp] (1:1)

Das Referenzspektrum des freien AF6 ist schwarz, das des Komplexes mit H-Ras[GppNHp] ist blau dargestellt. Zusätzlich sind unterhalb des Spektrums Beispiele für die beobachteten Effekte hervorgehoben. Es wurden keine weiteren Titrationsschritte durchgeführt. **Proteine:** vermeintlich 0,7 mM ^{15}N -AF6 mit 1,26 mM ^{14}N -H-Ras[GppNHp] **Puffer:** 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,9 / 2 mM MgCl_2 / 0,2 mM EDTA. **Messbedingungen:** 303 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / TROSY-Spektrum. **AcquPars:** TD(F2) 8129x800 TD(F1) / DS 16/NS 8. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

Die Messbedingungen der TROSY-Experimente [Steiner, 2001] waren wie folgt:

- 1) ^{15}N -AF6 Referenzmessung: 1 mM AF6
800 MHz-Spektrometer, 303 K, *number of scans* (NS) = 8, *number of dummy scans* (DS) = 16, *time domain* (TD) 8192(F2) / 800 (F1), *receiver gain* (RG) 128, Dauer der Messung 2 h.
- 2) AF6-Rap1A Komplex: 0,7 mM ^{15}N -AF6 mit 0,91 mM ^{14}N -Rap1A[GppNHp]
800 MHz Spektrometer, 303 K, NS = 56, DS = 112, TD 8192(F2) / 800 (F1), RG 90,5, Dauer der Messung 22 h.
- 3) AF6- H-Ras Komplex: 0,7 mM ^{15}N -AF6 mit 1,26 mM ^{14}N -H-Ras[GppNHp]
800 MHz Spektrometer, 303 K, NS = 8, DS = 16, TD 8192(F2) / 800 (F1), RG 80,6, Dauer der Messung 24 h.

Die Parameter der Prozessierung der TROSY-Experimente [Steiner, 2001] waren wie folgt:

Tabelle 4-7: Übersicht über geänderte Prozessierungsparameter der TROSY-Spektren

Parameter	ursprüngliche Prozessierung		neue Prozessierung	
	F2	F1	F2	F1
<i>SI</i>	1024	1024	8192	4096
<i>WDW</i>	QSINE	QSINE	GM	GM
<i>LB[Hz]</i>	no	no	-6	-8
<i>GB</i>	no	no	0,12	0,1
<i>SSB</i>	2	2	no	no
<i>ME_mod</i>	no	no	no	LPfc
<i>NCOEF</i>	no	100	no	32
<i>LPBIN</i>	no	1600	no	128

Änderungen in der Prozessierung sind grün hervorgehoben.

Nach der neuen Prozessierung der Spektren, wurden diese wie die Daten der HSQC-Interaktionsexperimente (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2) bearbeitet und analysiert.

4.3.3.2 Aufspaltung einzelner Resonanzlinien und verschwinden einiger Signale der Interaktion des AF6 mit Rap1A[GppNHp] und AF6 mit H-Ras[GppNHp] im Überblick (TROSY)

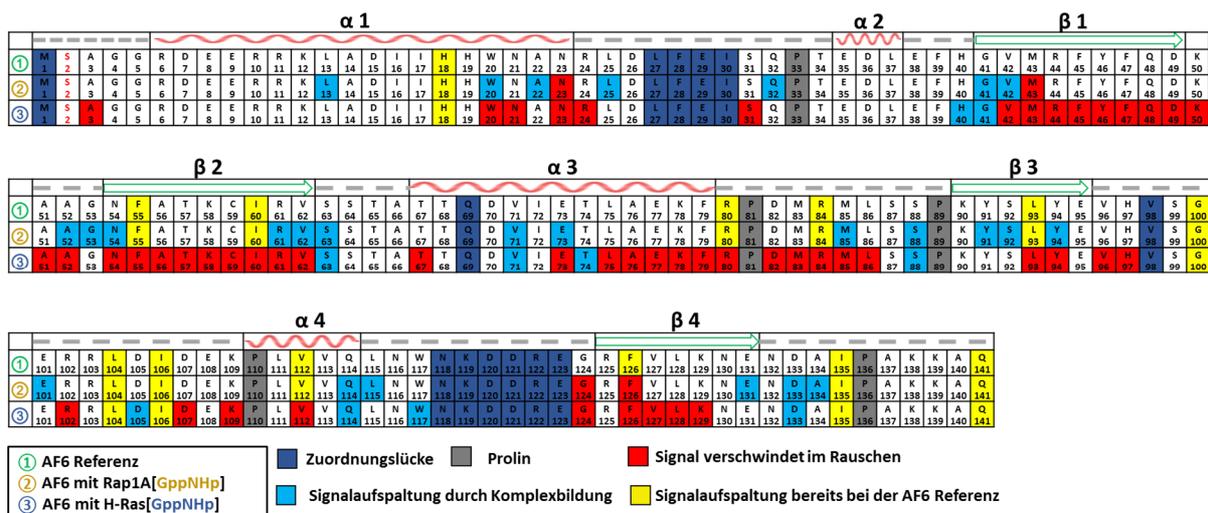


Abbildung 4-68: Langsame Austauschprozesse der AF6-Rap1A[GppNHp] und AF6 H-Ras[GppNHp]-Komplexbildung auf die Signale im ¹H-¹⁵N-TROSY-Spektrum

Dargestellt sind die Aminosäuresequenz des AF6-Konstruktes und das Verhalten jeder einzelnen Aminosäure in Bezug auf ein Aufspalten seiner Resonanzlinien oder ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung. Der genaue Farbcode ist innerhalb der Abbildung erläutert.

Die Auswertung der Spektren 2001 durch Guido Steiner, zeigte bereits bei der AF6 mit Rap1A Messung ein Aufspalten einzelner Signale in zwei Resonanzlinien, jedoch wurden die Spektren der Referenzmessung und der Messung von AF6 mit H-Ras nicht daraufhin untersucht. Hierbei zeigt sich, dass bereits bei der Referenzmessung des freien AF6 zwei Zustände auf Grund einer

Aufspaltung der Resonanzlinien einiger Signale zu beobachten sind und es auch in der Messung von AF6 mit H-Ras zu Signalaufspaltungen und langsamen Austauschprozessen kommt. Diese wurden stets einzeln auf ihre Signifikanz hin überprüft und gegebenenfalls in die Bestimmung der Interaktionsfläche einbezogen.

4.3.3.3 Auswertung der chemischen Verschiebungen und der Volumenänderung der Interaktion von AF6 mit Rap1A[GppNHp] und AF6 mit H-Ras[GppNHp]

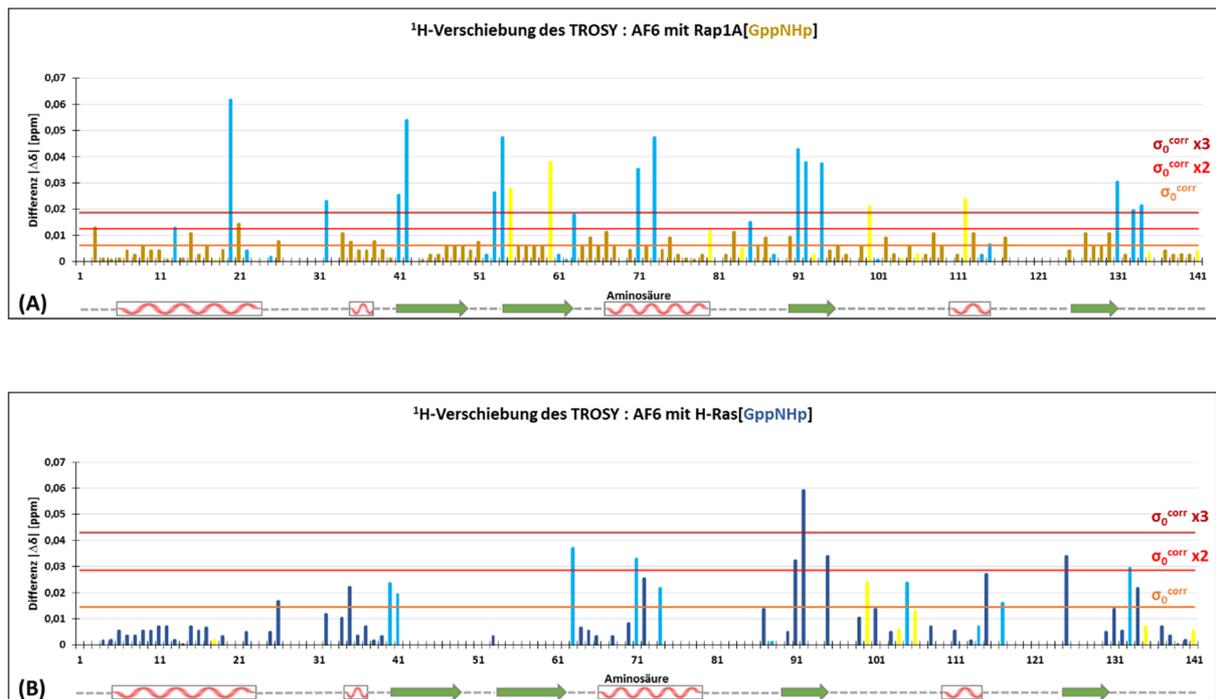


Abbildung 4-69: Chemische Verschiebungseffekte der Komplexbildung in ^1H -Ebene

Dargestellt sind die Effekte der ^1H -chemischen Verschiebungsänderung der AF6-Signale durch Komplexbildung mit (A) Rap1A[GppNHp] in braun und (B) H-Ras[GppNHp] in dunkelblau, im molaren Verhältnis 1:1 (bezogen auf die absolute Proteinkonzentration). In Cyan sind die langsamen Austauschprozesse der Komplexbildung hervorgehoben, in gelb die Aufspaltung der Resonanzlinien der AF6-Referenz in Abwesenheit des Bindepartners. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Die Signifikanzlevels σ_0^{corr} sind markiert.

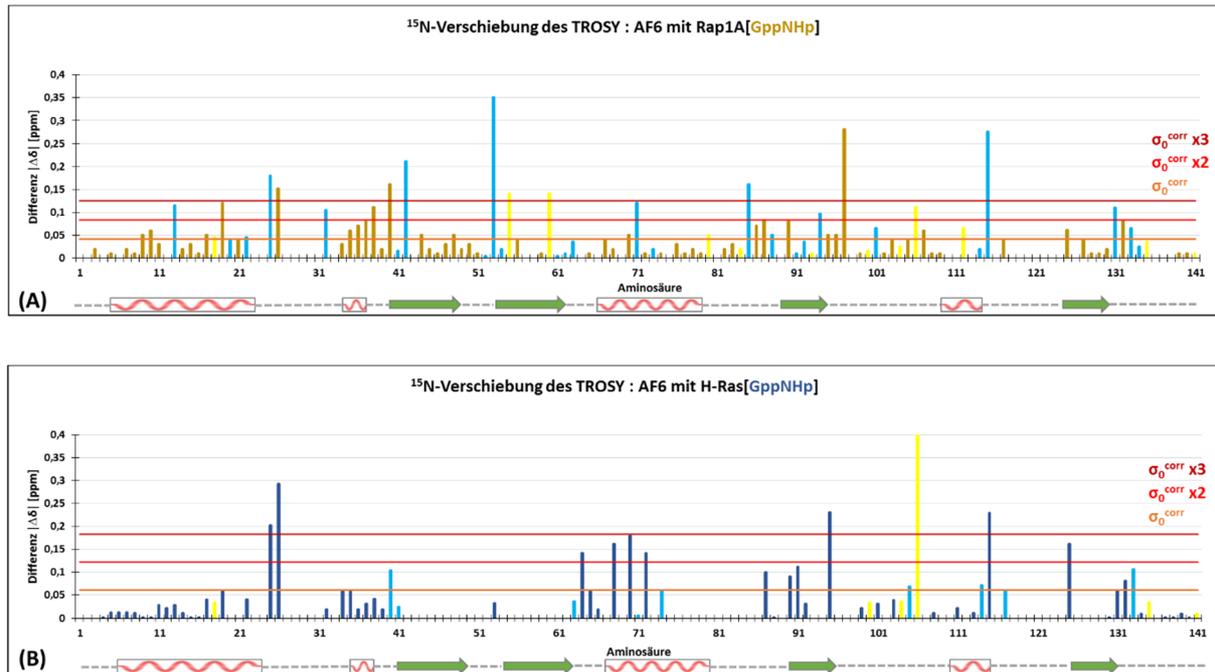


Abbildung 4-70: Chemische Verschiebungseffekte der Komplexbildung in ^{15}N -Ebene

Dargestellt sind die Effekte der ^{15}N -chemischen Verschiebungsänderung der AF6-Signale durch Komplexbildung mit (A) Rap1A[GppNHp] in braun und (B) H-Ras[GppNHp] in dunkelblau, im molaren Verhältnis 1:1 (bezogen auf die absolute Proteinkonzentration). In Cyan sind die langsamen Austauschprozesse der Komplexbildung hervorgehoben, in gelb die Aufspaltung der Resonanzlinien der AF6-Referenz in Abwesenheit des Bindepartners. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Die Signifikanzlevels σ_0^{corr} sind markiert.

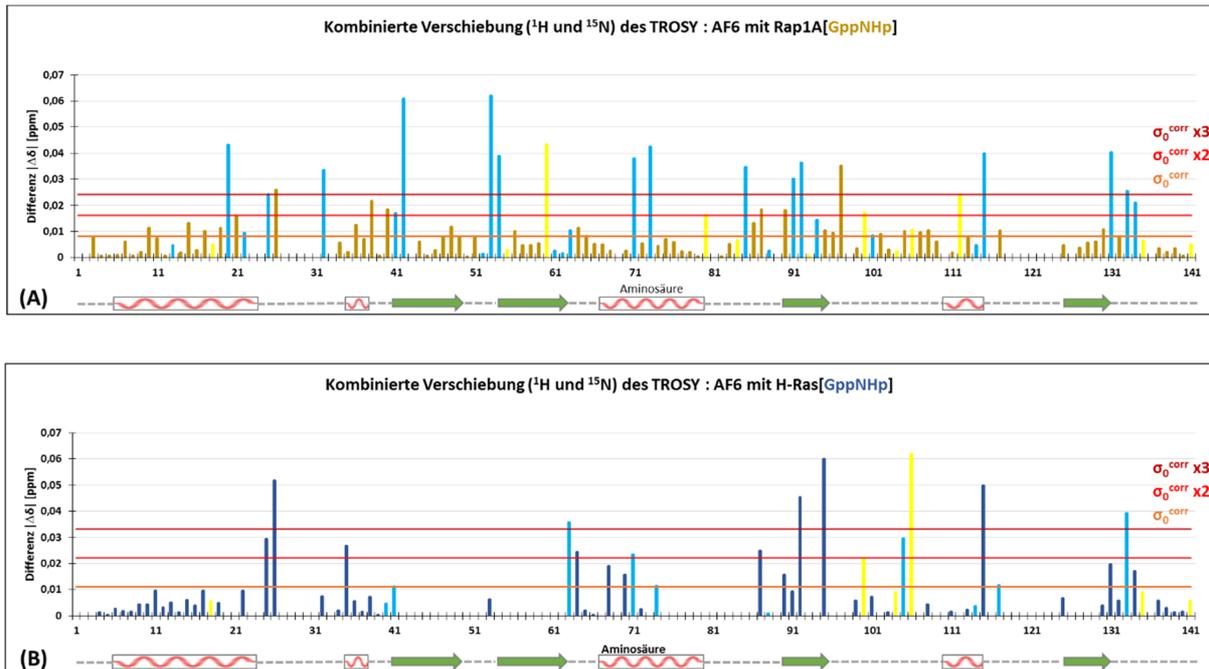


Abbildung 4-71: Chemische Verschiebungseffekte der Komplexbildung in ^1H und ^{15}N Kombination

Dargestellt sind die Effekte der ^1H - und ^{15}N - kombinierten chemischen Verschiebungsänderung der AF6-Signale durch Komplexbildung mit **(A)** Rap1A[GppNHp] in braun und **(B)** H-Ras[GppNHp] in dunkelblau, im molaren Verhältnis 1:1 (bezogen auf die absolute Proteinkonzentration). In Cyan sind die langsamen Austauschprozesse der Komplexbildung hervorgehoben, in gelb die Aufspaltung der Resonanzlinien der AF6-Referenz in Abwesenheit des Bindepartners. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Die Signifikanzlevels σ_0^{corr} sind markiert.

In Abbildung 4-69 bis 4-71 ist jeweils in **(A)** der Betrag der relativen Signaldifferenz des Komplexes aus AF6 mit Rap1A[GppNHp] in Bezug auf die Signale des freien AF6 Referenzspektrums ($|\Delta\delta| = \delta_{\text{AF6+Rap1A[GppNHp]}} - \delta_{\text{AF6 Referenz}}$) der TROSY-Messungen dargestellt. In **(B)** ist der Betrag der relativen Signaldifferenz des Komplexes aus AF6 mit H-Ras[GppNHp] in Bezug auf die Signale des freien AF6 Referenzspektrums ($|\Delta\delta| = \delta_{\text{AF6+H-Ras[GppNHp]}} - \delta_{\text{AF6 Referenz}}$) der TROSY-Messungen dargestellt. Zu erkennen sind die Stärke der chemischen Verschiebungseffekte jeder einzelnen Aminosäure (Position 1-141) des AF6-Konstruktes mit der darunter abgebildeten Sekundärstruktur. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Alle Aminosäuren die einen Effekt stärker als σ_0^{corr} aufweisen werden als signifikant eingestuft und werden in den nachfolgenden Analysen weiter untersucht. Zusätzlich wird auch die Änderung der Signalvolumina in die Analysen einbezogen.

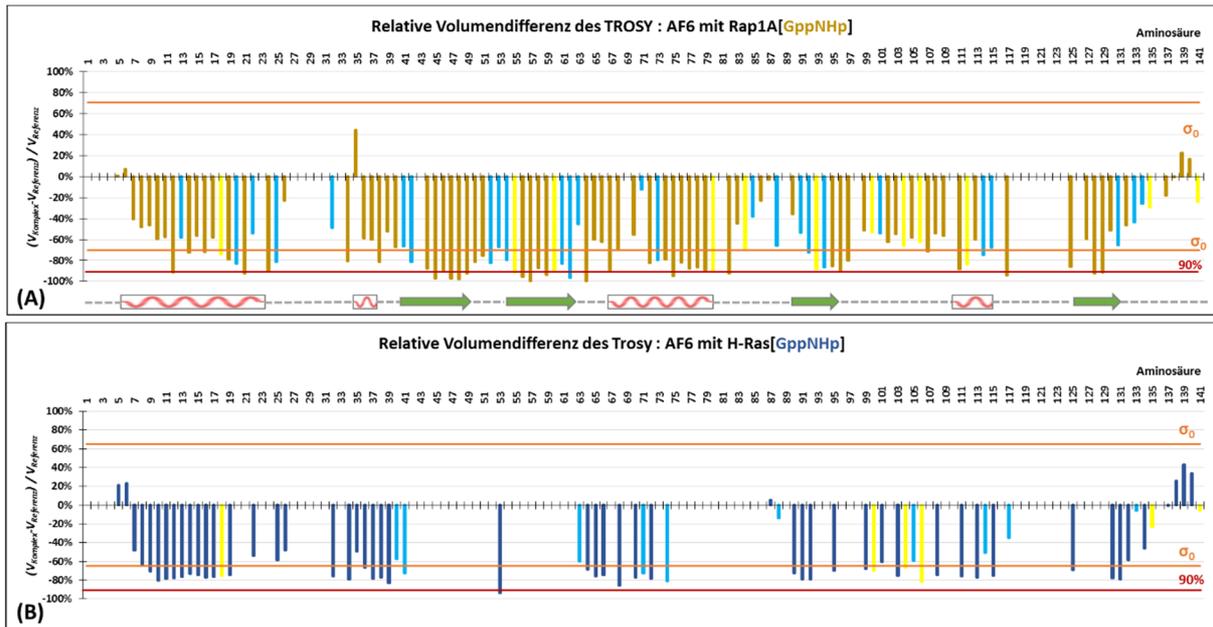


Abbildung 4-72: Relative Volumenänderungen der Komplexbildung

Dargestellt sind die relativ zum Referenzspektrum (freies AF6) auftretenden Veränderungen der Signalvolumina $[(V_{AF6+GTPase[GppNHp]} - V_{AF6\text{ Referenz}}) / V_{AF6\text{ Referenz}}]$ jeder einzelnen Aminosäure des AF6-Konstruktes durch die Komplexbildung mit **(A)** Rap1A[GppNHp] in braun und **(B)** H-Ras[GppNHp] in dunkelblau im molaren Verhältnis 1:1 (bezogen auf die absolute Proteinkonzentration). In Cyan sind die langsamen Austauschprozesse der Komplexbildung hervorgehoben, in gelb die Aufspaltung der Resonanzlinien der AF6-Referenz in Abwesenheit des Bindepartners. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Die Signifikanzlevels σ_0 / 90% sind markiert.

Deutlich zu erkennen ist das trotz der TROSY-Messungen des AF6 mit H-Ras[GppNHp] Komplexes ein Großteil der Signale durch Linienverbreiterung verschwindet. Im Fall des AF6-Rap1A[GppNHp] Komplexes sind weitaus mehr Signale verfolgbar und auch ihre langsamen Austauschprozesse sind daher besser zu analysieren. Die Signale jeder einzelnen Aminosäure wurden auf ein signifikantes Verhalten hin überprüft und gegebenenfalls in die Analysen mit einbezogen. Das Signifikanzkriterium σ_0 der Volumenänderung ist nicht so stringent wie σ_0^{corr} , da es durch die Komplexbildung im Allgemeinen bereits zu einer Abnahme der gesamten Volumina kommt. Daher ist die Signifikanzgrenze der Volumenauswertung der TROSY-Messungen auf Grund der massiven Volumenänderungen auf $> 90\%$ angehoben. Langsame Austauschprozesse werden, sofern sie anhand ihrer Signale in den Spektren verifiziert wurden, als starke chemische Verschiebung klassifiziert.

4.3.3.4 Übertragung der chemischen Verschiebung der TROSY-Messungen auf die Primärstruktur des AF6-Konstruktes

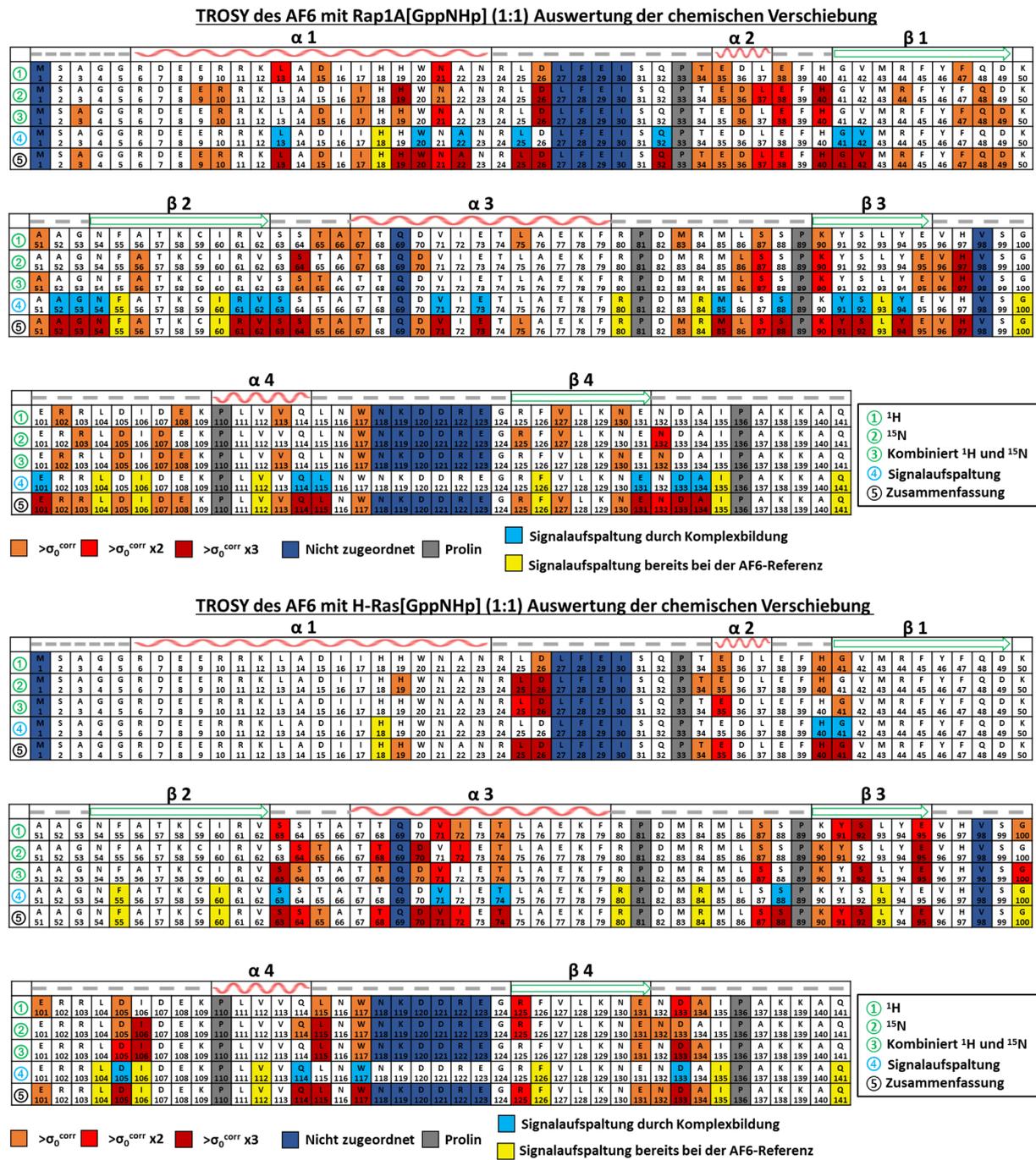


Abbildung 4-73: Chemische Verschiebungsänderungen der AF6-Rap1A[GppNHp]- und der AF6 H-Ras[GppNHp] Komplexbildung (des molaren Verhältnisses 1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Auswertung der chemischen Verschiebungen (δ) in ¹H / ¹⁵N und beide kombiniert ($\Delta_{combined}$), sowie die gesonderte Auswertung der langsamen Austauschprozesse (hellblau). Farbige markierte Aminosäuren sind gemäß der Kriterien signifikant, weiße Aminosäuren zeigen keine signifikanten Veränderungen. In gelb sind die bereits im Referenzspektrum auftretenden Aufspaltungen der Resonanzlinien markiert.

Erneut werden die Differenzen der chemischen Verschiebung mit Werten zwischen σ_0^{corr} und $\sigma_0^{corr} \times 3$ werden der Population C_1 zugeordnet und sind daher mögliche direkte Bindestellen des Komplexes. Differenzen die unter σ_0^{corr} liegen, zählen zu der Population C_2 und sind daher eher intramolekulare Wechselwirkungen oder konformationellen Änderungen zuzuschreiben. Die farbliche Kodierung erfolgt nach den zuvor bestimmten Signifikanzkriterien. Zusätzlich fließen gesondert ausgewertete langsame Austauschprozesse in die Zusammenfassung mit ein, jedoch werden die langsamen Austauschprozesse, die bereits beim freien AF6 auftreten nicht gewichtet. Die langsamen Austauschprozesse des Komplexes werden, wenn als signifikant erachtet, als starke chemische Verschiebung gewertet. Die farbig markierten Aminosäuren zeigen signifikante Veränderungen (Gewichtung siehe Farbcode unterhalb der Primärsequenz) Eine Zusammenfassung der Effekt (⑤) erfolgt durch Auswahl des jeweils stärksten Effekts der verschiedenen chemischen Verschiebungen (① bis ④).

4.3.3.5 Kombination der Daten aus Volumen- und chemischer Verschiebungsauswertung der

Trosy-Messungen

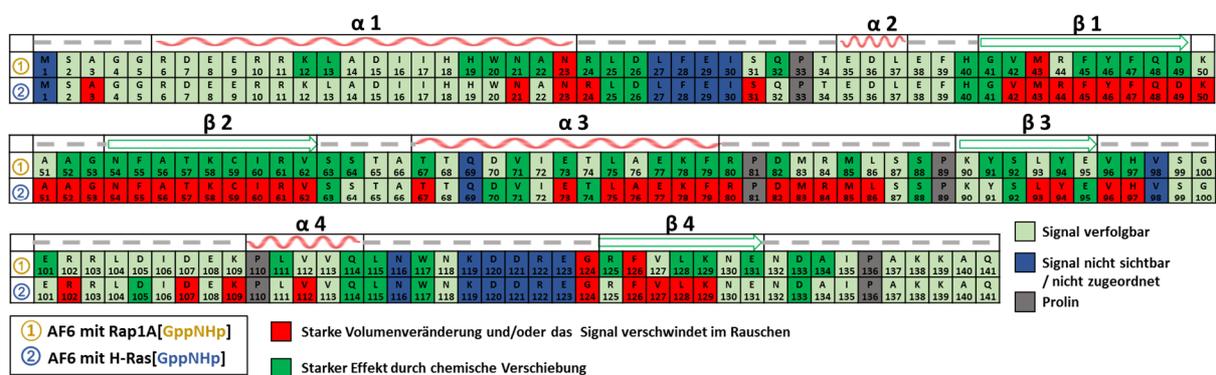


Abbildung 4-74: Kombination der chemischen Verschiebung und der Volumenänderungen der AF6 mit Rap1A[GppNHp] und AF6 mit H-Ras[GppNHp]-Komplexbildung (1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6 Konstruktes

In rot sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die eine starke Volumenveränderung aufweisen, oder durch zu starke Volumenabnahme im Rauschen verschwinden. In dunkelgrün sind die Aminosäuren markiert, die starke chemische Verschiebungen zeigen. Die restlichen beobachtbaren Signale sind in hellgrün dargestellt.

4.3.3.6 Eingrenzung der Kontaktfläche des AF6 der TROSY-Interaktionsmessungen mittels Oberflächenzugänglichkeit und Signalintensität

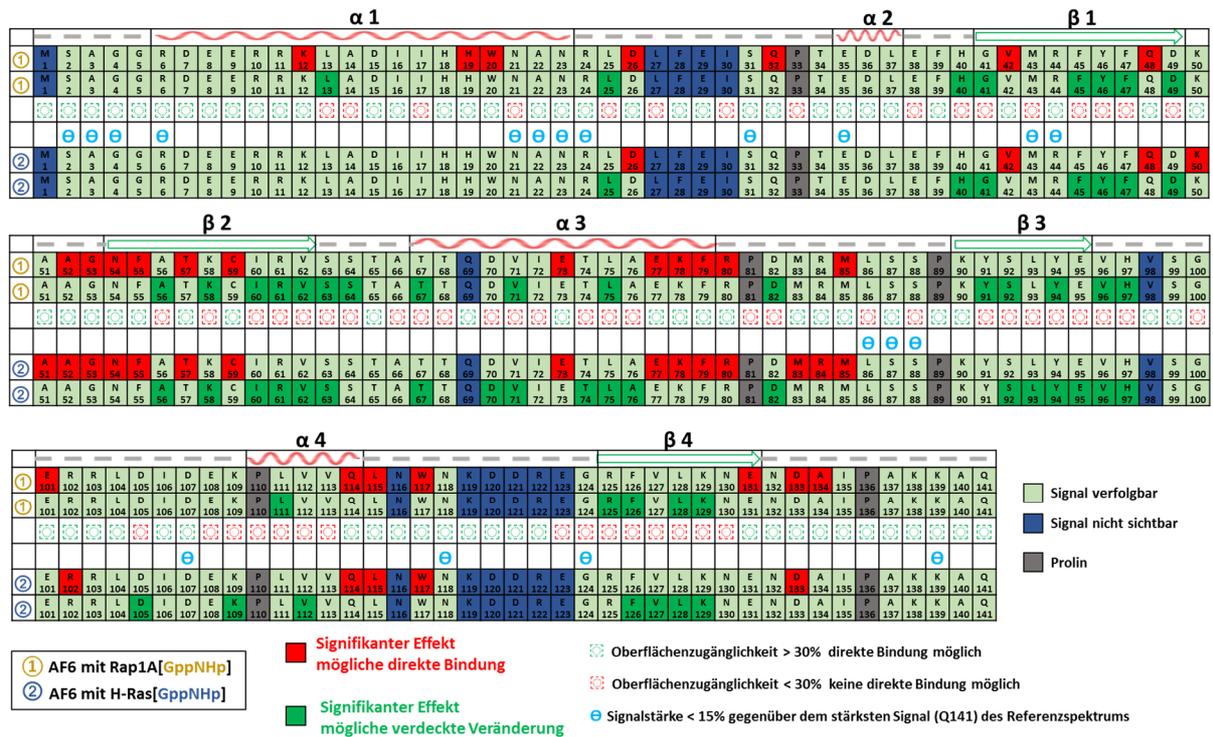


Abbildung 4-75: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche zwischen AF6 und aktivem Rap1A[GppNHp] sowie H-Ras[GppNHp] anhand der Kriterien der Oberflächenzugänglichkeit und der relativen Signalstärke.

In rot sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die auf Grund ihrer Oberflächenzugänglichkeit und ihrer signifikanten Effekte während der Komplexbildung direkt an einer Bindung beteiligt sein können. In grün sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die ebenfalls signifikante Effekte durch die Komplexbildung zeigen, aber durch ihre Abschottung eher intramolekularen Prozessen zuzuschreiben sind.

Durch das filtern der Interaktionseffekte mittels der Kriterien der Oberflächenzugänglichkeit (\odot) und der relativen Signalstärke (Θ) lässt sich auch in diesem Fall die aktive Interaktionsfläche des AF6 mit den kleinen GTPasen eingrenzen und zusätzliche die konformationellen Veränderungen des Proteins zusammenfassen (Abb. 4-75). Durch die Übertragung der Ergebnisse auf die 3D-Struktur des AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“) lassen sich die zusammenhängenden Bindebereiche erkennen (Abb. 4-76). Dies dient als letztes Filterkriterium um die Interaktionsfläche zu definieren.

Neben dem kanonischen Bindebereich, an dem H-Ras und Rap1A gleichermaßen binden, scheinen die $\alpha 1$ -Helix und der C-terminale Anteil des AF6 nur für Rap1A bindungsrelevant zu sein. Eine explizite Auswertung der Ergebnisse erfolgt in der Diskussion (Kapitel 5.3).

4.3.3.7 Übertragung der Ergebnisse auf die 3D-Struktur von AF6

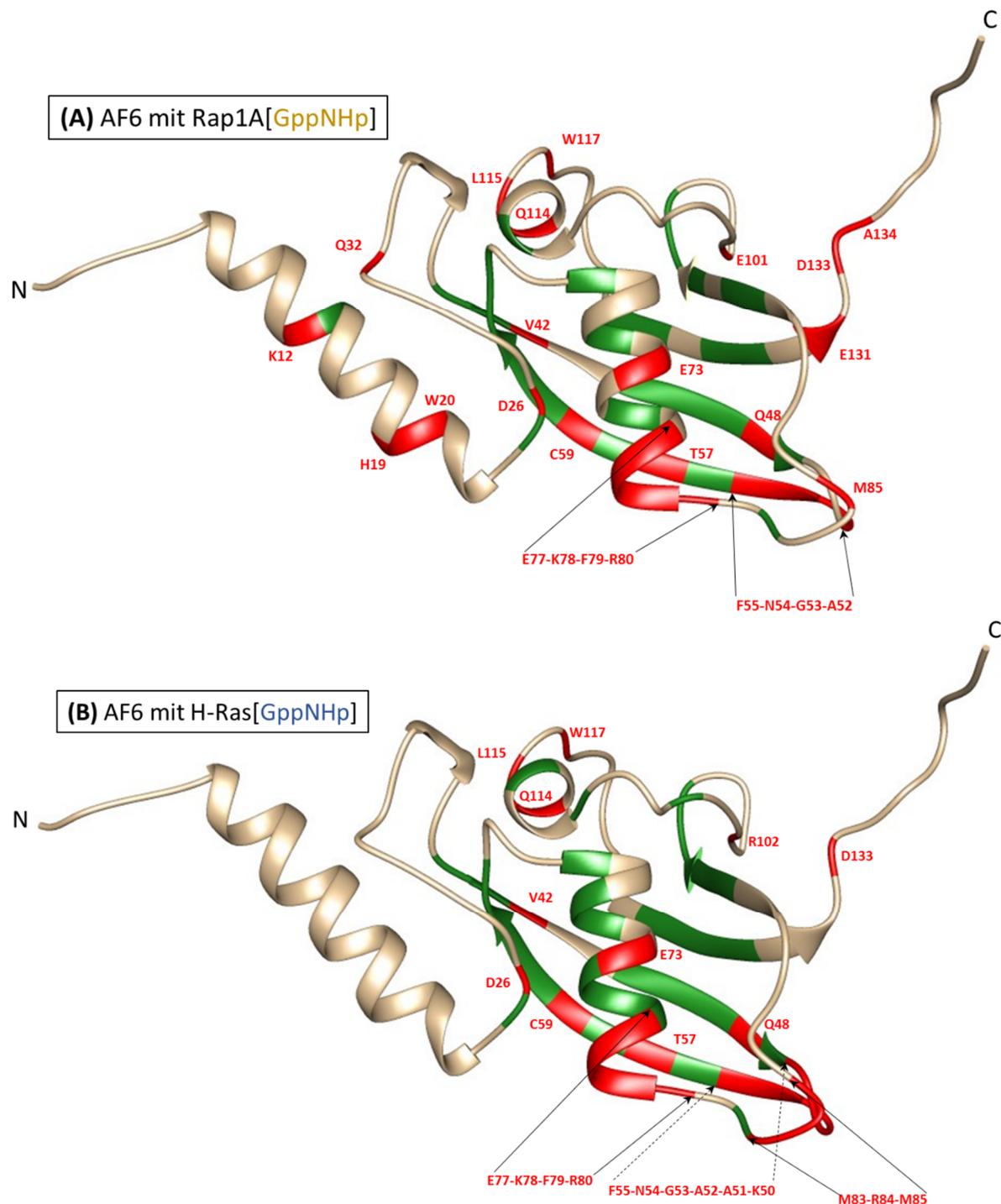


Abbildung 4-76: Übertragung der Interaktionsauswertung auf die 3D-Struktur von AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“)

Dargestellt ist die Interaktion von Seiten des ^{15}N -AF6 (700 μM) mit **(A)** 900 μM ^{14}N -Rap1A[GppNHp] und **(B)** 1200 μM ^{14}N -H-Ras[GppNHp]. Die beteiligten Aminosäuren die signifikante Effekte zeigen sind farbig markiert. In rot mit einer Oberflächenzugänglichkeit > 30%, in grün < 30%.

4.3.4 Alignment der Interaktionsbereiche verschiedener Ras-Binde- und Ras-Assoziations-Domänen mit H-Ras/Rap1A und Vergleich mit den Dockingexperimenten von Ralph Elsner

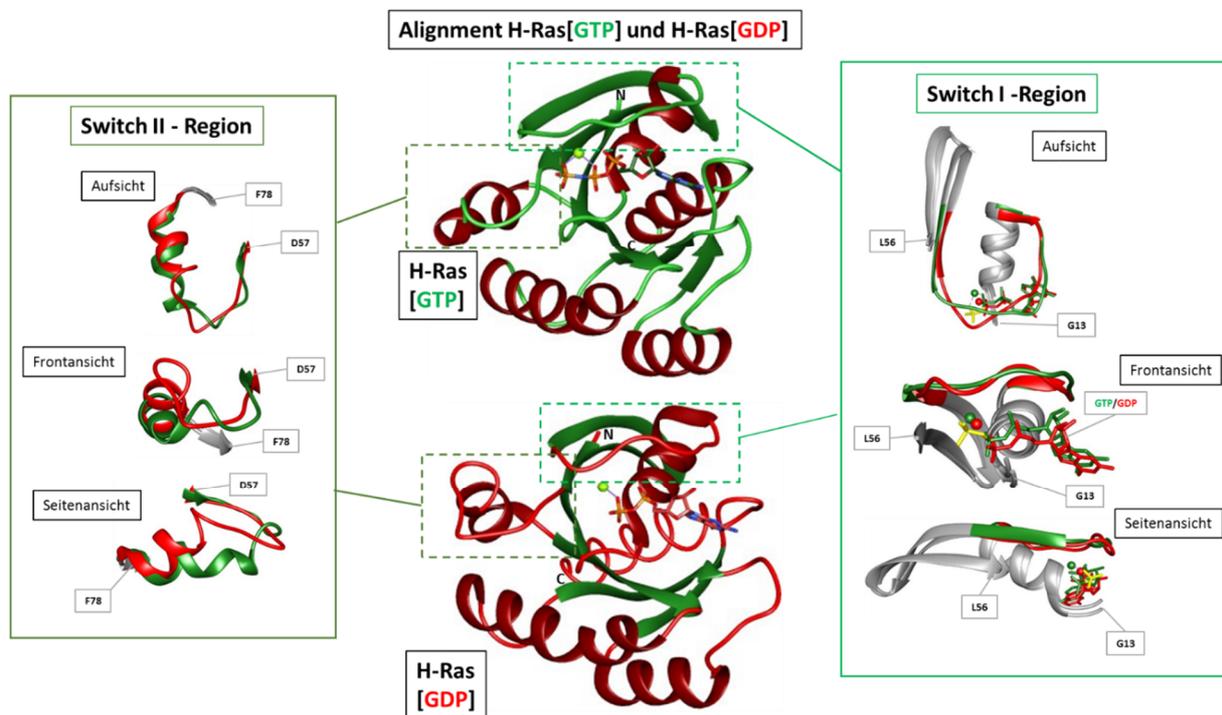


Abbildung 4-77: Vergleich der GTP/GDP Konformation der 3D-Struktur des H-Ras

Dargestellt sind die aktive, GTP beladene Konformation des H-Ras in grün (PDB-File 5P21) und die inaktive mit GDP beladene Konformation des H-Ras in rot (PDB-File 4Q21). Hervorgehoben sind jeweils die beiden *Switch*-Regionen in Aufsicht, Frontansicht und Seitenansicht. Das GDP (*Switch I* Region) ist ebenfalls rot gekennzeichnet, GTP in grün und sein γ -Phosphat in gelb.

Da zwischen GTP- und GDP-gebundenem Zustand gravierende Affinitätsunterschiede vorliegen, war zusätzlich eine strukturelle Analyse der beiden Konformationen am Beispiel des H-Ras notwendig. Der GTP-gebundene Zustand der Ras GTPase ist die aktive Konformation, die es dem Ras ermöglicht als molekularer Schalter seine Effektor-Proteine zu binden. Hierbei kommt es vor allem in der *Switch I* Region, der Aminosäuren Q25-Y40, und der *Switch II* Region mit den Aminosäuren D57-G75, durch die GTP-Beladung zu essentiellen strukturellen Veränderungen (Abb. 4-77). Für die Kontaktierung des GTP γ -Phosphats und des Mg^{2+} -Ions ist ein konserviertes Threonin (T35 in H-Ras) in der *Switch I* Region essentiell. Ein konserviertes Glycin in der *Switch II* Region (G60 in H-Ras) spürt die Anwesenheit des GTPs ebenfalls [Vetter, 2014]. Die *Switch I* Region wird auch Effektor-Region genannt, da sie häufig in GTP-beladenem Zustand an der Effektor-Bindung beteiligt ist. Dieser Vergleich der Konformationen wird in der

Diskussion mit in die strukturelle Beschreibung der Interaktionskomplexe einfließen (Kapitel 5.3).

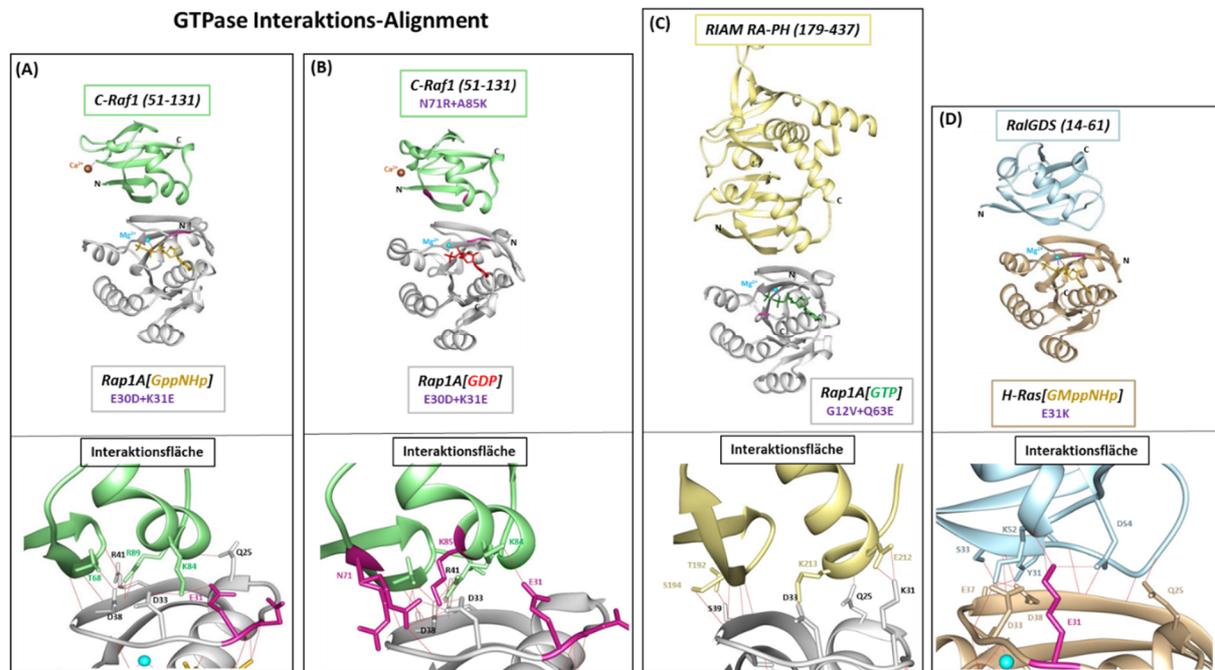


Abbildung 4-78: Darstellung verschiedener Kontakte zwischen kleinen GTPasen und ihren Binde/Assoziations-Domänen

(A) Zeigt die Interaktion von C-Raf1(51-131) mit Rap1A[GppNHp](E30D/K31E) PDB-File „1GUA“. **(B)** Interaktion von C-Raf1(51-131)(N71R/A85K) mit Rap1A[GDP](E30D/K31E) PDB-File „3KUC“. **(C)** RIAM RA-PH(179-437) mit Rap1A[GTP] (G12V/Q63E) PDB-File „4KCG“. **(D)** RalGDS(14-61) mit H-Ras[GppNHp] (E31K) PDB-File „1LFD“.

Zusätzlich wurden diverse bereits strukturell aufgeklärte Interaktionskomplexe der kleinen GTPasen mit ihren Effektor-Proteinen untersucht, um Rückschlüsse auf homologe Übereinstimmungen treffen zu können. So scheint die Interaktion des Rap1A mittels Aspartat33 - Lysin(X_1) und Glutamat37-Lysin(X_2) in den Komplexen konserviert zu sein [Zhang, 2014]. Zusätzlich unterscheidet sich Rap1A gegenüber den anderen Ras GTPasen in 4 Aminosäuren der *Switch I* Region, dem Glycin26, Isoleucin27, Glutamat30 und Lysin31. Hierbei scheint das Lysin31 eine tragende Rolle zuzuspielen, da es mit den Rap1A spezifischen Interaktionspartnern eine Salzbrücke zu Glutamat(X) ausbildet (bei RIAM durch Glutamat212), bei Ras-spezifischen Interaktionspartnern befindet sich an der Position des Glutamats(X) ein Aspartat(X), welches durch die kürzere Seitenkette des Aspartats nicht in der Lage zu sein scheint, die essentielle Salzbrücke auszubilden [Zhang, 2014].

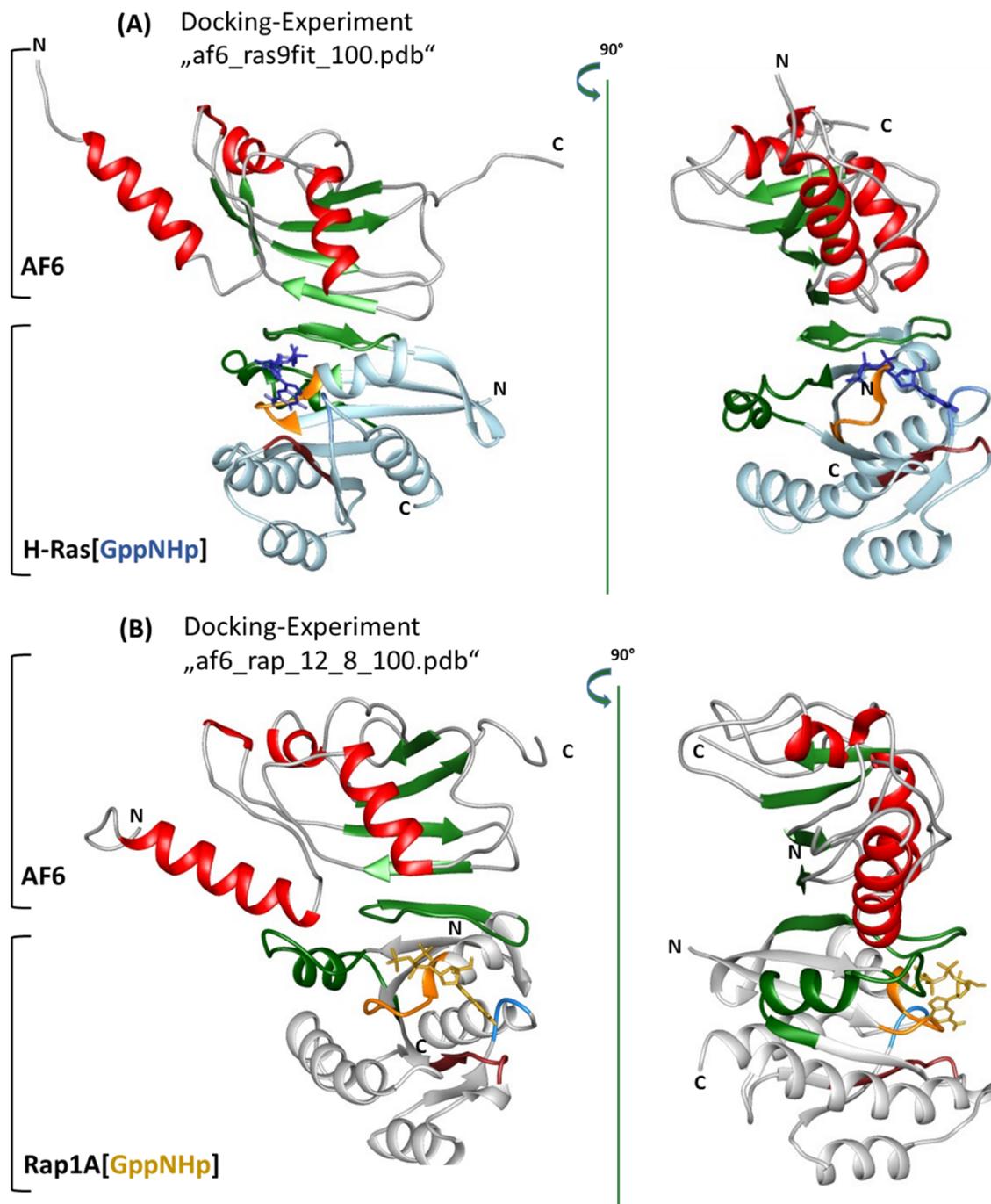


Abbildung 4-79: Resultat der Dockingexperimente des (A) AF6 mit H-Ras[GppNHp] und (B) AF6 mit Rap1A[GppNHp] von Ralph Elsner 2006 neu dargestellt

Im oberen Teil befindet sich jeweils AF6, mit den α -Helices in rot und den β -Faltblättern in grün. Darunter befindet sich H-Ras/Rap1A in der simulierten Komplexstruktur. G1 (P-Loop) ist in orange, G2 (Switch I) in grün, G3 (Switch II) in dunkelgrün, G4 (LVGNKxDL-Motiv) in braun und die G5 (SAK-Motiv) in hellblau dargestellt.

4.3.5 Zusammenfassung der aktiven Interaktionsfläche des AF6 im Komplex mit Rap1A und H-Ras

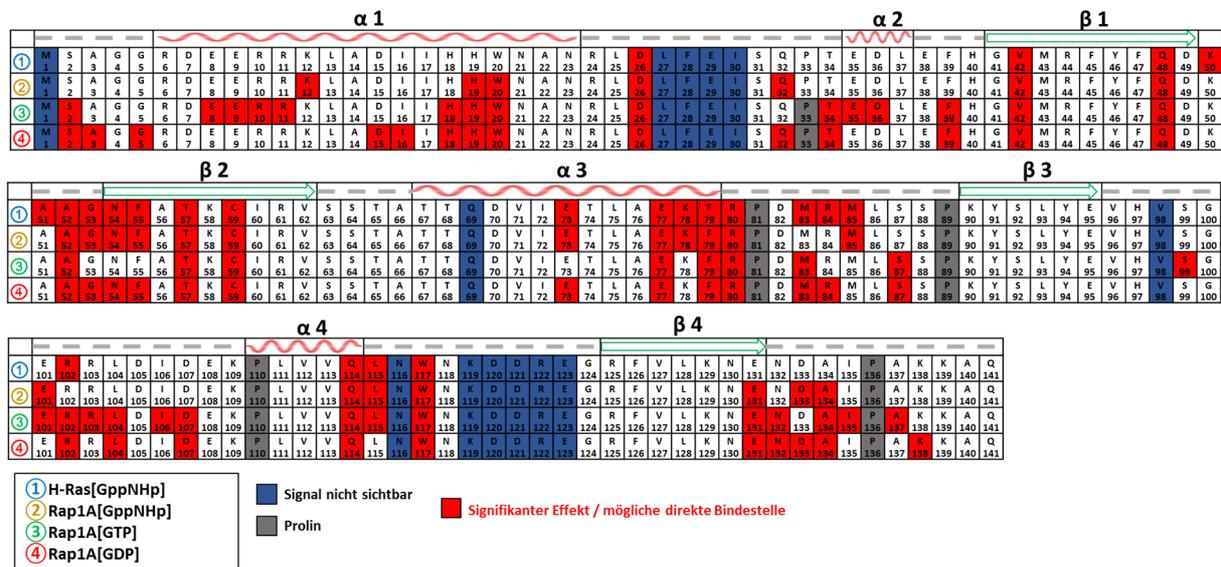


Abbildung 4-80: Zusammenfassung der Aminosäuren des AF6, die an einer aktiven Komplexbildung mit den GTPasen H-Ras und Rap1A beteiligt sein können.

① Komplex des AF6 mit H-Ras[GppNHp], ② Komplex des AF6 mit Rap1A[GppNHp], ③ Komplex des AF6 mit Rap1A[GTP] und der Komplex des AF6 mit Rap1A[GDP] ④. Signifikante Aminosäuren die auf Grund ihrer Oberflächenexposition (> 30%) direkt an einer Bindung beteiligt sein können, sind rot dargestellt. Proline sind grau und nicht zugeordnete Signale in dunkelblau gekennzeichnet.

In Abbildung 4-80 sind die Ergebnisse der NMR-Interaktionsstudien hinsichtlich aktiv an einer Komplexbildung mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A beteiligter Aminosäuren des AF6 dargestellt. Eine Diskussion dieser Ergebnisse findet in Kapitel 5.3 statt.

4.3.6 Das Verhalten der Aminosäure Alanin134 des AF6 während der Komplexbildung mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A

Das A134 des AF6 zeigte während den NMR-Titrations-Experimenten ein interessantes Verhalten und wurde zusätzlich genauer charakterisiert (Abb. 4-81). Hierbei kam es zu einer Aufspaltung seiner Resonanzlinien auf Grund eines langsamen Austauschprozesses durch die Komplexbildung des AF6 mit der GTPase Rap1A, nicht jedoch mit H-Ras. Zusätzlich wurden Langzeit-Hydrolyse-Experimente durchgeführt um das Verhalten genauer zu charakterisieren. Hierzu wurde über einen Zeitraum von 3 Tagen 40 aufeinanderfolgende HSQC-Spektren des Komplexes AF6 mit Rap1A[GTP] aufgenommen (Abb. 4-82). Anhand der bestimmten GTP-Hydrolyserate (Abb. 4-83) konnte dann jedem Spektrum eine GTP/GDP Beladung des Rap1As zugeordnet werden.

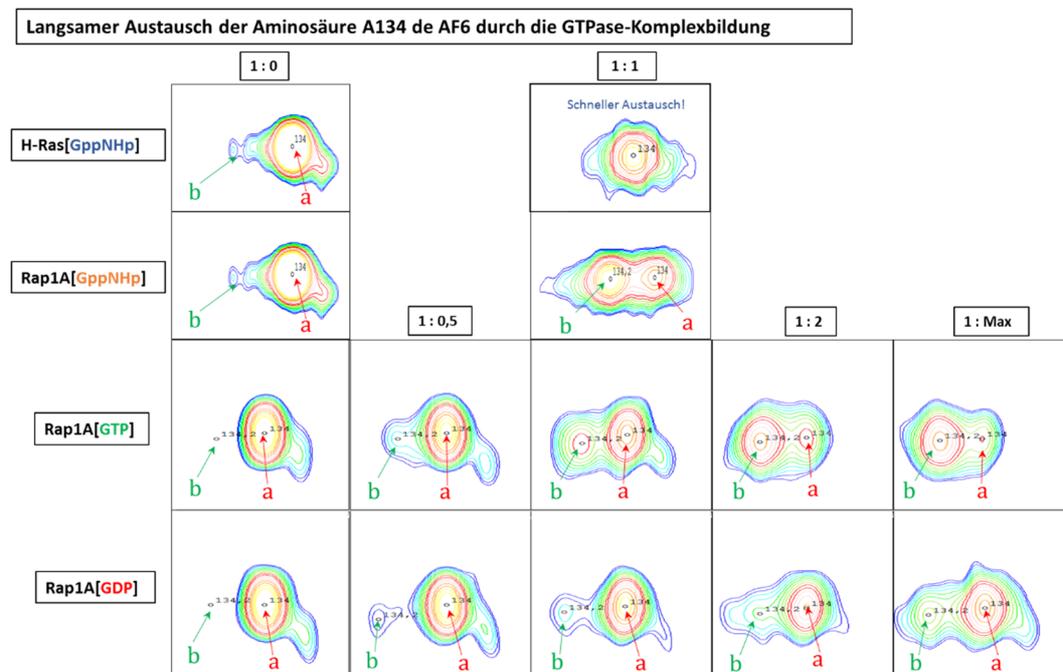


Abbildung 4-81: Übersicht über die Konformationen der Aminosäure A134 des AF6 während den Interaktionsexperimenten mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A

Links sind die GTPasen und ihre Nukleotidbeladung angegeben, in den Kästen sieht man das HSQC-Kreuzsignal des A134 für jeden einzelnen durchgeführten Titrationschritt und die beobachtete Aufspaltung der Resonanzlinien in Konformation **a**, den ungebundenen Zustand und **b**, den Zustand des Komplexes.

Die Auswertung der Signale der zwei Konformationen der Aminosäure A134 des AF6 zeigt ein eindeutiges Rap1A assoziiertes Verhalten während der Interaktionsexperimente. Dieses Verhalten lässt sich bei der Interaktion des AF6 mit H-Ras oder ZO1 (Kapitel 4.4) nicht beobachten.

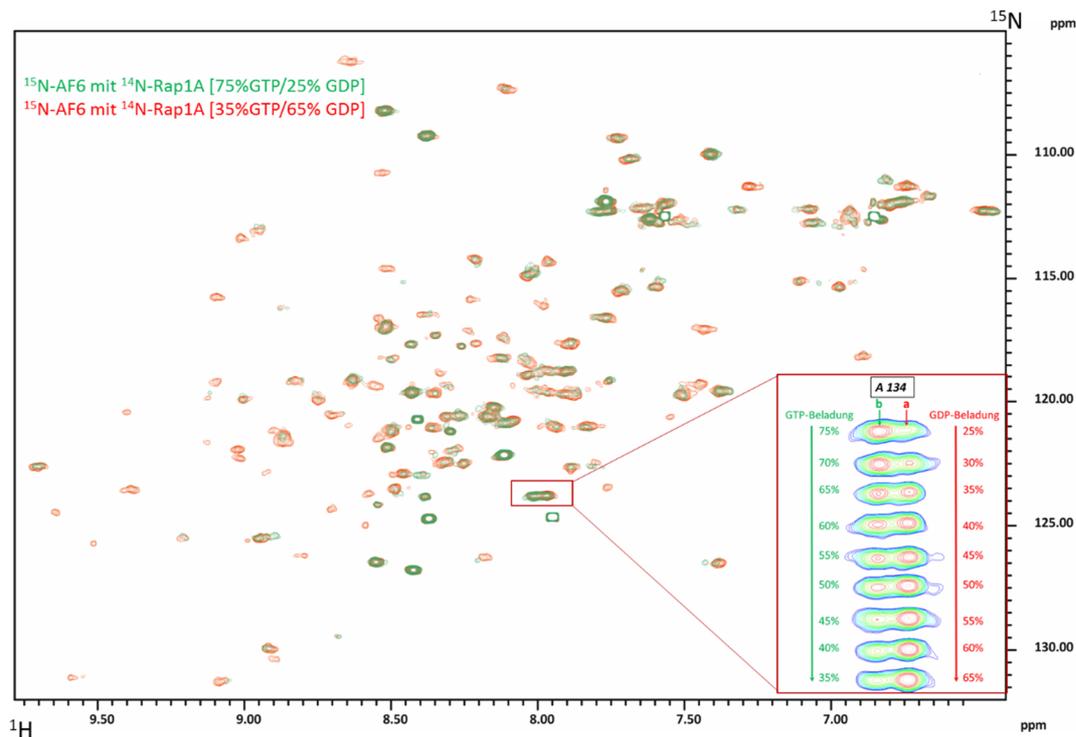


Abbildung 4-82: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Langzeit Hydrolysemessung des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP]

In grün Start der Messreihe Rap1A[75% GTP / 25% GDP]. In Rot Ende der Messreihe nach ca. drei Tagen durchgehender HSQC-Messungen bei 25 °C Rap1A [35% GTP / 65% GDP]. Die langsamen Austauschprozesse von A134 sind rechts unten vergrößert dargestellt und geben einen Überblick über den Verlauf der Hydrolyse. Die Hydrolyserate wurde durch einen exponentiellen Kurvenverlauf *gefitted* (Abb. 4-83). **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBF / pH 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer. **Protein:** 200 μM ^{15}N -AF6 mit 400 μM ^{14}N -Rap1A[GTP].

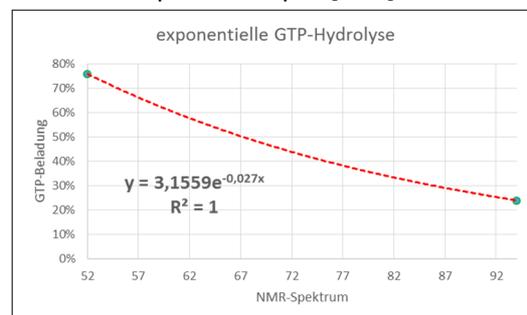


Abbildung 4-83: Bestimmung der GTP-Hydrolyserate während der Langzeitmessung mittels HPLC

Diese Bestimmung, ermöglichte es jedem einzelnen HSQC-Spektrum der Messreihe eine aktive, GTP-beladene Rap1A-Konzentration zu zuordnen.

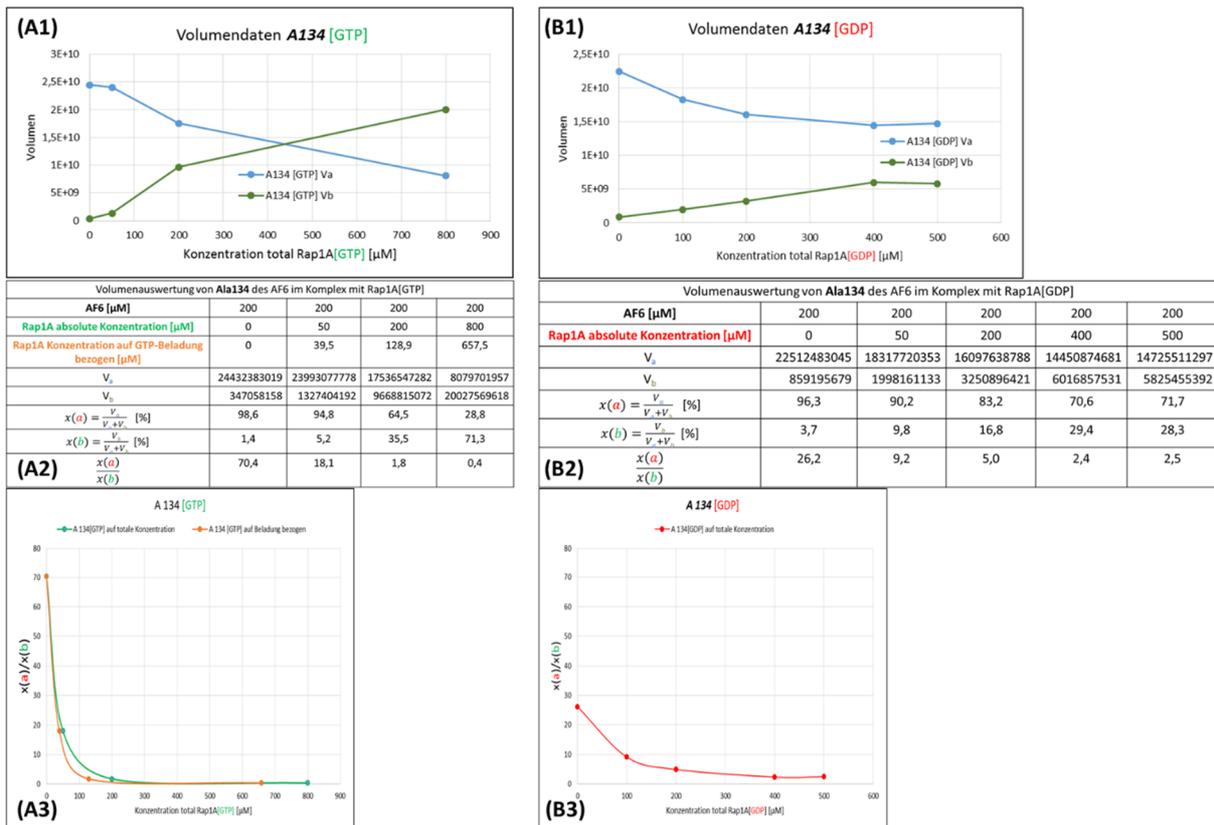


Abbildung 4-84: Volumenauswertung des Signals der Aminosäure A134 während der AF6-Rap1A[GTP] Titration (A) und der AF6-Rap1A[GDP] Titration (B)

In **A1** (für GTP) und **B1** (für GDP) ist das Volumen der beiden Konformationen (a) und (b) der Aminosäure A134 des AF6, während der Titrationsverläufe dargestellt. In **A2** und **B2** sind die Daten tabellarisch zusammengefasst. In **A3** und **B3** ist das relative Verhältnis der beiden Konformationen $x(a)/x(b)$ während der Titration zueinander aufgetragen.

Nur anhand der Konformations-Verhältnisse (in Abbildung 4-84 A2/A3 und B2/B3) zwischen freiem AF6, Konformation (a) und dem Komplex, Konformation (b) (siehe Abb. 4-82), konnte bei den Titrations des AF6 mit Rap1A[GTP/GDP] eine Sättigung ab einem molaren Verhältnis von (1:1) festgestellt werden. Da dieser Bereich aber außerhalb der kanonischen Bindeposition liegt, spiegelt dieses Verhalten möglicherweise eine regulatorische Funktion des C-terminus oder ein sekundäres Bindungsverhalten wider.

Hinsichtlich des Informationsgehaltes und des Umfangs der erhaltenen Daten konnte die Interaktion der Afadin 6 RA 1-Domäne mit den kleinen GTPasen H-Ras[GppNHp] und Rap1A[GppNHp/GTP und GDP] ausgiebig analysiert werden. Eine Auswertung und Interpretation dieser gesammelten Daten geschieht im Diskussionsteil.

4.4 NMR-Interaktionsexperimente des AF6 mit den Konstrukten des *Zonula occludens 1*

Bereits 1997 konnte Yamamoto eine Interaktion des N-terminalen Bereiches des ZO1(1-780) mit dem N-terminalen Bereich des AF6(36-494) durch Pulldown-Experimente zeigen. Gerald Bäumel gelang es daraufhin 2008 durch NMR-Experimente diesen Interaktionsbereich auf die Aminosäuren 186-421 des ZO1 und die Aminosäuren 1-141 des AF6 einzugrenzen. Da das ZO1-Konstrukt (186-421) mit der PDZ2-Domäne eine klassische Protein-Protein-Interaktionsdomäne trägt, wurde diese und ein künstlich durch Mutation erzeugtes monomeres Konstrukt, das MUT2-Konstrukt, hinsichtlich einer Bindung mit AF6 mittels NMR analysiert.

4.4.1 HSQC-Messungen des AF6 mit PDZ2 im molaren Verhältnis von 1:1,5

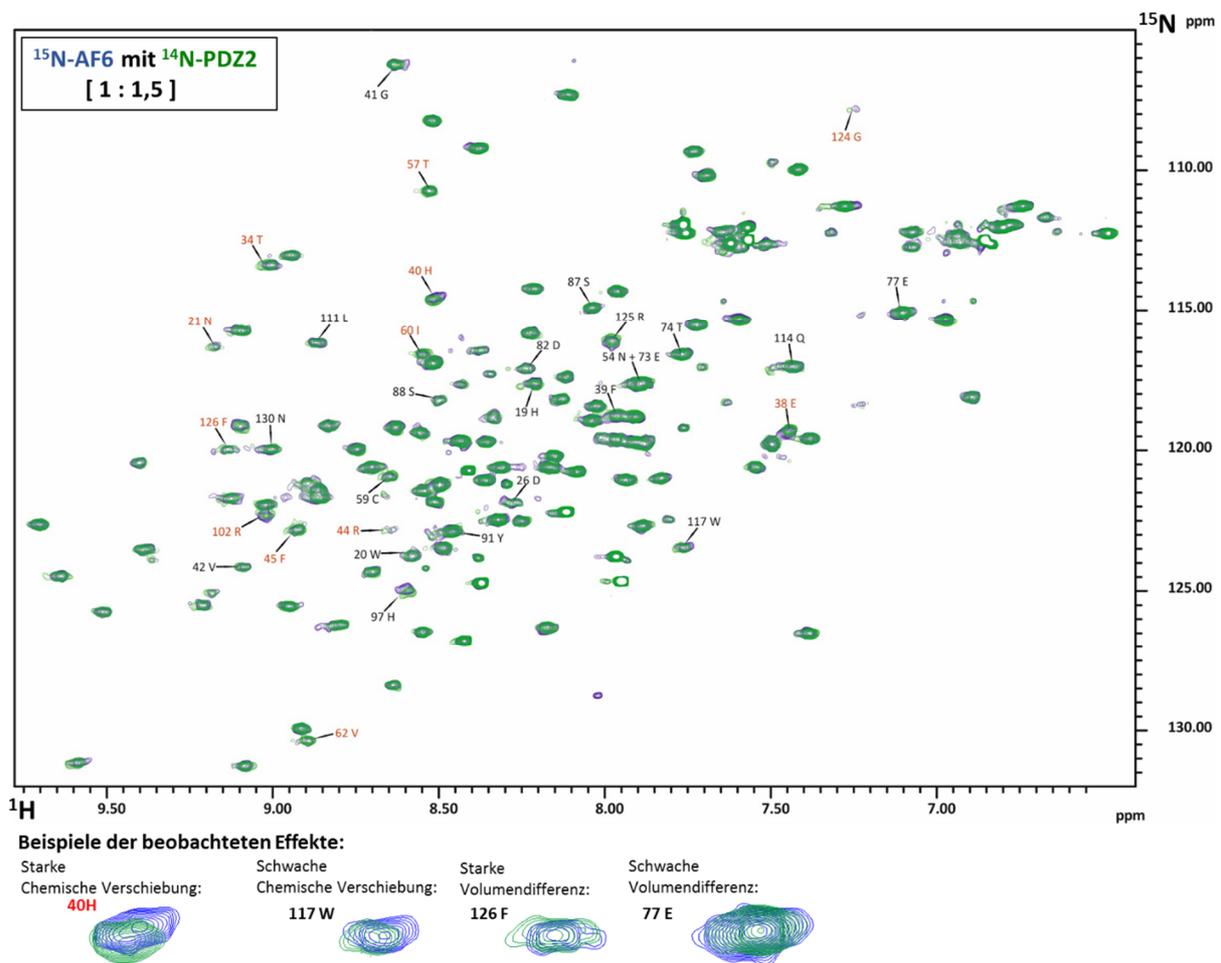


Abbildung 4-85: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -PDZ2 im Verhältnis (1:1,5)

Das Referenzspektrum des freien AF6 ist blau, das des Komplexes mit ZO1-PDZ2 (1: 1,5) ist grün dargestellt. Zusätzlich sind unterhalb des Spektrums Beispiele für die beobachteten Effekte hervorgehoben.

Proteine: 200 μM ^{15}N -AF6 mit 300 μM ^{14}N -PDZ2 vereint. **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBSF / pH = 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner

Standard / 5% D₂O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / HSQC-Spektrum. **AcquPars:** TD(F2) 2048 x 256 TD(F1) / DS 16 / NS 16. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

Eine rein visuelle Auswertung der Spektren (Abb. 4-85) der AF6 mit ZO1-PDZ2-Interaktion zeigt wesentlich schwächere Effekte als beispielsweise die Komplexbildung des AF6 mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A. Dennoch war das auf Grund der vermuteten transienten Interaktion zwischen beiden Konstrukten zu erwarten. Eine Auswertung der Daten erfolgte identisch der Vorgehensweise der AF6 mit H-Ras/Rap1A Interaktionsanalysen. Im Falle der chemischen Verschiebung wurde aus zeitlichen Gründen nur die kombinierte chemische Verschiebung in die Analyse einbezogen.

4.4.1.1 Auswertung der chemischen Verschiebungen und der Volumenänderung der HSQC-Messung des AF6 mit ZO1-PDZ2 im molaren Verhältnis 1:1,5 (200 μ M : 300 μ M)

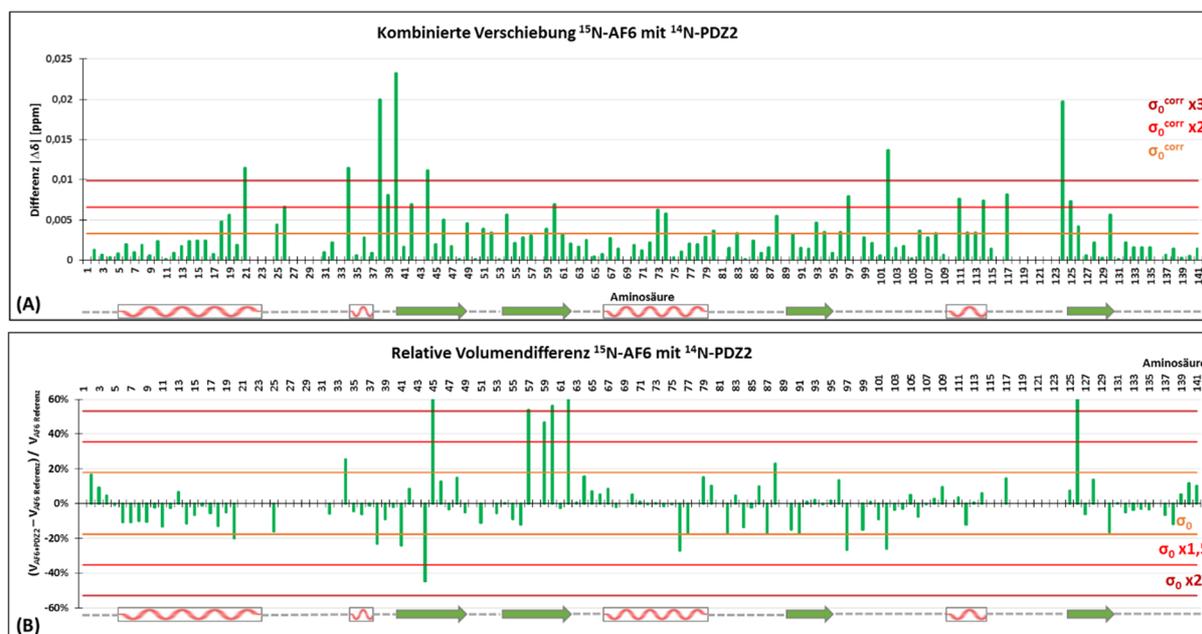


Abbildung 4-86: Kombinierte chemische Verschiebungseffekte (A) und Volumenänderungen (B) der AF6-PDZ2 Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum.

In (A) sind die Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderung und in (B) die Effekte der Volumenänderung der ¹⁵N-AF6-Signale durch Komplexbildung mit ¹⁴N-ZO1-PDZ2 im molaren Verhältnis 1:1,5 dargestellt. Die Signifikanzlevels σ_0^{corr} (A) und σ_0 (B) sind markiert.

In Abbildung 4-86 (A) ist der Betrag der relativen Signaldifferenz des Komplexes aus 200 μ M AF6 mit 300 μ M ZO1-PDZ2 in Bezug auf die Signale des freien AF6 200 μ M Referenzspektrums ($|\Delta\delta| = \delta_{AF6+PDZ2} - \delta_{AF6 \text{ Referenz}}$) dargestellt. Zu erkennen sind die Stärke der chemischen Verschiebungseffekte jeder einzelnen Aminosäure (Position 1-141) des AF6-Konstruktes mit der darunter abgebildeten Sekundärstruktur. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung

des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Alle Aminosäuren die einen Effekt stärker als σ_0^{corr} aufweisen werden als signifikant eingestuft und werden in den nachfolgenden Analysen weiter untersucht.

Zusätzlich sind in Abbildung 4-86 (B) die relativ zum Referenzspektrum auftretenden Veränderungen der Signalvolumina $[(V_{AF6+PDZ2} - V_{AF6 \text{ Referenz}}) / V_{AF6 \text{ Referenz}}]$ jeder einzelnen Aminosäure des AF6-Konstruktes durch die Komplexbildung mit 300 μ M ZO1-PDZ2 dargestellt. Hierbei dient die einfache Standardabweichung σ_0 als Signifikanzkriterium. Langsame Austauschprozesse wie im Fall des AF6-Rap1A[GTP]-Komplexes konnten hierbei nicht beobachtet werden.

4.4.1.2 Kombination der chemischen Verschiebungs- sowie Volumen Effekte der AF6 mit ZO1-PDZ2 Interaktionsmessung

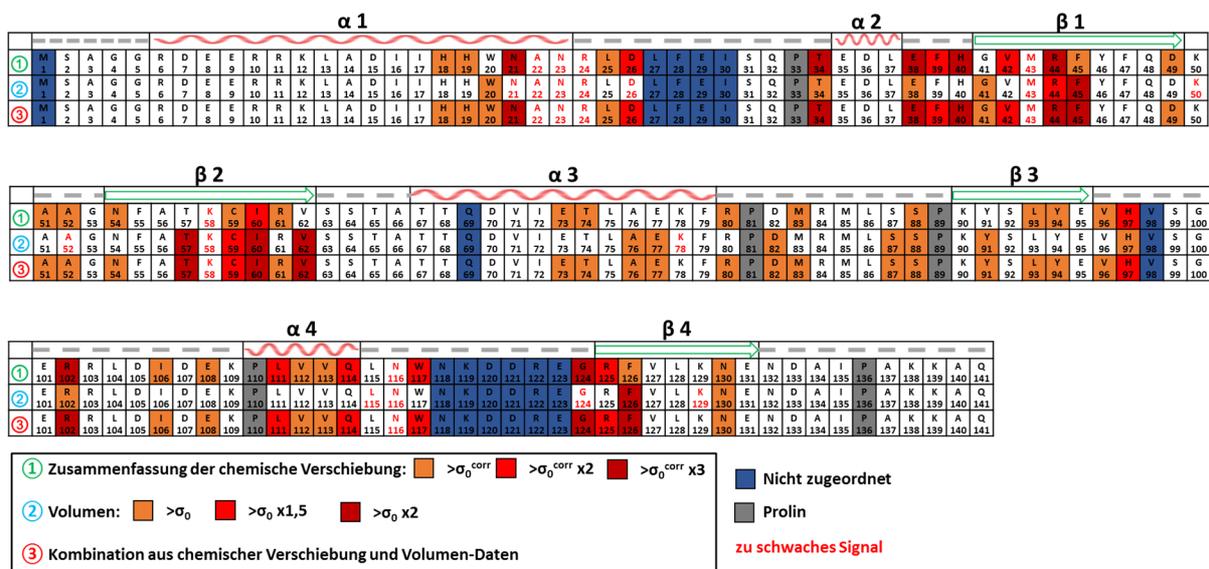


Abbildung 4-87: Kombination aus chemischer Verschiebung und Volumenänderung der Interaktion des AF6 mit ZO1-PDZ2 übertragen auf die Primärsequenz des AF6

Dargestellt sind die Ergebnisse der Auswertung der kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{combined}$) ①, sowie die Auswertung der Volumenänderungen ②. Farblich markierte Aminosäuren sind gemäß der Kriterien signifikant, weiße Aminosäuren zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Eine Zusammenfassung der Effekte ③ erfolgt erneut durch Auswahl des jeweils stärksten Effekts der verschiedenen chemischen Verschiebungen ① und der Volumenänderung ② (Abb. 4-87). Das dient dazu, wie auch in den Analysen zuvor, die Interaktion so detailliert wie möglich zu charakterisieren. Die anschließende Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche geschieht im Folgenden wieder über die Filterkriterien der Oberflächenzugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren und ihre relativen Signalintensitäten (siehe Kapitel 4.3.1.7).

4.4.1.3 Eingrenzung der Interaktionsfläche des AF6 mit der ZO1-PDZ2 Domäne

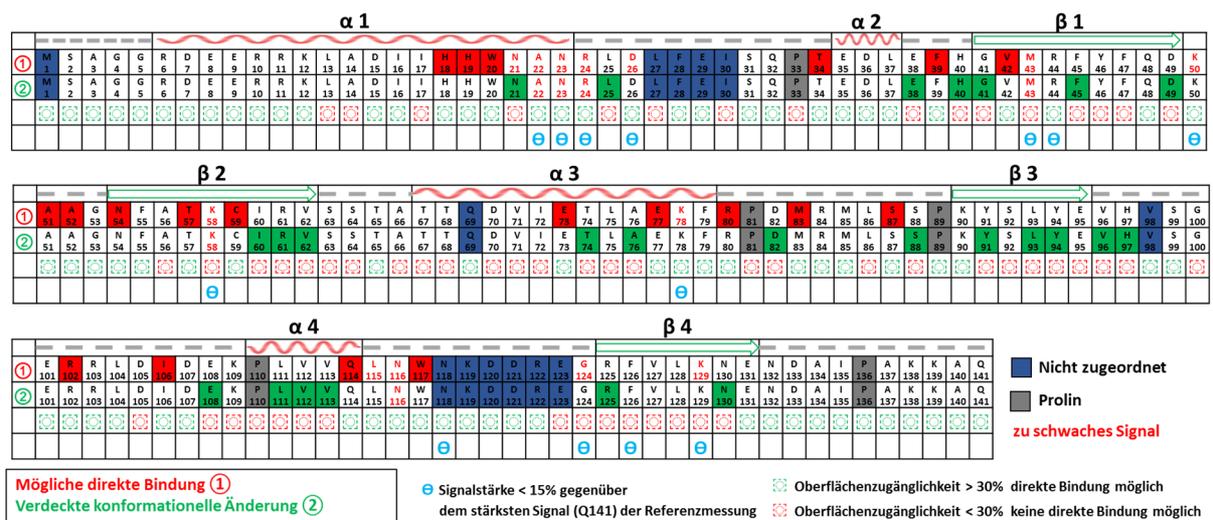


Abbildung 4-88: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche der AF6 mit ZO1-PDZ2 Interaktion anhand des Kriteriums der Oberflächenzugänglichkeit und der relativen Signalstärke

In rot sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die auf Grund ihrer Oberflächenzugänglichkeit und ihrer signifikanten Effekte während der Komplexbildung direkt an einer Bindung beteiligt sein können. In grün sind die Aminosäuren des AF6 dargestellt, die ebenfalls signifikante Effekte durch die Komplexbildung zeigen, aber durch ihre Abschottung eher intramolekularen Prozessen zuzuschreiben sind. Zu schwache Signale, die teils massive Effekte vortäuschen können sind durch das Kriterium der Signalstärke eliminiert.

Das Filtern der Interaktionseffekte mittels der Kriterien der Oberflächenzugänglichkeit (☒) und der relativen Signalstärke (Θ) lässt erneut die aktive Interaktionsfläche des AF6 eingrenzen und zusätzliche die konformationellen Veränderungen des Proteins zusammenfassen (Abb. 4-88). Durch die Übertragung der Ergebnisse auf die 3D-Struktur des AF6 („AF6(1-141)“ PDB-File) lassen sich im letzten Schritt die zusammenhängenden Bindebereiche auf dem AF6 erkennen (Abb. 4-89).

4.4.2 HSQC-Messungen des AF6 mit ZO1-MUT2 im molaren Verhältnis von 1:1,5

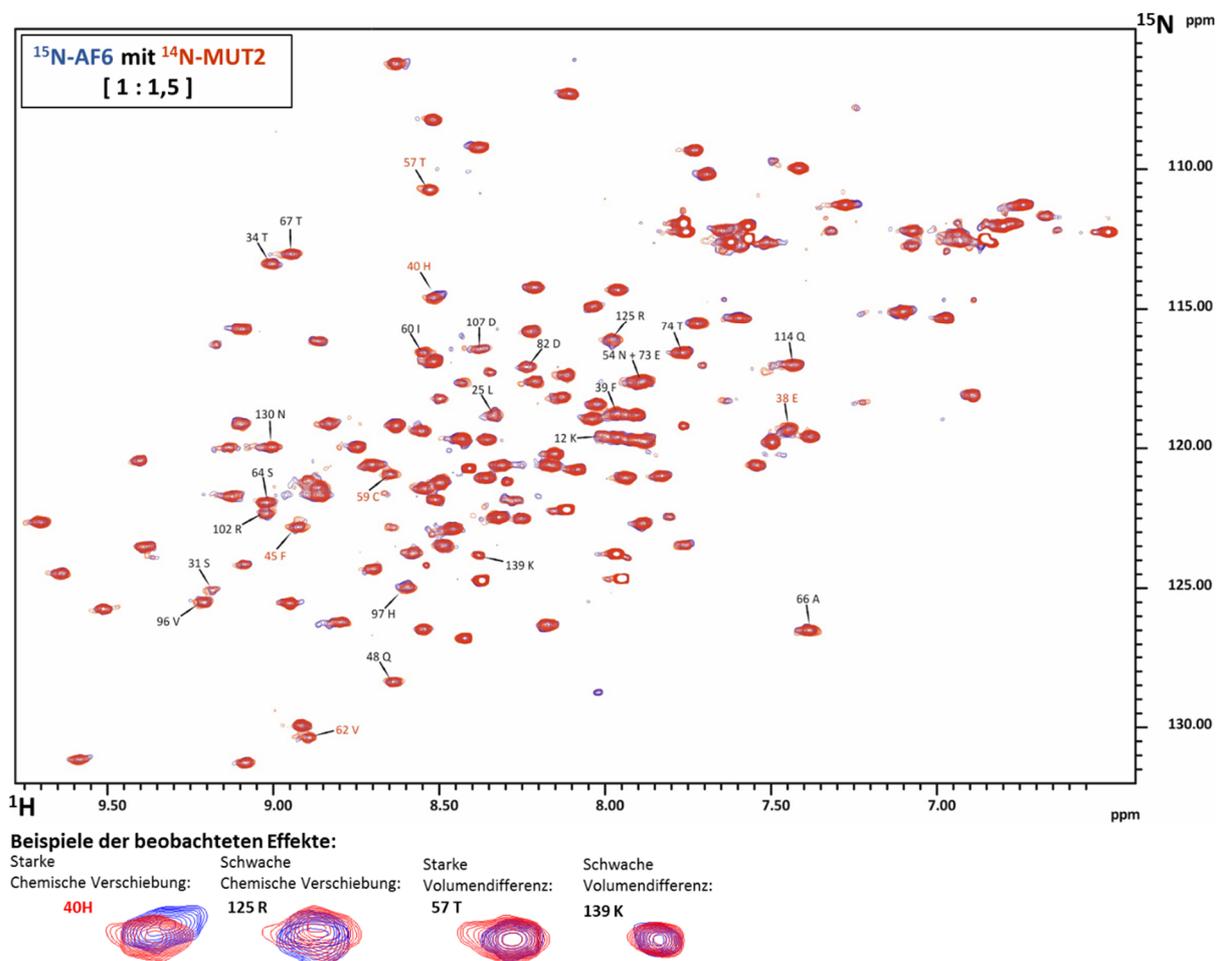


Abbildung 4-90: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -MUT2 im Verhältnis (1:1,5)

Das Referenzspektrum des freien AF6 ist blau, das des Komplexes mit MUT2 (1: 1,5) ist rot. Zusätzlich sind unterhalb des Spektrums Beispiele für die beobachteten Effekte hervorgehoben. **Proteine:** 200 μM ^{15}N -AF6 mit 300 μM ^{14}N -MUT2 vereint. **Puffer:** 20 mM PIPES / 100 mM KCl / 2 mM MgCl_2 / 0,1 mM NaN_3 / 2 mM DTE / 0,1 mM AEBSF / pH = 6,9. **Messbedingungen:** 50 μM DSS interner Standard / 5% D_2O / 298 K / 800 MHz Bruker Spektrometer / HSQC-Spektrum. **AcquPars:** TD(F2) 2048 x 256 TD(F1) / DS 16 / NS 16. **ProcPars:** (F2)8192 x (F1)4096 / WDW = GM mit LB[Hz]: F2(-6) und F1(-8) sowie GB: F2(0.12) und F1(0.1).

Eine rein visuelle Auswertung auch dieser Spektren (Abb. 4-90) der AF6 mit ZO1-MUT2-Interaktion zeigt ähnlich schwache Effekte wie bei den Interaktionsmessungen des AF6 mit ZO1-PDZ2 beobachtet werden konnten. Eine Auswertung der Daten erfolgte identisch der Vorgehensweise der AF6 mit ZO1-PDZ2 Interaktionsanalyse.

4.4.2.1 Auswertung der chemischen Verschiebungen und der Volumenänderung der HSQC-Messung des AF6 mit ZO1-MUT2 im molaren Verhältnis 1:1,5 (200 μ M : 300 μ M)

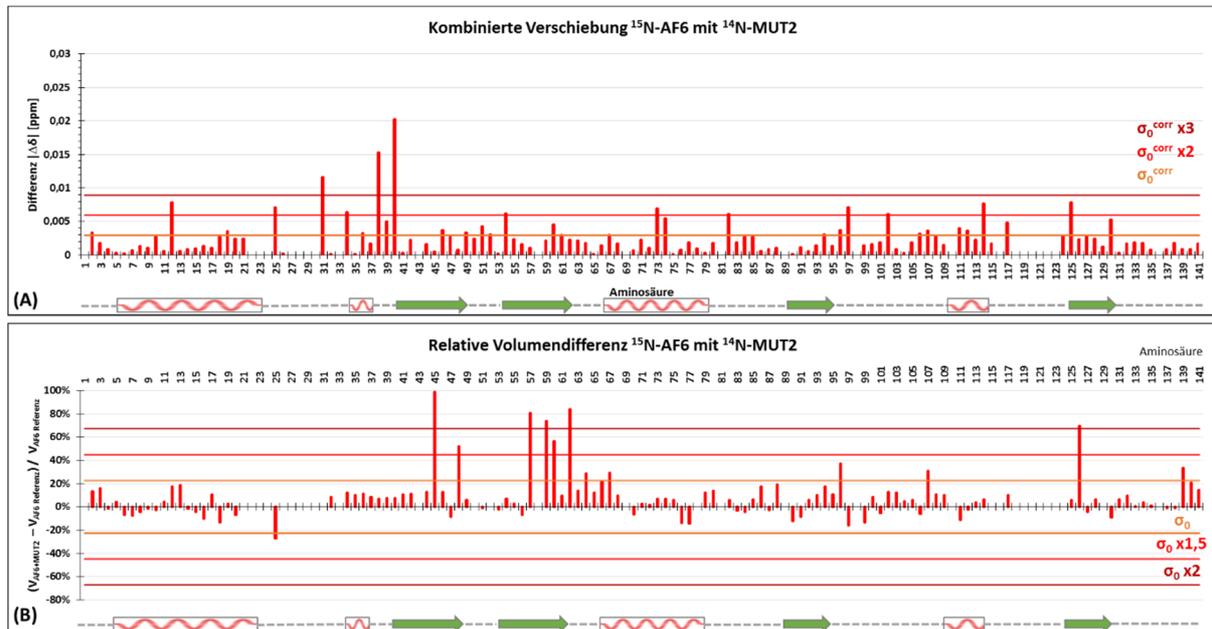


Abbildung 4-91: Kombinierte chemische Verschiebungseffekte (A) und Volumenänderungen (B) der AF6-MUT22 Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum

In (A) sind die Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderung und in (B) die Effekte der Volumenänderung der AF6-Signale durch Komplexbildung mit ZO1-MUT2 im molaren Verhältnis 1:1,5 dargestellt. Die Signifikanzlevels σ_0^{corr} (A) und σ_0 (B) sind markiert.

In Abbildung 4-91 (A) ist der Betrag der relativen Signaldifferenz des Komplexes aus 200 μ M AF6 mit 300 μ M ZO1-MUT2 in Bezug auf die Signale des freien AF6 200 μ M Referenzspektrums ($|\Delta\delta| = \delta_{\text{AF6+MUT2}} - \delta_{\text{AF6 Referenz}}$) dargestellt. Zu erkennen sind die Stärke der chemischen Verschiebungseffekte jeder einzelnen Aminosäure (Position 1-141) des AF6-Konstruktes mit der darunter abgebildeten Sekundärstruktur. Lücken im Diagramm sind auf fehlende Zuordnung des Signals, oder auf ein Verschwinden des Signals durch die Komplexbildung zurückzuführen. Alle Aminosäuren die einen Effekt stärker als σ_0^{corr} aufweisen werden als signifikant eingestuft und werden in den nachfolgenden Analysen weiter untersucht. Zusätzlich sind in Abbildung 4-91 (B) die relativ zum Referenzspektrum auftretenden Veränderungen der Signalvolumina $[(V_{\text{AF6+MUT2}} - V_{\text{AF6 Referenz}}) / V_{\text{AF6 Referenz}}]$ jeder einzelnen Aminosäure des AF6-Konstruktes durch die Komplexbildung mit 300 μ M ZO1-MUT2 dargestellt. Hierbei diene ebenfalls die einfache Standardabweichung σ_0 als Signifikanzkriterium. Langsame Austauschprozesse wie im Fall des AF6-Rap1A[GTP]-Komplexes konnten auch bei diesen Messungen nicht beobachtet werden.

4.4.2.2 Kombination der chemischen Verschiebungs- sowie Volumen Effekte der AF6 mit ZO1-MUT2 Interaktionsmessung

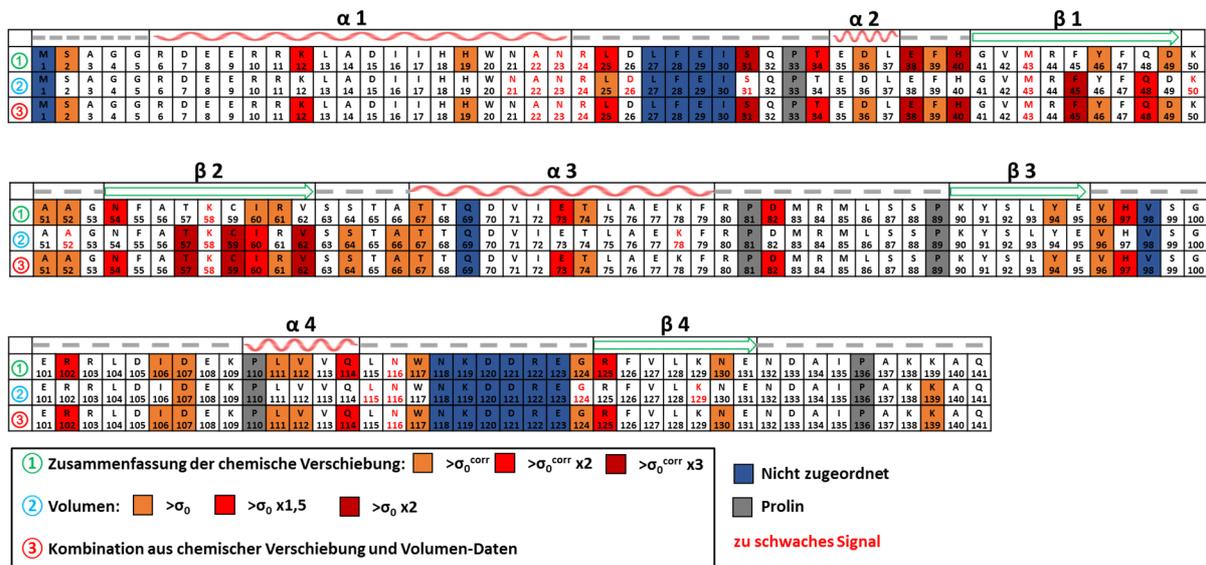


Abbildung 4-92: Kombination aus chemischer Verschiebung und Volumenänderung der Interaktion des AF6 mit ZO1-MUT2 übertragen auf die Primärsequenz des AF6

Dargestellt sind die Ergebnisse der Auswertung der kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{combined}$) ①, sowie die Auswertung der Volumenänderungen ②. Farblich markierte Aminosäuren sind gemäß der Kriterien signifikant, weiße Aminosäuren zeigen keine signifikanten Veränderungen.

Eine Zusammenfassung der Effekte (③) erfolgt erneut durch Auswahl des jeweils stärksten Effekts der verschiedenen chemischen Verschiebungen (①) und der Volumenänderung (②) (Abb. 4-92). Die anschließende Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche geschieht im Folgenden wieder über die Filterkriterien der Oberflächenzugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren und ihre relativen Signalintensitäten (siehe Kapitel 4.3.1.7).

4.4.2.3 Eingrenzung der Interaktionsfläche des AF6 mit dem monomeren MUT2-Konstrukt

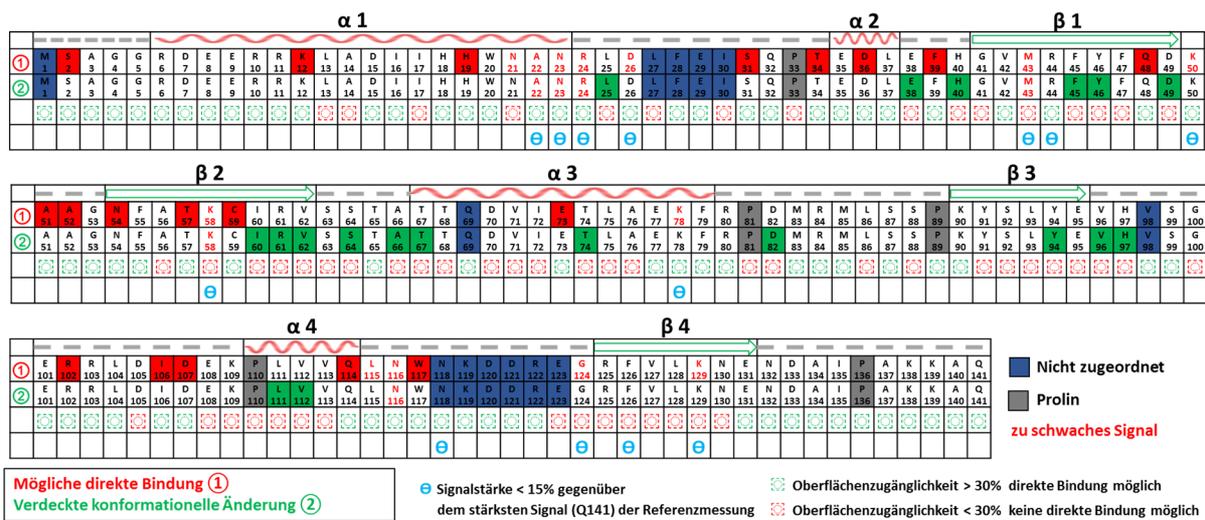


Abbildung 4-93: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche des AF6 durch MUT2-Interaktion

In rot sind die Aminosäuren des ¹⁵N-AF6 dargestellt, die auf Grund ihrer Oberflächenzugänglichkeit und ihrer signifikanten Effekte während der Komplexbildung direkt an einer Bindung beteiligt sein können. In grün sind die Aminosäuren des ¹⁵N-AF6 dargestellt, die ebenfalls signifikante Effekte durch die Komplexbildung zeigen, aber durch ihre Abschottung eher intramolekularen Prozessen zuzuschreiben sind. Zu schwache Signale, die teils massive Effekte vortäuschen können sind durch das Kriterium der Signalstärke eliminiert.

Das Filtern der Interaktionseffekte durch die Kriterien der Oberflächenzugänglichkeit (☒) und der relativen Signalstärke (Θ) ermöglicht es auch in diesem Fall, die aktive Interaktionsfläche des AF6 einzugrenzen und zusätzliche konformationellen Veränderungen des Proteins zusammenzufassen (Abb. 4-93). Durch die Übertragung der Ergebnisse auf die 3D-Struktur des AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“) lassen sich im letzten Schritt die eventuell zusammenhängenden Bindebereiche auf dem AF6 erkennen (Abb. 4-94).

4.4.2.4 Übertragung der Ergebnisse der AF6 mit ZO1-MUT2 Interaktionsmessung auf die 3D-Struktur des AF6

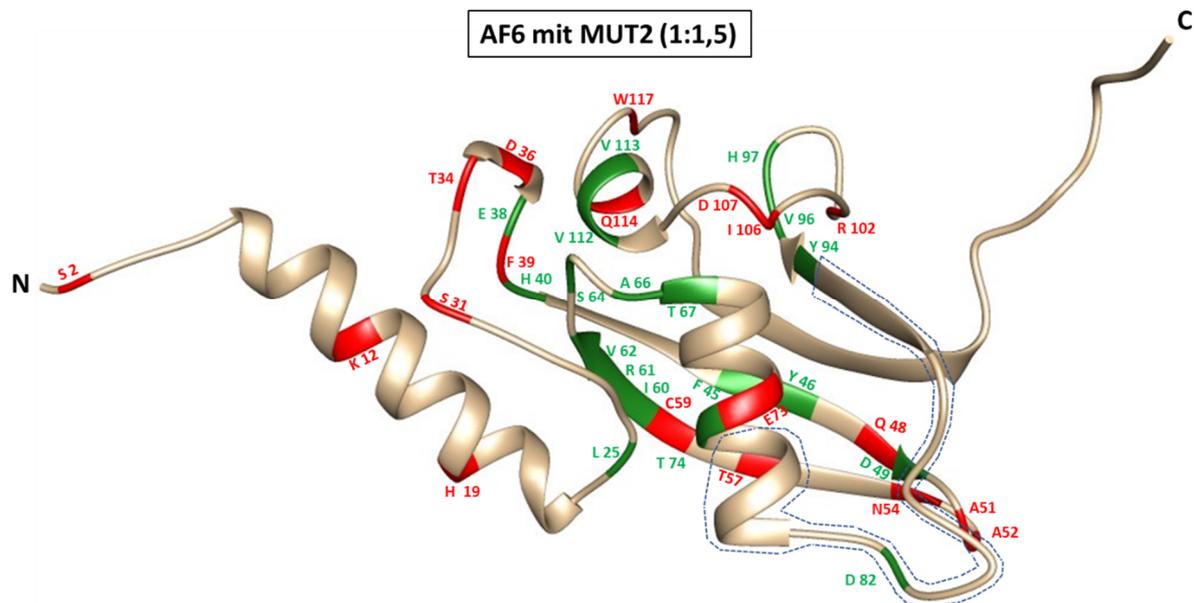


Abbildung 4-94: Übertragung der Interaktionsauswertung auf die 3D-Struktur des AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“)

Dargestellt ist die Interaktion von Seiten des ^{15}N -AF6 (200 μM) mit ^{14}N -ZO1-MUT2 (300 μM). Die beteiligten Aminosäuren die signifikante Effekte zeigen sind farblich markiert. In rot mit einer Oberflächenzugänglichkeit > 30%, in grün < 30%. Der gravierende Unterschied zur AF6-ZO1-PDZ2 Interaktion ist in blau hervorgehoben.

In Abbildung 4-94 zeigt sich, abgesehen von Bereichen im β 2-Faltblatt des AF6, keine Interaktion des MUT2-Konstruktes mit dem kanonischen Bindebereich des AF6. Auch die α 1-Helix oder der C-terminale Anteil des AF6 scheinen nicht gebunden zu werden. Auffälliger Unterschied zu der AF6-PDZ2 Interaktion ist auch der Bereich zwischen den Aminosäuren A76 und Y94, der bei der Wildtyp PDZ2-Domäne eine Bindung an AF6 zeigt. Somit scheint das MUT2-Konstrukt keine relevante Bindung an AF6 zu offenbaren.

Anhand der durchgeführten Interaktionsmessungen zwischen AF6 und den ausgewählten ZO1-Konstrukten PDZ2 und MUT2, konnten neue Erkenntnisse über die Interaktion zwischen Afadin 6 und Zonula occludens 1 gewonnen werden. Eine Untersuchung der Interaktion von Seiten der Zonula occludens Konstrukte, sowie eine Einfluss ihrer Phosphorylierungsmutanten konnte zeitlich nicht mehr durchgeführt werden. Eine Auswertung und Interpretation der gesammelten Daten erfolgt im Diskussionsteil Kapitel 5.4.

5. Diskussion

5.1 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der Konstrukte

5.1.1 Die Konstrukte des Afadin 6

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Ras-Assoziationsdomäne 1 des Afadin 6 Proteins, die bereits 1999 von Thomas Linnemann charakterisiert und als minimales AF6(1-141) Konstrukt definiert wurde. Die 3D-Struktur dieser Domäne konnte in den darauffolgenden Arbeiten von Guido Steiner und Ralph Elsner gelöst und verfeinert werden [Steiner, 2001 / Elsner, 2006] und zeigt ein Ubiquitin-Faltungsmotiv. Ubiquitin ist ein hoch konserviertes Protein, bestehend aus 78 Aminosäuren, welches in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Die kovalente Kopplung von Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnlichen Proteinen an ausgewählte Proteine führt zu einer Degradation dieser über das 26 S-Proteasom. Durch die Evolution kam es zu einer Kopplung dieser Ubiquitin-ähnlichen Domäne mit anderen Genen oder Genabschnitten, was zu einer Auffächerung und Spezialisierung dieser Bereiche hinsichtlich ihrer zellulären Funktionen mit sich brachte [Kiel, 2006]. Im Laufe der fortschreitenden Aufklärung von Proteinstrukturen und ihrer konservierten Bereiche konnten proteinübergreifende Faltungsmotive erkannt und klassifiziert werden [Thornton, 1999]. In der stetig wachsenden Anzahl von Proteinstrukturen lassen sich auf Grund ihrer dreidimensionalen Faltung ca. ein Drittel der Proteine in 10 sogenannte *Superfold*-Klassen (übergeordnete Faltungsmotive) unterteilen. Hierzu gehören *globin*, *updown*, *trefoil*, *Tim-barrel*, *OB-roll*, *double wound*, *immunoglobulin*, *Ubiquitin-roll*, *jelly-roll* und *plaitfold*, die sich meist aus α - und β -Haarnadelstrukturen, sowie $\beta\alpha\beta$ -Strukturen zusammensetzen. Die sequenziellen Übereinstimmungen der unterschiedlichen Proteine dieser Klassen sind meist nur sehr gering, wenn überhaupt vorhanden. Daher bietet sich hier die strukturelle Information als Charakteristikum an. Anhand der übereinstimmenden Sequenzen, konnte für die Ubiquitin-Faltung eine Klassifizierung in 5 unterschiedliche Unterfamilien durchgeführt werden [Kiel, 2004/2005/2006]. Die RA-Familie (*Ras association domain*), RBD-Familie (*Ras binding domain*) und die PI3K-RBD Familie sind dafür bekannt mit aktiven, GTP-beladenen, Ras-Proteinen zu interagieren. Des Weiteren gibt es noch die UBQ-Familie, welche homolog zu Ubiquitin ist und die B41-Familie, die zum Beispiel in der JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade von Bedeutung ist. Die Topologie der 5 Unterfamilien ist hierbei identisch und weist ein $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Ubiquitin-Faltungsmotiv auf (Abb. 5-1 und 5-2).

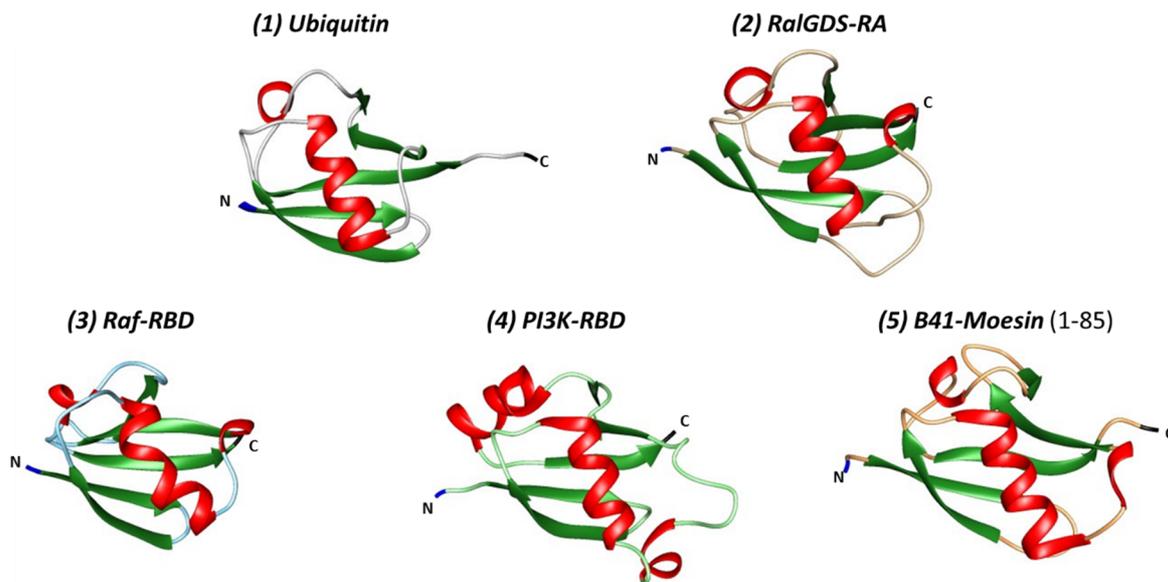


Abbildung 5-1: 3D-Strukturen der 5 verschiedenen Unterfamilien des „Ubiquitin-Superfold“

Dargestellt ist je ein Vertreter der 5 unterschiedlichen Ubiquitin-Unterfamilien (zugehörige PDB-files in Klammern): **(1) UBQ-Familie** mit Ubiquitin („1UBQ“), **(2) RA-Familie** mit RalGDS („1LFD“), **(3) RBD-Familie** mit c-RAF1 („1GUA“), **(4) PI3K-RBD-Familie** mit PI3K („1HE8“) und **(5) B41-Familie** mit der ersten Domäne (Aminosäure 1-81) von Moesin („1EW5“), nach [Kiel, 2006].

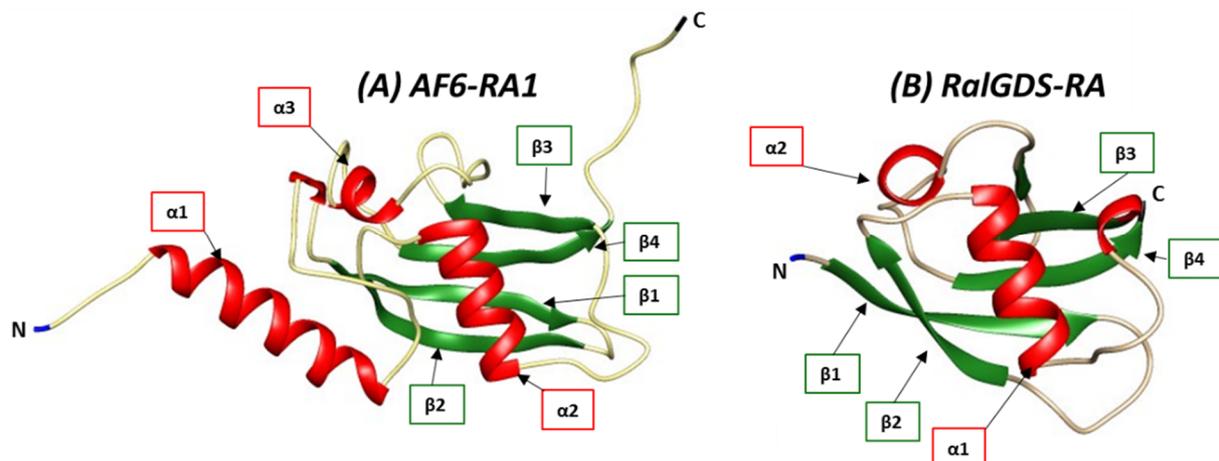


Abbildung 5-2: Direkter Vergleich der Ras-assoziierenden-Domänen. (A) AF6-RA1 („AF6(1-141)“) und (B) RalGDS („1LFD“)

Ein Hauptmerkmal der Ras-Assoziationsdomäne 1 des Afadin 6 (RA1) ist die N-terminale α 1-Helix, die für die Funktionalität der Domäne als essentiell bestimmt wurde [Linnemann, 1999]. Diese ist bei den anderen Familien oder auch innerhalb der RA-Familie bei keiner anderen Domäne vorhanden. Die Expression und Aufreinigung dieses Konstruktes konnte so weit optimiert werden, dass bereits eine 1 l -Expressionskultur ausreichend ist, um millimolare Konzentrationen an aufgereinigtem AF6 herzustellen und ist so optimal für Proteinmengen im NMR-Maßstab geeignet (Kapitel 4.1.1.1). Zusätzlich konnte das Phänomen der proteolytischen Fragmentierung des Konstruktes charakterisiert und weitestgehend inhibiert werden

(Kapitel 4.1.1.2). Eine weitere interessante Beobachtung ist die Dimerisierung der AF6-RA1-Domäne, die in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen dimerer und monomerer Konformation, wobei das Gleichgewicht auf Seiten des Monomers zu liegen scheint (Kapitel 4.1.1.3). Diese Dimerisierung ist auch über einen längeren Zeitraum stabil und bindungsaktiv. Es konnte gezeigt werden, dass die dimere Konformation H-Ras[GTP] binden kann (Abb. 4-7), nach intrinsischer Inaktivierung durch Hydrolyse des GTPs zu GDP, diese dimere Konformation aber nicht mehr nachweisbar ist. Diese Dimerisierung scheint in diesem Fall konzentrationsbedingt zu sein, hat aber wohl auf zellulärer Ebene auch eine regulatorische Funktion inne, die im Bezug zur Interaktion des AF6 mit kleinen GTPasen diskutiert wird [Manara, 2014]. Die Arbeitsgruppe um Elena Manara konnte im Juli 2014 zeigen, dass die onkogene MLL-AF6 Chimäre (Kapitel 1.6) dazu führt, dass AF6 durch Dimerisierung via RA1-Domäne mit MLL-AF6 fusioniert und so durch die Eigenschaften des MLL in den Zellkern lokalisiert wird. Das wiederum führt zu einer Konzentrationsabnahme des AF6 im Zytoplasma, zu einer Verminderung der Regulation kleiner GTPasen durch AF6 und infolgedessen zu einem Anstieg der Ras-Aktivität. AF6 selbst trägt, im Gegensatz zur DOT1L-Histon-Methyltransferase-Aktivität des MLL, kein direktes onkogenes Potential. Durch die verminderte Regulation der kleinen GTPasen im Zytoplasma, kann sich aber sekundär das massive onkogene Potential von überaktiviertem Ras entfalten [Kim, 2009]. Im Jahr 2010 konnte die Arbeitsgruppe um Ooshio durch Co-Immunopräzipitations-Experimente nachweisen, dass die prolinreichen Regionen des ZO1 C-Terminus mit der SH3-Domäne des AF6 interagieren. Diese Beobachtung machten auch Yamamoto *et al.* bereits 1997 durch ihre Pulldown-Analysen, erachteten aber die Interaktion des N-terminalen Anteils des ZO1 mit dem N-terminalen Anteil des AF6 als die stärkere der beiden Interaktionen. Die Expression und Aufreinigung der prolinreichen Regionen I und II des ZO1 und der SH3-Domäne des AF6 im Zuge dieser Arbeit, zeigte leider, dass diese unlöslich von *E. coli* in *Inclusion bodies* verpackt werden und auch nach sorgfältiger Rückfaltung keine „korrekte“ Faltung aufweisen. NMR-Interaktionstests waren daher mit diesen Konstrukten leider nicht möglich.

5.1.2 Die Konstrukte des Zonula occludens 1

Gerald Bäumel konnte in seiner Dissertation im Jahre 2008 die Interaktionsfläche des Afadin 6 mit Zonula occludens 1 auf den Bereich zwischen den Aminosäuren 186 und 421 des ZO1-Proteins eingrenzen. Dieser Bereich deckt die zweite PDZ-Domäne und den Linkerbereich zur dritten PDZ-Domäne ab. Im Zuge dieser Arbeit konnten diverse Konstrukte dieses Bereichs kloniert und in ihrer Expression und Aufreinigung erfolgreich für den NMR-Maßstab optimiert werden (Tab. 4-1). Das Augenmerk lag hierbei vor allem auf der PDZ2-Domäne, da diese einen klassischen Vertreter einer Protein-Protein-Interaktionsdomäne darstellt. 2008 konnte die Arbeitsgruppe um Jia Chen diese Domäne näher charakterisieren und zeigen, dass die PDZ2-Domäne über eine *domain-swapped*-Faltung homodimerisiert und somit erst eine spezifische Bindeposition für Connexin 43 schafft. Zusätzlich konnten sie die 3D-Struktur dieses Homodimeres lösen und durch Insertion eines GGGA-Motives in das β 2-Faltblatt eine stabile monomere Version erzeugen. Diese künstlich erzeugte Monomerisierung konnte durch die beiden in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte „PDZ2“ und „MUT2“ genauer analysiert und validiert werden (Kapitel 4.1.2). Hierbei war es notwendig die Signale der HSQC-Spektren dieser beiden Konstrukte durch sequentielle Zuordnung mit Hilfe von Prof. Caludia Munte exakt zu bestimmen (Kapitel 4.2.2, Tab. 4-5). Anhand der CA-, CB-, HN- und N-chemischen Verschiebungen der beiden Konstrukte, konnte der Effekt der GGGA-Insertion in das β 2-Faltblatt auf die Faltung der Sekundärstruktur vorhergesagt werden (Abb. 4-34). Infolgedessen erfährt das E238 eine gravierende Änderung seiner Konformation und könnte so für nachfolgende Experimente als Signal einer Monomerisierung der PDZ2-Domäne unter nativen Bedingungen fungieren (Abb. 4-36 und 4-37). Eine Monomerisierung der PDZ2-Domäne war nur durch das künstlich erzeugte MUT2-Konstrukt erfolgreich, da sämtliche Versuche über Rückfaltungsexperimente, Variationen des pH-Bereichs oder der Ionenstärke der Puffer ein Monomer der PDZ2-Domäne zu erzeugen, scheiterten (Kapitel 4.1.2). Neben der Vorhersage der Sekundärstruktur konnte auch über eine Analyse der Linienbreiten (Tab. 4-6) und über analytische Größenausschlusschromatographie (Kapitel 4.1.2.2) die monomere Konformation des MUT2-Konstruktes bestätigt werden. Zusätzlich zeigte sich im Falle der PDZ2-Domäne, bzw. der auf ihr basierenden Konstrukte, dass während der Aufreinigung, durch den Wechsel des Puffersystems hin zu PIPES-Puffer, starke Signale im niedermolekularen Bereich auftreten (Abb. 4-14). Diese kommen bei identischer Aufreinigung des AF6 Konstruktes nicht vor und wurden negativ auf un-

gewollte Pufferartefakte hin getestet. Phosphor-NMR-Experimente (nicht gezeigt) konnten lediglich die Präsenz von Phosphor in diesen Fraktionen zeigen, eine Bestimmung dieser Verbindungen war aber leider nicht möglich. Bekannt ist allerdings, dass die PDZ-Domänen im Allgemeinen eine niedrige und in speziellen Fällen, wie bei Syntenin 1 der Fall, eine hohe Affinität gegenüber Phosphoinositolen wie PIP₂ aufweisen [Zimmermann, 2006] und diese beobachteten Signale auf Grund einer Verdrängung dieser Phosphorverbindungen durch den Pufferwechsel zustande kommen könnten. Diese Beobachtung könnte Einfluss auf die Interaktion der ZO1-PDZ Konstrukte mit den in dieser Arbeit getesteten Proteinen haben. Zum einen inhibierend durch die Blockierung der möglichen Bindestelle, zum anderen auch förderlich durch eine indirekte, gekoppelte Bindung über diese Phosphorverbindungen. Die Untersuchung der Primärsequenz des ZO1-PDZ2-Konstruktes mit den Programmen NetPhos2.0 und GPS 2.1.2 offenbarte 7 mögliche signifikante Phosphorylierungspositionen (T188, S192, Y198, S204, T243, T247 und S252) innerhalb der Domäne (Kapitel 4.1.2.3). Diese wurden im Laufe dieser Arbeit mittels gerichteter Punktmutation in ein Glutamat umgewandelt (Abb. 4-15 / Tab. 4-2). Diese Vorgehensweise ermöglichte es, eine Phosphorylierung an der gewollten Position zu simulieren. Die Expression und Aufreinigung konnte ähnlich der Ausgangs-Konstrukte PDZ2/MUT2 durchgeführt werden (Abb. 4-17) und zeigte ebenfalls das Auftreten der zuvor beschriebenen „Phosphor“-Signale (Abb. 4-18). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Phosphorylierungsmutationen keine nachweisbaren Änderungen des dimeren oder monomeren Zustands der Konstrukte bewirkt wurden (Kapitel 4.1.2.4).

5.1.3 Die kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras

Die Herstellung der kleinen GTPase H-Ras wurde im Zuge des Großpraktikums von unserer technischen Angestellten Sabine Ruppel in großem Maßstab durchgeführt (Kapitel 4.1.3.1). Die Expression und Aufreinigung der kleinen GTPase Rap1A erwies sich im Vergleich aber als etwas aufwendiger als die Konstrukte des ZO1, des AF6 und des H-Ras. Ein Transfer des gewünschten Konstrukts in diverse alternative Expressionsplasmide, sowie eine Optimierung der Expression durch die Verwendung unterschiedlicher Expressionsstämme zeigte leider nicht den gewünschten Erfolg (Kapitel 4.1.3.1). Daher wurde die bis dato durchgeführte Aufreinigungsmethode (Rap1A ΔC^1-167 / GroEL, CK600K) soweit möglich, erfolgreich optimiert (Kapitel 4.1.3.2). Eine Markierung der GTPase mit ¹⁵N oder ¹³C durch Expression in Minimalmedium war leider auf Grund der schlechten Ausbeute nicht möglich. Im Laufe der Aufreinigung

konnte durch analytische Gelfiltration ein monomeres Laufverhalten der kleinen GTPase Rap1A gezeigt werden (Abb. 4-22). Die natürliche Nukleotidbeladung der kleinen GTPasen wurde direkt nach der Aufreinigung aus *E. coli* bestimmt und zeigte eine ca. 50 : 50 Beladung der GTPase Rap1A mit GTP und GDP, wobei H-Ras nur im GDP-beladenen Zustand vorlag. Im Zuge dessen konnte die Beladung der GTPasen mit den gewünschten Nukleotiden durch einen optimierten Austausch effektiv bei Rap1A[GTP] bis zu 83%, bei H-Ras[GTP] bis zu 78%, durchgeführt werden (Kapitel 4.1.3.3).

5.2 Pulldown-Analysen der Interaktionen zwischen AF6 mit ZO1, Rap1A und H-Ras

Ein klassischer Ansatz eine Protein-Protein-Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen, AF6, ZO1, Rap1A und H-Ras zu zeigen, stellt das Pulldown-Experiment dar. Hierbei wird das zu untersuchende *Bait*-Protein an eine Matrix lokalisiert und der mögliche *Prey*-Bindepartner eine gewisse Zeit auf dieser Matrix inkubiert wird. Befindet sich der mögliche Bindepartner anschließend in der Waschfraktion, so kann eine Interaktion ausgeschlossen werden. Kann das *Prey*-Protein jedoch in der Eluatfraktion nachgewiesen werden, so ist dies ein Nachweis für eine direkte Interaktion der beiden Proteine. Ein Vorteil dieser Methode ist es, eine große Anzahl von Proteinen gleichzeitig unter denselben Bedingungen auf eine Interaktion hin zu testen. Um falsch-positive Ergebnisse, so wie zu stringente Parameter zu vermeiden, wurden die Pulldown-Experimente nach aktuellstem Stand [Nature protocol, 2004 / Nature protocol, 2006 / Wissmueller, 2011] und unter schonenden Bedingungen (*Gravity-flow*, etc.) durchgeführt (Kapitel 3.4.2 und 4.1.4). Im Falle der kleinen GTPasen konnte die erwartete Interaktion mit der Ras-Assoziationsdomäne 1 des Afadin 6 unter diversen Beladungszuständen (GTP/GDP/GppNHp) gezeigt werden (Abb. 4-26). Auffällig war hierbei, dass nur ein kleiner Teil der (ca. 1 μ M-Bereich) eingesetzten Proteine miteinander interagierten und der Großteil nicht an das *Bait*-Protein binden konnte. Möglicherweise wird hierbei der Interaktionsbereich des AF6 durch den N-terminal gekoppelten GST-Tag verdeckt. Des Weiteren war erkennbar, dass in den diversen Waschsritten ein kleiner Teil des gekoppelten GST-AF6 ausgewaschen wurde. Eine His₆-basierter Pulldown konnte nachfolgend nicht durchgeführt werden, da das AF6-Konstrukt eine natürliche Affinität an Ni²⁺-NTA aufweist. Diese könnte man sich in Zukunft zu Nutze machen um ein Tag-freies AF6-Konstrukt ohne die Nebeneffekte der proteolytischen Fragmentierung, durch die Serin-Protease Thrombin, herzustellen.

Die Interaktion des Afadin 6 mit dem Protein Zonula occludens 1 wurde, wie bereits erwähnt, 1997 von der Arbeitsgruppe um Yamamoto durch ein Pulldown-Experiment gezeigt. Hierbei interagiert der N-terminale Anteil des AF6 (36-494) mit ZO1 und wurde durch aktives Ras von ZO1 verdrängt. Ebenfalls konnte damals gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen AF6 mit dem N-terminalen Anteil des ZO1 (1-780 / PDZ1 bis GuK) stattfindet. Eine zusätzliche Interaktion des ZO1(1-780) mit dem C-terminalen Bereich von AF6(1130-1612) konnte ebenfalls gezeigt werden, diese war aber um ein deutliches schwächer als die Interaktion mit dem AF6(36-494). Die Arbeitsgruppe um Ooshio zeigte 2010 durch Co-Immunopräzipitations-Experimente, dass die Interaktion des ZO1 über seine SH3-Domäne mit der prolinreichen Region des AF6(1219-1399) stattfindet. Die 2008 von Gerald Bäumel durchgeführten Pulldown-Experimente zwischen AF6-RA1 und den ZO1-Konstrukten des Bereiches ZO1(1-780) konnten jedoch keine Interaktion zwischen AF6 und ZO1 zeigen, offenbarten allerdings durch NMR-Titrationsexperimente eine Interaktion der AF6 RA1-Domäne mit dem ZO1(186-420). Die in dieser Arbeit durchgeführten Pulldown-Experimente des AF6-RA1 mit den ZO1-Konstrukten sollten zum Einen die bis dato gesammelten Erkenntnisse validieren und boten zusätzlich die Möglichkeit, die durch Punktmutation erzeugten Phosphorylierungsmutanten unter den gleichen Bedingungen auf eine Interaktion hin zu testen. Hierbei bestätigte sich, dass sich mittels optimierten Pulldown-Experimenten ebenfalls keine Interaktion zwischen den eingegrenzten Bereichen des ZO1 und der AF6-RA1-Domäne (Kapitel 4.1.4) zeigen lässt. Ebenso konnte kein bindungsrelevantes Muster einer posttranskriptionellen Modifikation des ZO1-PDZ2- und MUT2-Konstruktes durch Phosphorylierung in den Pulldown-Experimenten gezeigt werden. Das wiederum bestätigt die Vermutung, dass die Interaktion des AF6-RA1 mit dem ZO1-PDZ2 Konstrukt nur vorübergehend und wahrscheinlich mit schwacher Affinität stattfindet. Da keine Interaktion gezeigt werden konnte, war es auch nicht möglich, die von Yamamoto beschriebene Verdrängung des ZO1 von AF6 durch H-Ras[GTP], zu validieren. Ein sensitiver Nachweis der möglichen Interaktion mittels Western Blot konnte aus Zeitgründen nur einmalig und in unzureichender Qualität durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt), ließ aber ebenfalls keine Anzeichen einer Interaktion erkennen.

5.3 Die NMR-Analyse der Interaktion des Afadin 6 mit den kleinen GTPasen Rap1A und H-Ras

Um die bereits bekannte Interaktion des Afadin 6 mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A genauer zu charakterisieren und die molekulare Interaktionsfläche der AF6 RA1-Domäne exakt zu definieren, wurden HSQC-Interaktionsexperimente mittels Titration durchgeführt (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2). Zusätzlich wurden die bereits von Guido Steiner 2001 durchgeführten TROSY-Interaktionsexperimente unter heutigen Aspekten neu ausgewertet (Kapitel 4.3.3) und somit für einen Vergleich mit den HSQC-Interaktionsexperimenten zugänglich gemacht. Die strukturellen Veränderungen die durch die Beladung der kleinen GTPase mit GTP einhergehen wird als *loaded spring* (gespannte Feder oder geschlossene Form) Mechanismus der Schalterregionen I und II (*Switch I* und *Switch II*) bezeichnet [Wittinghofer, 2001]. Wird das γ -Phosphat des GTPs hydrolytisch abgespalten, gehen die *Switch I* und *Switch II* Regionen in einen eher ungeordneten Zustand (offene Form) über. Diese Annahme stimmt aber nur für die Arf- und Ran-Unterfamilie der Ras-Familie, die hierbei eine Sonderform darstellen [Vetter, 2014]. Bei der Ras-, Rho- und Rab- Unterfamilie scheinen die Konformationen der *Switch I* und *Switch II* Regionen im Bereich weniger Pikosekunden zu fluktuieren und ist die Affinität des Bindepartners groß genug, zwingt der Effektor auch die Schalterregion (offene Form) der GDP-beladenen GTPase in die geschlossene Form und kann diese binden [Vetter, 2014]. Hierbei gibt es gravierende Unterschiede zwischen den einzelnen GTPasen hinsichtlich einer Beladung mit GTP-Analoga wie GppNHp, die von der GTPase nicht hydrolytisch gespalten werden können und sie somit in ihrer aktiven Konformation halten. So zeigt zum Beispiel Rap1A zu 86%, Ra1A zu 40% und M-Ras sogar nur zu 7% die geschlossene Konformation bei Beladung mit dem Analoga GppNHp [Vetter, 2014]. Aus diesem Grund war es von Bedeutung die Komplexbildung des AF6 mit der GTPase Rap1A unter den natürlichen Rahmenbedingungen der Nukleotidbeladung mit GTP und GDP, zu untersuchen (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2). Hierzu wurden HSQC-Experimente ausgewählt, da diese relativ zu den TROSY-Messungen schneller durchzuführen waren und somit die schwache, aber dennoch aktive intrinsische Hydrolyse Aktivität, vernachlässigt werden konnte. Zusätzlich wurde jedoch das Puffersystem für die Messungen optimiert und verhinderte daher bereits einen absoluten Vergleich mit den vorangegangenen TROSY-Messungen (Kapitel 4.3.3) [Steiner, 2001]. Dennoch lassen sich die Erkenntnisse beider Messreihen untereinander und mit den darauf basierenden Docking-Experimenten von Ralph Elsner vergleichen.

Die Resultate der Interaktionsexperimente des AF6 mit den kleinen GTPasen H-Ras[GppNHp] und Rap1A[GppNHp/GTP/GDP] sind in Abbildung 5-3 dargestellt.

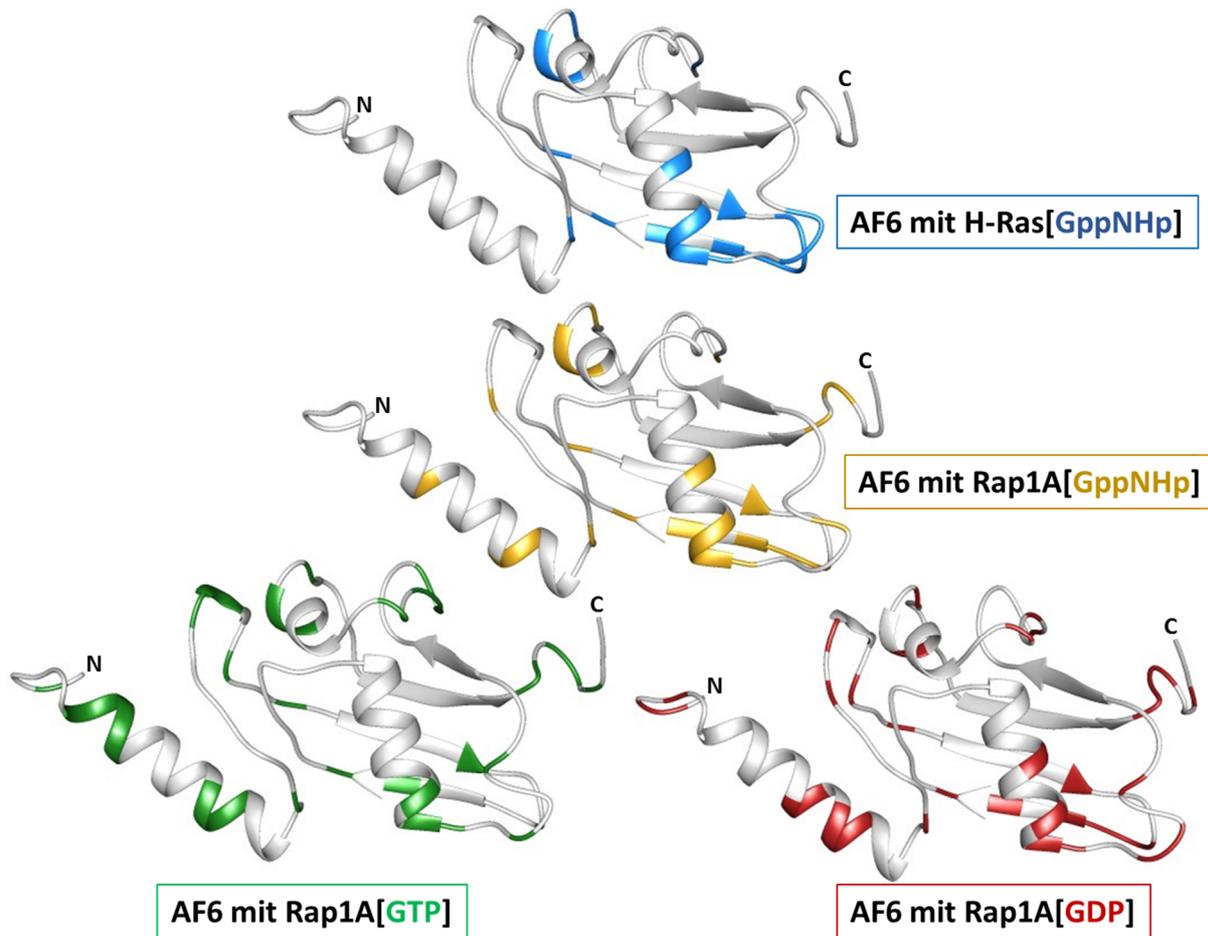


Abbildung 5-3: Resultat der Interaktionsstudien des AF6 mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A, von Seiten des AF6-Konstruktes

Dargestellt ist die AF6 RA1-Domäne (1-141) die von Ralph Elsner 2001 gelöst und durch Guido Steiner 2006 verfeinert wurde (PDB-File „AF6(1-141)“). Farblich hervorgehoben sind die selektierten Aminosäuren des AF6, die signifikante Veränderungen auf Grund einer Komplexbildung zeigen und anhand der Filterkriterien der Oberflächenzugänglichkeit (> 30%) und der relativen Signalintensität für eine direkte Interaktion in Frage kommen. In blau der Komplex mit H-Ras[GppNHp] und in gelb der Komplex mit Rap1A[GppNHp], der neu ausgewerteten TROSY Interaktionsstudien [Steiner, 2001]. Darunter die mit seinen natürlichen Nukleotiden beladen Komplexe des Rap1A. In grün der Komplex mit Rap1A[GTP], in rot der Komplex mit Rap1A[GDP].

Die Kombination der Docking-Experimente [Elsner, 2006] (Kapitel 4.3.4.3), mit den in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsexperimenten zwischen AF6-RA1 und Rap1A[GTP/GDP] (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2), den neu ausgewerteten TROSY-Messungen der AF6 Interaktion mit Rap1A[GppNHp] und H-Ras[GppNHp], sowie dem Vergleich verschiedener kleiner GTPase-Effektor Komplexe (Kapitel 4.3.4), ermöglicht im Folgenden eine sehr detaillierten Analyse und Charakterisierung der Interaktionsfläche der Afadin 6 RA1-Domäne mit den Effektor GTPasen H-Ras und Rap1A (Kapitel 5.3.1 und 5.3.2).

5.3.1 Interaktion der Afadin 6 RA1-Domäne mit H-Ras[GppNHp]

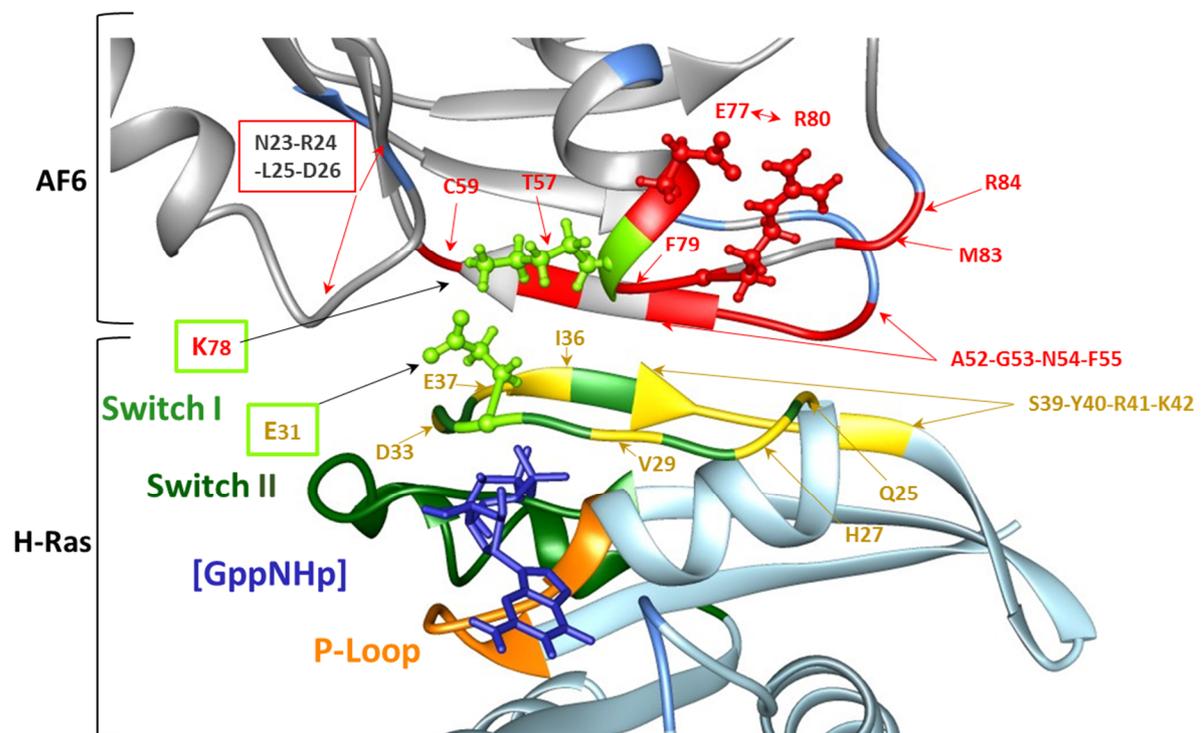


Abbildung 5-4: Darstellung der aktiven Interaktionsfläche der Afadin 6 RA1-Domäne mit H-Ras

In grau ist die AF6 RA1-Domäne dargestellt, die möglichen an einer aktiven Interaktion beteiligten Aminosäuren dieser Domäne in blau und die letztendlich als bindungsaktiv definierten Aminosäuren in rot. Der rote Bereich markiert nicht zugeordnete Aminosäuren. Unterhalb des AF6 befindet sich in hellblau das Ras[GppNHp]-Protein des Dockingkomplexes [Elsner, 2006 / „af6_ras6fit_100.pdb“]. Mögliche aktive Bindepositionen des H-Ras sind in gelb dargestellt, inaktive in dunkelgrün. Die G1, G2 und G3 Regionen sind gemäß dem gebräuchlichen Farbcode hervorgehoben und die essentielle Salzbrücke zwischen AF6-K78 und H-Ras-E31 ist in hellgrün markiert.

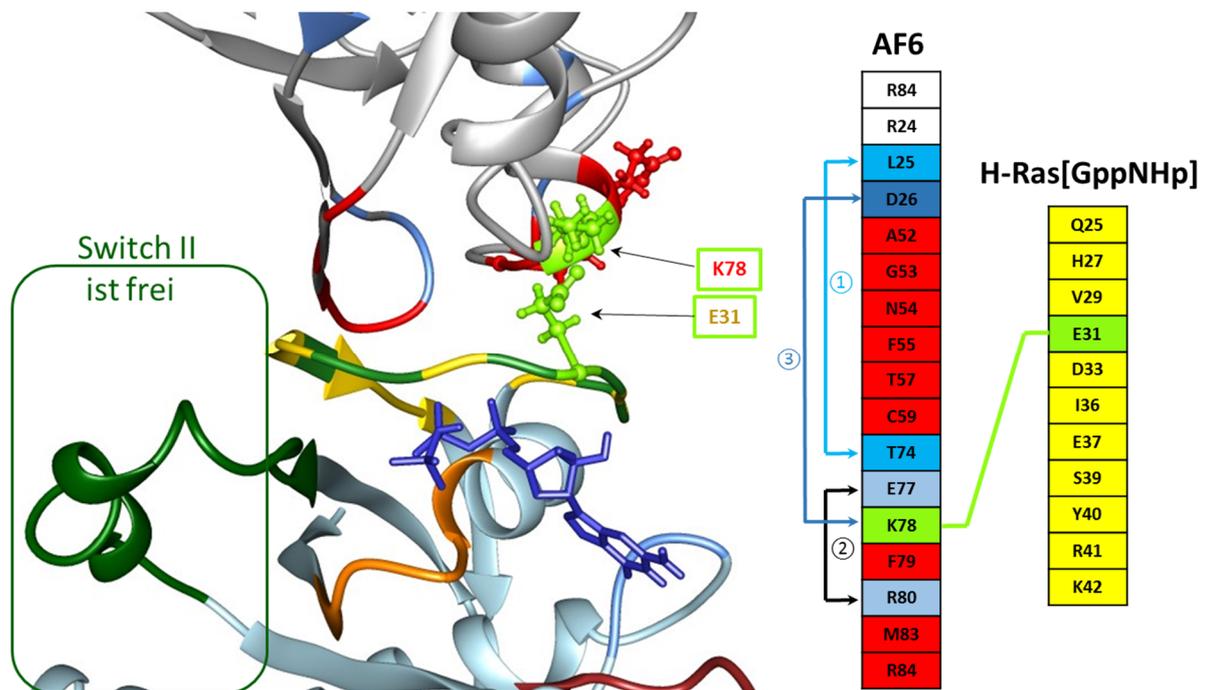


Abbildung 5-5: Übersicht über die Aminosäuren der Interaktionsfläche von AF6 mit H-Ras[GppNHp]

Auf der linken Seite ist die Kontaktfläche zwischen AF6 und H-Ras[GppNHp] dargestellt. Die *Switch II*-Region ist grün hervorgehoben und die charakteristische Salzbrücke zwischen AF6-K78 und H-Ras-E31 ist in hellgrün markiert. Rechts im Bild ist eine Übersicht über die eingegrenzten, direkt an der Bindung beteiligten Aminosäuren dargestellt.

Die Interaktionsfläche des AF6 mit H-Ras ließ sich somit auf die in Abbildung 5-4 und 5-6 dargestellten Aminosäuren eingrenzen. Charakteristisch ist die Salzbrücke des AF6-K78 mit dem H-Ras-E31, die wohl letztendlich ausschlaggebend für die Orientierung des Komplexes zu sein scheint. Intramolekulare Interaktionen (blaue Pfeile ①③) stabilisieren den Komplex, wobei die Interaktion des AF6-E77 mit AF6-R80 (②) das ansonsten für die Interaktion des AF6 mit Rap1A wichtige AF6-E77 aus dieser Interaktionsfläche isoliert. Durch diese Bindung orientiert sich H-Ras wie in Abbildung 5-5 gezeigt, so an AF6, dass die *Switch II* Region nicht an dieser Bindung beteiligt wird. Das ist möglicherweise einer der Gründe, wieso die Affinität des H-Ras mit einem K_d von 4 μM zu AF6 geringer ist, als die des Rap1A mit einem K_d von 0,25 μM [Linne-mann, 1999].

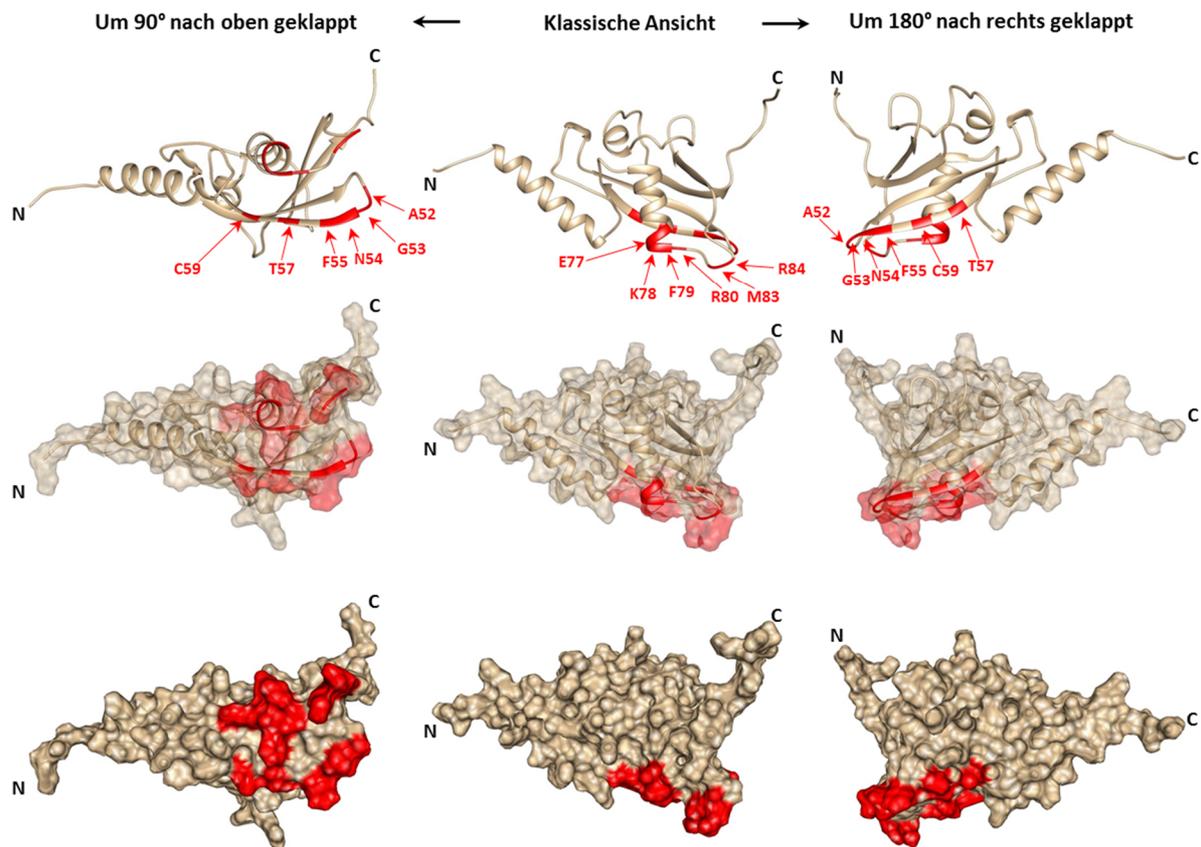


Abbildung 5-6: Übersicht über den Bindebereich des AF6-Konstruktes mit H-Ras[GppNHp]

Dargestellt ist die AF6-RA1-Domäne in unterschiedlicher räumlicher Orientierung. In rot hervorgehoben sind die für die H-Ras-AF6-Komplexbildung als aktiver Bindebereich definierten Aminosäuren des AF6-Konstruktes.

5.3.2 Interaktion der Afadin 6 RA1-Domäne mit Rap1A

Im Folgenden liegt der Fokus auf dem kanonischen Interaktionsbereich des Docking-Experiments „af6_rap_12_8_100.pdb“ [Elsner, 2006]. Allem Anschein nach binden Rap1A[GTP] und Rap1A[GDP] die gleiche Position der AF6 RA1-Domäne, jedoch mit unterschiedlich hoher Affinität [Linnemann, 1999]. Rap1A[GTP] hat hierbei eine starke Affinität mit 0,25 μM im Gegensatz zu Rap1A[GDP], das mit einer Affinität von $> 100 \mu\text{M}$ rund 400-fach schwächer an AF6-RA1 bindet. Die Arbeitsgruppe um Zhang konnte 2014 die Interaktion der kleinen GTPase Rap1A[GTP] mit dem Effektor RIAM genauer charakterisieren und stellte fest, dass eine Salzbrücke des Rap1A, ausgehend von der Aminosäure K31, charakteristisch für die Interaktion des Rap1A mit speziellen Rap1A-Effektoren ist.

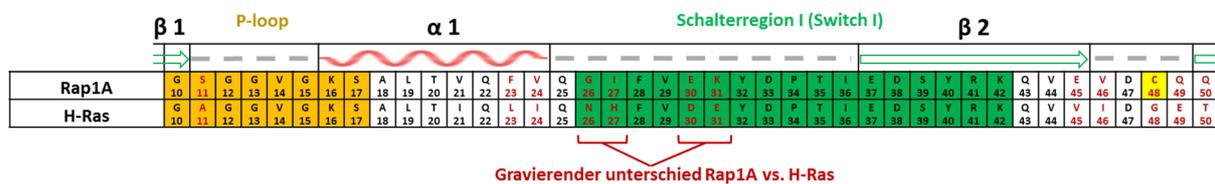


Abbildung 5-7: Charakteristischer Unterschied der Primärsequenzen zwischen den beiden GTPasen Rap1A und H-Ras

Der P-Loop ist in orange, die *Switch I* in grün und die Unterschiede in den Sequenzen sind in rot dargestellt.

Gravierendster Unterschied zwischen H-Ras und Rap1A scheinen die 4 Aminosäuren der *Switch I* Region und hierbei besonders das K31 des Rap1A zu sein (Abb. 5-7) [Zhang, 2014]. Diese Beobachtung ist auch im Fall der Interaktion von AF6-RA1 mit Rap1A der Fall. Auffällig hierbei ist auch die Tatsache, dass AF6-RA1 mit Rap1A mit weitaus höherer Affinität als H-Ras bindet und zusätzlich über das notwendige, konservierte E77 dieser beschriebenen Salzbrücke verfügt. Um die Interaktionsfläche des AF6-RA1 mit Rap1A einzugrenzen, wurden die Ergebnisse der TROSY-Rap1A[GppNHp] und HSQC-Rap1A[GTP]/[GDP] Messungen kombiniert (Abb. 5-8). Die TROSY-Messung mit Rap1A[GppNHp] lieferte hierbei eine detaillierte Einsicht in die Interaktion, da auf Grund dieser Messtechnik weitaus mehr Signale verfolgt werden konnten. Die HSQC-Messung mit Rap1A[GTP] erweitert das Spektrum durch die Analyse der Signale, welche verschwinden und derer, die ein langsames Austauschverhalten zeigen. Zusätzlich zeigt die HSQC-Messung mit Rap1A[GDP] weitaus schwächere Effekte, die auf Grund der internen Referenzierung und Filterung jedoch stärker gewichtet wurden, als es im direkten Ver-

gleich mit der Rap1A[GTP] Messung der Fall gewesen wäre. Daher ist es sinnvoll die Gemeinsamkeiten hervorzuheben und anschließend auftretende Unterschiede zu analysieren. Zwei Übereinstimmungen der drei unterschiedlichen Messungen (Kapitel 4.3.5 und Abb. 5-3) wurden daraufhin als eine allgemeine Übereinstimmung definiert (Abb. 5-8).

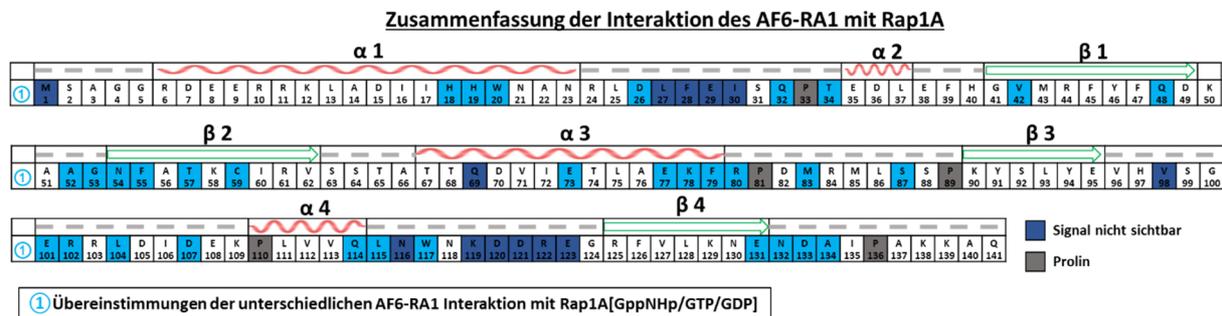


Abbildung 5-8: Übereinstimmungen der Interaktionsflächen des AF6-RA1 mit den drei verschiedenen Rap1A-Komplexen [GppNHp/GTP/GDP].

In hellblau sind die übereinstimmenden Bereiche der drei Komplexe Rap1A[GppNHp/GTP/GDP] mit AF6, auf dessen Primärsequenz hervorgehoben.

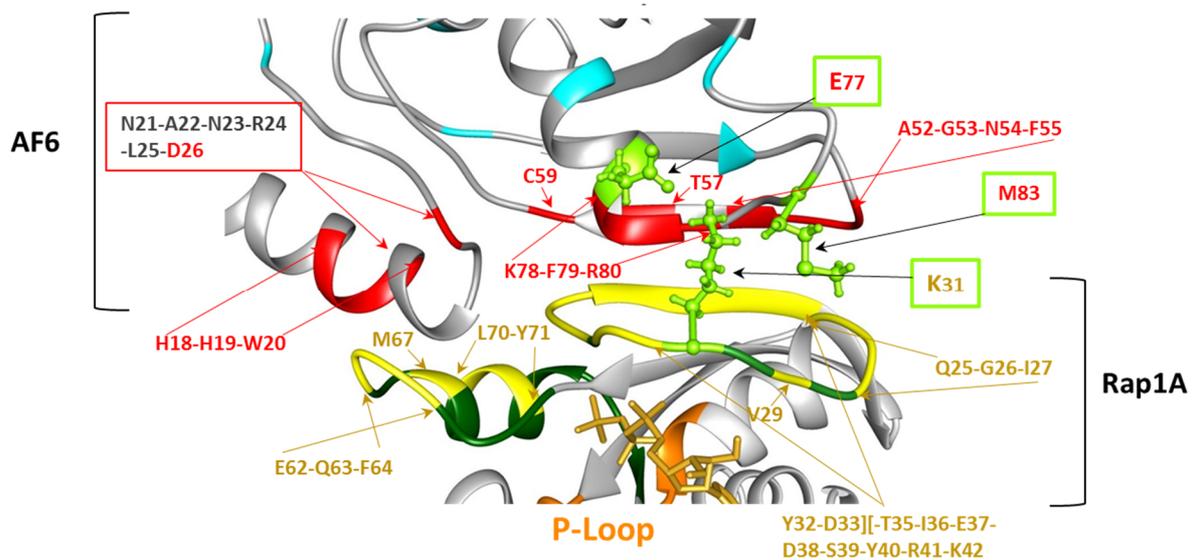


Abbildung 5-9: Der aktive Bindebereich des AF6-Rap1A-Komplexes basierend auf „af6_rap_12_8_100.pdb“ [Elsner, 2006]

Die übereinstimmenden Aminosäuren der Rap1A[GppNHp/GTP/GDP] Interaktionen mit AF6 sind hellblau markiert, die auf das Docking übertragenen aktiven Aminosäuren sind rot dargestellt. Darunter befindet sich das Rap1A[GppNHp] Protein im Komplex, wobei die G-Domänen nach dem gebräuchlichen Farbcode und die für eine aktive Beteiligung an der Bindung in Frage kommenden Aminosäuren des Rap1A sind gelb markiert. Die wichtige Salzbrücke zwischen AF6-E77 und Rap1A-K31 sowie deren Unterstützung durch AF6-M83 sind in hellgrün hervorgehoben.

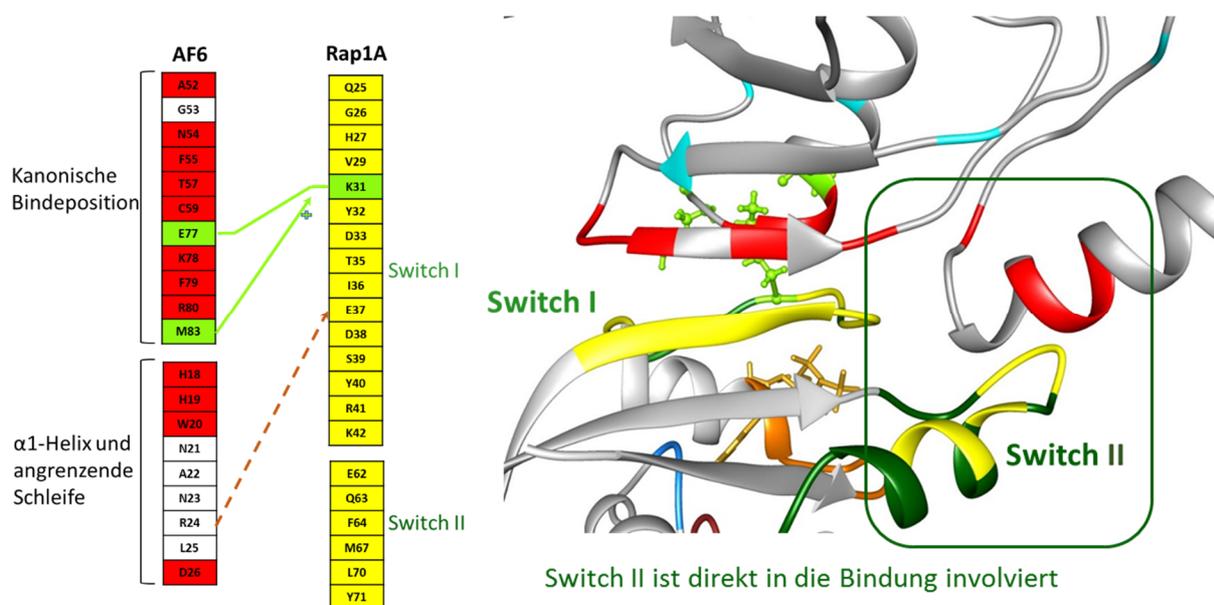


Abbildung 5-10: Übersicht über die Aminosäuren der Interaktionsfläche AF6 mit Rap1A

Auf der rechten Seite ist die Kontaktfläche zwischen AF6 und Rap1A dargestellt. Die *Switch II*-Region ist grün hervorgehoben und die charakteristische Salzbrücke zwischen AF6-K78 und H-Ras-E31 ist in hellgrün markiert. Links im Bild ist eine Übersicht über die eingegrenzten, direkt an der Bindung beteiligten Aminosäuren dargestellt.

Durch die Interaktionsstudien des AF6-RA1 mit Rap1A[GppNHp/GTP und GDP] konnte gezeigt werden, dass die für Rap1A-Effektoren wohl essentielle Salzbrücke auch in diesem Komplex zwischen AF6-E77 und Rap1A-K31 ausgebildet und zusätzlich durch AF6-M83 stabilisiert wird. Ebenso ist die Aminosäure AF6-R24 der α 1-Helix des AF6 wahrscheinlich durch Interaktion mit Rap1A-E37 an dem kanonischen Bindebereich beteiligt (Abb.5-9 und 5-11). Die Art der Interaktion kann hier nur durch die Dockingstruktur geschätzt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Zusätzlich zeigt sich, dass die α 1-Helix und die daran angrenzende Schleifenregion mit in die AF6-RA1 Bindung involviert sind.

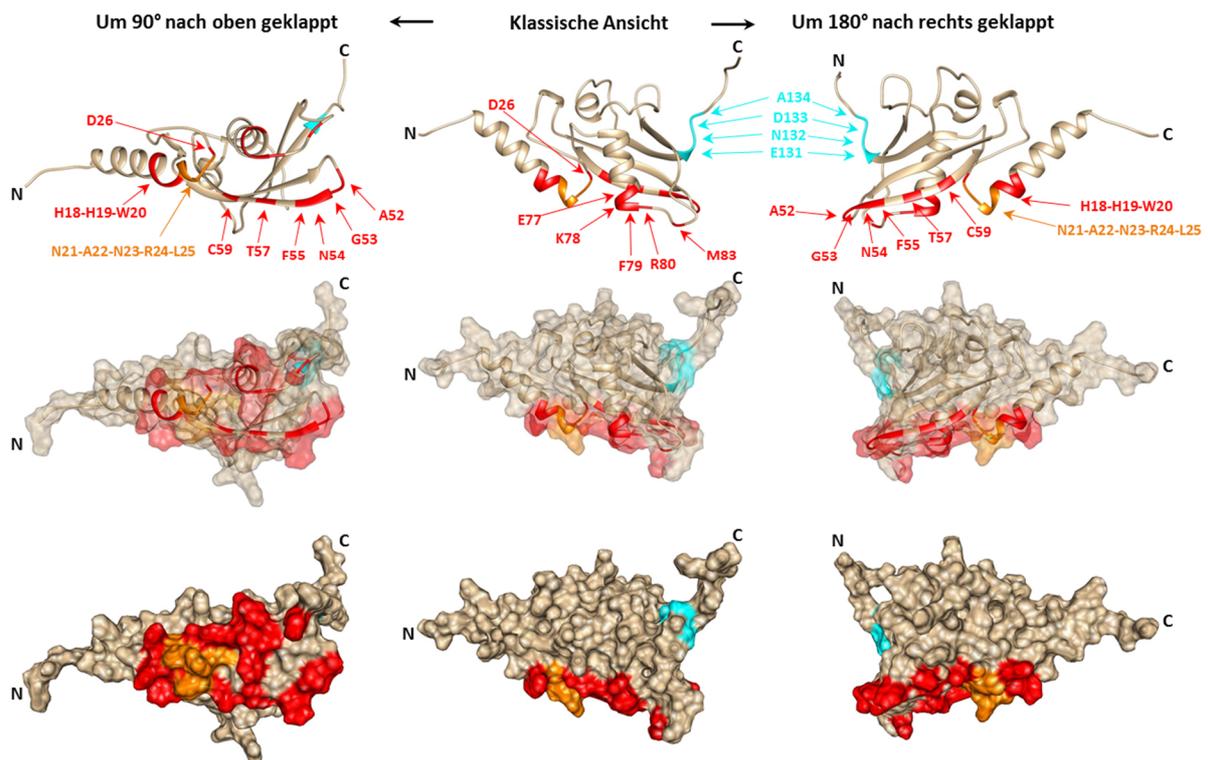


Abbildung 5-11: Übersicht über den Bindebereich des AF6-Konstruktes mit Rap1A

Dargestellt ist die AF6-RA1-Domäne in unterschiedlicher räumlicher Orientierung. In rot hervorgehoben sind die für die H-Ras-AF6-Komplexbildung als aktiver Bindebereich definierten Aminosäuren des AF6-Konstruktes. Zusätzlich ist der wahrscheinlich involvierte, aber in den NMR-Spektren nicht verfolgbare C-terminale Abschnitt der α 1-Helix in orange markiert (N21, A22, N23, R24, L25). Der an der Komplexbildung beteiligte C-terminale Bereich des AF6 ist in Cyan hervorgehoben (E131, N132, D133, A134).

Zusätzlich zu den Bindungseffekten an der kanonischen Bindepotion treten starke Wechselwirkungen im C-terminalen Bereich der AF6-RA1 im Bereich der Aminosäuren E131 bis K138 auf, die anhand des charakteristischen Verhaltens der Aminosäure A134 (Kapitel 4.3.6) näher analysiert werden konnten. Die Bindung des Rap1A führt zu einer Interaktion mit dem N-terminalen Ende der α 1-Helix und deren Schleifenregion daraufhin zu konformationellen Änderungen innerhalb des gesamten Moleküls und letztendlich zu einer zusätzlichen, für Rap1A charakteristischen Reaktion im C-terminalen Bereich (Kapitel 4.3.5 und 4.3.6). Bereits durch Guido Steiner konnte 2001 in den TROSY-Messreihen festgestellt werden, dass der Komplex bei einem molaren Verhältnis des AF6 zu Rap1A von 1:1,3 und AF6 zu H-Ras von 1:1,8 nicht in der Sättigung vorliegt. Zurückgeführt wurde diese Beobachtung auf eventuelle ungenaue Konzentrationsbestimmung (Kapitel 3.2.6), eine teilweise Inaktivierung des AF6 durch Proteolyse (Kapitel 4.1.1.2) oder auf mangelnde Nukleotidbeladung (Kapitel 4.1.3.3). Diese drei Kriterien

wurden im Zuge dieser Arbeit exakt eingehalten, dennoch lag der Komplex nie in vollständiger Sättigung vor. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das Verhalten des AF6-RA1 sein Homodimere auszubilden (Kapitel 4.1.1.4) und es hierbei zu kompetitiven Reaktionen um die GTPase-Bindeposition kommt. Eine weitere Erklärung wäre eine multiple Bindung in dem Bereich des AF6-RA1. Durch ein Deletions-Konstrukt des AF6 (1-6) Δ [127-1824] (Kapitel 1.7) konnte gezeigt werden [Linnemann, 1999], dass es eine zweite Bindeposition für Rap1A, nicht jedoch für H-Ras an AF6 gibt. Diese könnte den Bereich AF6(127-141) überschneiden und ausschlaggebend für die im C-terminalen Bereich beobachteten Effekte sein. Ebenso ist es möglich, dass der C-Terminus auch eine regulatorische Funktion besitzt. So wurde in der Arbeit von Linnemann auch gezeigt, dass die Interaktion eines, im C-terminalen Bereich um einen Myc-Tag und einen 10 Aminosäuren langen Linkerbereich, verlängertes AF6(1-141) Konstrukt nicht mehr in der Lage war die kleinen GTPasen Rap1A oder H-Ras zu binden. Beispielsweise kann es durch die Bindung eines Effektors an die benachbarte Region des AF6-RA1 zu einer Umlagerung des C-terminalen Bereichs des AF6(1-141) kommen, woraufhin dieser die kanonische Binderegion der RA1-Domäne blockiert oder auch frei gibt. Die unterschiedlichen Affinitäten des Rap1A[GTP] und Rap1A[GDP] an die AF6 RA1-Domäne zu binden, basieren auf zwei grundsätzlichen Zuständen. Zum einen auf der Orientierung des Rap1A-K31, der offenen GDP-beladenen Form. Auf Grund der Konformationsänderungen vom „on“[GTP], in den „off“[GDP] Zustand (Kapitel 4.3.4) vergrößert sich die Distanz zwischen den Seitenketten des Rap1A-K31 und AF6-E77 und die Ausbildung der charakteristischen Salzbrücke ist nicht mehr möglich. Zum anderen befindet sich die *Switch II* Region im offenen Zustand in ihrer nach oben geklappten Konformation, was zusätzlich zu einer sterischen Hinderung im Bereich der α 1-Helix des AF6 führt. Die vielen zusätzlichen Bindepositionen forcieren aber dennoch eine Bindung (Kapitel 4.3.2) des GDP-beladenen Rap1As. Die zusätzliche GTP-Beladung (9,5-4,4%) der Rap1A[GDP] Probe (Kapitel 4.3.2.8) hat außerdem einen Einfluss auf die beobachteten Effekte, ist aber im Verhältnis zu den eingesetzten molaren Konzentrationen nicht der alleinige Grund für die beobachteten Effekte, daher kann angenommen werden, dass die Bindebereiche beider Nukleotid-Beladungen identisch sind. Bei beiden Beladungen ist die α 1-Helix involviert, wobei diese durch die Komplexbildung eine leichte Neuorientierung erfährt. Die Aminosäuren AF6-R10 und AF6-R11 (unterstützt durch AF6-E8 und AF6-E9) scheinen durch die Bindung des Rap1A[GTP] so ausgerichtet zu werden, dass sie eine Interaktion mit AF6-E35 und AF6-D36 eingehen können. Diese Interaktion stabilisiert den kanonischen Bindebereich, der zusätzlich

durch die Interaktion im Bereich AF6-H18 bis AF6-D26 erweitert ist. Diese Theorie wird durch Titrationsmessungen [Linnemann, 1999] mit zwei N-terminal verkürzten Konstrukten der AF6 RA1-Domäne gestützt. Hierbei zeigte sich, dass AF6(13-133) mit einem 2,4-fach niedrigeren K_d ($0,6 \mu\text{M}$) und das Konstrukt AF6(30-141) sogar mit einem um den 80-fachen niedrigeren K_d ($20 \mu\text{M}$) an Rap1A[GppNHp] bindet.

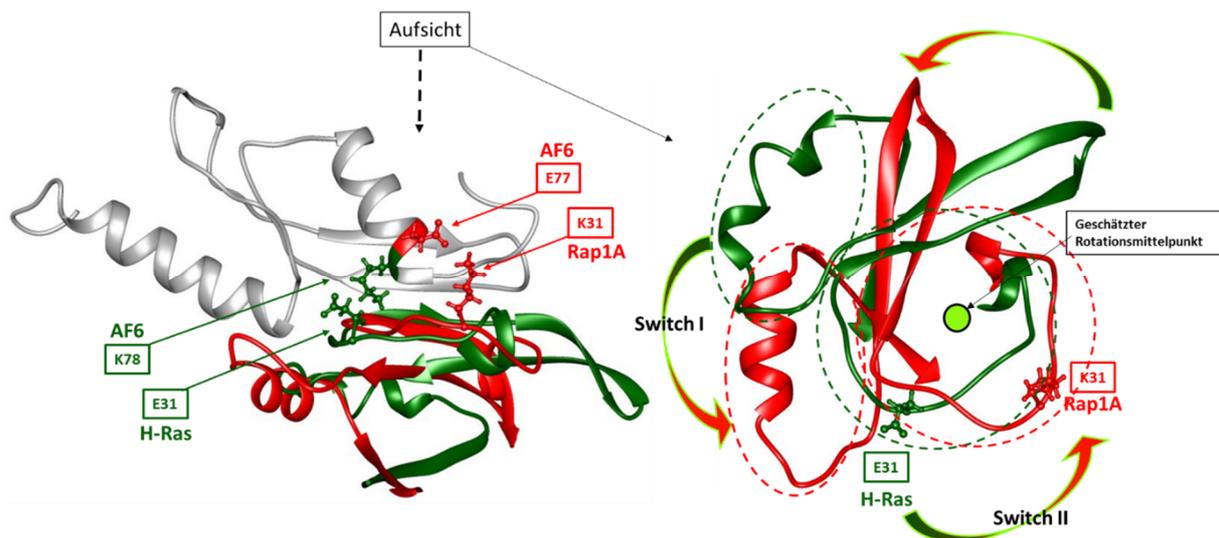


Abbildung 5-12: Darstellung der unterschiedlichen Orientierung der GTPasen H-Ras und Rap1A an die RA1-Domäne des AF6

AF6 ist in grau, Rap1A mit seiner zugehörigen charakteristischen Bindepotion in rot und H-Ras mit seiner charakteristischen Bindepotion in grün dargestellt. Auf der rechten Seite ist eine Aufsicht auf die kleinen GTPasen dargestellt und ihre Rotation zueinander hervorgehoben.

Durch die Orientierung des Rap1A-K31 an das AF6-E77, im Vergleich zum H-Ras-E31 an AF6-K78, vollzieht das Rap1A eine Drehung die zu einer Interaktion mit der α 1-Helix des AF6 führt (Abb. 5-12). Diese Drehung ist allem Anschein nach der gravierende Unterschied in beiden molekularen Interaktionsbereichen und kann die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten beider GTPasen an AF6-RA1 erklären.

5.4 Die NMR-Analyse der Interaktion des Afadin 6 mit Zonula occludens 1

Um die Beobachtungen von Gerald Bäumel im Jahr 2008 zu bestätigen und eine mögliche Interaktion von AF6 und ZO1 im N-terminalen Bereich (186-420) genauer zu charakterisieren, wurden HSQC-NMR-Experimente mit ^{15}N -markiertem AF6 und ^{14}N -ZO1-PDZ2 /-ZO1-MUT2 im Komplex (1:1,5) durchgeführt (Kapitel 4.4). Hierbei ließ sich eine Interaktion zwischen der AF6 RA1-Domäne und der ZO1-PDZ2 Domäne nachweisen. Die beobachteten schwachen Effekte stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Gerald Bäumel und den durchgeführten Pull-down-Versuchen (Kapitel 4.1.4). Schwache Protein-Protein-Interaktionen ($K_d > 1 \text{ mM}$) sind bei Weitem nicht so gut erforscht, wie die vielen starken ($K_d < 10 \text{ }\mu\text{M}$) Interaktionen [Vaynberg, 2005]. Das liegt zum einen an der Tatsache, dass klassische Co-Immunopräzipitationen oder Pulldown-Versuche häufig nicht empfindlich genug sind und dass die für die Strukturaufklärung wichtige Methode der Röntgenkristallographie meist an dem Problem der Kristallisation solcher Komplexe scheitert. Dennoch konnte gezeigt werden, dass schwache, nur durch NMR-Methoden detektierte Protein-Protein-Interaktionen, auch physiologisch essentiell sind [Vaynberg, 2006]. Auch bei der Interaktion des N-Terminus von ZO1 mit dem N-Terminus von AF6 scheint dies der Fall zu sein. Zusätzlich stellt sich die Frage, inwiefern die Homodimerisierung der PDZ2-Domäne und posttranslationale Modifikationen durch Phosphorylierung von regulatorischer Bedeutung sein könnten. Um dies zu untersuchen, wurde erfolgreich eine monomere Mutante der PDZ2-Domäne („MUT2“) durch Insertion der 4 Aminosäuren „GGGA“ in das β 2-Faltblatt der PDZ2-Domäne (an Position H205]GGGA[I206 der PDZ2) erzeugt (Kapitel 4.1.2) und charakterisiert. Die Annahme ist, dass die Homodimerisierung erst zu einem späteren Zeitpunkt, nach Ausbildung der Tight Junctions einsetzt, um die Tight Junctions durch Oligomerisierung der Gerüstproteine zu stärken. Somit ist eventuell die monomere Konformation eines früheren Zeitpunktes zugänglich für eine Interaktion mit dem Afadin 6. Außerdem ist das ZO1-Protein ein Phosphorprotein, das an diversen Positionen modifiziert werden kann (Uniprot P39447) weshalb die beiden Konstrukte ZO1-PDZ2 und ZO1-MUT2 auf die Möglichkeit einer posttranslationalen Phosphorylierung hin getestet und dementsprechende Mutanten angefertigt wurden (Kapitel 4.1.2.3). Durchgeführte Pulldown-Analysen dieser ZO1-Konstrukte mit der AF6 RA1-Domäne konnten jedoch keine direkte oder über H-Ras gekoppelte Interaktion zeigen (Kapitel 4.1.4). NMR-Analysen der Komplexe AF6 mit ZO1-PDZ2 und AF6 mit ZO1-MUT2 konnten allerdings eine Interaktion der Proteine aufzeigen, die Infolgedessen

charakterisiert wurde (Kapitel 4.4). Eine rein visuelle Auswertung der aktiven Interaktionsbereiche des AF6 mit Rap1A und AF6 mit ZO1-PDZZ/MUT2 zeigt bereits eine deutliche Übereinstimmung der beteiligten Aminosäuren.

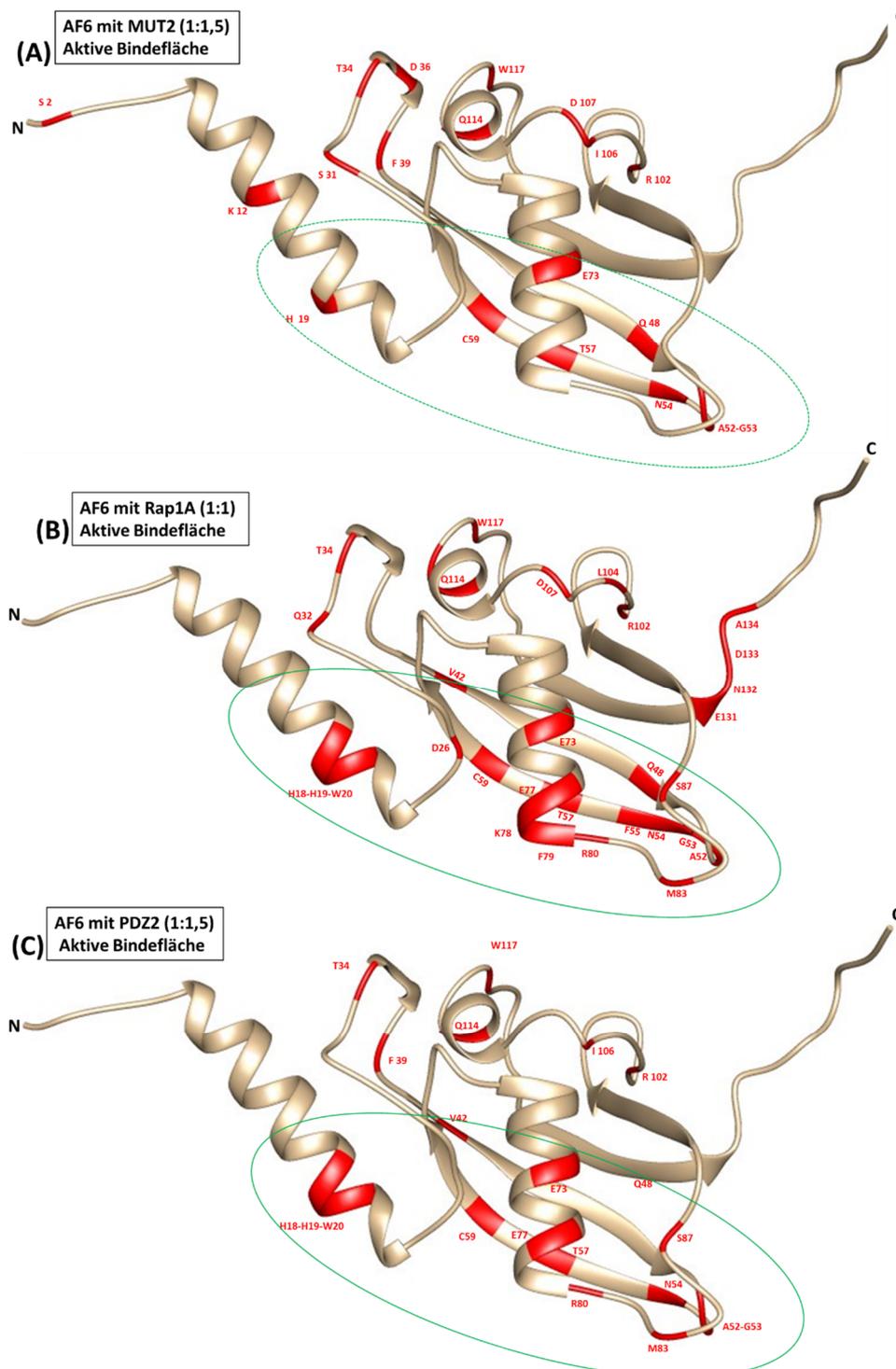


Abbildung 5-13: Vergleich der aktiven Bindebereiche des AF6 der Komplexe des AF6 mit (A) ZO1-MUT2, (B) AF6 mit Rap1A[Zusammenfassung](siehe Abb. 5-8) und (C) AF6 mit ZO1-PDZZ

Die möglichen, aktiv an einer Interaktion beteiligten Aminosäuren, sind in rot, der signifikante übereinstimmende Bereich ist in grün markiert.

Die Effekte des AF6-MUT2-Komplexes sind hierbei am schwächsten und scheinen auf Grund einer schwachen Interaktion über das β 2-Faltblatt (A52, G53, N54, T57 und C59) des AF6 stattzufinden. Vergleicht man jedoch die Effekte der monomeren MUT2-Domäne mit denen der Wildtyp PDZ2-Domäne, so ist auffällig, dass sich der festgestellte Unterschied mit der kanonischen Bindeposition des AF6-Rap1A-Komplexes A52, N54, T57, C59, E77, R80, M83 und S87, deckt. Auch die α 1-Helix des AF6 ist durch die Aminosäuren H18, H19 und W20 in die Bindung mit ZO1-PDZ2 involviert (Kapitel 4.4.1.4) (Abb. 5-13 und 5-14).

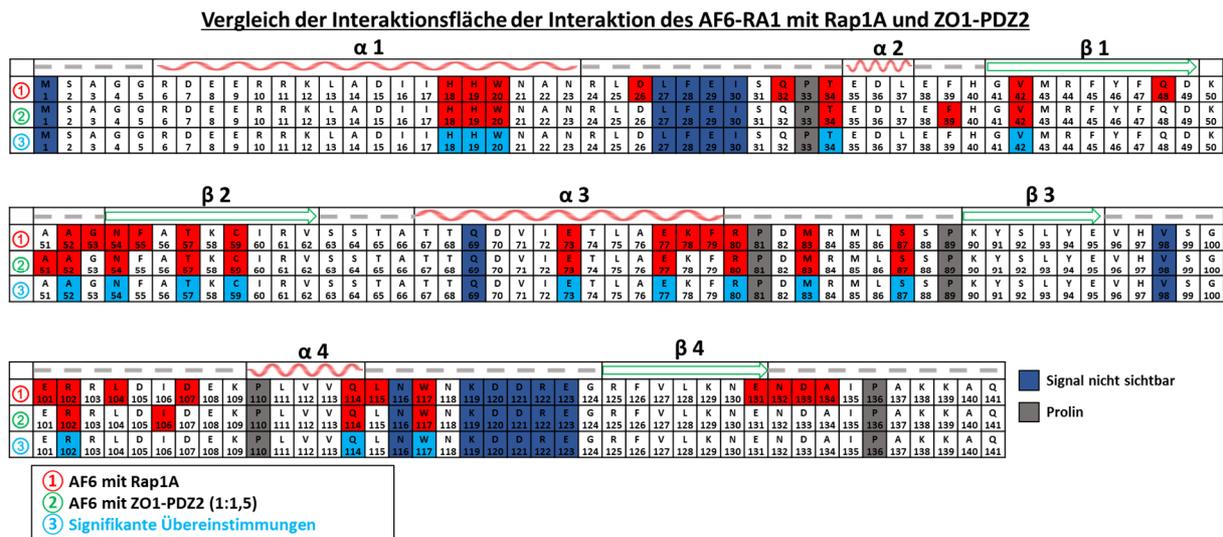


Abbildung 5-14: Übereinstimmungen der AF6-Rap1A und AF6- ZO1-PDZ2 Komplexe.

Dargestellt sind die bindungsaktiven Aminosäuren des AF6 (rot) in Bezug auf einen Komplex mit Rap1A (siehe Abbildung 5-8) ① und ZO1-PDZ2 ②. Zusätzlich sind die Übereinstimmungen beider in hellblau hervorgehoben ③.

Die Arbeitsgruppe um Chen konnte 2008 zeigen, dass die ZO1-PDZ2 Domäne über 26 Wasserstoffbrücken zwischen β 1- β 4' und β 2- β 2', sowie zwei Salzbrücken zwischen K209 und E238, ein *domain-swapped*-Homodimer ausbildet (Abb. 5-15). Erst durch die Dimerisierung der PDZ2-Domäne wird eine spezifische Bindeposition für den C-terminalen Bereich „-RPRPDDLEI-COOH“ des Connexin43 gebildet, an die es mit einem K_d von etwa 17 μ M binden kann. Eine Monomerisierung der PDZ2-Domäne über „GGGA“-Insertion inhibiert diese Interaktion.

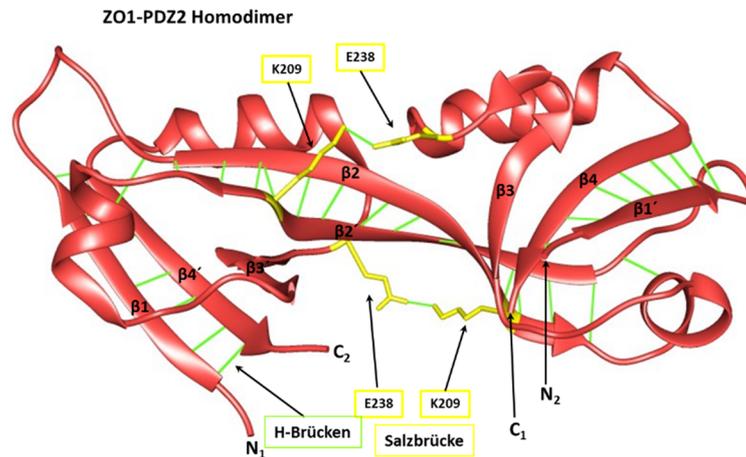


Abbildung 5-15: Kristallstruktur des ZO1-PDZ2 Homodimers (PDB-File „3CYY“)

In hellgrün sind die 26 Wasserstoffbrücken und in gelb die zwei essentiellen Salzbrücken zwischen E238 und K209 dargestellt.

Es gibt verschiedenste Arten wie PDZ-Domänen untereinander oder mit Effektoren interagieren können [Ye, 2013]. Meist ist jedoch das „GLGF“-Motiv der PDZ-Domäne für die Bindung eines C-terminalen Peptids verantwortlich. Im Falle der ZO1-PDZ2 Domäne fehlt dieses intakte GLGF-Motiv und die Interaktion mit Connexin43 wird nur zum Teil über ein YGL-Motiv vermittelt. Die restliche Interaktionsfläche wird hauptsächlich über ein Netzwerk aus Ladungen [Chen, 2008] (Abb. 5-16) und einigen weiteren Wasserstoffbrücken vermittelt. Die Arbeitsgruppe um Chen konnte außerdem das Erkennungsmotiv der ZO1-PDZ2 Domäne für C-terminale Peptide wie folgt definiert werden: „R/K-X-R/K-P-D/E-D/E-ψ-D/E-ψ-COOH“, hierbei steht X für eine beliebige und ψ für eine hydrophobe Aminosäure. Ein Sequenzabgleich mittels Datenbankrecherche konnte keine weiteren Übereinstimmungen, abgesehen von der Familie der Connexine, identifizieren. Vergleicht man allerdings die PDZ2-Connexin43 Erkennungssequenz mit den Übereinstimmungen der Rap1A-AF6- und AF6-PDZ2-Interaktion (Tab. 5-1), so zeigt sich eine teilweise Übereinstimmung der Sequenzen, die das Bindungsverhalten zwischen AF6 und ZO1-PDZ2 erklärt.

Tabelle 5-1: Vergleich des Connexin-Bindemotivs der ZO1-PDZ2 Domäne mit dem C-terminalen Ende des Connexin43 und der Schleifenregion der Interaktionsstudie AF6-PDZ2 vs. AF6-Rap1A

Connexin Erkennungsmotiv	R/K	X	R/K	P	D/E	D/E	ψ	D/E	ψ	COOH
Connexin 43	R	P	R	P	D	D	L	E	I	
AF6-RA1	K78	F79	R80	P81	D82	M83	R84	M85	L86	S87

Übereinstimmungen sind in grün hervorgehoben. X steht für eine beliebige und ψ für eine hydrophobe Aminosäure. Die Aminosäuren des AF6-RA1 sind zusätzlich mit ihren Positionen gekennzeichnet.

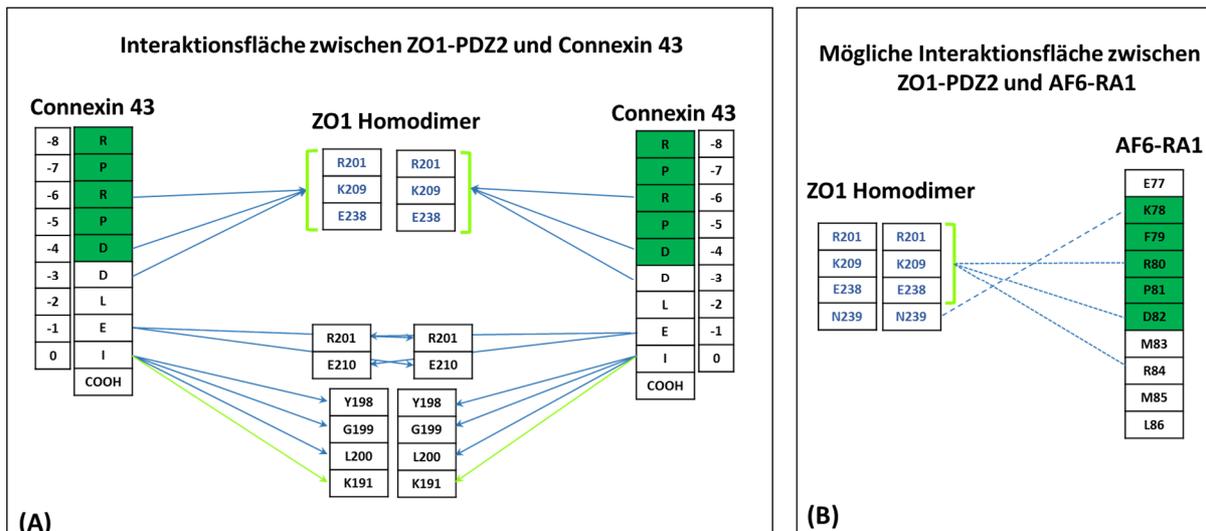


Abbildung 5-16: Darstellung der Interaktionsfläche zwischen ZO1-PDZ2 und Connexin43 (A) und der möglichen Interaktionsfläche zwischen AF6-RA1 und ZO1-PDZ2 (B)

Mögliche Wasserstoffbrücken sind in hellblau gekennzeichnet, durch positive oder negative Ladungen vermittelte Kontakte in hellgrün.

Die homodimere PDZ2-Domäne des Zonula occludens 1 ist in der Lage zwei Connexine43 zu binden, wobei sich die Salzbrücken zwischen K209 und E238 als absolut essentiell herausgestellt haben (Abb. 5-15), da eine Punktmutation dieser Aminosäuren in ein Alanin zu einer 8-fachen Abnahme der Affinität führt. Auch die Streckung des β 2-Faltblattes durch GGGA-Insertion führt zu einem kompletten Verlust der Bindeeigenschaften für Connexin43 der ZO1-PDZ2-Domäne [Chen, 2008]. Betrachtet man diese Ergebnisse (Abb. 5-16) in Bezug auf die 3D-Faltung der Proteine AF6 und ZO1-PDZ2 (Abb. 5-17), so ergibt sich in Abbildung 5-18 folgendes Bild einer Interaktion zwischen der Ras-Assoziations-Domäne 1 des Afadin 6 und der PDZ2-Domäne des Zonula occludens 1.

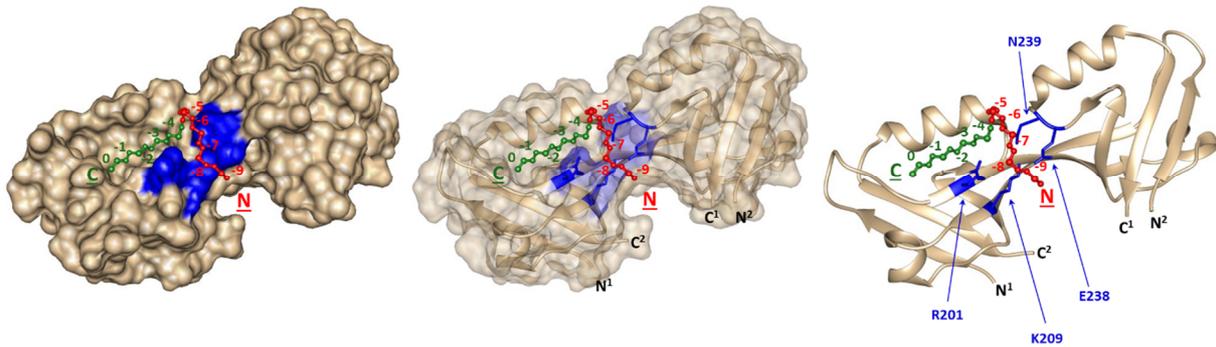


Abbildung 5-17: Die 3D-Struktur des PDZ2-Homodimers im Komplex mit dem C-Terminus des Connexin43

Links ist die Oberfläche des PDZ2-Homodimers mit gebundenem Cx43-Peptid dargestellt, rechts die klassische Bänderstruktur. Die homologe Übereinstimmung des AF6 mit Cx43 ist rot dargestellt, der C-terminale Rest des Peptids in grün. Die hydrophile Bindungsfurche mit den essentiellen Ladungen der Salzbrücke (K209 und E238) ist blau dargestellt.

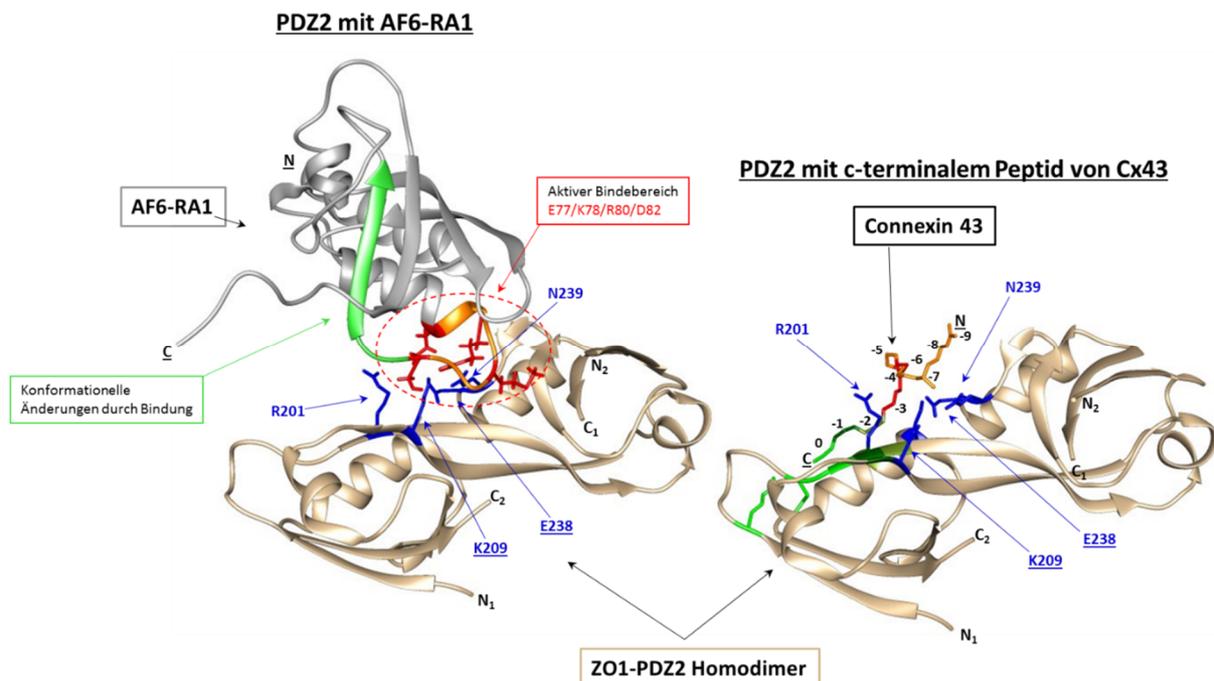


Abbildung 5-18: Übertragung der Ergebnisse der Interaktionsstudien zwischen AF6-RA1 und ZO1-PDZ2 auf die 3D-Struktur des ZO1-PDZ2 Homodimers und direkter Vergleich mit dem Komplex aus ZO1-PDZ2 und Connexin43

Auf der linken Seite ist ein möglicher Komplex aus AF6-RA1 und ZO1-PDZ2 basierend auf dem PDB-File „3CY“ und durch manuelles Docking erstellt. Die grüne Markierung zeigt die konformationellen Veränderungen des AF6 durch die PDZ2 Bindung, in rot sind aktive Beteiligungen des AF6 an der Interaktion hervorgehoben. Blau sind die, für die Interaktion essentiellen Aminosäuren der PDZ2-Domäne markiert. Rechts ist der Komplex aus ZO1-PDZ2 und einem Connexin43 (PDB-File „3CY“) in gleicher Orientierung dargestellt. Die Bindungen der Aminosäure (0/-1/-2) des C-Terminus von Cx43 (rechte Bildhälfte) sind grün dargestellt, für die Bindung der Aminosäuren (-5) bis (-9) essentielle Aminosäuren der PDZ2-Domäne ebenfalls in blau.

Wie schon gezeigt, sind die Bindungseffekte zwischen ZO1-PDZ2 und AF6-RA1 eher schwacher Natur, stehen aber im Einklang mit den bereits gewonnenen Erkenntnissen [Yamaoto, 1979 und 1999 / Bäumel, 2006]. Eine weitläufig diskutierte Theorie ist [Sakamoto, 2008 / Komura, 2008 / Severson, 2009 / Boettner, 2009 / Hämälistö, 2013], dass die Interaktion zwischen den Kompartimenten der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Kontakte durch Integrine vermittelt wird. Die beiden Proteine Afadin 6 und Zonula occludens 1 haben neben der Ausbildung der Zell-Zell- und auch Zell-Matrix-Kontakte vielfältige Funktionen und scheinen beide essentielle Schnittstellen der Signaltransduktion in Bezug zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität, der Zellteilung, der Zellverbindung und Weiterem zu sein. Für ZO1-PDZ2 wurde bewiesen [Field, 2005], dass es in der Lage ist Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu binden, welches Proteine an die Plasmamembran lokalisiert. Anhand dieser Tatsache konnte die Arbeitsgruppe um Hämälistö 2013 beobachten, dass ZO1 mit PIP₂ und α 5 β 1-Integrin in sich teilenden NCI-H460 Zellen kolokalisiert und letztendlich die PDZ2-Domäne für die Bindung des α 5 β 1-Integrin C-Terminus über dessen „PPATSDA“-Motiv verantwortlich ist. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Proteinkinase PKC ϵ ZO1 an Position 168 phosphoryliert und somit Einfluss auf dessen Interaktion mit den Integrinen nimmt. Das auf diese Weise phosphorylierte ZO1 wird an die Integrine der Zell-Matrix-Kontakte lokalisiert und offenbart somit ein neues Level der Koordination zwischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Integrin kann hierbei in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen, einem hochaffinen Zustand, der stark an extrazelluläre Proteine bindet und einem niederaffinen Zustand, der eine solche Bindung zusätzlich schwächt [Takagi, 2002]. Zusätzlich scheint die PIPKI γ 90 (PIP-Kinase), die durch PTP μ (Protein-Tyrosin Phosphatase) reguliert wird [Sakamoto, 2008], für die Aktivierung der Integrine zu sorgen, die im Rückschluss verantwortlich für die Nectin-vermittelte Ausbildung der Adherens Junctions sind. Für diese Nectin-basierte Ausbildung der Adherens Junctions wiederum ist AF6 verantwortlich und diese Zell-Zell- und Zell-Matrix-Koordination erfolgt über Rap1A [Boettner, 2009]. Durch die in dieser Arbeit analysierte Interaktion der AF6 RA1-Domäne mit Rap1A und der ZO1-PDZ2-Domäne scheint ein Linker für diese hoch komplexe Kommunikation gefunden worden zu sein. Da diese Interaktion von Seiten des ZO1-PDZ2 relativ schwach ausfällt, ist es sehr wahrscheinlich, dass zusätzliche Effekte wie die posttranslationale Modifikationen der Einheiten, Kopplung oder Unterstützung der Bindung durch Ausbildung trimerer Komplexe, oder faltungsbedingte Umlagerungen der Gerüstproteine an diesem *cross-talk* beteiligt sind.

5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Interaktionsprozesse jeder einzelnen Aminosäure der Ras-Assoziationsdomäne 1 des Afadin 6 analysiert. Diese liefern ein sehr detailliertes und umfangreiches Bild über die Komplexbildung dieser Domäne mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A, sowie mit der PDZ2-Domäne des Tight Junction Proteins Zonula occludens 1. Das nächste Ziel ist es, die Informationen, der in dieser Arbeit analysierten Komplexe, aus reziproker Sicht mit NMR-Methoden zu charakterisieren, um ein vollständiges Bild dieser Interaktionen zu erhalten. Von Seiten des Rap1A war eine Markierung für NMR-Experimente leider noch nicht möglich, könnte aber durch neue Plasmid-Systeme, einer Erweiterung der Expressionsparameter sowie durch einen Wechsel hin zu alternativen Expressionsorganismen, wie zum Beispiel Hefen, möglich sein. Von Seiten des ZO1 sind die Ausgangsbedingungen für eine NMR-spektroskopische Charakterisierung optimal. Eine elegante Methode die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse zu validieren, wäre die gezielte Einführung von *loss-of-function* Mutationen durch gezielte Mutagenese. Somit könnte die, in den durch diese Arbeit definierten Bindebereichen, essentiellen Aminosäuren des AF6, wie beispielsweise das E77, oder die noch ungeklärte Aufgabe des C-terminalen Bereichs durch Mutation des A134 gezielt verändert werden. So würde man weitere Erkenntnisse über ihre Signifikanz erhalten. Zusätzlich zu einer Analyse dieser Experimente auf atomarer Ebene mittels NMR könnten Affinitätsmessungen durch Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, Isotherme-Titrations-Kalorimetrie oder durch Microscale Thermophorese für eine Validierung dieser Ergebnisse durchgeführt werden. Ein weiterer interessanter Aspekt des Afadin 6 und des Zonula occludens 1 war stets ihr Oligomerisierungszustand. Da dieser gravierenden Einfluss auf die Funktionalität des Proteins hat, sollten diese auch näher charakterisiert werden. Hierbei ist zum einen die Größe des Protein-Konstrukts und zum anderen der Zeitpunkt ihrer Präsenz während den zellulären Prozessen der Ausbildung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte von Interesse. Ersteres könnte man durch dynamische Lichtstreuung näher charakterisieren. Die zellulären Prozesse zu studieren gestaltet sich komplexer, könnte aber durch Fluoreszenzmarkierung dieser Konstrukte direkt im geeigneten eukaryotischen Zellsystem mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie oder STED-(*stimulated emission depletion*) Mikroskopie beobachtet werden.

6. Summary

One aim of this thesis was to study the interaction between the Ras-association-domain 1 of the protein Afadin 6 (AF6-RA1) and the small GTPases H-Ras and Rap1A with nuclear magnetic resonance (NMR) based methods. Afadin 6 is one of the main scaffold proteins present in adherens junctions and is important for the formation and maintenance of these Nectin-mediated cell-cell contacts. The small GTPases H-Ras and Rap1A can switch their activity, based on their nucleotide loading and therefore serve as a molecular switch mediator in the cell. Both of them are part of various signal transduction pathways like the RTK- (Receptor tyrosine kinases) or the JAK/STAT- (Januskinase and signal transducers and activators of transcription) pathway. Based on their function as molecular switches they influence differentiation and proliferation of the cells. The interaction of Afadin 6 and these small GTPases was already known, but the molecular mechanism how this interaction takes place, is not completely understood yet. During this work it was possible to investigate the complex formation of ¹⁵N-labeled AF6-RA1 with the unlabeled GTPases through NMR titration experiments on an atomic scale. Thereby it was founded, that both GTPases share the same canonical binding area on the AF6-RA1 protein. This area includes the amino acids C59, T57, F55, N54, G53 and A52 of the β 2-sheet[N54 to V62] and the amino acids E77, K78, F79, R80, M83 and R84 of the α 3-helix[T67 to F79] as well as the adjacent loop region. Furthermore some specific differences between the AF6-RA1 and H-Ras as well as the AF6-RA1 and Rap1A complex could be identified. Thus H-Ras carries a glutamate at position 31, while Rap1A carries a lysine at this position. This difference leads to the formation of a salt bridge between H-Ras-E31 and AF6-K78, whereas in the case of Rap1A a salt bridge between Rap1A-K31 and AF6-E77 is formed. The result of this difference is a rotation of the Rap1A protein compared to the H-Ras protein in their complexes. This leads to an interaction of the amino acids H18, H19, W20 and D26 of the α 1-helix and the adjacent loop region of AF6-RA1 with the switch II region of Rap1A. Hence the higher affinity of Rap1A towards AF6 compared to H-Ras towards AF6 can be explained. Also there are some interesting binding events in the C-terminal region (E131, N132, D133 and A134) of the AF6-RA1 whose function couldn't be solved yet. The second aim of this thesis was to minimize the area of interaction between the proteins Afadin 6 and Zonula occludens 1 using biochemical and NMR-spectroscopic methods. The Zonula occludens 1 protein only occurs in tight junctions while Afadin 6 seems to be excluded from those. Apart from this strict

separation both proteins appear to be co-localized when new cell-cell contacts are developed. The investigation of the complex formation between ^{15}N -AF6-RA1 and the PDZ2-domain of Zonula occludens 1 and between AF6-RA1 and a monomeric version (MUT2) of this homodimeric PDZ2-domain using NMR-spectroscopy, leads to the exact localization of the interaction domain. Thus it was found that AF6-RA1 interacts with the wild type, dimeric PDZ2-domain, but not with the monomeric mutant. Interestingly this interaction is highly similar to the molecular interaction of AF6-RA1 and Rap1A. The most important regions seem to be the canonical part, E77 to D82, of the AF6-RA1, which is homologous to the already known binding motif of Connexin43 with the PDZ2 domain of Zonula occludens 1. This area might be able to initiate the complex formation between Afadin 6 and the Zonula occludens 1 protein. Additionally it was possible to sequentially assign the HSQC-signals of the PDZ2 and the monomeric MUT2 version and to characterize their biochemical features. Therefore the interaction of Afadin 6 with Zonula occludens 1 from an inverse point of view has to be analyzed in future projects, to validate this knowledge. The investigation of the complex formation between Zonula occludens 1, H-Ras and Rap1A with their coincident binding partner Afadin 6 provides some interesting insights into the physiological context of these proteins.

7. Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Zell-Zell-Verbindungen	4
Abbildung 1-2: Funktionale Komplexe der epithelialen Zellkontakte.....	4
Abbildung 1-3: Epitheliale Tight Junctions [Tsukita, 2014]	5
Abbildung 1-4: Die drei Hauptfunktionen der Tight Junctions.....	6
Abbildung 1-5: Komplexe Protein-Protein Interaktionen der Tight Junctions [Shin, 2006].....	7
Abbildung 1-6: Übersicht über die Komponenten der Adherens Junctions [Niessen, 2007].....	8
Abbildung 1-7: Schematische Übersicht über die drei humanen ZO-Proteine und ihrer konservierten Domänen	10
Abbildung 1-8: Schematische Darstellung des humanen ZO1 Proteins mit einigen seiner in den Tight Junction assoziierten Bindepartnern und den bis dato aufgeklärten Teilstrukturen	11
Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des humanen AF6 Proteins mit einigen seiner assoziierten Bindepartnern und den bis dato aufgeklärten Teilstrukturen	12
Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der kleinen humanen GTPase H-Ras	14
Abbildung 1-11: 3D-Struktur des humanen H-Ras in GTP-gebundener Form.....	14
Abbildung 1-12: Schematische Darstellung des GDP-GTP-Schaltermechanismus der kleinen G-Proteine	15
Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der kleinen humanen GTPase Rap1A	16
Abbildung 1-14: 3D-Struktur des humanen Rap1A in GTP gebundener Form.....	16
Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der Fokalen Adhäsionen in Bezug auf ihre Position und ihre Protein- Komplexe [Canel, 2013]	17
Abbildung 1-16: Schematische Darstellung des Verlaufs einer epithelialen Krebsentwicklung [Sever, 2015]	18
Abbildung 1-17: Darstellung der von Thomas Linnemann getesteten AF6-Konstrukte.....	20
Abbildung 1-18: Die 3D-Struktur des AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“) nach Guido Steiner	21
Abbildung 2-1: pGEX4T1-Expressionsvektor (GE Healthcare).....	26
Abbildung 2-20: pET14b-Expressionsvektor [Novogene].....	27
Abbildung 2-31: Klonierungsvektoren pCR-Blunt II-TOPO [Lifetechnologies] und pGEM-T-Easy [Promega]	27
Abbildung 3-1: Schematischer Überblick über die Herstellung eines neuen Konstruktes (Erläuterung im nachfolgenden Text).....	33
Abbildung 3-2: Ablauf eine gerichteten Mutagenese. [„User Guide: The Phusion Site-Directed Mutagenesis Protocol Lifetechnologies“]	37
Abbildung 3-3: Schematischer Ablauf einer 2,5 l Proteinexpression in <i>E. coli</i>	40
Abbildung 3-4: Übersicht über das ÄKTA-FLPC System [Quelle „ <i>GE imagination at work</i> “].....	46
Abbildung 3-5: Konzentrationsbestimmung mittels ¹ H-NMR	50
Abbildung 3-6: Verwendete Guaninnukleotide GDP und GTP sowie dessen Analoga GppNHp.....	52
Abbildung 3-7: Klassischer Aufbau einer Semi-Dry Western Blot Apparatur	53

Abbildung 3-8: Eichspektrum einer Superdex 75 10/300 Gelfiltrationssäule und der mittels K_{av} angefertigte Eichgerade [LMW Gel Filtration Calibration Kit]	56
Abbildung 3-9: Schematische Übersicht über den Ablauf eines GST-Pulldowns	57
Abbildung 3-10: Schematische Darstellung des magnetischen Moments μ	59
Abbildung 3-11: (1) Drehimpuls und (2) Zeeman-Effekt	60
Abbildung 3-12: Veranschaulichung des rotierenden Systems (1) und der Auswirkungen eines 90° -Puls (2)	61
Abbildung 3-13: Beispiel einer einfachen J-Kopplung zwischen H_A und H_B	62
Abbildung 3-14: Schematische Darstellung eines 1D-NMR Experiments [Lottspeich, 2006]	65
Abbildung 3-15: Übersicht über verschiedenen Bereiche eines 1D Spektrums von AF6(1-141)	66
Abbildung 3-16: Schematische 2D-Pulsfolge [Lottspeich, 2006].....	66
Abbildung 3-17: Entstehung eines 2D-Spektrums durch zweidimensionale Fourier-Transformation der Messdaten [Lottspeich, 2006]	67
Abbildung 3-18: Überblick über die Pulsfolge eines entkoppelten HSQC-Spektrums [Pascal, 2008]	67
Abbildung 3-19: Übersicht eines HSQC-Spektrums von ^{15}N -MUT2	68
Abbildung 3-20: Überblick über die Pulsfolge eines HNCO und HNCA [Pascal, 2008]	69
Abbildung 3-21: Übersicht über den Magnetisierungstransfer der Trippelresonanzexperimente [http://www.protein-nmr.org.uk/]	70
Abbildung 4-1: Schematischer Überblick über das Protein Afadin 6	72
Abbildung 4-2: Vergleich der Expressionen von GST-AF6 (pGEX4T1) und His-AF6 (pET14b) eines 1 l-Ansatzes..	73
Abbildung 4-3: Verdautest des GST-AF6 Konstruktes mit einer überdosierten Thrombinlösung	74
Abbildung 4-4: Edman-Abbau der Teilstücke des proteolytisch verdauten AF6 Konstruktes	75
Abbildung 4-5: Säulenchromatographische (SEC) Aufreinigung des AF6-Konstruktes mit bereits abgespaltenem His ₆ -Affinitätstag	76
Abbildung 4-6: Analytische SEC (Superdex 75 /10 /300) des AF6-Konstruktes in Bezug auf das dynamische Monomer- / Dimer-Gleichgewicht	77
Abbildung 4-7: Aktivitätstest des dynamischen AF6 Monomer-, Dimer-Gleichgewichts mit GTP beladenem H-Ras	78
Abbildung 4-8: Langzeitbeobachtung des AF6 Monomer/Dimer Gleichgewichts mittels analytischer SEC (Superdex 75 /10 /300)	79
Abbildung 4-9: Darstellung der mit ASAView berechneten Oberflächenzugänglichkeit des AF6-Konstruktes	80
Abbildung 4-10: Schematischer Überblick über das Protein Zonula occludens 1 und seine Konstrukte.....	81
Abbildung 4-11: Alignment der Aminosäuresequenzen von ① PDZ2 (PDB-Files „2JWE“), ② eigenes PDZ2-Konstrukt im pET14b Plasmid und ③ MUT2 Konstrukt ebenfalls im pET14b Plasmid	82
Abbildung 4-12: 3D-Struktur der PDZ2-Domäne (PDB-File „2JWE“) und der monomeren Variante MUT2 (<i>homology model</i> [PDB-File „4OAJ“]) des Zonula occludens 1 Proteins.....	82
Abbildung 4-13: GST-Spin Aufreinigung einiger ZO1 Konstrukte	83
Abbildung 4-14: SEC der ZO1-PDZ2- und der ZO1-MUT2-Konstrukte (Superdex 200pg / 26 / 600).....	85

Abbildung 4-15: (A) Übersicht über die signifikantesten Phosphorylierungsvorhersagen der ZO1-PDZ2 Domäne und (B) Sequenzalignment der erfolgreich durchgeführten Mutationen	86
Abbildung 4-16: Übertragung der Phosphorylierungspositionen auf die 3D-Struktur des PDZ2-Homodimers (PDB-File „2JWE“)	86
Abbildung 4-17: Beispiel für die Ni ²⁺ -NTA-Spin Aufreinigung der Phosphorylierungsmutanten T188E und S192E der PDZ2- und MUT2-Konstrukte und Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE	87
Abbildung 4-18: Darstellung der einzelnen SEC-Experimente des Großteils der Phosphorylierungsmutanten (A) PDZ2-basiert, (B) MUT2-basiert	88
Abbildung 4-19: Aminosäuresequenz Alignment der GTPasen H-Ras und Rap1A.....	89
Abbildung 4-20: Expressionstest der unterschiedlichen Rap1A Expressionssysteme	90
Abbildung 4-21: Hochsalz-Stufengradient der Rap1A Aufreinigung über eine selbstgepackte Q-Sepharosesäule und SDS-PAGE Kontrolle der Aufreinigung.....	91
Abbildung 4-22: SEC des konzentrierten Rap1A-Proteingemischs über eine Superdex 200pg 26/600 Säule und Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE	92
Abbildung 4-23: Beladungszustände der Rap1A-Proben mittels <i>reversed phase</i> HPLC überprüft	93
Abbildung 4-24: Beladungszustände der H-Ras Proben mittels <i>reversed phase</i> HPLC überprüft.....	94
Abbildung 4-25: Bestimmung der intrinsischen GTP-Hydrolyse Aktivität der GTPasen Rap1A und H-Ras mittels HPLC	96
Abbildung 4-26: SDS-Page der ersten GST-Pulldown-Experimente	97
Abbildung 4-27: SDS-Page der nachfolgenden GST-Pulldown-Experimente	98
Abbildung 4-28: ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektrum des AF6-Konstrukts.....	100
Abbildung 4-29: Neu prozessierte ¹ H- ¹⁵ N-TROSY-Spektrum des AF6-Konstrukts [Steiner, 2001]	101
Abbildung 4-30: Überlagerung des ¹ H- ¹⁵ N-TROSY-Spektrums [Steiner, 2001] und des ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektrums von AF6(1-141)	102
Abbildung 4-31: 600 MHz HSQC-Spektrum des ¹⁵ N/ ¹³ C-PDZ2-Konstruktes.....	103
Abbildung 4-32: Überlagerung der 800 MHz HSQC-Spektren von PDZ2 und MUT2.....	104
Abbildung 4-33: 600 MHz-HSQC-Spektrum des ¹⁵ N/ ¹³ C-MUT2-Konstruktes	105
Abbildung 4-34: CSI 2.0-Graphik der PDZ2 (Wildtyp) Domäne (A) und ihrer künstlich durch GGAA-Insertion erzeugten Mutante (B).....	109
Abbildung 4-35: 3D-Struktur der PDZ2-Domäne (PDB-File „2JWE“) und der monomeren Variante MUT2 (homology model [PDB-File„4OAJ“]) des Zonula occludens 1 Proteins	110
Abbildung 4-36: Übersicht über die Effekte der Monomerisierung mittels GGGA-Insertion auf die einzelnen chemischen Verschiebungen im direkten Vergleich mit der Wildtyp PDZ2-Domäne	110
Abbildung 4-37: Monomerisierungseffekte des MUT2-Konstruktes im direkten Vergleich mit der Wildtyp PDZ2-Domäne, übertragen auf ihre 3D-Strukturen	111
Abbildung 4-38: ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektren der ¹⁵ N-AF6 mit ¹⁴ N-Rap1A[GTP] Titration	113
Abbildung 4-39: Kombinierte ¹ H- und ¹⁵ N- Verschiebungseffekte Δδ der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektrum während der vollständigen Titrationsreihe	114

Abbildung 4-40: Volumen Effekte der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum der Titrationschritte 1:1 und 1:4 (AF6 zu Rap1A[GTP])	115
Abbildung 4-41: Signal Aufspaltungen und verschwinden vieler Signale des ^{15}N -AF6 durch die AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung im ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum der Titrationschritte 1:0,5 bis 1:4 (AF6 zu Rap1A[GTP])	116
Abbildung 4-42: Übertragung der Signalaufspaltungen der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung auf die 3D-Struktur des AF6-Konstruktes (PDB-File „AF6(1-141)“)	117
Abbildung 4-43: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP], Titrationschritt 1:1.	118
Abbildung 4-44: Chemische Verschiebungseffekte $ \Delta\delta $ der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung (1:1) auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum	119
Abbildung 4-45: Effekte der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung (1:1) auf die Volumina der Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum	120
Abbildung 4-46: Übertragung der signifikanten chemischen Verschiebungsänderungen der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung (1:1) auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes	121
Abbildung 4-47: Kombination der chemischen Verschiebung und der Volumenänderungen der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung (1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes....	122
Abbildung 4-48: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche des AF6 mit aktivem Rap1A[GTP] anhand des Kriteriums der Oberflächenzugänglichkeit und der relativen Signalstärke.....	123
Abbildung 4-49: Übertragung der Interaktionsauswertung AF6 mit Rap1A[GTP] (1:1) auf die 3D-Struktur von AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“).....	124
Abbildung 4-50: GTP/GDP-Beladung des Rap1A während der AF6-Rap1A[GTP] Interaktionsmessung.....	125
Abbildung 4-51: Ausschnitt aus den ^1H -Spektren der einzelnen ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP] Titrationschritte	126
Abbildung 4-52: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GDP] Titration.....	127
Abbildung 4-53: Kombinierte ^1H -und ^{15}N -Verschiebungseffekte $ \Delta\delta $ der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum während der vollständigen Titrationsreihe	128
Abbildung 4-54: Volumen Effekte der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum der Titrationschritte 1:1 und 1:2,5 (AF6 zu Rap1A[GDP])	129
Abbildung 4-55: Langsame Austauschprozesse der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum der Titrationschritte 1:0,5 bis 1:2,5 (AF6 zu Rap1A[GDP])	130
Abbildung 4-56: Übertragung der langsamen Austauschprozesse der AF6-Rap1A[GTP]-Komplexbildung auf die auf die 3D-Struktur des AF6-Konstruktes (PDB-File „AF6(1-141)“)	130
Abbildung 4-57: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GDP] Titrationschritt 1:1.....	131
Abbildung 4-58: Chemische Verschiebungseffekte $ \Delta\delta $ der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum.....	132
Abbildung 4-59: Effekte der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung (1:1) auf die Volumina der Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum	133

Abbildung 4-60: Chemische Verschiebungsänderungen der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung (1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes.....	134
Abbildung 4-61: Kombination der chemischen Verschiebung und der Volumenänderungen der AF6-Rap1A[GDP]-Komplexbildung (1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes ..	135
Abbildung 4-62: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche zwischen AF6 und inaktivem Rap1A[GDP] anhand des Kriteriums der Oberflächenzugänglichkeit und der relativen Signalstärke	136
Abbildung 4-63: Übertragung der Interaktionsauswertung AF6 mit Rap1A[GDP] (1:1) auf die 3D-Struktur von AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“).....	137
Abbildung 4-64: GTP/GDP-Beladung des Rap1A, während der AF6- Rap1A[GDP] Titrationsmessung.....	138
Abbildung 4-65: ^1H -Spektren der einzelnen ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GDP] Titrationschritte	138
Abbildung 4-66: ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GppNHp] (1:1).....	140
Abbildung 4-67: ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -H-Ras[GppNHp] (1:1).....	141
Abbildung 4-68: Langsame Austauschprozesse der AF6-Rap1A[GppNHp] und AF6 H-Ras[GppNHp]-Komplexbildung auf die Signale im ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektrum.....	142
Abbildung 4-69: Chemische Verschiebungseffekte der Komplexbildung in ^1H -Ebene	143
Abbildung 4-70: Chemische Verschiebungseffekte der Komplexbildung in ^{15}N -Ebene	144
Abbildung 4-71: Chemische Verschiebungseffekte der Komplexbildung in ^1H und ^{15}N Kombination.....	145
Abbildung 4-72: Relative Volumenänderungen der Komplexbildung.....	146
Abbildung 4-73: Chemische Verschiebungsänderungen der AF6-Rap1A[GppNHp]- und der AF6 H-Ras[GppNHp] Komplexbildung (des molaren Verhältnisses 1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6-Konstruktes.	147
Abbildung 4-74: Kombination der chemischen Verschiebung und der Volumenänderungen der AF6 mit Rap1A[GppNHp] und AF6 mit H-Ras[GppNHp]-Komplexbildung (1:1) übertragen auf die Primärsequenz des AF6 Konstruktes	148
Abbildung 4-75: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche zwischen AF6 und aktivem Rap1A[GppNHp] sowie H-Ras[GppNHp] anhand des Kriteriums der Oberflächenzugänglichkeit und der relativen Signalstärke.	149
Abbildung 4-76: Übertragung der Interaktionsauswertung auf die 3D-Struktur von AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“)	150
Abbildung 4-77: Vergleich der GTP/GDP Konformation der 3D-Struktur des H-Ras	151
Abbildung 4-78: Darstellung verschiedener Kontakte zwischen kleinen GTPasen und ihren Binde/Assoziations-Domänen	152
Abbildung 4-79: Resultat der Dockingexperimente des (A) AF6 mit H-Ras[GppNHp] und (B) AF6 mit Rap1A[GppNHp] von Ralph Elsner 2006 neu dargestellt	153
Abbildung 4-80: Zusammenfassung der Aminosäuren des AF6, die an einer aktiven Komplexbildung mit den GTPasen H-Ras und Rap1A beteiligt sein können.	154
Abbildung 4-81: Übersicht über die Konformationen der Aminosäure A134 des AF6 während den Interaktionsexperimenten mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A	155

Abbildung 4-82: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Langzeit Hydrolysemessung des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -Rap1A[GTP]	156
Abbildung 4-83: Bestimmung der GTP-Hydrolyserate während der Langzeitmessung mittels HPLC.....	156
Abbildung 4-84: Volumenauswertung des Signals der Aminosäure A134 während der AF6-Rap1A[GTP] Titration (A) und der AF6-Rap1A[GDP] Titration (B)	157
Abbildung 4-85: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -PDZ2 im Verhältnis (1:1,5)	158
Abbildung 4-86: Kombinierte chemische Verschiebungseffekte (A) und Volumenänderungen (B) der AF6-PDZ2 Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum.....	159
Abbildung 4-87: Kombination aus chemischer Verschiebung und Volumenänderung der Interaktion des AF6 mit ZO1-PDZ2 übertragen auf die Primärsequenz des AF6	160
Abbildung 4-88: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche der AF6 mit ZO1-PDZ2 Interaktion anhand des Kriteriums der Oberflächenzugänglichkeit und der relativen Signalstärke.....	161
Abbildung 4-89: Übertragung der Interaktionsauswertung des AF6 mit ZO1-PDZ2 auf die 3D-Struktur von AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“).....	162
Abbildung 4-90: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -AF6 mit ^{14}N -MUT2 im Verhältnis (1:1,5).....	163
Abbildung 4-91: Kombinierte chemische Verschiebungseffekte (A) und Volumenänderungen (B) der AF6- MUT2 Komplexbildung auf die Signale des AF6 im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum.....	164
Abbildung 4-92: Kombination aus chemischer Verschiebung und Volumenänderung der Interaktion des AF6 mit ZO1-MUT2 übertragen auf die Primärsequenz des AF6.....	165
Abbildung 4-93: Eingrenzung der aktiven Interaktionsfläche des AF6 durch MUT2-Interaktion	166
Abbildung 4-94: Übertragung der Interaktionsauswertung auf die 3D-Struktur des AF6 (PDB-File „AF6(1-141)“)	167
Abbildung 5-1: 3D-Strukturen der 5 verschiedenen Unterfamilien des „Ubiquitin-Superfold“	169
Abbildung 5-2: Direkter Vergleich der Ras-assoziiierenden-Domänen.(A) AF6-RA1 („AF6(1-141)“) und (B) RaIGDS („1LFD“)	169
Abbildung 5-3: Resultat der Interaktionsstudien des AF6 mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A, von Seiten des AF6-Konstruktes.....	176
Abbildung 5-4: Darstellung der aktiven Interaktionsfläche der Afadin 6 RA1-Domäne mit H-Ras	177
Abbildung 5-5: Übersicht über die Aminosäuren der Interaktionsfläche von AF6 mit H-Ras[GppNHp].....	178
Abbildung 5-6: Übersicht über den Bindebereich des AF6-Konstruktes mit H-Ras[GppNHp]	179
Abbildung 5-7: Charakteristischer Unterschied der Primärsequenzen zwischen den beiden GTPasen Rap1A und H-Ras	180
Abbildung 5-8: Übereinstimmungen der Interaktionsflächen des AF6-RA1 mit den drei verschiedenen Rap1A- Komplexe [GppNHp/GTP/GDP].	181
Abbildung 5-9: Der aktive Bindebereich des AF6-Rap1A-Komplexes basierend auf „af6_rap_12_8_100.pdb“ [Elsner, 2006]	181
Abbildung 5-10: Übersicht über die Aminosäuren der Interaktionsfläche AF6 mit Rap1A	182
Abbildung 5-11: Übersicht über den Bindebereich des AF6-Konstruktes mit Rap1A	183

Abbildung 5-12: Darstellung der unterschiedlichen Orientierung der GTPasen H-Ras und Rap1A an die RA1-Domäne des AF6	185
Abbildung 5-13: Vergleich der aktiven Bindebereiche des AF6 der Komplexe des AF6 mit (A) ZO1-MUT2, (B) AF6 mit Rap1A[Zusammenfassung](siehe Abb. 5-8) und (C) AF6 mit ZO1-PDZ2	187
Abbildung 5-14: Übereinstimmungen der AF6-Rap1A und AF6- ZO1-PDZ2 Komplexe.	188
Abbildung 5-15: Kristallstruktur des ZO1-PDZ2 Homodimers (PDB-File „3CYY“).....	189
Abbildung 5-16: Darstellung der Interaktionsfläche zwischen ZO1-PDZ2 und Connexin43 (A) und der möglichen Interaktionsfläche zwischen AF6-RA1 und ZO1-PDZ2 (B).....	190
Abbildung 5-17: Die 3D-Struktur des PDZ2-Homodimers im Komplex mit dem C-Terminus des Connexin43 ...	191
Abbildung 5-18: Übertragung der Ergebnisse der Interaktionsstudien zwischen AF6-RA1 und ZO1-PDZ2 auf die 3D-Struktur des ZO1-PDZ2 Homodimers und direkter Vergleich mit dem Komplex aus ZO1-PDZ2 und Connexin43	191

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Affinitäten des AF6 gegenüber den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A und Mutationen dieser	21
Tabelle 2-1: Verwendete Geräte	23
Tabelle 2-2: Molekularbiologische Kits	24
Tabelle 2-3: Säulenmaterial	24
Tabelle 2-4: Einwegmaterialien.....	24
Tabelle 2-5: Molekulargewichtsstandards	25
Tabelle 2-6: Enzyme	25
Tabelle 2-7: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.....	28
Tabelle 2-8: Übersicht über verwendete Programme und bioinformatische Tools.....	30
Tabelle 3-1: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele.....	38
Tabelle 3-2: SDS-PAGE Lösungen	38
Tabelle 3-3: Standard SDS-Färbelösungen	38
Tabelle 3-4:Lösungen für Minimalmedium nach Neidhardt	41
Tabelle 3-5: Zusammensetzung Minimalmedium nach Neidhardt.....	41
Tabelle 3-6: Lösungen für Neues Minimalmedium	41
Tabelle 3-7: Zusammensetzung Neues Minimalmedium.....	42
Tabelle 3-8: GST-Puffer	45
Tabelle 3-9: His ₆ -Puffer	46
Tabelle 3-10: Rap1A Puffer	47
Tabelle 3-11: Übersicht über verwendeten Ionenaustauscher.....	47
Tabelle 3-12: Lösungen für Western Blot.....	52
Tabelle 3-13: Übersicht über die wichtigsten Kerne und Isotope der NMR	59
Tabelle 3-14: Probenzusammensetzung	64
Tabelle 4-1: Übersicht über die hergestellten ZO1 Konstrukte.....	81

Tabelle 4-2: Übersicht über die erfolgreich durchgeführten Phosphorylierungsmutationen	87
Tabelle 4-3: Detaillierte Übersicht der Nukleotid-Beladungszustände der Rap1A-Proben	94
Tabelle 4-4: Detaillierte Übersicht der Nukleotid-Beladungszustände der H-Ras-Proben.....	95
Tabelle 4-5: Die chemischen Verschiebungen der sequentiellen Zuordnungen des PDZ2- und MUT2-Konstruktes	105
Tabelle 4-6: Auswertung der Linienbreite der PDZ2- und MUT2-Spektren (Abb.4-33)	108
Tabelle 4-7: Übersicht über geänderte Prozessierungsparameter der TROSY-Spektren.....	142
Tabelle 5-1: Vergleich des Connexin-Bindemotivs der ZO1-PDZ2 Domäne mit dem C-terminalen Ende des Connexin43 und der Schleifenregion der Interaktionsstudie AF6-PDZ2 vs. AF6-Rap1A	189

Literaturverzeichnis

[Arozarena, 2011] Imanola Arozarena, Fernando Calvo, Piero Crespo (2011): „**Ras, an Actor on Many Stages: Posttranslational Modifications, Localization, and Site-Specified Events**“, Genes & Cancer, 2(3) 182–194.

[Avila-Flores, 2001] Avila-Flores A, Rendón-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, González-Mariscal L. (2001) : „**Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C**“, Biochem. J. 360, 295-304.

[Balda, 1996] Maria S. Balda, James M. Anderson, Karl Matter (1996) : „ **The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain**“, FEBS Letters 399, 326-332.

[Balda, 2000] Maria S. Balda, Karl Matter (2000) : „ **The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression**“, The EMBO journal Vol.19 No.9, 2024-2033.

[Banks, 2012] Lawrence Banks, David Pim, Miranda Thomas (2012) : „ **Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer**“, Nat Rev Cancer 12(12)/877-886.

[Bauer, 2010] Bauer H, Zweimueller-Mayer J, Steinbacher P, Lametschwandtner A, Bauer HC. (2010) : „**The dual role of zonula occludens (ZO) proteins**“, J. Biomed Biotechnol. Vol.2010 ID.402593

[Bäumel, 2008] Gerald Bäumel Dissertation (2008) : „**Interaktion des humanen Tight Junction Proteins ZO-1 mit dem Ras-Effektor AF6 und Untersuchung am Zellwandprotein Aga2 von *Saccharomyces cerevisiae***“ Universität Regensburg NWF III

[Boettner, 2009] Benjamin Boettner, Linda Van Aelst (2009) : „**Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling**“ Current Opinion in Cell Biology 2009, Vol.21, 684-693

[Braekeleer, 2010] De Braekeleer E, Meyer C, Le Bris MJ, Douet-Guilbert N, Basinko A, Morel F, Berthou C, Marchalek R, Férec C, De Braekeleer M. (2010) : „**Identification of a MLL-MLLT4 fusion gene resulting from a t(6;11)(q27;q23) presenting as a del(11q) in a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia**“ Leukemia & Lymphoma 51(8), 1570-1573

[Candiano, 2004] Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. (2004) : „ **Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis**“ Electrophoresis 25, 1327-1333

[Canel, 2013] Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. (2013) : „**E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis**“ Journal of Cell Science 126, 393-401

[Capaldo, 2011] Capaldo CT, Koch S, Kwon M, Laur O, Parkos CA, Nusrat A. (2011) : „ **Tight junction zonula occludens-3 regulates cyclin D1-dependent cell proliferation**“ Molecular biology of the cell 15;22(10), 1677-1685

- [Caron, 2000] Emmanuelle Caron, Annette J. Self, Alan Hall (2000) : „**The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin α M β 2 by LPS and other inflammatory mediators**“ Current biology 10(16), 974-978
- [Chen, 2006] Chen VC, Li X, Perreault H, Nagy JI. (2006) : „**Interaction of Zonula Occludens-1 (ZO-1) with α -Actinin-4: Application of functional Proteomics for Identification of PDZ Domain-Associated Proteins**“ Journal of proteome research 5(9), 2123-2134
- [Chen, 2008] Chen J, Pan L, Wei Z, Zhao Y, Zhang M. (2008) : „**Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites**“ The EMBO journal 27, 2113-2123 and supplementary data
- [Citi, 2011] Citi S, Spadaro D, Schneider Y, Stutz J, Pulimeno P. (2011) : „**Regulation of small GTPases at epithelial cell-cell junctions**“ Molecular Membrane Biology 28(7-8), 427-444
- [Crittenden, 2004] Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM. (2004) : „**CalDAG-GEFI integrates for platelet aggregation and thrombus formation**“ Nature Medicine 10(9), 982-986
- [Dejana, 2004] Elisabetta Dejana (2004) : „**Endothelial Cell-Cell Junctions: Happy Together**“ Nature reviews. Molecular cell biology 5(4), 261-270
- [Ebnet, 2004] Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. (2004) : „**Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?**“ Journal of cell science 117, 19-29
- [Elsner, 2006] Ralph Elsner Dissertation (2006) : „**NMR-basierte Aufklärung der Strukturen von Ras-Bindedomänen und ihrer Wechselwirkungen mit den kleinen GTPasen H-Ras und Rap1A**“ Universität Regensburg NWF III
- [Fanning, 2002] Alan S. Fanning, Thomas Y. Ma, James Melvin Anderson (2002) : „**Isolation and functional characterization of the actin-binding region in the tight junction protein ZO-1**“ the FASEB journal 16(13), 1835-1857
- [Field, 2005] Field SJ, Madson N, Kerr ML, Galbraith KA, Kennedy CE, Tahiliani M, Wilkins A, Cantley LC. (2005) : „**PtdIns(4,5)P₂ Functions at the Cleavage Furrow during Cytokinesis**“ Current biology Vol.15, 1407-1412
- [Fogh, 2014] Betina S. Fogh, Hinke A.B. Multhaupt, John R. Couchman (2014) : „**Protein Kinase C, Focal Adhesion and the Regulation of Cell Migration**“ Journal Histochem Cytochem 62(3), 172-184
- [Fournier, 2011] Fournier G, Cabaud O, Josselin E, Chaix A, Adélaïde J, Isnardon D, Restouin A, Castellano R, Dubreuil P, Chaffanet M, Birnbaum D, Lopez M. (2011) : „**Loss of AF6/afadin, a marker of poor outcome in breast cancer, induces cell migration, invasiveness and tumor growth**“ Oncogene 30, 3862-3874
- [Frische 2010] E.W. Frische, F.J.T. Zwartkruis (2010) : „**Rap1, a mercenary among the Ras-like GTPases**“ Developmental biology 340(1), 1-9
- [Garmy-Susini, 2010] Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, Foubert P, Ellies LG, Barnes L, Feral C, Papanayannopoulou T, Lowy A, Blair SL, Cheresch D, Ginsberg M, Varner JA. (2010) : „**Intergrin α 4 β 1 signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis**“ cancer research 70(8), 3042-3052
- [Giepmans, 2004] Ben N.G. Giepmans (2004) : „**Gap junctions and connexin-interacting proteins**“ cardiovascular research 62(2), 233-245
- [Gonzalez-Mariscal, 1999] González-Mariscal L, Islas S, Contreras RG, García-Villegas MR, Betanzos A, Vega J, Díaz-Quiñónez A, Martín-Orozco N, Ortiz-Navarrete V, Cereijido M, Valdés J. (1999) : „**Molecular Characterization of the Tight Junction Protein ZO-1 in MDCK Cells**“ Experimental cell research 248(1), 97-109

- [Gonzalez-Mariscal, 2002] Islas S, Vega J, Ponce L, González-Mariscal L. (2002) : „**Nuclear Localization of the Tight junction Protein ZO-2 in Epithelial Cells**“ *Experimental Cell Research* 274(1), 138-148
- [Gonzalez-Mariscal, 2003] González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. (2003) : „**Tight junction proteins**“ *Prog Biophys Mol Biol* 81(1), 1-44
- [Gonzalez-Mariscal, 2004] Jaramillo BE, Ponce A, Moreno J, Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Gonzalez-Mariscal L. (2004) : „**Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells**“ *Experimental cell research* 297(1), 247-258
- [Gonzalez-Mariscal, 2006] González-Mariscal L, Ponce A, Alarcón L, Jaramillo BE. (2006) : „**The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals**“ *Experimental cell research* 312(17), 3323-3335
- [Gonzalez-Mariscal, 2009] Chamorro D, Alarcón L, Ponce A, Tapia R, González-Aguilar H, Robles-Flores M, Mejía-Castillo T, Segovia J, Bandala Y, Juaristi E, González-Mariscal L. (2009) : „**Phosphorylation of Zonula occludens-2 by Protein Kinase C ϵ Regulates Its Nuclear Exportation**“ *Molecular biology of the cell* Vol.20, 4120-4129
- [Gonzalez-Mariscal, 2014] González-Mariscal L, Domínguez-Calderón A, Raya-Sandino A, Ortega-Olvera JM, Vargas-Sierra O, Martínez-Revollar G. (2014) : „**Tight Junctions and the Regulation of Gene Expression**“ *Semin Cell Dev Biol* 36, 213-223
- [Günzel, 2013] Dorothee Günzel, Alan S.L.Yu (2013) : „**Claudins and the modulation of the tight junction permeability**“ *Physiological reviews* 93(2), 525-569
- [Hämälistö, 2013] Hämälistö S, Pouwels J, de Franceschi N, Saari M, Ivarsson Y, Zimmermann P, Brech A, Stenmark H, Ivaska J. (2013) : „**A ZO-1/ α 5 β 1-Integrin Complex Regulates Cytokinesis Downstream of PKC ϵ in NCI-H460 Cells plated on Fibronectin**“ *PLoS one* 8(8), e70696
- [Hogan, 2004] Hogan C, Serpente N, Cogram P, Hosking CR, Bialucha CU, Feller SM, Braga VM, Birchmeier W, Fujita Y. (2004) : „**Rap1 Regulates the Formation of E-Cadherin-Based Cell-Cell contacts**“ *Molecular and Cellular Biology* Vol24, No15, 6690-6700
- [Huo, 2011] Huo L, Wen W, Wang R, Kam C, Xia J, Feng W, Zhang M. (2011) : „**Cdc42-dependent formation of the ZO-1/MRCK β complex at the leading edge controls cell migration**“ *The EMBO journal* 30, 665-678
- [Itho, 1999] Masahiko Itho, Kazumasa Morita, Shiochiro Tsukita (1999) : „**Characterization of ZO-2 as a MAGUK Family Member Associated with Tight as well as Adherens Junctions with a Binding Affinity to Occludin and α Catenin**“ *J Biol Chem* 274(9), 5981-5986
- [Itho, 2001] Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. (2001) : „**Junctional adhesion molecules (JAM) binds PAR-2: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions**“ *J Cell Biol* 154(3), 491-497
- [Kiel, 2004] Christina Kiel, Luis Serrano, Christian Herrmann (2004) : „**A Detailed Thermodynamic Analysis of Ras/Effector Complex Interfaces**“ *J Mol Biol* 340(5), 1039-1058
- [Kiel, 2005] Kiel C, Wohlgemuth S, Rousseau F, Schymkowitz J, Ferkinghoff-Borg J, Wittinghofer F, Serrano L. (2005) : „**Recognizing and Defining True Ras Binding Domains II: *In Silico* Prediction Based on Homology Modelling and Energy Calculations**“ *J Mol Biol* 348(3), 759-75
- [Kiel, 2006] Christina Kiel, Luis Serrano (2006) : „**The Ubiquitin Domain Superfold: Structure-based Sequence Alignments and Characterization of Binding Epitopes**“ *J Mol Biol* 355(4), 821-844
- [Kim, 2009] Kim WI, Matise I, Diers MD, Largaespada DA. (2009) : „**RAS oncogene suppression induces apoptosis followed by more differentiated and less myelosuppressive disease upon relapse of acute myeloid leukemia**“ *Blood* 113(5), 1086-1096

- [Kimmelman, 2015] Alec C. Kimmelman (2015) : „**Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers**“ Clin Cancer Res 21(8), 1828-1834
- [Komura, 2008] Komura H, Ogita H, Ikeda W, Mizoguchi A, Miyoshi J, Takai Y. (2008) : „**Establishment of cell polarity by afadin during the formation of embryoid bodies**“ Genes Cells 13(1), 79-90
- [Lee, 2010] Ho-Jin Lee, Jie J Zhend (2010) : „**PDZ domains and their binding partners: structure, specificity and modification**“ Cell commun Signal 8:8
- [Li, 2012] X.Li, B.D.Lynn, J.I.Nagy (2012) : „**The effector and scaffolding proteins AF6 and MUPP1 interact with connexin36 and localize at gap junctions that form electrical synapses in rodent brain**“ Eur J Neurosci 35(2), 166-168
- [Linnemann, 1999] Thomas Linnemann Dissertation (1999) : „**Funktionelle Analyse der Spezifität von AF6 und RaIGDS zu Mitgliedern der Ras-Subfamilie**“ Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum
- [Linnemann, 1999] Linnemann T, Geyer M, Jaitner BK, Block C, Kalbitzer HR, Wittinghofer A, Herrmann C. (1999) : „**Thermodynamic and kinetic characterization of the interaction between the Ras binding domain of AF6 and members of the Ras subfamilie**“ J Biol Chem 274(19), 13556-13562
- [Lodish, 2007] Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Anthony Bretscher (2007) : „**Molecular Cell Biology 6th Edition**“ W.H. Freeman and Company ISBN: 1429203145
- [Lottspeich, 2006] Friedrich Lottspeich, Joachim W. Engels, Solodkoff Zettlmeier Lay (2006) : „**Bioanalytik**“ ISBN: 9783827415202
- [Maiers, 2013] Maiers JL, Peng X, Fanning AS, DeMali KA. (2013) : „**ZO-1 recruitment to α -catenin a novel mechanism for coupling the assembly of tight junctions to adherens junctions**“ J Cell Sci 126(17), 3904-3915
- [Manara, 2014] Manara E, Baron E, Tregnago C, Aveic S, Bisio V, Bresolin S, Masetti R, Locatelli F, Basso G, Pigazzi M. (2014) : „**MLL-AF6 fusion oncogene sequesters AF6 into the nucleus to trigger Ras activation in myeloid leukemia**“ Blood 124(2), 263-272
- [Mandai, 1997] Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, Obaishi H, Wada M, Nishioka H, Itoh M, Mizoguchi A, Aoki T, Fujimoto T, Matsuda Y, Tsukita S, Takai Y. (1997) . „**Afadin: A Novel Actin Filament-binding Protein with one PDZ Domain localized at Cadherin-based Cell-to-Cell Adherens Junctions**“ J Cell Biol 139(2), 517-528
- [McCann, 2012] McCann JJ, Zheng L, Rohrbeck D, Felekyan S, Kühnemuth R, Sutton RB, Seidel CA, Bowen ME. (2012) : „**Supertertiary structure of the synaptic MAGuK scaffold proteins is conserved**“ Proc Natl Acad Sci USA 109(39), 15775-15780
- [Meerschaert, 2009] Meerschaert K, Tun MP, Remue E, De Ganck A, Boucherie C, Vanloo B, Degeest G, Vandekerckhove J, Zimmermann P, Bhardwaj N, Lu H, Cho W, Gettemans J. (2009) : „**The PDZ2 domain of zonula occludens 1 and 2 is a phosphositide binding protein**“ Cell Mol Life Sci 66(24), 3951-3966
- [Mege, 2006] Rene-Marc Mege, Julie Gavard, Mireille Lambert (2006) : „**Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton**“ Curr Opin Cell Biol 18(5), 541-548
- [Meng, 2009] Wenxiang Meng, Masatoshi Takeichi (2009) : „**Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation**“ Cold Spring Harb Perspect Biol 1(6), a002899

[Meyer, 2013] Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, Pombo de Oliveira M, Renneville A, Villarese P, Macintyre E, Cavé H, Clappier E, Mass-Malo K, Zuna J, Trka J, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Oh SH, Tsaur G, Fechina L, van der Velden VH, van Dongen JJ, Delabesse E, Binato R, Silva ML, Kustanovich A, Aleinikova O, Harris MH, Lund-Aho T, Juvonen V, Heidenreich O, Vormoor J, Choi WW, Jarosova M, Kolenova A, Bueno C, Menendez P, Wehner S, Eckert C, Talmant P, Tondeur S, Lippert E, Launay E, Henry C, Ballerini P, Lapillone H, Callanan MB, Cayuela JM, Herbaux C, Cazzaniga G, Kakadiya PM, Bohlander S, Ahlmann M, Choi JR, Gameiro P, Lee DS, Krauter J, Cornillet-Lefebvre P, Te Kronnie G, Schäfer BW, Kubetzko S, Alonso CN, zur Stadt U, Sutton R, Venn NC, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Madsen HO, Archer P, Hancock J, Cerveira N, Teixeira MR, Lo Nigro L, Möricke A, Stanulla M, Schrappe M, Sedék L, Szczepański T, Zwaan CM, Coenen EA, van den Heuvel-Eibrink MM, Strehl S, Dworzak M, Panzer-Grümayer R, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. (2013) : „**The MLL recombinome of acute leukemias in 2013**“ *Leukemia* 27(11), 2165-2176

[Nature protocol, 2004] J. Sambrook, DW Russell (2004) : „**Detection of Protein-Protein interactions Using the GST Fusion Protein Pulldown Technique**“ *CSH Protoc* 2004(1)

[Nature protocol, 2006] TN. Nguyen, JA. Goodrich (2006) : „**Protein-Protein interaction assays: eliminating false positive interactions**“ *Nat. Methods* 3(2), 135-139

[Neunlist, 2012] Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M. (2012) : „**The digestive neuronal-gial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease**“ *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10(2), 90-100

[Niessen, 2007] Carien M. Niessen (2007) : „**Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function**“ *J Invest Dermatol* 127(11), 2525-2532

[Ogita, 2010] Ogita H, Rikitake Y, Miyoshi J, Takai Y. (2010) : „**Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology**“ *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86(6), 621-629

[Ooshio, 2010] Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, Miyata M, Fukumoto Y, Matsuzawa N, Ogita H, Takai Y.. (2010) : „**Involvement of the Interaction of Afadin with ZO-1 in the Formation of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Cells**“ *J Biol Chem* 285(7), 5003-5012

[Owen, 2015] Darcia Owen, Helene R.Mott (2015) : „**Structures of Ras superfamily effector complexes: What have we learnt in two decades?**“ *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50(2), 85-133

[Pai, 1989] Wittinghofer A, Franken SM, Scheidig AJ, Rensland H, Lautwein A, Pai EF, Goody RS. (1989) : „**Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the H-Ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation**“ *Nature* 341(6239), 209-214

[Pascal, 2008] Steven M. Pascal (2008) : „**NMR primer: An HSQC-based approach**“ ISBN: 9781901019087

[Penkert, 2004] Rhiannon R. Penkert, Heather M DiVittorio, Kenneth E.Prehoda (2004) : „**Internal Recognition Through PDZ Domain Plasticity in the Par 6 -Pals 1 Complex**“ *Nat Struct Mol Biol* 11(11), 1122-1127

[Pigazzi, 2011] Pigazzi M, Masetti R, Bresolin S, Beghin A, Di Meglio A, Gelain S, Trentin L, Baron E, Giordan M, Zangrando A, Buldini B, Leszl A, Putti MC, Rizzari C, Locatelli F, Pession A, Te Kronnie G, Basso G. (2011) : „**MLL partner genes drive distinct gene expression profiles and genomic alterations in pediatric acute myeloid leukemia: an AIEOP study**“ *Leukemia* 25(3), 560-563

[Pokutta, 2002] Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ, Weis WI. (2002) : „**Biochemical and Structural Definition of the I-Afadin and Actin-binding Sites of α -catenin**“ *J Biol Chem* 277(21), 18868-18874

[Sakamoto, 2008] Sakamoto Y, Ogita H, Komura H, Takai Y. (2008) : „**Involvement of Nectin in Inactivation of Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ after the establishment of cell-cell adhesion**“ *J Biol Chem* 283(1), 496-505

- [Saksela, 2012] K. Saksela, P. Permi (2012) : „**SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity?**“ FEBS Lett 586(17), 2609-2614
- [Sato, 2006] Sato T, Fujita N, Yamada A, Ooshio T, Okamoto R, Irie K, Takai Y. (2006) : „**Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells.**“ J Biol Chem 281(8), 5288-5299
- [Schwamborn, 2004] Jens C. Schwamborn, Andreas W. Püschel (2004) : „**The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity**“ Nat Neurosci 7(9), 923-929
- [Sever, 2015] Richard Sever, Joan S. Brugge (2015) : „**Signal Transduction in Cancer**“ Cold Spring Harb Perspect Med 5(4), a006098
- [Severson, 2009] Severson EA, Lee WY, Capaldo CT, Nusrat A, Parkos CA. (2009) : „**Junctional Adhesion Molecule A Interacts with Afadin and PDZ-GEF2 to Activate Rap1A, Regulate β 1 Integrin Levels and Enhance Cell Migration**“ Mol Biol Cell 20(7), 1916-1925
- [Shaw, 2009] Andrey S. Shaw, Erin L. Filbert (2009) : „**Scaffold proteins and immune-cell signalling**“ Nat Rev Immunol 9(1), 47-56
- [Shin, 2006] Kunyoo Shin, Vanessa C. Fogg, Ben Margolis (2006) : „**Tight Junctions and Cell Polarity**“ Annu Rev Cell Dev Biol 22, 207-235
- [Spörner, 2014] Rosnizeck IC, Filchtinski D, Lopes RP, Kieninger B, Herrmann C, Kalbitzer HR, Spoerner M. (2014) : „**Elucidating the mode of action of a typical Ras state 1(T) inhibitor**“ Biochemistry 53(24), 3867-78
- [Steiner, 2001] Guido Steiner Dissertation (2001) : „**NMR-Untersuchungen zur Struktur und Dynamik kleiner GTPasen und ihrer Effektoren**“ NWF III Regensburg
- [Steiner, 2000] Steiner G, Kremer W, Linnemann T, Herrmann C, Geyer M, Kalbitzer HR. (2000) : „**Sequence-specific resonance assignment of the Ras-binding domain of AF6**“ J Biomol NMR 18(1), 73-74
- [Su, 2003] Su L, Hattori M, Moriyama M, Murata N, Harazaki M, Kaibuchi K, Minato N. (2003) : „**AF-6 Controls Integrin-mediated Cell Adhesion by Regulating Rap1 Activation through the Specific Recruitment of Rap1GTP and SPA-1**“ J Biol Chem 278(17), 15232-15238
- [Takagi, 2002] Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. (2002) : „**Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-In and Inside-Out Signaling**“ Cell 110(5), 599-611
- [Takai, 2001] Yoshimi Takai, Takuya Sasaki, Takashi Matozaki (2001) : „**Small GTP-Binding Proteins**“ Physiol Rev 81(1), 153-208
- [Takai, 2003] Yoshimi Takai, Hiroyuki Nakanishi (2003) : „**Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions**“ J Cell Sci 116(1), 17-27
- [Takai, 2007] Jun Miyoshi, Yoshimi Takai (2007) : „**Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton**“ Biochim Biophys Acta 1778(3), 670-91
- [Tanaka-Okamoto, 2011] Tanaka-Okamoto M, Hori K, Ishizaki H, Itoh Y, Onishi S, Yonemura S, Takai Y, Miyoshi J. (2011) : „**Involvement of afadin in barrier function and homeostasis of mouse intestinal epithelia**“ J Cell Sci 124(13), 2231-2240
- [Tanos, 2008] B. Tanos, E. Rodriguez-Boulan (2008) : „**The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer**“ Oncogene 27(55), 6939-6957

- [Tawa, 2010] Tawa H, Rikitake Y, Takahashi M, Amano H, Miyata M, Satomi-Kobayashi S, Kinugasa M, Nagamatsu Y, Majima T, Ogita H, Miyoshi J, Hirata K, Takai Y. (2010) : „**Role of Afadin in Vascular Endothelial Growth Factor-and Sphingosine 1-Phosphate- Induced Angiogenesis**“ *Circ Res* 106(11), 1731-1742
- [Thornton, 1999] Salem GM, Hutchinson EG, Orengo CA, Thornton JM. (1999) : „**Correlation of Observed Fold Frequency with Occurrence of Local Structural Motifs**“ *J Mol Biol* 287(5), 969-981
- [Tsukita, 2014] Sachiko Tsukita, Atsushi Tamura (2014) : „**Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: Advances in the field of barrierology revealed in knockout mice**“ *Semin Cell Dev Biol* 36, 177-185
- [Van Itallie, 2013] Van Itallie CM, Aponte A, Tietgens AJ, Gucek M, Fredriksson K, Anderson JM. (2013) : „**The N and C Termini of ZO-1 Are Surrounded by Distinct Proteins and Functional Protein Networks**“ *J Biol Chem* 288(19), 13775-13788
- [Vaynberg, 2005] Vaynberg J, Fukuda T, Chen K, Vinogradova O, Velyvis A, Tu Y, Ng L, Wu C, Qin J. (2005) : „**Structure of an Ultraweak Protein-Protein Complex and its Crucial Role in Regulation of Cell Morphology and Motility**“ *Mol Cell* 17(4), 513-523
- [Vaynberg, 2006] Julia Vaynberg, Jun Qin (2006) : „**Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy**“ *Trends Biotechnol* 24(1), 22-27
- [Vetter, 2011] Alfred Wittinghofer, Ingrid R.Vetter (2011) : „**Structure-Function Relationship of the G Domain, a Canonical Switch Motif**“ *Annu Rev Biochem* 80, 943-971
- [Vetter, 2014] Ingrid R.Vetter : „**The Structure of the G Domain of the Ras Superfamily**“ Chapter 2 ISBN: 978-3-7091-1805-4
- [Vogelstein, 2013] Bert Vogelstein et al. (2013) : „**Cancer Genome Landscapes**“ *Science* 339(6127), 1546-1558
- [Wickström, 2011] Sara A. Wickström, Reinhard Fässler (2011) : „**Regulation of membrane traffic by integrin signaling**“ *Trends Cell Biol* 21(5), 266-273
- [Winder, 2009] Winder T, Mündlein A, Rhomberg S, Dirschmid K, Hartmann BL, Knauer M, Drexel H, Wenzl E, De Vries A, Lang A. (2009) : „**Different types of K-Ras mutations are conversely associated with overall survival in patients with colorectal cancer**“ *Oncol Rep* 21(5), 1283-1287
- [Wissmueller, 2011] Wissmueller S, Font J, Liew CW, Cram E, Schroeder T, Turner J, Crossley M, Mackay JP, Matthews JM. (2011) : „**Protein-protein interactions: Analysis of a false positive GST pulldown result**“ *Proteins* 79(8), 2365-2371
- [Wittchen, 1999] Erika S. Wittchen, Julie Haskins, Bruce R.Stevenson (1999) : „**Protein interactions at the Tight Junction. Actin has multiple binding partners, and ZO1 forms independent complexes with ZO2 and ZO3**“ *J Biol Chem* 274(49), 35179-35185
- [Wittinghofer, 2001] Alfred Wittinghofer, Ingrid R.Vetter (2001) : „**The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions**“ *Science* 294(5545), 1299-1304
- [Yamamoto, 1997] Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, Mizoguchi A, Ide C, Kaibuchi K. (1997) : „**The Ras Target AF-6 Interacts with ZO-1 and Serves as a Peripheral Component of Tight Junctions in Epithelial Cells**“ *J Cell Biol* 139(3), 785-795
- [Yamamoto, 1999] Yamamoto T, Harada N, Kawano Y, Taya S, Kaibuchi K. (1999) : „**In Vivo Interaction of AF-6 with Activated Ras and ZO-1**“ *Biochem Biophys Res Commun* 259(1), 103-107

[Ye, 2013] Fei Ye, Mingjie Zhang (2013) : „**Structures and target recognition of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures**“ Biochem J 455(1), 1-14

[Yeatman, 2004] Timothy J. Yeatman (2004) : „**A Renaissance For SRC**“ Nat Rev Cancer 4(6), 470-480

[Zemljic-Harpf, 2014] Zemljic-Harpf AE, Godoy JC, Platoshyn O, Asfaw EK, Busija AR, Domenighetti AA, Ross RS. (2014) : „**Vinculin directly binds zonula occludens 1 and is essential for stabilizing connexin 43 containing gap junctions in cardiac myocytes**“ J Cell Sci 127(5), 1104-1116

[Zhang, 2014] Zhang H, Chang YC, Brennan ML, Wu J. (2014) : „**The structure of Rap1 in complex with RIAM reveals specificity determinants and recruitment mechanism**“ J Moll Cell Biol 6(2), 128-139

[Zhu, 2011] Zhu J, Shang Y, Xia C, Wang W, Wen W, Zhang M. (2011) : „**Guanylate kinase domains of the MAGUK family scaffold proteins as specific phospho-protein-binding modules**“ EMBO J 30(24), 4986-4997

[Zimmermann, 2006] Pascale Zimmermann (2006) : „**The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions**“ Biochim Biophys Acta 1761(8), 947-956

Die Abkürzungen der Journale nach dem Titel, erfolgte mittels Pubmed Nomenklatur.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

Chemische Verschiebungen

Tabelle der neu prozessierten TROSY-Messungen [Steiner, 2001]:

^{15}N -AF6(1-141) mit ^{14}N -Rap1A[GppNHp] und ^{14}N -H-Ras[GppNHp]

Aminosäure	AF6 (1-141)		AF6 (1-141) mit Rap1A		AF6 (1-141) mit H-Ras	
	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]
M1						
S2			117,902	8,29291		
A3	127,086	8,42692	127,066	8,43973		
G4	108,758	8,42523	108,758	8,42623	108,759	8,42673
G5	109,721	8,30879	109,731	8,3081	109,733	8,30691
R6	122,328	8,44211	122,328	8,44311	122,34	8,43686
D7	120,15	8,35604	120,13	8,35197	120,162	8,35248
E8	121,034	8,10458	121,044	8,1022	121,045	8,10102
E9	120,763	8,07252	120,813	8,06676	120,764	8,06727
R10	121,696	8,42861	121,636	8,42454	121,697	8,42336
R11	119,508	7,95438	119,478	7,95032	119,479	7,94744
K12	120,01	7,91557	120,01	7,91488	120,031	7,90863
L13	121,485	7,87	121,475	7,87437	121,456	7,86812
A14	121,897	8,7712	121,877	8,7722	121,908	8,77101
D15	119,327	7,84468	119,297	7,83387	119,328	7,83775
I16	123,101	7,81937	123,091	7,81699	123,102	7,81412
I17	124,025	8,39992	124,075	8,40598	124,066	8,40648
H18	120,732	8,66488	120,632	8,6625	120,603	8,66975
H19	118,384	8,11808	118,263	8,12246	118,325	8,12127
W20	124,236	8,52987	124,266	8,5258		
N21	117,049	9,11379	117,009	9,0996		
A22	120,863	7,36202			120,904	7,36689
N23	117,591	7,42952				
R24	118,976	7,10718	118,976	7,13856		
L25	119,428	8,24466	119,418	8,25072	119,63	8,24953
D26	122,328	8,2109	122,479	8,21865	122,621	8,22759
L27						
F28						
E29						
I30						
S31	125,56	9,12392				
Q32	114,861	7,87506	114,901	7,87606	114,842	7,88669
P33						
T34	113,927	8,97372	113,957	8,9629	113,988	8,96341
E35	120,923	9,3315	120,983	9,32406	120,864	9,30937
D36	116,065	7,64385	115,995	7,63979	116,046	7,64029
L37	114,69	8,13496	114,77	8,13089	114,721	8,12802
E38	119,608	7,36033	119,719	7,36808	119,65	7,36183
F39	119,297	7,89363	119,277	7,898	119,278	7,89681
H40	115,443	8,4303	115,282	8,43129	115,344	8,44699
G41	106,871	8,56362	106,861	8,56631	106,852	8,56512
V42	124,697	8,96528	124,637	8,96459		
M43	127,508	8,86908				
R44	123,222	8,54168	123,272	8,54099		
F45	123,302	8,83871	123,322	8,83633		
Y46	121,746	8,84039	121,736	8,83802		
F47	122,298	9,0446	122,328	9,05066		
Q48	128,552	8,54168	128,501	8,53593		
D49	126,785	8,09783	126,765	8,09208		
K50	123,784	8,46405	123,814	8,45998		
A51	122,951	8,24972	122,941	8,24228		
A52	120,251	7,84131	120,261	7,85074		
G53	107,834	8,02526	107,844	8,02795	107,866	8,02845
N54	118,133	7,83118	118,143	7,83387		
F55	120,06	8,45224	120,12	8,44648		
A56	126,594	8,69019	126,554	8,68444		
T57	111,357	8,43198	111,357	8,42623		
K58	122,379	8,62775	122,379	8,622		
C59	121,535	8,61088	121,525	8,60512		
I60	117,38	8,49105	117,37	8,4853		
R61	124,878	8,62606	124,878	8,62875		
V62	130,8	8,82521	130,8	8,83295		
S63	118,976	7,924	118,956	7,93006	118,997	7,95588
S64	122,379	8,91465	122,499	8,9089	122,52	8,92121
T65	109,912	7,65398	109,902	7,64485	109,973	7,64873
A66	127,016	7,29114	127,016	7,2972	126,997	7,29432
T67	113,596	8,87584	113,556	8,88696		
T68	119,648	8,7577	119,668	8,75195	119,81	8,76089
Q69						
D70	120,331	7,42952	120,281	7,4339	120,151	7,43777
V71	121,174	8,24803	121,144	8,24397	121,195	8,20734
I72	121,184	8,63113	121,174	8,62537	121,326	8,60563

Aminosäure	AF6 (1-141)		AF6 (1-141) mit Rap1A		AF6 (1-141) mit H-Ras	
	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]
E73	118,133	7,83118	118,143	7,83387		
T74	116,958	7,69111	116,968	7,69548	116,899	7,72467
L75	121,997	8,45392	121,997	8,4448		
A76	122,178	8,76276	122,148	8,76039		
E77	115,774	7,07512	115,784	7,07612		
K78	117,611	7,65904	117,631	7,65835		
F79	116,547	8,12821	116,557	8,12583		
R80	121,234	7,48859	121,274	7,48284		
P81						
D82	117,601	8,14509	117,621	8,14271		
M83	120,12	7,90038	120,09	7,9115		
R84	121,435	8,2666	121,405	8,26591		
M85	120,08	8,24634	120,07	8,2524		
L86	123,011	8,1569	122,941	8,15114		
S87	115,413	7,95944	115,332	7,95032	115,313	7,94576
S88	117,932	8,44549	117,982	8,43636	117,973	8,44024
P89						
K90	122,921	7,73499	123,001	7,74442	123,012	7,73986
Y91	123,412	8,37292	123,402	8,36548	123,524	8,34066
S92	116,246	9,00072	116,226	8,99497	116,277	8,94147
L93	126,323	9,40576	126,333	9,40338		
Y94	125,059	9,56439	125,018	9,56877		
E95	120	9,04122	119,95	9,03716	119,77	9,00728
V96	126,253	9,14417	126,203	9,13842		
H97	125,882	8,51299	125,601	8,51061		
V98						
S99	110,705	7,6101	110,715	7,60435	110,726	7,59979
G100	110,484	7,34852	110,484	7,33939	110,465	7,33652
E101	117,42	8,41511	117,42	8,41442	117,451	8,40142
R102	122,509	8,96359	122,499	8,95446		
R103	130,378	8,82183	130,338	8,82452	130,339	8,82671
L104	131,713	8,99059	131,693	8,98315	131,755	8,98872
D105	123,242	9,63359	123,202	9,62783	123,183	9,6199
I106	119,709	8,54843	119,628	8,54605	119,459	8,53137
D107	116,978	8,31047	116,918	8,3081		
E108	120,12	7,31645	120,11	7,30563	120,131	7,30951
K109	121,134	8,58725	121,124	8,58149		
P110						
L111	116,808	8,78301	116,808	8,78064	116,829	8,77776
V112	118,564	6,8321	118,564	6,82803		
V113	121,586	7,75693	121,586	7,74611	121,597	7,75843
Q114	117,591	7,37214	117,561	7,37652	117,662	7,37533
L115	120,401	7,80587	120,301	7,80011	120,172	7,77868
N116						
W117	124,005	7,72655	123,965	7,71742	123,956	7,71117
N118						
K119						
D120						
D121						
R122						
E123						
G124	108,657	7,1865				
R125	116,707	7,92063	116,768	7,91656	116,869	7,88669
F126	120,572	9,07835				
V127	124,065	9,31969	124,105	9,30887		
L128	131,643	9,51208	131,633	9,50632		
K129	124,396	9,26906	124,386	9,2633		
N130	120,502	8,89946	120,482	8,88865	120,503	8,90434
E131	126,032	8,86402	125,992	8,85658	125,973	8,85033
N132	118,715	8,07252	118,795	8,07014	118,796	8,06727
D133	121,254	8,00332	121,375	8,03976	121,346	8,02676
A134	124,286	7,8835	124,306	7,88618	124,277	7,90525
I135 trans	122,559	8,01345	122,519	8,00263	122,52	8,00651
I135 cis	119,658	7,67592	119,598	7,66342	119,599	7,66223
P136						
A137	125,159	8,2666	125,159	8,26253	125,16	8,25966
K138	121,646	8,19571	121,646	8,19334	121,647	8,19215
K139	124,296	8,28685	124,306	8,28953	124,287	8,28666
A140	127,267	8,33073	127,277	8,32835	127,268	8,32885
Q141	125,089	7,83962	125,079	7,83556	125,08	7,83437

Zweite Konformationen der neu prozessierten TROSY-Messungen:

Position	AF6 (1-141)		Position	AF6 (1-141) mit Rap1A		Position	AF6 (1-141) mit H-Ras	
	N [ppm]	HN [ppm]		N [ppm]	HN [ppm]		N [ppm]	HN [ppm]
18,2	120,14	8,65644	13,2	121,264	7,89125	18,2	120,202	8,64782
55,2	119,899	8,49611	18,2	120,331	8,65744	40,3	115,333	8,46049
60,2	117,641	8,55518	20,2	124,286	8,65744	41,2	106,842	8,60056
80,2	120,993	7,45821	22,2	120,823	7,36301	63,2	119,027	7,96601
84,2	121,806	8,28685	22,3	120,813	7,35289	71,2	121,165	8,22253
93,2	126,363	9,37538	25,2	119,799	8,24228	74,2	116,899	7,70105
100,2	110,514	7,37214	32,2	115,031	7,91994	74,3	116,899	7,74155
104,2	131,693	8,96191	41,2	106,851	8,61187	88,3	117,893	8,44867
106,2	120,13	8,53999	42,2	124,336	8,85827	104,2	131,725	8,97522
112,2	118,434	6,7764	52,2	120,251	7,82712	105,2	123,163	9,59965
126,2	120,492	9,01422	53,2	108,527	8,0752	114,2	117,662	7,35508
135 cis 2	119,648	7,66411	54,2	118,163	7,92331	117,2	123,936	7,72636
135 trans 2	122,549	8,00501	61,2	124,868	8,61862	117,3	123,936	7,6943
141,2	125,089	7,84975	62,2	130,78	8,81608	133,2	121,376	8,03858
			63,2	118,926	7,95369	135,trans 2	122,52	7,99807
			71,2	120,963	8,18152	135 cis 2	119,599	7,65042
			73,2	118,163	7,92331	141,2	125,08	7,8445
			80,2	120,853	7,44065			
			84,2	121,796	8,27772			
			85,2	119,769	8,21021			
			88,3	117,982	8,4448			
			88,4	118,283	8,44142			
			91,2	123,402	8,29459			
			92,2	116,196	8,93084			
			93,2	126,333	9,38313			
			93,3	126,303	9,30212			
			93,4	126,313	9,28693			
			94,2	124,908	9,63459			
			101,2	117,551	8,41442			
			104,2	131,663	8,97134			
			106,2	119,99	8,54774			
			114,2	117,581	7,36301			
			115,2	119,95	7,79843			
			131,2	125,852	8,81101			
			133,2	121,264	8,00601			
			134,2	124,316	7,92331			
			135 trans 2	122,519	8,00938			
			135 cis 2	119,588	7,65498			
			141,2	125,079	7,84568			

Tabelle ¹⁵N-AF6 mit ¹⁴N-Rap1A[GTP] Titration :

	AF6 [200µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/100µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/200µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/400µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/800µM]	
	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]
AS										
M1										
S2	117,294	8,34278	117,286	8,34367	117,273	8,34695	117,281	8,34787	117,309	8,34306
A3	126,455	8,54813	126,447	8,54902	126,448	8,54791	126,456	8,55029	126,45	8,54988
G4	108,221	8,5188	108,214	8,51969	108,214	8,52004	108,208	8,52095	108,216	8,52348
G5	109,233	8,37798	109,232	8,37741	109,24	8,37776	109,241	8,37867	109,242	8,37826
R6	121,84	8,51146	121,833	8,51089	121,84	8,51124	121,827	8,51215	121,842	8,51174
D7	119,659	8,43079	119,652	8,43021	119,652	8,4291	119,626	8,42707	119,641	8,42814
E8	120,589	8,16823	120,588	8,16912	120,609	8,168	120,624	8,16745	120,666	8,16851
E9	120,199	8,15209	120,199	8,15152	120,22	8,14893	120,275	8,14691	120,27	8,15091
R10	121,231	8,49826	121,21	8,49769	121,204	8,49657	121,13	8,49455	121,117	8,49121
R11	118,955	8,03914	118,948	8,03857	118,955	8,03599	118,894	8,00903	118,868	8,00129
K12	119,543	8,00688	119,563	7,9975	119,543	8,00518	119,544	8,0061	119,586	8,01449
L13	121,047	7,93793	121,04	7,93736	121,04	7,93624	121,041	7,94302	121,117	7,94262
A14	121,389	8,86497	121,402	8,86439	121,409	8,86328	121,403	8,87006	121,391	8,86965
D15	118,804	7,90566	118,804	7,90509	118,804	7,90544	118,737	7,89755	118,67	7,90301
I16	122,674	7,88806	122,667	7,88602	122,674	7,88637	122,627	7,87995	122,642	7,86928
I17	123,46	8,48653	123,467	8,48595	123,447	8,48483	123,509	8,48428		
H18	119,953	8,74615	119,953	8,74558	119,953	8,743	119,913	8,74097		
H19	117,608	8,21223	117,628	8,21165	117,622	8,2076				
W20	123,754	8,5804	123,754	8,5813	123,747	8,57724				
N21	116,295	9,17887	116,384	9,17683						
A22	120,254	7,44948								
N23	117,198	7,49789								
R24	118,422	7,23973								
L25	118,832	8,33251	118,804	8,33487	118,825	8,33228				
D26	121,867	8,27237	121,853	8,27033	121,874	8,27801	121,957	8,28039	121,965	8,28439
L27										
F28										
E29										

	AF6 [200µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/100µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/200µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/400µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/800µM]	
	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]
A5										
I30										
S31	125,06	9,18767	125,012	9,18709						
Q32	114,306	7,9614	114,312	7,96083	114,299	7,96118	114,334	7,97383	114,294	7,97342
P33										
T34	113,369	9,00432	113,376	9,00667	113,424	8,99529				
E35	120,445	9,40036	120,438	9,40858	120,425	9,4016				
D36	115,523	7,72084	115,522	7,71734	115,509	7,71769	115,489	7,7098	115,415	7,71086
L37	114,21	8,21223	114,21	8,21312	114,21	8,21347	114,334	8,20852	114,342	8,21105
E38	119,31	7,44655	119,31	7,44597	119,31	7,44486				
F39	118,757	7,96287	118,742	7,9667	118,736	7,96851	118,73	7,96942		
H40	114,559	8,51	114,558	8,51382	114,579	8,5127	114,471	8,50188		
G41	106,245	8,63321	106,238	8,63263	106,245	8,63298	106,226	8,62803		
V42	124,144	9,08646	124,143	9,08882	124,199	9,0877				
M43	127,022	8,96178								
R44	122,804	8,64934	122,838	8,64877						
F45	122,811	8,92511	122,817	8,92307	122,838	8,92195				
Y46	121,177	8,89284	121,169	8,89666	121,156	8,89408				
F47	121,703	9,12606	121,703	9,12695	121,676	9,12437				
Q48	128,376	8,63614	128,375	8,63703	128,396	8,63298				
D49	126,277	8,17263	126,277	8,17058	126,297	8,17093	126,244	8,16451		
K50	123,098	8,51733								
A51	122,455	8,32078	122,448	8,3202	122,455	8,31908	122,456	8,31413	122,45	8,30786
A52	119,7	7,9042	119,706	7,90509	119,7	7,90544	119,715	7,92542	119,695	7,92501
G53	107,312	8,10809	107,305	8,10604	107,312	8,10639				
N54	117,615	7,88806	117,614	7,88895	117,622	7,88637				
F55	119,358	8,554	119,358	8,55342	119,365	8,55524				
A56	126,202	8,79896	126,201	8,79692	126,188	8,79727				
T57	110,723	8,52906	110,73	8,52702	110,73	8,53177				
K58	121,635	8,67135	121,6	8,6649	121,621	8,67992				
C59	120,917	8,64788	120,93	8,64583	120,931	8,64765				
I60	116,596	8,54667	116,589	8,54462	116,603	8,53911				
R61	124,301	8,69482	124,301	8,69424	124,301	8,69606				
V62	130,359	8,89284	130,344	8,8952	130,365	8,89995				
S63	118,435	8,02301	118,442	8,0239	118,428	8,02719				
S64	121,936	9,02192	121,922	9,02428	121,915	9,01729	121,861	9,00354		
T65	109,329	7,72964	109,328	7,72907	109,335	7,73089	109,377	7,7274	109,365	7,73139
A66	126,496	7,38054	126,488	7,38143	126,489	7,38178	126,524	7,3959	126,525	7,40723
T67	113,034	8,94418	113,041	8,94213	113,014	8,94835	112,871	8,95073	112,858	8,96206
T68	119,119	8,83123	119,112	8,83212	119,119	8,82807				
Q69										
D70	119,775	7,49642	119,768	7,49731	119,748	7,49473	119,742	7,50884	119,723	7,52164
V71	120,609	8,31197	120,609	8,31287	120,602	8,30882	120,562	8,30093	120,557	8,30346
I72	120,596	8,70362	120,588	8,70304	120,596	8,70339	120,583	8,6999	120,543	8,7083
E73	117,615	7,88806	117,614	7,88895	117,622	7,88637				
T74	116,596	7,76632	116,589	7,76721	116,576	7,76902	116,576	7,76847	116,564	7,77687
L75	121,437	8,54373	121,436	8,54316	121,457	8,54497				
A76	121,676	8,85763	121,662	8,85706	121,662	8,86621	121,629	8,87739		
E77	115,092	7,10184	115,085	7,0998	115,106	7,10309				
K78	117,047	7,70471	117,074	7,70413						
F79	115,837	8,22543	115,83	8,22339	115,871	8,24134				
R80	120,609	7,54042	120,588	7,54132	120,63	7,53727				
P81										
D82	117,082	8,23277	117,054	8,23952	117,157	8,24868				
M83	119,604	7,96287	119,597	7,96229	119,611	7,96264	119,619	7,98409		
R84	121,067	8,36038	121,067	8,35834	121,054	8,35869	121,116	8,37134	121,008	8,35773
M85	119,707	8,35451	119,706	8,3554	119,693	8,35575				
L86	122,517	8,2489	122,509	8,24833	122,524	8,24721	122,456	8,25546	122,43	8,27265
S87	114,901	8,03768	114,893	8,0371	114,866	8,03599	114,792	8,02076	114,786	8,02476
S88	117,663	8,42785	117,676	8,43021	117,669	8,43203	117,636	8,43294	117,658	8,43547
P89										
K90	122,428	7,80005	122,414	7,80828						
Y91	122,886	8,45866	122,879	8,45955	122,893	8,4599	122,914	8,46081	122,874	8,44574
S92	115,742	9,09233	115,741	9,09468	115,748	9,09063	115,64	9,08714		
L93	125,723	9,51037	125,73	9,5142	125,709	9,50721				
Y94	124,465	9,63798	124,451	9,63741	124,424	9,63629	124,446	9,64747		
E95	119,16	9,09819	119,139	9,09908	119,153	9,1009				
V96	125,491	9,20674	125,483	9,2091	125,511	9,20505				
H97	124,985	8,59654	124,971	8,59596	124,944	8,59191				
V98										
S99	110,197	7,69444	110,19	7,6924	110,183	7,69128	110,164	7,68339	110,151	7,67712
G100	109,971	7,41574	109,964	7,4137	109,971	7,41259	109,986	7,4091	109,994	7,40723
E101	116,897	8,51586	116,896	8,51529	116,945	8,51857	116,959	8,52242	116,988	8,51908
R102	122,305	9,01898	122,318	9,02281	122,284	9,01876				
R103	129,928	8,91484	129,921	8,91426	129,907	8,91168	129,874	8,92139		
L104	131,24	9,08352	131,247	9,08002	131,22	9,07156	131,193	9,06661	131,16	9,053
D105	122,633	9,70106	122,619	9,70195	122,612	9,6979	122,6	9,70908	122,601	9,70574
I106	119,187	8,63027	119,166	8,63117	119,16	8,62858	119,051	8,62803	119,114	8,62322
D107	116,459	8,38091	116,459	8,37741	116,432	8,38656	116,426	8,3772	116,455	8,38266
E108	119,584	7,38054	119,583	7,3785	119,584	7,37885	119,578	7,36656	119,552	7,36175

	AF6 [200µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/100µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/200µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/400µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/800µM]	
	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN
AS	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]
K109	120,719	8,40878	120,711	8,40821	120,712	8,40856	120,713	8,40947	120,714	8,412
P110										
L111	116,186	8,86203	116,179	8,85706	116,083	8,83394				
V112	118,114	6,89355	118,113	6,89151	118,1	6,8948				
V113	120,979	7,82939	120,978	7,82881	120,985	7,82476	121,048	7,82714	121,063	7,83114
Q114	117,02	7,42895	117,013	7,42984	117,054	7,42139				
L115	119,762	7,88219	119,761	7,88162	119,727	7,8805	119,762	7,87702	119,709	7,86634
N116										
W117	123,44	7,76192	123,446	7,76574	123,447	7,76609				
N118	125,217	8,12715								
K119										
D120										
D121										
R122										
E123										
G124	107,831	7,24266								
R125	116,124	7,979	116,124	7,9755	116,083	7,97585				
F126	119,953	9,1334	119,946	9,14015						
V127	123,515	9,38716	123,521	9,38951	123,549	9,38546	123,523	9,36438	123,551	9,3669
L128	131,131	9,58811	131,137	9,59047	131,117	9,57175				
K129	123,925	9,36222								
N130	119,96	9,00432	119,959	9,00227	119,898	8,99969	119,872	8,98887		
E131	125,532	8,95151	125,524	8,9524	125,443	8,94102	125,355	8,90233	125,363	8,92099
N132	118,169	8,13155	118,175	8,13098	118,175	8,1284	118,217	8,11757	118,28	8,11864
D133	120,76	8,08462	120,752	8,08404	120,76	8,08292	120,884	8,11171	120,898	8,1157
A134	123,768	7,9658	123,767	7,96523	123,775	7,96558	123,789	7,96796	123,797	7,97342
I135 trans	122,182	8,11542	122,168	8,11484	122,161	8,11373	122,128	8,11317	122,122	8,11277
I135 cis	119,208	7,76045	119,187	7,75841	119,187	7,75436	119,092	7,7538	119,121	7,75486
P136										
A137	124,705	8,37211	124,697	8,37007	124,704	8,36896	124,699	8,3684	124,7	8,36946
K138	121,204	8,29584	121,204	8,29526	121,197	8,29561	121,198	8,29653	121,199	8,29759
K139	123,816	8,38091	123,822	8,38327	123,829	8,38069	123,823	8,38307	123,797	8,37973
A140	126,776	8,42345	126,769	8,42288	126,776	8,42176	126,77	8,42267	126,764	8,4208
Q141	124,643	7,94967	124,636	7,94909	124,636	7,94798	124,637	7,94889	124,638	7,94995

Tabelle ¹⁵N-AF6 mit ¹⁴N-Rap1A[GTP] Titration, zweite Konformationen:

Position	AF6 [200µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/100µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/200µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/400µM]		AF6 mit Rap1A[GTP] [200µM/800µM]					
	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]				
71,2	120,58	8,2650	71,2	120,58	8,2644	13,2	120,79	7,9553	13,2	120,79	7,9606	13,2	120,81	7,9675
134,2	123,79	8,0098	134,2	123,79	8,0092	34,2	113,41	9,0084	37,2	114,27	8,2055	37,2	114,30	8,2037
						34,2	113,43	8,9806	37,2	114,40	8,2143	37,2	114,41	8,2154
						71,2	120,60	8,2692	49,2	126,26	8,1938	66,3	126,53	7,3866
						76,2	121,68	8,8559	49,2	126,22	8,1410	66,3	126,51	7,4306
						76,2	121,64	8,8779	64,2	121,87	9,0152	71,2	120,59	8,2667
						79,2	115,89	8,2252	64,2	121,85	8,9932	91,2	122,95	8,3973
						79,2	115,85	8,2604	66,2	126,51	7,3856	101,2	117,05	8,5161
						82,2	117,12	8,2310	66,2	126,53	7,4061	101,2	116,89	8,5146
						82,2	117,19	8,2662	71,2	120,55	8,2671	104,2	131,16	9,0735
						91,2	122,94	8,3953	84,2	121,02	8,3625	104,2	131,16	9,0368
						101,2	116,90	8,5156	84,2	121,21	8,3845	105,2	122,54	9,7101
						101,2	117,00	8,5200	88,2	117,95	8,4285	105,2	122,64	9,6984
						104,2	131,25	9,0862	91,2	122,94	8,3962	131,2	125,37	8,9327
						104,2	131,20	9,0613	99,2	110,19	7,6907	131,2	125,35	8,9121
						111,2	116,18	8,8632	99,2	110,14	7,6731	134,2	123,80	8,0115
						111,2	115,96	8,8119	101,2	116,89	8,5180			
						131,2	125,52	8,9512	101,2	117,03	8,5209			
						131,2	125,37	8,9248	103,2	129,88	8,9111			
						134,2	123,81	8,0066	103,2	129,87	8,9316			
									104,2	131,21	9,0798			
									104,2	131,18	9,0534			
									113,2	121,04	7,8403			
									113,2	121,04	7,8154			
									131,2	125,38	8,9243			
									131,2	125,33	8,8759			
									134,2	123,81	8,0105			

Tabelle ¹⁵N-AF6 mit ¹⁴N-Rap1A[GDP] Titration :

	AF6 [200µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/100µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/200µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/400µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/500µM]	
	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]
A5										
M1										
S2	117,292	8,34534	117,286	8,34752	117,266	8,34952	117,3	8,34839	117,308	8,35402
A3	126,446	8,5463	126,454	8,54848	126,447	8,55048	126,441	8,54935	126,442	8,55057
G4	108,226	8,51843	108,227	8,51914	108,221	8,52114	108,221	8,52148	108,215	8,52124
G5	109,231	8,37614	109,232	8,37832	109,232	8,38033	109,233	8,3792	109,234	8,38042
R6	121,838	8,50963	121,832	8,51034	121,833	8,51087	121,833	8,51121	121,834	8,51097
D7	119,657	8,42895	119,658	8,43113	119,659	8,4302	119,652	8,43054	119,653	8,43323
E8	120,594	8,16639	120,595	8,1671	120,602	8,16764	120,602	8,16798	120,624	8,1692
E9	120,204	8,15025	120,198	8,15097	120,199	8,1515	120,199	8,15037	120,207	8,15306
R10	121,223	8,49642	121,23	8,49714	121,217	8,49767	121,197	8,50095	121,205	8,5007
R11	118,939	8,03731	118,947	8,03802	118,941	8,03856	118,948	8,03596	118,949	8,03865
K12	119,541	8,00651	119,542	8,00282	119,535	8,00775	119,502	8,00663	119,516	8,00932
L13	121,045	7,93756	121,046	7,93828	121,046	7,93881	121,012	7,93622	121,027	7,93744
A14	121,387	8,86313	121,381	8,86384	121,381	8,86585	121,388	8,86618	121,383	8,86594
D15	118,809	7,90529	118,803	7,90454	118,79	7,90654	118,79	7,90541	118,771	7,90517
I16	122,672	7,88769	122,666	7,88694	122,653	7,88601	122,66	7,88488	122,634	7,88464
I17	123,445	8,48322	123,466	8,4854	123,473	8,48741	123,494	8,48628	123,482	8,48017
H18	119,965	8,74432	119,959	8,74503	119,953	8,74557	119,96	8,74884	119,947	8,74566
H19	117,606	8,21039	117,607	8,21111	117,614	8,20871	117,608	8,20318	117,636	8,2088
W20	123,759	8,58003	123,739	8,57781	123,767	8,58568	123,768	8,58015	123,748	8,57698
N21	116,3	9,17556	116,356	9,16748	116,302	9,17241				
A22	120,245	7,44911								
N23	117,196	7,51512								
R24	118,338	7,22469								
L25	118,837	8,33214	118,79	8,33872	118,831	8,33486	118,845	8,33226	118,778	8,34082
D26	121,866	8,26907	121,9	8,27711	121,853	8,26885	121,894	8,26479	121,896	8,27188
L27										
F28										
E29										
I30										
S31	125,045	9,1917	125,038	9,17628	125,032	9,18415				
Q32	114,304	7,96103	114,312	7,96175	114,319	7,96082	114,319	7,96555	114,321	7,96384
P33										
T34	113,361	9,00541	113,395	9,00612	113,396	9,00813	113,424	9,0114	113,391	9,01262
E35	120,45	9,40292	120,43	9,40217	120,458	9,40417	120,424	9,40304	120,46	9,40867
D36	115,521	7,71901	115,522	7,72119	115,522	7,72026	115,502	7,72353	115,503	7,71302
L37	114,202	8,21186	114,202	8,21404	114,21	8,21311	114,23	8,21491	114,259	8,2132
E38	119,315	7,44618	119,316	7,44982	119,296	7,44889	119,276	7,44776	119,243	7,44752
F39	118,755	7,96103	118,742	7,96321	118,742	7,96228	118,736	7,96555	118,717	7,96091
H40	114,564	8,51256	114,578	8,51474	114,558	8,51381	114,606	8,52001	114,621	8,52124

	AF6 [200µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/100µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/200µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/400µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/500µM]	
	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]
A5										
G41	106,244	8,62844	106,244	8,63062	106,231	8,63262	106,225	8,62269	106,274	8,62685
V42	124,128	9,08315	124,143	9,08533	124,13	9,09027	124,144	9,06861	124,097	9,0889
M43										
R44	122,795	8,64311	122,769	8,63795	122,803	8,63556	122,824	8,64323		
F45	122,802	8,9218	122,789	8,91518	122,803	8,92599	122,817	8,93953		
Y46	121,168	8,891	121,196	8,89025	121,21	8,89225	121,211	8,89259	121,212	8,89381
F47	121,695	9,12422	121,695	9,12347	121,71	9,12694	121,73	9,12875	121,725	9,11677
Q48	128,381	8,63431	128,382	8,63649	128,355	8,63556	128,335	8,63589	128,343	8,64885
D49	126,275	8,17226	126,276	8,17297	126,277	8,17644	126,263	8,17824	126,257	8,1824
K50	123,11	8,51989	123,104	8,51767						
A51	122,447	8,32041	122,441	8,32112	122,441	8,32019	122,434	8,31906	122,436	8,32028
A52	119,698	7,90236	119,699	7,90601	119,706	7,90654	119,707	7,90541	119,701	7,91251
G53	107,303	8,10625	107,311	8,10696	107,311	8,10896	107,305	8,11224	107,292	8,10906
N54	117,613	7,88623	117,621	7,89134	117,614	7,89334	117,594	7,88781	117,595	7,88904
F55	119,363	8,55363	119,35	8,55434	119,365	8,55488	119,426	8,55522	119,373	8,55791
A56	126,2	8,79712	126,201	8,79637	126,201	8,79251	126,202	8,80164	126,182	8,7882
T57	110,728	8,52723	110,736	8,52794	110,723	8,52848	110,744	8,53321	110,697	8,53444
K58	121,606	8,67391	121,613	8,68196	121,614	8,66929				
C59	120,922	8,64457	120,93	8,64382	120,923	8,64582	120,889	8,64323		
I60	116,588	8,54336	116,588	8,54261	116,561	8,54315	116,534	8,54642	116,529	8,54324
R61	124,306	8,69298	124,307	8,69662	124,273	8,70156	124,294	8,69457	124,227	8,69872
V62	130,336	8,89393	130,344	8,88878	130,344	8,89372	130,331	8,91312		
S63	118,433	8,02264	118,434	8,02335	118,435	8,02976	118,394	8,03009	118,416	8,02839
S64	121,927	9,02008	121,935	9,02079	121,922	9,0228	121,929	9,02607	121,957	9,02143
T65	109,327	7,72927	109,328	7,72852	109,328	7,73052	109,335	7,73086	109,343	7,73062
A66	126,494	7,38164	126,495	7,38235	126,502	7,38289	126,502	7,38616	126,531	7,38738
T67	113,032	8,94381	113,026	8,94452	113,013	8,94359	112,993	8,93659	113,035	8,93928
T68	119,11	8,83086	119,111	8,83011	119,118	8,83211	119,105	8,83391	119,134	8,83807
Q69										
D70	119,78	7,49605	119,774	7,49823	119,775	7,49877	119,748	7,50204	119,776	7,50326
V71	120,614	8,31307	120,608	8,31232	120,602	8,31139	120,595	8,31026	120,59	8,31148
I72	120,587	8,70178	120,588	8,70103	120,588	8,70303	120,582	8,6975	120,576	8,70459
E73	117,613	7,88623	117,621	7,89134	117,614	7,89334	117,594	7,88781	117,595	7,88904
T74	116,594	7,76595	116,588	7,76519	116,582	7,76719	116,589	7,76753	116,597	7,76289
L75	121,428	8,54336	121,422	8,54554	121,416	8,54461	121,423	8,55815	121,403	8,55791
A76	121,674	8,8558	121,675	8,85651	121,669	8,85705	121,662	8,85738	121,663	8,85861
E77	115,09	7,10147	115,084	7,10072	115,092	7,10419	115,085	7,10453	115,086	7,09988
K78	117,011	7,70581	117,005	7,70505	116,985	7,71146				
F79	115,829	8,22506	115,823	8,22284	115,823	8,22338	115,837	8,22078	115,907	8,22934
R80	120,601	7,54152	120,601	7,54517	120,623	7,54864	120,616	7,54311	120,604	7,54873
P81										
D82	117,087	8,23093	117,074	8,23751	117,095	8,24245				
M83	119,596	7,9625	119,596	7,96175	119,611	7,96375	119,625	7,97142	119,64	7,96678
R84	121,066	8,35854	121,059	8,35925	121,053	8,35979	121,047	8,3572	121,048	8,35255
M85	119,705	8,35414	119,699	8,35485	119,693	8,35392	119,686	8,3528	119,667	8,34962
L86	122,515	8,24853	122,523	8,24924	122,523	8,24978	122,489	8,24425	122,511	8,24988
S87	114,906	8,03731	114,9	8,03655	114,893	8,03562	114,894	8,03743	114,881	8,03719
S88	117,668	8,42602	117,682	8,4238	117,662	8,42727	117,628	8,432	117,65	8,42589
P89										
K90	122,453	7,79968	122,441	7,80333	122,455	7,8024	122,482	7,7998	122,449	7,80249
Y91	122,884	8,45829	122,885	8,459	122,885	8,45807	122,893	8,45694	122,88	8,45816
S92	115,747	9,09049	115,754	9,09267	115,741	9,0888	115,755	9,09648	115,756	9,09037
L93	125,721	9,51	125,715	9,50925	125,723	9,51272	125,73	9,51159	125,752	9,51721
Y94	124,457	9,63615	124,464	9,63979	124,451	9,6418	124,438	9,6348	124,439	9,64042
E95	119,165	9,09636	119,166	9,09707	119,132	9,0976	119,105	9,09794	119,188	9,0933
V96	125,509	9,2093	125,476	9,21295	125,483	9,21055	125,518	9,20942	125,451	9,21211
H97	124,963	8,59617	124,956	8,59688	124,991	8,60035	125,039	8,59482	125,006	8,59898
V98										
S99	110,188	7,69114	110,196	7,69332	110,19	7,69239	110,19	7,69126	110,177	7,69102
G100	109,97	7,41537	109,97	7,41462	109,971	7,41662	109,985	7,41549	109,986	7,41672
E101	116,895	8,51549	116,896	8,51474	116,896	8,51674	116,904	8,51708	116,912	8,5183
R102	122,303	9,01861	122,317	9,02373	122,277	9,014	122,27	9,0246	122,217	9,01996
R103	129,919	8,913	129,92	8,91371	129,921	8,91572	129,9	8,91606	129,895	8,91581
L104	131,252	9,08315	131,239	9,0824	131,254	9,08	131,24	9,07447	131,235	9,07863
D105	122,631	9,70069	122,625	9,69993	122,605	9,699	122,619	9,69787	122,62	9,70057
I106	119,179	8,62844	119,179	8,63062	119,18	8,63116	119,153	8,63002	119,154	8,62978
D107	116,444	8,37761	116,445	8,38126	116,425	8,37299	116,432	8,38066	116,406	8,37749
E108	119,575	7,3787	119,59	7,38088	119,583	7,37995	119,577	7,38029	119,592	7,38005
K109	120,71	8,40695	120,711	8,40766	120,711	8,40966	120,712	8,41	120,706	8,41123
P110										
L111	116,184	8,85873	116,199	8,86384	116,172	8,86145	116,186	8,86178	116,214	8,87181
V112	118,105	6,89318	118,113	6,89243	118,1	6,89003	118,107	6,8933	118,122	6,88866
V113	120,984	7,82902	120,984	7,82973	120,985	7,82733	120,992	7,83061	121,014	7,83183
Q114	117,025	7,43004	117,026	7,43075	117,02	7,42836	117,006	7,43456	117,055	7,43139
L115	119,753	7,87889	119,754	7,88254	119,754	7,88161	119,748	7,87754	119,763	7,88024
N116										
W117	123,431	7,76301	123,418	7,76079	123,446	7,76573	123,453	7,75286	123,42	7,75702
N118										
K119										

	AF6 [200µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/100µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/200µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/400µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/500µM]	
	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN
AS	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]
D120										
D121										
R122										
E123										
G124	107,871	7,25549	107,865	7,243						
R125	116,116	7,97717	116,11	7,98081	116,11	7,97695	116,11	7,98462	116,112	7,98291
F126	119,958	9,12716	119,925	9,12787	119,918	9,12547	119,946	9,14341	119,947	9,15931
V127	123,52	9,38385	123,514	9,3875	123,508	9,3851	123,549	9,38544	123,502	9,38666
L128	131,136	9,58774	131,116	9,58552	131,117	9,59046	131,144	9,5864	131,118	9,57882
K129	123,862	9,36185	123,863	9,36256	123,87	9,3719				
N130	119,951	9,00248	119,945	9,00319	119,959	9,00079	119,953	9,00553	119,968	9,00676
E131	125,53	8,94967	125,524	8,94892	125,511	8,95092	125,497	8,94686	125,499	8,95102
N132	118,174	8,12972	118,168	8,12896	118,189	8,13243	118,196	8,12837	118,217	8,1516
D133	120,751	8,08278	120,766	8,08496	120,759	8,08696	120,78	8,0873	120,781	8,08706
A134	123,766	7,96543	123,767	7,96615	123,774	7,96668	123,781	7,96702	123,783	7,96971
I135 trans	122,18	8,11505	122,174	8,11576	122,168	8,1163	122,161	8,11517	122,155	8,11639
I135 cis	119,186	7,76008	119,2	7,75932	119,2	7,76426	119,18	7,7558	119,175	7,75702
P136										
A137	124,703	8,37028	124,703	8,37099	124,704	8,37153	124,697	8,3704	124,699	8,37162
K138	121,189	8,294	121,196	8,29471	121,204	8,29525	121,197	8,29559	121,185	8,29681
K139	123,814	8,38054	123,815	8,38126	123,822	8,38179	123,809	8,38066	123,81	8,38189
A140	126,774	8,42162	126,768	8,42233	126,769	8,42286	126,769	8,42174	126,763	8,42296
Q141	124,641	7,9493	124,642	7,95001	124,643	7,95055	124,643	7,94942	124,637	7,95064

Tabelle ¹⁵N-AF6 mit ¹⁴N-Rap1A[GDP] Titration, zweite Konformationen:

Position	AF6 [200µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/100µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/200µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/400µM]		AF6 mit Rap1A[GDP] [200µM/500µM]					
	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN	N	HN				
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]				
71,2	120,58	8,2632	71,2	120,58	8,2639	71,2	120,58	8,2644	48,2	128,28	8,6417	64,3	121,95	9,0316
134,2	123,76	8,0153	124,2	107,81	7,1975	82,2	117,08	8,2307	48,2	128,36	8,6241	64,3	121,95	9,0126
			126,2	119,93	9,1381	82,2	117,10	8,2571	64,2	121,94	9,0334	71,2	120,59	8,2513
			126,2	119,91	9,1190	111,2	116,18	8,8702	64,2	121,91	9,0172	91,2	122,91	8,4229
			131,2	125,52	8,9122	111,2	116,15	8,8541	71,2	120,60	8,2515	125,2	116,03	7,9946
			134,2	123,83	8,0277	131,2	125,51	8,9113	75,2	121,45	8,5464	125,2	116,20	7,9682
						134,2	123,80	8,0224	75,2	121,38	8,5684	126,2	119,95	9,1402
									91,2	122,93	8,41	126,2	119,94	9,1783
									94,2	124,43	9,6817	130,2	119,92	9,0258
									104,2	131,27	9,0818	130,3	119,95	8,9847
									104,2	131,20	9,0656	130,4	119,76	9,0023
									111,2	116,17	8,8720	131,2	125,39	8,9290
									111,2	116,19	8,8485	132,2	118,21	8,1325
									126,2	119,91	9,1316	132,2	118,22	8,1706
									126,2	119,97	9,1551	134,2	123,81	8,0210
									131,2	125,49	8,9145			
									134,2	123,80	8,0095			

Tabelle ¹⁵N-AF6 mit ¹⁴N-ZO1-PDZ2 / ZO1-MUT2:

Aminosäure	AF6 (1-141)		AF6 (1-141) mit PDZ2		AF6 (1-141) mit MUT2	
	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]
M1						
S2	117,291	8,34027	117,272	8,34179	117,286	8,34506
A3	126,445	8,54562	126,44	8,54715	126,447	8,54748
G4	108,239	8,51628	108,227	8,51781	108,221	8,51815
G5	109,23	8,3784	109,232	8,37699	109,239	8,37733
R6	121,831	8,51042	121,825	8,50901	121,839	8,50935
D7	119,663	8,43121	119,665	8,4298	119,665	8,43014
E8	120,586	8,16718	120,608	8,16577	120,602	8,16611
E9	120,203	8,14958	120,198	8,1511	120,199	8,15144
R10	121,222	8,49575	121,23	8,49727	121,231	8,49761
R11	118,952	8,0381	118,961	8,03669	118,954	8,03703
K12	119,533	8,0117	119,549	8,01029	119,535	8,00182
L13	121,051	7,93542	121,046	7,93401	121,053	7,93435
A14	121,4	8,86246	121,408	8,86398	121,395	8,86432
D15	118,809	7,90315	118,797	7,90761	118,804	7,90501
I16	122,678	7,88555	122,666	7,88414	122,673	7,88448
I17	123,451	8,48401	123,466	8,48261	123,467	8,48294
H18	119,944	8,74511	119,993	8,7437	119,973	8,74404
H19	117,599	8,21119	117,655	8,20978	117,635	8,21011
W20	123,765	8,57789	123,74	8,57942	123,733	8,57975
N21	116,313	9,16755	116,342	9,17788	116,302	9,17235
A22	120,251	7,46017	120,273	7,47343	120,301	7,4679
N23	117,052	7,49244	117,183	7,5057	116,999	7,49724
R24	118,344	7,22255	118,38	7,22994	118,366	7,22147
L25	118,836	8,3344	118,81	8,33299	118,804	8,33039
D26	121,885	8,27279	121,866	8,28312	121,874	8,27465
L27						
F28						
E29						
I30						
S31	125,071	9,18222	125,073	9,18081	125,073	9,19582
Q32	114,324	7,95889	114,298	7,96042	114,312	7,96075
P33						
T34	113,38	9,00034	113,389	9,0136	113,382	9,00807
E35	120,436	9,39931	120,431	9,40084	120,424	9,40118
D36	115,527	7,72127	115,535	7,71692	115,529	7,71726
L37	114,221	8,21119	114,223	8,20978	114,223	8,21305
E38	119,363	7,44844	119,262	7,44116	119,276	7,44443
F39	118,788	7,96182	118,728	7,96042	118,735	7,96369
H40	114,508	8,50455	114,64	8,51488	114,613	8,51521
G41	106,243	8,6307	106,238	8,62929	106,252	8,62963
V42	124,121	9,08835	124,157	9,0928	124,15	9,08727
M43	126,945	8,98567	126,905	8,98719	127,028	8,967
R44	122,842	8,64243	122,844	8,65569	122,824	8,64723
F45	122,808	8,92406	122,817	8,91972	122,81	8,92299
Y46	121,154	8,89179	121,189	8,89332	121,176	8,89365
F47	121,714	9,12062	121,702	9,12507	121,709	9,12541
Q48	128,367	8,63656	128,375	8,63516	128,368	8,63549
D49	126,295	8,17305	126,269	8,17164	126,276	8,17198
K50	123,061	8,52215	123,07	8,52074	123,049	8,52108
A51	122,453	8,3168	122,454	8,32125	122,455	8,32159
A52	119,704	7,90609	119,706	7,90174	119,706	7,90208
G53	107,303	8,10851	107,311	8,1071	107,311	8,10744
N54	117,633	7,89142	117,614	7,88707	117,607	7,88741
F55	119,376	8,55149	119,385	8,55301	119,385	8,55335
A56	126,199	8,79791	126,187	8,79651	126,194	8,79684
T57	110,741	8,52509	110,736	8,52954	110,737	8,52695
K58	121,646	8,65417	121,552	8,66449	121,593	8,66483
C59	120,935	8,64536	120,909	8,64396	120,923	8,64429
I60	116,601	8,54562	116,568	8,54128	116,568	8,54455
R61	124,292	8,69524	124,307	8,69676	124,321	8,69417
V62	130,363	8,88886	130,351	8,89332	130,351	8,89365
S63	118,419	8,02343	118,434	8,01909	118,442	8,02236
S64	121,933	9,02087	121,942	9,0224	121,935	9,02273
T65	109,326	7,73007	109,341	7,72866	109,335	7,729
A66	126,48	7,3839	126,502	7,37955	126,495	7,37989
T67	113,025	8,94166	113,04	8,94319	113,04	8,94353
T68	119,123	8,83018	119,125	8,83171	119,125	8,83205
Q69						
D70	119,786	7,49537	119,781	7,49397	119,788	7,4943
V71	120,607	8,31093	120,608	8,31245	120,616	8,31279
I72	120,586	8,7011	120,595	8,70263	120,602	8,70003
E73	117,633	7,89142	117,614	7,88707	117,607	7,88741
T74	116,58	7,76234	116,602	7,7668	116,596	7,76713
L75	121,441	8,54269	121,429	8,54421	121,429	8,54455
A76	121,667	8,85659	121,668	8,85518	121,668	8,85552
E77	115,083	7,09933	115,077	7,09792	115,085	7,10119

Aminosäure	AF6 (1-141)		AF6 (1-141) mit PDZ2		AF6 (1-141) mit MUT2	
	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]	N [ppm]	HN [ppm]
K78	117,052	7,70366	117,046	7,70225	117,033	7,70553
F79	115,828	8,22585	115,829	8,22151	115,837	8,22478
R80	120,6	7,54231	120,581	7,5409	120,602	7,54418
P81						
D82	117,093	8,23465	117,074	8,23911	117,108	8,23945
M83	119,602	7,96182	119,617	7,96335	119,604	7,96369
R84	121,058	8,35787	121,066	8,35646	121,067	8,35973
M85	119,698	8,352	119,706	8,35353	119,706	8,35386
L86	122,507	8,24932	122,509	8,24791	122,509	8,24825
S87	114,898	8,03517	114,9	8,03669	114,893	8,03703
S88	118,234	8,49575	118,202	8,49434	118,23	8,49761
P89						
K90	122,439	7,80341	122,454	7,80493	122,427	7,80527
Y91	122,883	8,45761	122,878	8,4562	122,879	8,45654
S92	115,746	9,09128	115,747	9,0928	115,748	9,09021
L93	125,728	9,51079	125,736	9,50352	125,723	9,50972
Y94	124,449	9,63694	124,471	9,63846	124,465	9,6388
E95	119,144	9,09715	119,159	9,09574	119,159	9,09314
V96	125,495	9,20569	125,497	9,21015	125,497	9,21049
H97	124,921	8,59549	125,032	8,58822	125,005	8,59149
V98						
S99	110,194	7,69193	110,182	7,69052	110,19	7,69086
G100	109,969	7,41323	109,977	7,41476	109,971	7,41509
E101	116,901	8,51335	116,896	8,51488	116,903	8,51521
R102	122,337	9,01794	122,242	9,01653	122,297	9,01687
R103	129,925	8,91233	129,927	8,91385	129,92	8,91419
L104	131,245	9,08248	131,267	9,08107	131,254	9,08141
D105	122,637	9,69855	122,625	9,70007	122,639	9,70041
I106	119,178	8,62776	119,2	8,62929	119,194	8,62963
D107	116,45	8,37547	116,438	8,37406	116,466	8,37733
E108	119,575	7,37803	119,59	7,37955	119,583	7,37989
K109	120,716	8,40774	120,711	8,40926	120,711	8,40667
P110						
L111	116,177	8,85952	116,192	8,86691	116,179	8,86432
V112	118,098	6,89104	118,12	6,89257	118,12	6,89291
V113	120,976	7,82688	120,998	7,8284	120,985	7,82874
Q114	117,018	7,42497	117,026	7,43236	117,026	7,4327
L115	119,759	7,87968	119,761	7,88121	119,761	7,88155
N116						
W117	123,444	7,75647	123,459	7,7668	123,46	7,76127
N118						
I119						
D120						
D121						
R122						
E123						
G124	107,836	7,24015	107,865	7,26221	107,831	7,24494
R125	116,136	7,97943	116,089	7,97802	116,083	7,97836
F126	119,957	9,13235	119,966	9,13681	119,966	9,13421
V127	123,506	9,38464	123,521	9,38324	123,521	9,38651
L128	131,129	9,58413	131,137	9,58566	131,137	9,586
K129	123,888	9,36411	123,876	9,36563	123,904	9,3601
N130	119,964	9,0062	119,945	9,00186	119,946	9,0022
E131	125,522	8,95046	125,531	8,94906	125,531	8,94939
N132	118,173	8,12904	118,181	8,13057	118,175	8,13091
D133	120,757	8,0821	120,759	8,08363	120,759	8,08397
A134	123,765	7,96476	123,767	7,96628	123,767	7,96662
I135 trans	122,186	8,11437	122,181	8,11297	122,181	8,11624
I135 cis	119,198	7,76234	119,2	7,76093	119,194	7,76713
P136						
A137	124,709	8,3696	124,704	8,37113	124,704	8,37146
K138	121,202	8,29333	121,203	8,29485	121,204	8,29519
K139	123,82	8,3784	123,808	8,37993	123,815	8,38027
A140	126,774	8,41947	126,768	8,421	126,769	8,42134
Q141	124,641	7,94716	124,642	7,94868	124,642	7,94902

Zuordnung der ¹³C/¹⁵N-PDZ2- und MUT2-Konstrukte, die zweiten Konformationen:

Nicht zugeordnete Resonanzen sind durch ein n gekennzeichnet, die zweite Konformation steht in Klammern rechts neben der Hauptkonformation.

AS	PDZ2				MUT2			
	HN	N	CA	CB	HN	N	CA	CB
T-1	9.05	118.7	61.8	71.2	9.08	119.4	62.1	71.1
K-2	8.56	125.8	55.8	33.1	8.60	126.4	55.7 (55.5)	33.2 (33.4)
V-3	8.80	124.5	61.1	35.8	8.87 (9.02)	124.4 (125.6)	61 (61.1)	35.9
T-4	8.82	123.7	61.5	70.2	8.80	123.6	61.7 (61.8)	70.2 (69.7)
L-5	9.18	126.6	53.0	43.9	9.25 (8.32)	126.8 (126.1)	53 (55)	43.9 (42.5)
V-6	8.70	122.9	61.2	34.3	8.74 (8.27)	123 (123)	61.4 (62.6)	34.3 (32.7)
K-7	8.45	126.2	56.9	33.6	8.32 (8.18)	126.4 (124.2)	56.8 (55.8)	33.6 (33)
S-8	9.67	121.3	58.9	65.0	9.67 (8.46)	121.5 (117)	58.9 (58.2)	65.2 (63.9)
R-9	8.07	120.3	55.4	ⁿ	8.1 (8.59)	120.4 (123)	55.4 (53.4)	ⁿ
K-10	ⁿ	ⁿ	58.4	32.3	ⁿ	ⁿ	58.5 (56.8)	32.4 (30.4)
N-11	8.28	114.7	53.3	37.2	8.27 (8.49)	114.6 (119.4)	53.3 (53.4)	37.2 (38.7)
E-12	7.82	120.6	56.7	31.1	7.82 (8.33)	120.4 (121.2)	56.7 (55.8)	31.2
E-13	8.49	120.1	54.3	31.5	8.50	119.8	54.2 (56.6)	31.5 (30.2)
Y-14	8.80	120.8	62.2	37.8	8.79 (8.15)	121.1 (120.9)	62.4 (58.2)	37.6 (38.7)
G-15	8.50	102.0	45.5	-	8.51 (8.26)	102.1 (110.3)	45.6 (45.4)	-
L-16	7.19	116.5	53.8	43.9	7.22 (8.27)	116.5 (114.4)	53.8 (53.3)	44.1
R-17	8.56	124.9	55.2	31.0	8.44	124.0	54.9	31.2
L-18	8.77	125.8	53.4	43.6	8.82	125.2	53.3 (54.8)	43.9 (41.2)
A-19	8.45	123.1	51.1	24.3	8.55 (8.31)	122.3 (124.5)	51 (54)	23.3 (18.9)
S-20	8.79	111.9	56.9	67.9	8.28 (8.26)	111.5 (118.7)	56.7 (57.9)	ⁿ
H-21	9.29	118.7	53.3	ⁿ	9.27	124.7	55.4	ⁿ
(G)	-	-	-	-	ⁿ	ⁿ	ⁿ	-
(G)	-	-	-	-	ⁿ	ⁿ	45.7 (45.4)	-
(G)	-	-	-	-	8.06 (8.3)	107.7 (108.8)	45 (45.5)	-
(A)	-	-	-	-	8.13	124.2	53 (52.4)	19.6 (19.3)
I-22	ⁿ	ⁿ	57.3	37.7	8.78 (8)	123.7 (119.5)	60.1 (60.9)	39.2 (38.9)
F-23	9.27	123.6	54.8	43.3	9.17 (8.3)	123.9 (124.7)	54.3 (57.4)	43.7 (39.7)
V-24	8.95	119.0	63.0	31.2	9.01 (8.04)	119.1 (123.5)	62.7 (61.7)	31.2 (33)
K-25	8.71	132.9	56.7	33.6	8.67 (8.2)	132.9 (130.1)	57.1 (58.2)	33.8
E-26	7.66	114.9	54.9	34.7	7.59	114.8	54.7 (56.5)	34.6 (30.3)
I-27	9.14	125.1	59.5	39.9	9.08 (8.25)	125 (122.3)	59.4 (61.2)	39.8 (38.7)
S-28	9.07	124.1	58.6	63.5	9.11 (8.58)	124.1 (123)	58.7 (58.2)	63.5
Q-29	9.04	126.3	57.7	28.7	9.03	126.2	57.8 (56.5)	28.7 (29.2)
D-30	9.02	118.6	55.5	39.7	9.02 (8.35)	118.8 (120.9)	55.6 (54.8)	39.8 (41.1)
S-31	7.26	112.2	57.5	66.8	7.29 (8.18)	112.2 (116.3)	57.6 (59.1)	66.6 (63.7)
L-32	8.69	119.1	58.2	42.7	8.72 (8.17)	118.9 (123.6)	58.1 (55.7)	42.7 (42)
A-33	8.54	118.9	55.2	18.9	8.56 (8.04)	118.9 (123.5)	55.2 (52.8)	18.9
A-34	7.62	122.3	54.9	18.5	7.65	122.9	55 (52.6)	18.5 (19.1)
R-35	8.00	116.3	58.4	31.7	8.02 (8.19)	116.4 (120)	58.4 (56.3)	30.7 (30.8)
D-36	7.75	119.0	57.1	43.8	7.76 (8.29)	118.9 (120.9)	57.1 (54.5)	43.9 (41.2)
G-37	7.44	103.1	46.2	-	7.44 (8.31)	102.8 (109)	46.3 (45.5)	-
N-38	8.57	117.7	55.4	40.0	8.49 (8.34)	117.7 (118.7)	55.8 (53.3)	40.1 (38.9)
I-39	8.21	119.1	60.5	39.7	8.4 (8.08)	119.8 (121.1)	60.8 (61.3)	39.3 (38.6)
Q-40	9.04	125.8	53.5	31.7	9.07 (8.53)	125.9 (124.8)	53.5 (55.5)	31.6 (29.6)
E-41	8.79	121.0	58.9	28.8	8.79 (8.5)	121.1 (123)	58.9 (56.9)	28.8 (30.4)
G-42	9.69	114.6	44.9	-	9.83 (8.45)	114.5 (110)	44.9 (45.3)	-
D-43	7.97	122.3	56.0	40.6	8.06 (8.22)	122.6 (120.6)	56 (54.5)	40.7 (41.3)
V-44	8.54	122.5	62.7	33.0	8.77 (8.08)	122.1 (120.2)	62.4 (62.4)	33.4 (32.8)
V-45	8.87	128.1	61.8	ⁿ	8.93 (8.26)	126 (124.7)	62.6 (62)	32 (33)
L-46	9.04	127.1	56.0	43.7	9.12 (8.29)	128.9 (125.4)	56 (56.4)	43.5
K-47	7.51	116.5	55.6	39.0	7.62	118.6	56.2 (56.3)	38.3 (33)
I-48	8.38	119.9	61.1	40.7	8.5 (8.14)	121.2 (122.5)	61 (61.1)	40.8 (38.9)
N-49	9.82	127.0	54.2	36.8	9.85 (8.03)	126.7 (127.3)	54.3 (54.8)	36.9
G-50	9.07	104.2	45.4	-	8.98	105.0	45.5 (45.5)	-
T-51	8.22	120.1	62.5	69.6	8.23 (8.09)	120 (114.4)	62.2 (62)	69.7
V-52	8.69	127.2	63.5	32.6	8.64	124.9	62.7 (62.5)	32.4 (32.7)
T-53	7.83	112.8	61.8	68.7	7.89 (8.22)	111.8 (118.1)	61.5 (61.9)	68.6 (70)
E-54	7.60	127.2	59.0	29.6	7.1 (8.28)	123.6 (123)	58.5 (56)	29.8
N-55	9.10	121.9	55.1	36.5	8.86	119.2	54.3	33.0
M-56	8.04	122.8	55.7	35.6	8.43	124.1	55.3	36.1
S-57	9.40	122.6	57.8	64.5	9.16	121.1	57.0	65.2
L-58	8.83	123.5	58.1	41.6	8.86	123.2	58.1 (55.8)	41.3 (42.1)
T-59	8.11	112.2	66.4	68.6	8.09 (8.05)	112.4 (113.9)	66.4 (62.6)	68.6 (69.6)
D-60	7.70	123.6	57.6	39.4	7.81 (8.19)	123.9 (123)	57.6 (54.4)	39.7 (41.2)
A-61	8.22	124.8	55.7	18.2	8.06 (8.22)	124.2 (124.6)	55.7 (53)	18.5
K-62	8.43	116.5	60.4	32.2	8.35	116.2	60.3 (55.1)	32.5 (32.4)
T-63	8.04	117.4	66.7	68.5	8.12 (8.12)	117.2 (115.9)	66.6 (62.4)	68.6 (69.8)
L-64	7.70	121.0	58.3	41.9	7.84 (8.42)	121.3 (124.6)	58.3 (56.2)	42.2
I-65	7.51	117.8	65.6	37.4	7.51	117.8	65.8 (61)	37.7 (38.7)
E-66	8.28	121.6	59.3	29.6	8.22 (8.41)	120.7 (125.9)	59.3 (56.6)	29.7 (30.4)

AS	PDZ2				MUT2			
	HN	N	CA	CB	HN	N	CA	CB
R-67	7.96	115.9	56.7	30.3	8 (7.95)	115.5 (127.6)	56.6 (57.4)	30.4
S-68	7.51	115.7	59.6	63.2	7.51	116.4	59.6 (59.7)	ⁿ (63)
K-69	8.69	123.9	56.8	ⁿ	ⁿ (8.72)	ⁿ (126.2)	ⁿ (57.1)	ⁿ (32.6)
G-70	ⁿ	ⁿ	46.5	-	ⁿ (8.29)	ⁿ (108.9)	46.6 (45.2)	-
K-71	7.70	121.0	55.8	35.1	7.91 (8.02)	122.1 (122.8)	55.8 (54.7)	35.2 (33)
L-72	9.06	126.7	53.7	45.0	9.05 (8.7)	126.3 (123.8)	53.7 (55.3)	45.4 (42.3)
K-73	8.63	126.4	55.0	33.7	8.6 (7.88)	126.3 (126.7)	54.8 (57.3)	34.1
M-74	9.39	123.5	53.8	38.1	9.32	123.2	53.8	38.2
V-75	7.97	122.2	62.0	33.4	8.14	122.2	62.0	33.2
V-76	9.10	121.6	58.8	35.7	9.04	120.4	58.3	36.1
Q-77	9.11	120.2	54.6	41.2	9.10	118.8	54.2	38.2
R-78	8.32	124.4	55.0	32.3	7.92	121.2	55.4 (56.1)	32.1 (31.1)
D-79	8.47	122.5	54.3 (54.4)	41.9	8.69 (8.5)	123.1 (122.3)	54.3 (54.3)	41.7 (41.7)
E-80	8.5 (8.61)	123 (122.8)	56.7 (56.8)	30.3 (30.3)	8.58 (8.6)	123.3 (123.4)	56.8 (56.9)	30.3 (30.3)
G-81	8.58 (8.6)	109.9 (109.9)	45.5 (45.5)	-	8.55 (8.53)	109.8 (109.8)	45.5 (45.4)	-
S-82	8.31 (8.29)	115.6 (115.7)	58.6 (58.7)	64 (64)	8.27 (8.27)	115.6 (115.6)	58.6 (58.6)	63.9 (64.0)
G-83	8.55 (8.52)	111.3 (111.2)	45.4 (45.4)	-	8.54 (8.49)	111.4 (111.2)	45.5 (45.4)	-
C-84	7.89 (7.99)	122.8 (123.6)	59.5 (56.8)	ⁿ	7.86 (8.01)	122.9 (123.6)	59.5 (56.8)	ⁿ

8. Danksagung

Ich möchte mich hiermit von ganzem Herzen bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben:

In erster Linie bei meinen Eltern, Roger und Ulrike, die ein steter Rückhalt für mich sind und mich immer gefördert und unterstützt haben. Ebenso bei meiner Liebe Julia, die mich immer und immer wieder motiviert und aufgebaut hat. Ohne euch hätte ich das nicht durchgezogen, ihr seid der absolute Wahnsinn 😊 !!!

Danke Hans-Robert, dass du mir die Möglichkeit zu forschen gegeben und das Interesse an der Wissenschaft geweckt und aufrechterhalten hast!!

Danke natürlich auch dem Prüfungsausschuss Prof. Dr. Christine Ziegler, Prof. Dr. Wolfram Gronwald und Prof. Dr. Gernot Längst für die Begutachtung meiner Arbeit.

Weiterer Dank gilt den vielen Mitarbeitern des Lehrstuhls: Gudrun Horn, Bine, Ingrid, Werner, Paul, Bärbel, Raphi, Markus, Michael und Harry die stets für ein Gespräch, oder den ein oder anderen Kaffee zu haben waren. Besonderer Dank auch an Claudia für die Hilfe im NMR-Bereich, ohne die ich häufig aufgeschmissen gewesen wäre.

Ebenso danke ich Axel Freischmidt, ohne sein Wissen wäre der biochemische Leidensweg unendlich lang geworden, auch wenn ich manche Ratschläge ignoriert habe ;) !

Hannes auch dir vielen, vielen Dank, du warst stets eine wichtige Unterstützung im Alltag des Laborlebens und ohne dich hätte ich viel weniger zu lachen gehabt!!

Danke auch Kurtis, Konzert und Kompott....und dem Quentchen an Chaos, das diese Welt ab und zu braucht.

Zu guter Letzt natürlich auch all meinen Freunden und meinen Geschwistern, die mich über die Jahre hin wohl für verrückt erklärt haben und mich dennoch stets motivierten.

Danke euch allen!!!!

9. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation selbstständig von mir angefertigt und alle genutzten Hilfsmittel von mir angegeben wurden.

Ich erkläre, dass die wörtlich oder dem Sinn nach anderer Veröffentlichungen entnommenen Stellen von mir gekennzeichnet wurden.

Malte Andrasch

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner weiteren Doktorprüfung unterzogen habe und diese Dissertation in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung an keiner weiteren Fakultät eingereicht wurde.

Malte Andrasch