

**Molekulare Eigenschaften  
des Integrin-regulierenden  
ADAP-SKAP55-Signalkomplexes**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von M. Sc. Bernhard M. Meineke

geboren am 08. Oktober 1979 in Tübingen.

Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Schraven

Prof. Dr. Ottmar Janßen

eingereicht am: 19. Dezember 2011

verteidigt am: 23. Mai 2012



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Christian Freund, Freie Universität Berlin und Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, und Herrn Prof. Dr. Burkhard Schraven, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, von Januar 2007 bis Dezember 2011 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie auf dem Campus Berlin-Buch angefertigt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.2 Angeborenes und adaptives Immunsystem .....	1
1.3 T-Zellen-Migration und -Adhäsion und Bildung der Immunologischen Synapse .....	4
1.4 Signaltransduktion und T-Zell-Aktivierung .....	6
1.5 Integrine in T-Zellen.....	8
1.6 Inside-out-Signaling .....	9
1.7 Adapterproteine .....	11
1.8 ADAP (Adhesion and Degranulation promoting Adaptor Protein) .....	12
1.9 SKAP55 (Src Kinase-Associated Phosphoprotein of 55 kDa) .....	16
1.10 SKAP-HOM (SKAP55 homologue).....	18
1.11 Membranrekrutierung des ADAP-SKAP55-Komplexes und Integrinaktivierung.....	20
1.11.1 Phosphoinositide / Lipidmodifikation.....	23
1.12 Elektronenmikroskopie (EM) .....	24
1.12.1 EM- Einzelpartikelaufnahmen und Prozessierung für die Rekonstruktion .....	24
1.12.2 Einzelpartikelrekonstruktion.....	25
1.13 Kernmagnetische Resonanz (NMR) .....	26
1.13.1 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Heteronuclear-Single-Quantum-Coherence (HSQC)-Experimente .....	27
1.13.2 Triple-Resonanz-Experimente für die sequentielle Signalzuordnung .....	28
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.1 Materialien .....	32
3.1.1 Allgemeine Chemikalien .....	32
3.1.2 Spezielle Chemikalien .....	32
3.1.3 Isotope.....	32
3.1.4 Phosphoinositolphosphate und Inositolphosphate .....	32
3.1.5 Oligonukleotide und Expressionskonstrukte .....	33
3.1.6 Expressionskonstrukte .....	35
3.1.7 Bakterienstämme.....	37
3.1.8 Bakterienmedien .....	37
3.1.9 Geräte.....	39
3.1.10 Software .....	41
3.1.11 Antikörper.....	41
3.1.12 Allgemeine Puffer .....	41

3.2 Methoden.....	42
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	42
3.2.2 PCR-basierte Klonierung.....	42
3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
3.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	43
3.2.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	43
3.2.6 Restriktionsverdau von DNA.....	44
3.2.7 Ligation.....	44
3.2.8 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	44
3.2.9 Isolation hochreiner Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	45
3.2.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	45
3.3 Präparative und analytische proteinbiochemische Methoden.....	46
3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.3.2 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen durch Western-Blotting.....	46
3.3.3 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	47
3.4 Zellkulturmethoden.....	48
3.4.1 Zellkultur von Insektenzellen.....	48
3.4.2 Kryokonservierung von Insektenzellen.....	48
3.4.3 Baculovirus-Expressionssystem (BEVS).....	49
3.4.4 Herstellung rekombinanter Baculoviren.....	49
3.4.5 Insektenzelltransfektion und Baculovirus-Amplifikation.....	51
3.4.6 Baculovirus-Proteinexpression.....	52
3.4.7 Baculovirus-Titerbestimmung.....	53
3.4.8 IPTG-induzierte Genexpression in <i>E. coli</i> .....	54
3.4.9 Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen und Thrombinverdau.....	55
3.4.10 Affinitätschromatographie zur Reinigung von His-Fusionsproteinen.....	55
3.4.11 Affinitätschromatographie zur Reinigung von Strep-Fusionsproteinen.....	56
3.4.12 Blue Native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE).....	56
3.4.13 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen.....	57
3.4.14 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen.....	57
3.5 Biophysikalische Methoden zur Proteincharakterisierung.....	58
3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	58
3.5.2 Proteinankonzentration.....	58
3.6 Elektronenmikroskopische Methoden.....	59
3.6.1 GraFix-Methode.....	59
3.6.2 Herstellung eines linearen Sucrosegradienten.....	60
3.6.3 Rotationsapparatur für die Herstellung linearer Sucrosegradienten.....	61
3.6.4 Herstellung negativkontrastierter Proben und elektronenmikroskopischer Einzelpartikelaufnahmen von Proteinkomplexen.....	61
3.6.5 Bildverarbeitung für Elektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion.....	62

3.6.6	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	62
3.6.7	Analytische Gelfiltration .....	63
3.7	NMR-Spektroskopie .....	63
3.7.1	NMR-Datenprozessierung und Signalzuordnung .....	63
3.7.2	2D-NMR-Spektroskopie .....	64
3.7.3	3D-NMR-Spektroskopie .....	64
3.7.4	Selektivmarkierung von Aminosäuren .....	65
3.7.5	NMR-Titrationsexperimente .....	66
3.7.6	Berechnung der chemischen Verschiebung .....	66
3.7.7	$K_D$ -Wert-Bestimmung .....	66
3.7.8	Initialer Präzipitationstest .....	67
3.7.9	„Sitting drop“-Kristallisationsansätze .....	67
3.7.10	Massenspektrometrie .....	68
3.7.11	Isolation der zytoplasmatischen Fraktion von primären humanen T-Zellen durch hypotonische Lyse .....	68
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>69</b>
4.1.1	Expressionsversuche des Volle-Länge-Proteins in <i>E. coli</i> .....	69
4.1.2	Koexpression von ADAP und SKAP55 .....	70
4.1.3	Klonierungsstrategie für die Koexpression von ADAP- und SKAP55- Konstrukten in Insektenzellen .....	70
4.1.4	Koexpression von ADAP und SKAP55 in Insektenzellen .....	72
4.1.5	Aufreinigung des ADAP-SKAP55-Komplexes .....	72
4.1.6	Kristallisationsansätze .....	73
4.2	Biochemische Charakterisierung des ADAP-SKAP55-Komplexes .....	75
4.2.1	Analytische Gelfiltration und dynamische Lichtstreuung .....	76
4.2.2	Blue Native PAGE (BN-PAGE) .....	77
4.2.3	Hochmassen-massenspektrometrische Analyse des ADAP-SKAP55- Komplexes .....	79
4.3	Bestimmung der multimerbildenden Einheiten .....	83
4.3.1	Dimerbildung von SKAP55 .....	83
4.3.2	Multimerbildung von ADAP .....	84
4.4	GraFix-Methodenetablierung und Stabilisierung des ADAP-SKAP55-Komplexes für die Elektronenmikroskopie .....	86
4.4.1	Etablierung eines Gradientenmischers für lineare Sucrosegradienten .....	86
4.4.2	Stabilisierung von Komplexen mit der GraFix-Methode .....	87
4.4.3	Einzelmoleküldarstellung des ADAP-SKAP55-Komplexes im negativen Kontrast mit Schwermetallsalzen ohne Stabilisierung .....	89
4.4.4	Die Einzelmoleküldarstellung der GraFix-stabilisierten ADAP- und SKAP55-Komplexe im negativen Kontrast mit Schwermetallsalzen .....	91
4.4.5	3D-Rekonstruktion des ADAP-SKAP55-Komplexes .....	93
4.5	NMR-spektroskopische Untersuchung von SKAP55 .....	96

4.5.1	Sequentielles NMR-Assignment der PH-Domäne von SKAP55 .....	96
4.5.2	NMR-Titrationsexperimente .....	102
4.5.3	Bindung von Inositolphosphaten an die PH-Domäne von SKAP55 .....	102
4.5.4	<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC-Titrationsexperimente der His-SKAP55 PH-Domäne .....	103
4.5.5	Erkennung der Inositolphosphate durch die SKAP55 PH-Domäne .....	104
4.5.6	Phosphoinositolphosphatbindung der SKAP55 PH-Domäne.....	108
4.5.7	Dissoziationskonstanten der SKAP55 PH-Domäne für Phosphoinositolphosphate und deren Kopfgruppen .....	109
4.5.8	NMR-Titration des SKAP55 DM-PH-Konstruktes.....	111
4.5.9	Dissoziationskonstanten des SKAP55 DM-PH-Konstruktes für Inositol- phosphate .....	112
4.5.10	Octyl-Phosphoinositolphosphat-Titration des SKAP55 DM-PH-Konstruktes	114
4.5.11	SKAP55 DM-Domänen-Interaktion mit der RAPL-SARAH-Domäne .....	115
4.5.12	SKAP55-Pulldown in Anwesenheit von PIP3-C8.....	118
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>119</b>
5.1	Rekombinante Expression und Aufreinigung des ADAP-SKAP55-Komplexes .....	119
5.2	Stöchiometrie und Aufbau des ADAP-SKAP55-Komplexes .....	120
5.3	Elektronenmikroskopisches Strukturmodell des ADAP-SKAP55-Komplexes .....	123
5.4	Kristallisationsversuche.....	126
5.5	Assignment der SKAP55 PH-Domäne.....	127
5.6	Kopfgruppenerkennung und Inositolphosphatbindung der SKAP55 PH-Domäne....	127
5.7	Inhibition der Lipidbindung von SKAP55 durch die DM-Domäne .....	133
5.8	Modell der SKAP55-Lipidbindung und des Öffnungsmechanismus .....	135
5.9	Modell des ADAP-SKAP55-Komplexes und seiner Funktionen .....	138
5.9.1	Stöchiometrie und Aufbau.....	138
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>141</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>142</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>153</b>
10.1	Assignment-Tabelle PH-Domäne von SKAP55.....	157
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>160</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>161</b>
<b>13.</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>162</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	T-Zell-Migration in sekundäres lymphatisches Gewebe.....	4
Abbildung 2:	Dynamik der Immunologischen Synapse .....	5
Abbildung 3:	Schema der T-Zell-Aktivierung .....	6
Abbildung 4:	Inside-out-Signalweg.....	9
Abbildung 5:	Domänen-Struktur von ADAP .....	12
Abbildung 6:	NMR-Strukturen der helikal erweiterten hSH3-Domänen von ADAP.....	15
Abbildung 7:	SKAP55-Domänen-Struktur sowie Kristallstruktur der PH-Domäne.....	17
Abbildung 8:	Kristallstruktur der SKAP-HOM DM- und PH-Domäne .....	19
Abbildung 9:	Phosphatidylinositolphosphat und Phosphatmodifizierungen.....	23
Abbildung 10:	Partikelrekonstruktion in der Elektronenmikroskopie.....	25
Abbildung 11:	Das $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment.....	27
Abbildung 12:	Darstellung von 3D-NMR-Experimenten .....	29
Abbildung 13:	Sequentielle Zuordnung von NH-Resonanzen im Triple-Resonanzspektrum .....	30
Abbildung 14:	Flussschema zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren .....	51
Abbildung 15:	Flussdiagramm der Probenvorbereitung der GraFix-Methode.....	59
Abbildung 16:	Rotationsapparatur für die Herstellung linearer Sucrosegradienten.....	61
Abbildung 17:	Expressionstest von SKAP55 und His-ADAP in <i>E. coli</i> .....	69
Abbildung 18:	Schema des pFastBac Dual-Vektors .....	71
Abbildung 19:	Zeitabhängige ADAP- und SKAP55-Koexpression.....	72
Abbildung 20:	Koaufrreinigung von koexprimiertem His-ADAP und Strep-SKAP55.....	73
Abbildung 21:	Größenbestimmung des His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplexes.....	76
Abbildung 22:	BN-PAGE des rekombinanten ADAP-SKAP55-Komplexes .....	78
Abbildung 23:	Hochmassen-MALDI-ToF-Analyse von His-ADAP .....	80
Abbildung 24:	Die Hochmassen-MALDI-ToF-Analyse von ADAP und SKAP55.....	82
Abbildung 25:	Alignment der Proteinsequenz der SKAP-HOM-Dimerisierungsdomäne.....	83
Abbildung 26:	Analytische Gelfiltration und dynamische Lichtstreuung von SKAP55.....	84
Abbildung 27:	Diagramme der Sucrosegradienten.....	87
Abbildung 28:	GraFix-Fixierung von ADAP-SKAP55-Komplexen. ....	88
Abbildung 29:	TEM-Aufnahme von negativkontrastierten ADAP-SKAP55-Komplexen. ...	90
Abbildung 30:	Aufnahme von GraFix-stabilisiertem His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplex .	91
Abbildung 31:	TEM-Aufnahme von GraFix- stabilisierten His-ADAP-Komplexen.....	92
Abbildung 32:	Klassendurchschnitte des His-ADAP-Komplexes .....	93
Abbildung 33:	Klassendurchschnitte des His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplexes .....	94

Abbildung 34: 3D-Modell des His-ADAP und His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplexes.....	95
Abbildung 35: $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC-Spektren von selektiv markiertem His-SKAP55 PH .....	96
Abbildung 36: Assignment der $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -markierten SKAP55 PH-Domäne .....	98
Abbildung 37: Chemische Verschiebungen ( $\Delta\delta$ ) der $\text{C}_\alpha$ -, $\text{C}_\beta$ - sowie $\text{C}_\text{O}$ -Atome des SKAP55-PH-Konstruktes	99
Abbildung 38: Assignment des $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums der His-SKAP55 PH-Domäne.	100
Abbildung 39: Zugeordnete Aminosäuren des His-SKAP55 PH-Domänen-Konstruktes ...	101
Abbildung 40: Chemische Strukturen der Phospholipide bzw. Inositolphosphate .....	102
Abbildung 41: NMR-Titration der His-SKAP55 PH-Domäne mit IP4 .....	104
Abbildung 42: SKAP55 bindet Inositolphosphate über die $\beta$ 1- $\beta$ 2, $\beta$ 3- $\beta$ 4- und $\beta$ 6- $\beta$ 7-Loops.....	105
Abbildung 43: Inositol P3-Phosphatgruppen-Erkennung der SKAP55 PH-Domäne.. .....	107
Abbildung 44: NMR-Titration der His-SKAP55 PH-Domäne mit PIP3-C4 .....	108
Abbildung 45: Chemische Verschiebung des SKAP55 PH-Konstruktes bei PIP2-C4 bzw. PIP3-C4-Zugabe. ....	109
Abbildung 46: Verschiebung der Lysin 117 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Resonanz in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration.....	110
Abbildung 47: $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des SKAP55 DM-PH-Konstruktes, überlagert mit dem Spektrum der PH-Domäne.....	112
Abbildung 48: $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des SKAP55 DM-PH-Konstruktes mit PIP3-C8..	114
Abbildung 49: $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der SKAP55 DM-Domäne. Überlagerung mit dem DM-PH-Konstrukt .....	115
Abbildung 50: Interaktion der RAPL-SARAH-Domäne mit der MST1-SARAH-Domäne.	116
Abbildung 51: $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der SKAP55 DM-Domäne mit der RAPL-SARAH-Domäne. ....	117
Abbildung 52: Pulldown mit Lysat von Jurkat-Zellen .....	118
Abbildung 53: 3D-Oberflächendarstellung der Adhäsionsregion aus Patla et al. ....	124
Abbildung 54: Modell der beteiligten Aminosäuren der SKAP55 PH-Domäne bei IP4-Bindung .....	128
Abbildung 55: Zeitliche Lokalisation von GFP-SKAP55 in T-Zell-APC-Komplexen.....	132
Abbildung 56: Lokalisationsstudien von SKAP55-Wildtyp und -Mutanten.....	134
Abbildung 57: Modell der autoinhibierten PH-DM-Domäne des SKAP55.....	136
Abbildung 58: Modelle der ADAP-SKAP55-Komplexe .....	138
Abbildung 59: Vergleich der chemischen Verschiebung der SKAP55 PH-Domäne bei IP4- und IP3-Zugabe. ....	153

---

Abbildung 60: Vergleich der chemischen Verschiebung der SKAP55 PH-Domäne bei PIP3-C4 bzw. PIP2-C4-Zugabe.....	154
Abbildung 61: NMR-Titration der His-SKAP55 PH-Domäne mit IP3.....	155
Abbildung 62: NMR-Titration der His-SKAP55 PH-Domäne mit PIP2-C4.....	155
Abbildung 63: Überlagerung der $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von SKAP55-Konstrukten.....	156
Abbildung 64: Wahrscheinlichkeitsvorhersage des Programms COILS für ADAP.....	156
Abbildung 65: Zeitabhängige Clusteranalyse der Proteinlokalisierung in murinen T-Zellen nach T-Zell-APC-Kontakt.....	159

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Oligonukleotide.....	33
Tabelle 2:	Bezeichnung der Expressionskonstrukte und der verwendeten Oligonukleotide.....	36
Tabelle 3:	Pipettierschema für M9-Medium.....	38
Tabelle 4:	Verwendete Geräte .....	40
Tabelle 5:	Verwendete Software .....	41
Tabelle 6:	Programm zur quantitativen Real-Time-PCR für Baculovirus-Titerbestimmung.....	53
Tabelle 7:	Aminosäurezusammensetzung für selektive <sup>15</sup> N-Markierung .....	65
Tabelle 8:	Tabellarische Darstellung der Konstrukte und Kristallisationskits.....	74
Tabelle 9:	Größenanalyse von rekombinant exprimierten ADAP-Konstrukten .....	85
Tabelle 10:	Dissoziationskonstanten der SKAP55 PH-Domäne .....	111
Tabelle 11:	Dissoziationskonstanten des SKAP55 DM-PH-Domänen-Konstruktes.....	113
Tabelle 12:	In Helix 1 und 2 gegenüberliegende Aminosäuren der SKAP-HOM-Struktur im Vergleich zum SKAP55-Homologie-Modell.....	122
Tabelle 13:	Assignte Resonanzen der His-SKAP55 PH-Domäne .....	158

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Während der Evolution hat sich ein komplexes und reguliertes Immunsystem zum Schutz von eukaryotischen Organismen entwickelt. Es schützt den Organismus vor pathogenen Mikroorganismen, Toxinen, körperfremden Partikeln sowie körpereigenen entarteten Zellen. Eine zu schwache als auch eine zu starke Reaktion des Immunsystems kann zum Tod des Organismus führen. Beispiele hierfür sind die Immunsuppression bei einer HIV-Infektion oder der anaphylaktische Schock bei einer Allergie. Das Immunsystem muss örtlich und zeitlich angemessen auf die entsprechenden Gefährdungen reagieren. Man unterscheidet das angeborene und das adaptive Immunsystem.

## 1.2 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Der angeborene und entwicklungsgeschichtlich ältere Abwehrmechanismus wird auch als angeborene Immunabwehr bezeichnet. Das Eindringen von pathogenen Organismen wird durch Barrieren verhindert, wie z.B. den mechanischen Schutz der Haut, den chemischen Schutz durch den pH-Wert und den biochemischen Schutz durch antimikrobielle Peptide und Enzyme. Wenn es dem pathogenen Organismus gelingt, diese Barrieren zu durchbrechen, wirken im Blutplasma gelöste Stoffe wie Antikörper und das Komplementsystem. Die Komponenten des Komplementsystems, die durch eine Proteasekaskade aktiviert werden, mobilisieren die Antikörper der adaptiven Immunantwort, verstärken die Entzündungsreaktion und führen u.a. durch Porenbildung in der Bakterienzellwand zur Lyse des Pathogens. Die zellulären Komponenten der angeborenen Immunantwort - wie z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und natürliche Killerzellen - töten Pathogene durch Phagozytose und Lyse. Ermöglicht wird dies durch Mustererkennungsrezeptoren auf der Oberfläche von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen [1]. Diese Rezeptoren erkennen z.B. Lipopolysaccharide, unmethylierte DNA und Zuckerstrukturen. Durch Phagozytose und Aktivierung des Komplementsystems wird eine Vielzahl von Erregern innerhalb von Stunden nach Eindringen in den Organismus eliminiert [2].

Ist die angeborene Immunabwehr alleine nicht erfolgreich, kommt es zur Aktivierung der spezifischen Immunabwehr [3]. Diese wird vermittelt durch humorale Komponenten wie die von B-Zellen produzierten Antikörper und durch zelluläre Komponenten wie z.B. den T-Helferzellen ( $T_H1$  und  $T_H2$ ), den zytotoxischen und den regulatorischen T-Zellen ( $T_H17$  und Tregs) [4].

B- und T-Vorläuferzellen werden im Knochenmark gebildet und exprimieren jeweils einen spezifischen T- bzw. B-Zellrezeptor. Die B-Zellen reifen im Knochenmark heran und differenzieren nach Aktivierung des B-Zellrezeptors zu Antikörper produzierenden Plasmazellen und vermitteln so die humorale Immunantwort. Die sekretierten Antikörper binden Pathogene und neutralisieren bzw. markieren diese für weitere Zellen des Immunsystems. Die Bedeckung der Fremdkörper-Oberfläche wird als Opsonisierung bezeichnet und richtet sich gegen extrazelluläre Pathogene [5].

Die zellvermittelte adaptive Immunantwort zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene erfolgt durch T-Zellen. Die Identifikation findet durch die spezifische Bindung des T-Zellrezeptors (TCR) an einen mit Antigen beladenen MHC-Komplex (Major Histocompatibility Complex) statt. Zwei Klassen der MHC-Moleküle werden unterschieden. Zellen, die Antigene über den MHC-II-Komplex auf der Zelloberfläche präsentieren, werden als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (antigen presenting cells: APC) bezeichnet [6]. Der MHC-I-Komplex wird nahezu ubiquitär auf allen Körperzellen exprimiert und präsentiert in der Regel Peptide aus dem Zytosol der Zelle. Die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems wie dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimieren und präsentieren zusätzlich Peptide aus intrazellulären Vesikeln [7, 8].

Knochenmark und Thymus werden als primäre lymphatische Organe bezeichnet. Vorläufer von T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus, wo sie während der T-Zell-Entwicklung durch das Expressionsmuster der Korezeptoren CD4 oder CD8 auf den T-Zellen charakterisiert sind. Diese Stadien werden entsprechend als doppelt negativ (DN,  $CD4^-/CD8^-$ ), doppelt positiv (DP,  $CD4^+/CD8^+$ ) und einzeln (single) positiv (SP,  $CD4^+$  oder  $CD8^+$ ) bezeichnet [9]. Im DN-Stadium wird ein Vorläufer-TCR (pre-TCR) aus einer Vorläufer- $\alpha$ -Kette und der rekombinierten  $\beta$ -Kette gebildet. Durch Neukombination von Gensegmenten wird die hohe Variabilität des TCRs erzielt. Nur wenn ein funktioneller pre-TCR gebildet wurde, passiert die T-Zelle die sogenannte  $\beta$ -Selektion. Andernfalls wird sie durch Apoptose getötet und geht nicht in das DP-Stadium über. Im DP-Stadium sterben die Zellen, die zu stark an MHC-Selbst-Peptid-Komplexe binden, ebenfalls. Die reifenden T-Zellen werden nur dann im DP-Stadium positiv selektioniert, wenn sie den MHC-Selbst-Peptid-Komplex zwar erkennen, aber mit einer Affinität, die nicht zur Hyperaktivierung der Signalwege und Induktion der Apoptose führt [10]. Nach positiver Selektion und Reifung zu SP  $CD4$  oder  $CD8$  T-Zellen verlassen diese immer noch "naiven" Zellen, die noch nicht mit Fremd-Antigen in Berührung gekommen sind, den Thymus. Sie zirkulieren

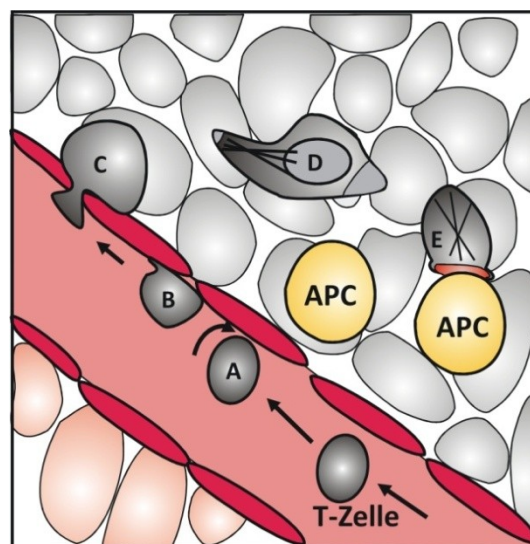
und besiedeln die sekundärlymphatischen Organe wie Milz, Lymphknoten, Tonsillen und Peyer-Plaques. Dendritische Vorläuferzellen wie Langerhanszellen phagozytieren Antigene in der Peripherie und wandern anschließend in die sekundären lymphatischen Organe. Nach Differenzierung zu dendritischen Zellen stimulieren sie dort die naiven T-Zellen durch die präsentierten Antigene und durch Kofaktoren [11, 12].

Die CD8-positiven T-Zellen binden an Zellen mit MHC-I-Molekülen an der Oberfläche und werden als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie töten bereits infizierte oder entartete Zellen durch Induktion von Fas-vermittelter Apoptose oder durch die gerichtete Ausschüttung lytischer Granula [13]. Die von den antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems auf der Oberfläche exprimierten MHC-II-Moleküle werden von CD4-positiven T-Zellen erkannt. Wenn zusätzlich eine Kostimulation des T-Zell Moleküls CD28 durch B7-Proteine auf der APC stattfindet, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle. Abhängig vom Zytokinmilieu beim Kontakt mit der Antigen-präsentierenden Zelle differenzieren die Zellen in  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -T-Zellen. Zudem können sich  $CD4^+$  T-Zellen in  $T_H17$  oder regulatorische T-Zellen (Treg) differenzieren [14]. Diese modulieren bzw. erhalten die Toleranz von T-Zellen, die körpereigenes Peptid erkennenden. Inflammatorische  $T_H1$ -Zellen aktivieren insbesondere Makrophagen durch Sekretion von Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und von Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).  $T_H2$ -Zellen stimulieren durch Sekretion von Interleukin-4 die Antikörperproduktion von B-Zellen.

Nach Ablauf der Immunantwort verbleibt ein geringer Anteil der differenzierten T- und B-Zellen als T- und B-Gedächtniszellen. Dies ermöglicht eine schnellere Reaktion bei einer erneuten Immunantwort auf das gleiche Pathogen. Diese sogenannte sekundäre Immunantwort führt zu einer lang anhaltenden Immunisierung gegenüber bereits bekämpften Pathogenen [15, 16].

### 1.3 T-Zellen-Migration und -Adhäsion und Bildung der Immunologischen Synapse

Die Rekrutierung naiver T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe bzw. aktivierter T-Zellen an den Entzündungsherd erfolgt in einem mehrstufigen Prozess (siehe Abbildung 1) [17]. Im ersten Kontakt binden Oberflächen-Glycoproteine der T-Zellen an E-, L- und P-Selektine der Epithelzellen. Diese schwache Bindung führt zu einer langsamen rollenden Bewegung und lokalen Anreicherung von T-Zellen. In einem weiteren Schritt werden durch Chemokine die Integrine, wie z.B. LFA-1, auf den T-Zellen aktiviert [18]. Zusätzlich werden bei einer Entzündungsreaktion durch Cytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$  die Integrin-Rezeptoren ICAM-1 auf Endothelzellen am Entzündungsort verstärkt exprimiert. Die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 führt zu einer starken Adhäsion der T-Zelle an das Endothel. Anschließend migrieren die T-Zellen durch Diapedese in das sekundär lymphatische Organ bzw. in den Entzündungsherd ein [19].

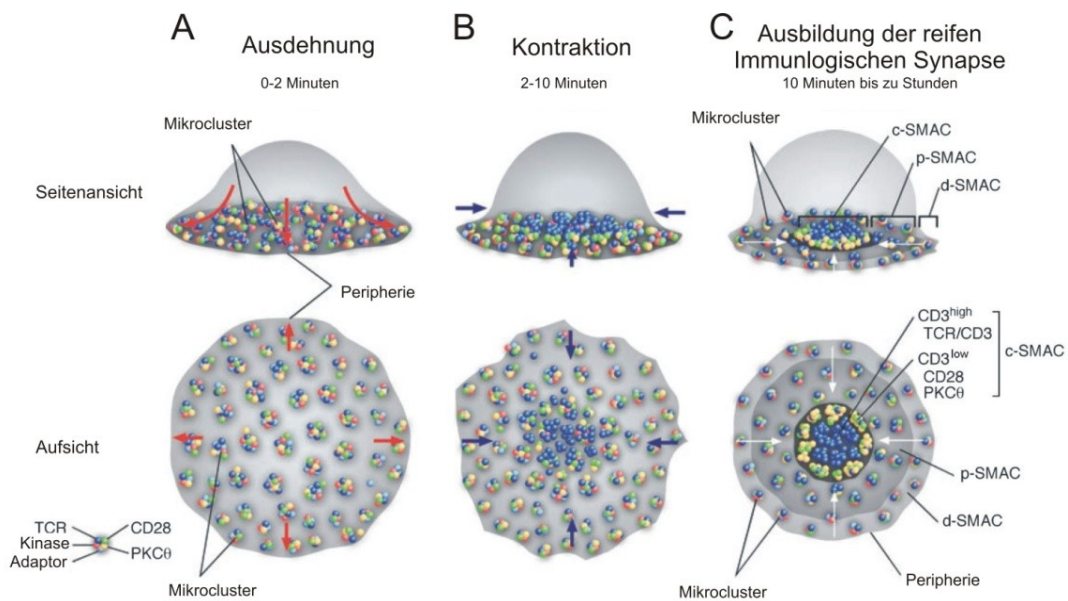


**Abbildung 1: T-Zell-Migration in sekundäres lymphatisches Gewebe. Mehrstufiger Prozess der Extravasation von T-Zellen aus dem Blutstrom ins Gewebe. A) Schwache dynamische Interaktionen induzieren rollende Bewegung der T-Zellen, B) Chemokin-vermittelte Adhäsion am Endothel, C) Extravasation ins Gewebe, D) Migration zur Antigen-präsentierenden Zelle (APC). E) Ausbildung der Immunologischen Synapse zwischen APC und T-Zelle. Abbildung nach Dr. S. Kliche, Universität Magdeburg.**

Die Migration wird z.B. durch die Chemokine CCL21 oder CCL19 vermittelt, die von Stromazellen der sekundären lymphatischen Organe gebildet werden. Sowohl naive T-Zellen als auch reife dendritische Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7. In der T-Zell-Zone treffen APC und T-Zelle zusammen. Bei Antigenerkennung des TCR bildet sich um den TCR-MHC-Peptidkomplex eine konzentrische Struktur der Oberflächenmoleküle zwischen der APC und T-Zelle aus. Diese Interaktionsfläche wird als



Immunologische Synapse oder SMAC (supramolecular activation cluster) bezeichnet [20]. Im Zentrum der Kontaktfläche bildet sich der c-SMAC (central supramolecular activation cluster) mit Mikroclustern aus, die TCR, CD2, SLP-76, ZAP70, PKC $\theta$ , LAT, CD3 sowie PI3K enthalten. Um dieses Zentrum organisieren sich Adhäsionsmoleküle wie das Integrin LFA-1 (Leucocyte Function-Associated Antigen-1) und Zytoskelettkomponenten, wie z.B. F-Aktin. Dieser Bereich wird als p-SMAC (peripheral supramolecular activation cluster) bezeichnet (siehe Abbildung 2, C). In der äußersten Region, dem d (distal)-SMAC sammeln sich die Tyrosin-Phosphatase CD45 und das Sialylglykoprotein CD43 [21].



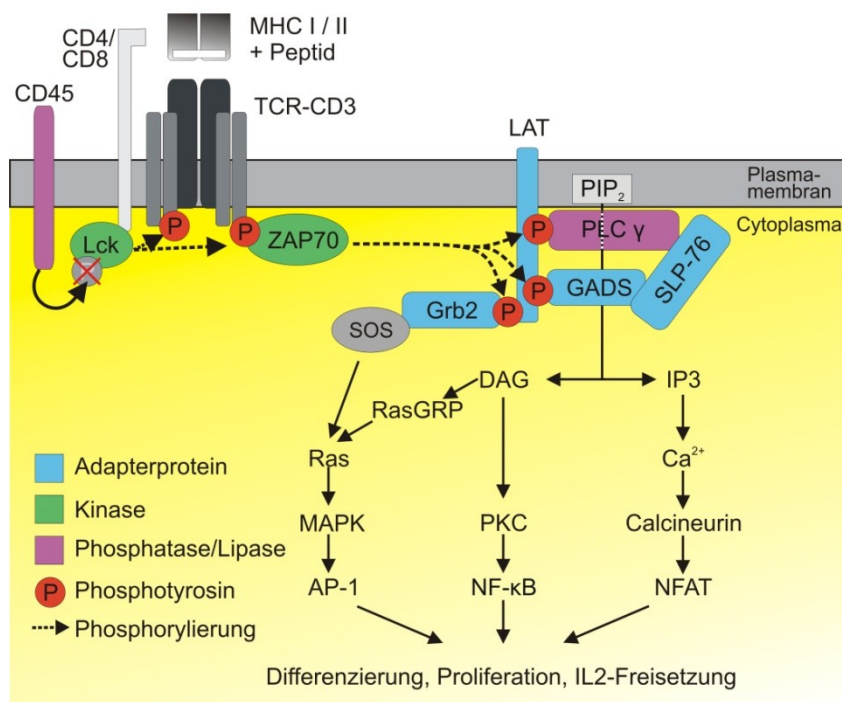
**Abbildung 2: Dynamik der Immunologischen Synapse.** A) Nach Kontakt der T-Zelle mit MHC-Molekülen bilden sich Mikrocluster aus TCR, Korezeptoren, Kinasen sowie Adapterproteinen aus. Die Kontaktfläche weitet sich konzentrisch aus und bildet an der Peripherie weitere Mikrocluster. B) Nach Ausbildung der vollständigen Kontaktfläche fusionieren die Mikrocluster zu größeren Clustern und konzentrieren sich im Zentrum der Synapse. C) Die ausgebildete Synapse enthält im Zentrum, dem c-SMAC (central supramolecular activation cluster), T-Zell- sowie Korezeptoren. Der c-SMAC wird von Adhäsions- sowie Kinase-Molekülen umgeben, dem p-SMAC (peripheral-SMAC). Weitere Mikrocluster bilden sich in der Peripherie, dem d-SMAC (distal-SMAC), und wandern in das Zentrum der Synapse. Abbildung modifiziert nach Yokosuka und Saito 2009 [21].

Die Stimulation der T-Zelle durch die APC führt zur Polarisation der T-Zelle. Aktin-Zytoskelett regulierende Proteine wie WAVE2, WASP und Arp2/3 induzieren die Polarisation und die Verzweigung von filamentösem Aktin (F-Aktin) in der pSMAC-Region [22]. F-Aktin expandiert konzentrisch in die Kontaktfläche zwischen T-Zelle und APC, lokalisiert Signalkomplexe und führt zur Stabilisierung der Immunologischen Synapse. Zusätzlich verlagert sich das MTOC (microtubule organizing center) in die Nähe der Immunologischen Synapse und ermöglicht dabei die gerichtete Sekretion von zytotoxischen Granula an die Plasmamembran der Immunologischen Synapse [23]. Die

Immunologische Synapse ist hoch dynamisch und wahrscheinlich für die optimale Aktivierung der T-Zelle nötig [24, 25].

### 1.4 Signaltransduktion und T-Zell-Aktivierung

Jede T-Zelle exprimiert einen für sie spezifischen T-Zellrezeptor, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Durch genetische Rekombination von Immunglobulin-Genen wird eine sehr hohe Variabilität dieses transmembranären Rezeptors erzeugt, der eine spezifische Erkennung des Antigen präsentierenden MHC ermöglicht. Die zytoplasmatischen Enden des TCR sind sehr kurz. Die Signalweiterleitung erfolgt daher durch die längeren zytoplasmatischen Enden des CD3-Komplexes. Der CD3-Komplex ist an den TCR gebunden und besteht aus einem  $\gamma\epsilon$ -,  $\delta\epsilon$ -Hetero- sowie  $\zeta\zeta$ -Homo-Dimeren [26]. In den zytoplasmatischen Enden enthalten diese ein oder mehrere sogenannte ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Eines der ersten Signale ist die Phosphorylierung dieser ITAMs in den zytoplasmatischen Enden des TCR-assozierten CD3-Multiproteinkomplexes durch Src-Kinasen wie Lck und Fyn [27].



**Abbildung 3: Schema der T-Zell-Aktivierung.** Assoziation des T-Zellrezeptors mit dem MHC-Peptid sowie weiterer Korezeptoren. Lck ist an den Korezeptor CD4 bzw. CD8 gebunden und phosphoryliert nach TCR-CD3-Stimulation Tyrosin-Motive der zytoplasmatischen Enden des CD3-Rezeptormoleküls. Die Kinase ZAP70 wird an die phosphorylierten ITAMs rekrutiert und phosphoryliert das membranständige Adapterprotein LAT. An phosphoryliertes LAT binden die Adapterproteine GADS, Grb2 sowie die Phospholipase PLC  $\gamma$ . Das an GADS bindende SLP-76 wird so ebenfalls rekrutiert. PLC  $\gamma$  wird aktiviert und spaltet PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG. Diese sekundären Botenstoffe sowie SOS, das über die Assoziation mit Grb2 an LAT rekrutiert wird, aktivieren Signalwege, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen.

Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion über die Zellmembran ist nicht bekannt. Die Bindung des T-Zellrezeptors sowie der Korezeptoren CD4 bzw. CD8 an den MHC-Komplex reicht nicht für die Aktivierung einer naiven T-Zelle aus. Es wird ein weiteres vom TCR unabhängiges Signal benötigt. Ein Kostimulus erfolgt durch den Rezeptor CD28. Dieser wird von den auf APC exprimierten Glykoproteinen der B7-Familie - B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) - gebunden. Fehlt dieser Kostimulus, verhält sich die Zelle tolerant oder anerg [28].

Die Kinase Lck ist konstitutiv mit dem zytoplasmatischen Ende von CD4 bzw. CD8 assoziiert und wird durch Dephosphorylierung der inhibitorischen Phosphatgruppe durch die Proteinphosphatase CD45 aktiviert (Abbildung 3). Die zur Src-Familie gehörenden Kinasen Lck und Fyn phosphorylieren die Tyrosin-Motive (ITAMs) der  $\zeta$ -Kette des CD3-TCR-Komplexes [29]. Durch Bindung der SH2-Domänen an die ITAMs wird ZAP70 ( $\zeta$ -associated Protein) rekrutiert, durch Lck phosphoryliert und damit aktiviert. Substrat der ZAP70-Kinase ist das transmembranäre und durch Palmitoylierung an der Plasmamembran in Lipid-Rafts verankerte LAT (Linker of Activated T-cells). An das phosphorylierte LAT binden GADS (Grb2-Related Adaptor Downstream of Shc) und Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) [30]. SLP76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) ist konstitutiv an das Adapterprotein GADS gebunden und wird nach der Rekrutierung von ZAP70 phosphoryliert. Phosphoryliertes SLP76 bindet die Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase  $C\gamma$  (PLC  $\gamma$ ). Nach Tec-Kinase-Aktivierung spaltet PLC  $\gamma$  Phosphatidyl-Inositoldiphosphat (PIP2) in die sekundären Botenstoffe Inositol-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 aktiviert durch Öffnung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Kanäle die Kalzium-abhängige Proteinkinase C (PKC) sowie die Phosphatase Calcineurin, welche wiederum die Translokation der Transkriptionsfaktoren NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells) und NF- $\kappa$ B in den Zellkern induzieren. Der an Grb2 bindende Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor SOS (Son Of Sevenless) aktiviert über den Ras-MAP-Kinase-Signalweg den Transkriptionsfaktor AP-1 (Activating Protein 1). Die Transkriptionsfaktoren führen zur IL2-Produktion, Differenzierung und Proliferation der T-Zelle [30-32].

### 1.5 Integrine in T-Zellen

Integrine vermitteln die schnelle und feste Adhäsion der T-Zelle aus dem Blutstrom an die Wand der Blutgefäße sowie die feste Bindung der T-Zelle an die Antigen präsentierende Zelle in der Immunologischen Synapse. Integrine werden aus einer transmembranständigen, nicht kovalent verknüpften  $\alpha$ - sowie  $\beta$ -Kette gebildet. In Säugern werden aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Ketten 24 unterschiedliche Dimere gebildet. T-Zellen exprimieren 12 unterschiedliche Integrin-Heterodimere. Am stärksten exprimiert werden die zur  $\beta$ 1-Integrinfamilie gehörenden Integrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 1,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 6 $\beta$ 1, auch als VLA (Very Late Antigen) bezeichnet, sowie das zur  $\beta$ 2-Familie gehörende  $\alpha$ L $\beta$ 2-Integrin, welches als LFA-1 (Leukocyte Function-associated Antigen-1) bezeichnet wird [33]. LFA-1 interagiert mit den interzellulären Adhäsionsmolekülen ICAM-1,-2,-3 (Intercellular Adhesion Molecule-1, -2, -3). Die  $\beta$ 1-Integrinfamilie bindet das von Endothelzellen nach Zytokinstimulus exprimierte VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) und das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen für Integrine mehrere Konformationen, die unterschiedlichen, *in vitro* beobachteten, bindungskompetenten Zuständen zugeordnet werden [34]. Die Ektodomäne besteht aus einer Kopfgruppe, die durch eine stäbchenförmige, „beinähnliche“ Struktur mit der Transmembran-Domäne verbunden ist und in einen kurzen zytoplasmatischen Teil mündet. Die Bindung des Liganden ICAM-1 erfolgt über die Kopfgruppe des Integrins. In der offenen hochaffinen Konformation (siehe Abbildung 4 ) stehen nur die Kopfgruppen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette in Kontakt, die „Beine“ sowie die zytoplasmatischen Enden sind voneinander separiert. Die „geschlossene“ Konformation zeigt eine an sich selbst zurück gefaltete Ektodomäne. Beide „Beine“ der Ektodomäne sowie die transmembranären und zytoplasmatischen Domänen interagieren miteinander. Zusätzlich wurde eine intermediäre Konformation beobachtet, die mit mittlerer Affinität in einer gestreckten Konformation vorliegt [35]. Die Informationsweiterleitung über die Membran wird durch Konformationsänderungen vermittelt. Die extrazelluläre Interaktion mit dem natürlichen Liganden oder  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  mit der Kopfgruppe führt zur offenen hochaffinen Konformation des LFA-1 Integrins. Daraus ergibt sich ein bidirektionales Modell für die Signalweiterleitung der Integrine, d.h. die Aktivität der Integrine kann sowohl von extrazellulären Liganden („outside-in“) oder intrazellulären Bindungspartnern („inside-out“) moduliert werden.

Integrine stellen als Transmembranproteine die mechanische Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix bzw. der Antigen präsentierenden Zelle und dem Zytoskelett der T-Zelle her. An das zytoplasmatische Ende der  $\beta_2$ -Integrine bindet Talin und verbindet die Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle [36].

## 1.6 Inside-out-Signaling

Die dynamische Regulierung der Integrine auf der T-Zell-Oberfläche durch Signalwege innerhalb der Zelle wird als Inside-out-Signaling bezeichnet. Hierzu zählt die Konformationsänderung der Integrine in die offene hochaffine Form (siehe Abbildung 4) sowie die Steigerung der Avidität durch örtliche Lokalisation der Integrine in sogenannten Clustern.

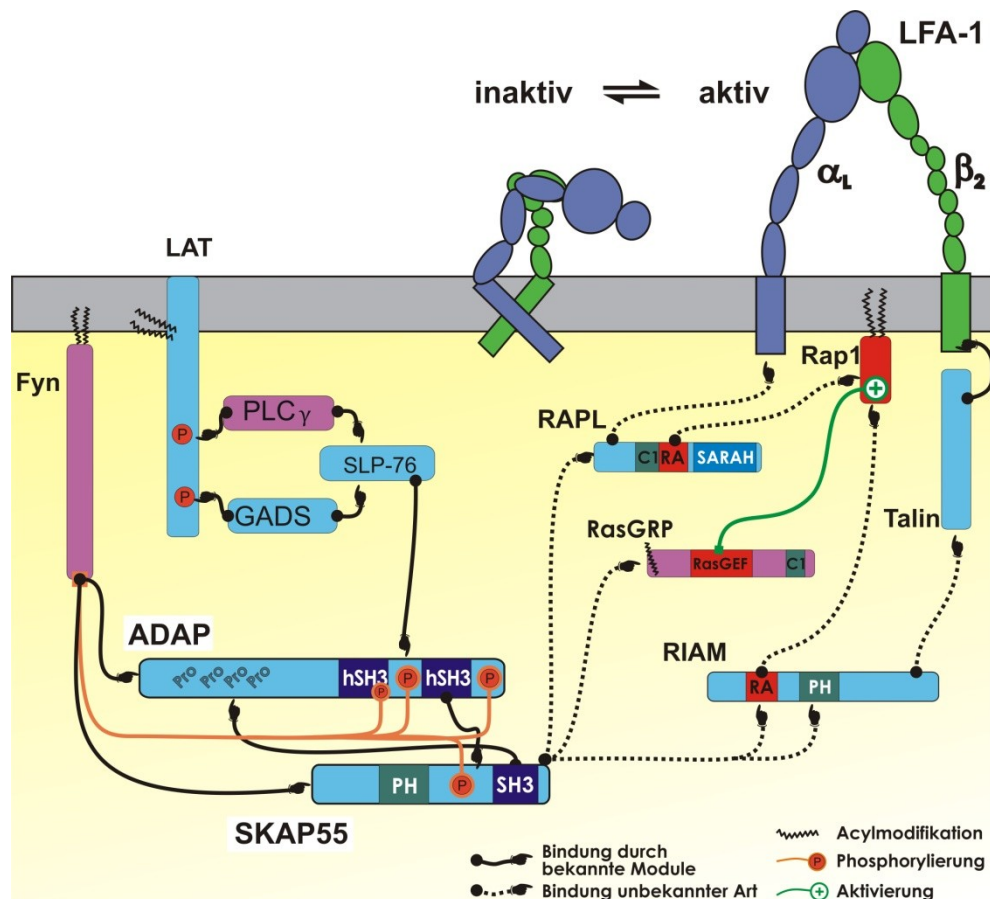


Abbildung 4: Inside-out-Signaling: Die Phosphorylierung von LAT vermittelt durch GADS und SLP76 - nach TCR-Stimulus - die Rekrutierung von ADAP und SKAP55 an die Membran. SKAP55 interagiert mit RAPL, RIAM und dem Rap1 aktivierenden RasGRP. RIAM und RAPL binden aktives Rap1 und sind direkt oder über Talin mit den zytoplasmatischen Enden der Integrin  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette assoziiert. Die Lokalisation von aktivem Rap1 an die Plasmamembran aktiviert die Integrine.

Eine zentrale regulatorische Funktion in der Integrinaktivierung nimmt die kleine GTPase Rap1 (Ras-proximity-1) ein. Dies wurde in Überexpressions-, Knock-out- sowie Mutations-Studien gezeigt [37, 38]. Die GTP-gebundene Form von Rap1 an der Plasmamembran führt zur Integrinaktivierung. Für den Ort der Rap1-Aktivierung gibt es unterschiedliche Hypothesen. Einige Ergebnisse weisen auf eine Aktivierung an den endosomalen Vesikeln, andere auf die Aktivierung an der Plasmamembran hin [39, 40]. In T-Zellen wurden für die Rap1-Aktivierung, d.h. den GDP zu GTP-Austausch von Rap1, die beiden Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor) C3G (Alternativname: RapGEF1) und RasGRP1 (Alternativname: CalDAG-GEF1: Ca<sup>2+</sup> und DAG-regulierter GEF Faktor I) identifiziert [41]. Rap1 ist durch eine C-terminale Geranyl-Geranyl-Lipidmodifizierung konstitutiv an Membranen gebunden und wird sowohl an der Plasmamembran als auch in Vesikeln des endo- und exozytoplasmatischen Recyclings gefunden. Die Lokalisation von aktiviertem Rap1 an die Plasmamembran ist ein regulatorischer Schritt in der Integrinaktivierung. An der Lokalisation sind die Rap1-bindenden Proteine RIAM und RAPL über direkte Interaktionen mit Rap1 beteiligt [42].

RIAM (Rap1-GTP-Interacting Adaptor Molecule) bindet aktives Rap1 über die RA-Domäne (Ras–Rap1 binding domain) sowie Talin über den N-Terminus. Die Lokalisation von Talin und aktivem Rap1 durch RIAM an das zytoplasmatische Ende des  $\beta_2$ -Integrins führt zur Integrinaktivierung [43, 44]. Die Bindung von Talin an das zytoplasmatische Integrin-Ende wird durch Kindlin 3 verstärkt. Mutationen in Kindlin 3 führen zu nicht aktivierbaren  $\beta$ -Integrinen. Diese Defekte in der Integrin-abhängigen Adhäsion und Migration führen zu erhöhter Infektionsanfälligkeit und Blutungsneigung. Diese Krankheit wird als LAD-III (Leukocyte Adhesion Deficiency-III) bezeichnet [45]. Überexpression von RIAM führt nach TCR-Stimulation zu einer verstärkten Adhäsion von T-Zellen an Fibronectin und ICAM-1 [41, 44]. Zudem bindet RIAM an SKAP55. Wird diese Interaktion inhibiert, ist die TCR-abhängige Adhäsion und Ausbildung von Zell-Zell-Komplexen aus T-Zellen und APCs vermindert (siehe auch 1.11) [41].

RAPL (Regulator of Adhesion and cell Polarization enriched in Lymphoid tissues, Alternativnamen: RASSF5, NORE1B, RASSF3) bindet an die zytoplasmatische  $\alpha_L$ -Kette der Integrine. T- und B-Zellen ohne RAPL zeigen Defekte in der T-Zell-Adhäsion und -Migration sowie dem LFA-1-Clustering. Überexpression von RAPL führt zu einem verstärkten LFA-1-Clustering und erhöhter Adhäsion [46]. RAPL enthält neben einer Rap1 bindenden RA-Domäne eine C-terminal gelegene SARA-Domäne [47, 48]. Die SARA-Domäne bindet die Serin-Threonin-Kinase MST1 (Mammalian Sterile 20-like). Zudem

wurde eine Bindung an den N-Terminus von SKAP55 beschrieben [49]. MST1-defiziente T-Zellen weisen in der Chemokin- sowie TCR-abhängigen Adhäsion und dem Integrin-Clustering eine nahezu vollständige Inhibition auf [50].

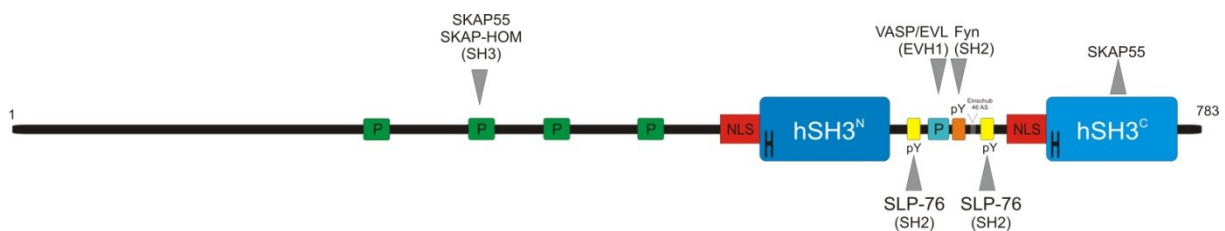
Im Inside-out-Signaling vermitteln Integrine kostimulatorische Signale für die Differenzierung von T-Zellen. Das durch den Inside-out-Signalweg aktivierte LFA-1 kann ICAM-1 binden und führt so zu einer vollständigen Aktivierung der Integrine und einer verstärkten Adhäsion. D.h. die Integrine gehen von der mittelaaffinen in die hochaffine Konformation über (siehe Abbildung 4). An dieser vollständigen Integrinaktivierung durch den Outside-in-Signalweg sind die bereits im Inside-out-Signalweg gebildeten Komplexe beteiligt (siehe 1.8). Die genauen molekularen Mechanismen sind wie im Inside-out-Signalweg nicht bekannt.

## **1.7 Adapterproteine**

Adapterproteine besitzen keine enzymatische Aktivität. Ihre Funktionsweise liegt in der Lokalisierung bzw. Delokalisation von Proteinen. Enzyme enthalten häufig Adapterdomänen, welche die Lokalisation und die Aktivität bestimmen [51, 52]. Die Interaktionen werden durch Protein-Domänen, d.h. die kleinsten, eigenständig gefalteten, strukturellen und funktionellen Einheiten, vermittelt [53]. Für Protein-Protein-Interaktionen sind z.B. die Bindung von SH3-, WW-, GYF-, EVH1- Domänen an prolinreiche Sequenzen beschrieben worden [54-57]. Ein regulatorischer Mechanismus für Protein-Protein-Interaktionen zur Komplexbildung ist z.B. die Erkennung von unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen. Phosphorylierungen an Serinen, Threoninen und Tyrosinen in Proteinen werden z.B. über SH2- und PTB- Domänen [57] erkannt. Phosphorylierungen am Inositolring von Lipiden werden über PH-, FYVE-, PX-, PHD- und FERM-Domänen erkannt [58-61]. Die posttranslationale Modifikation der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung kann sehr schnell ausgeführt werden. Bei T-Zell-Aktivierung werden Proteine und Lipide der Plasmamembran verstärkt phosphoryliert [62, 63].

## 1.8 ADAP (Adhesion and Degranulation promoting Adaptor Protein)

ADAP wurde durch die Assoziation mit dem Adapterprotein SLP76 und als Substrat der Fyn-Kinase erstmals identifiziert und beschrieben. Die Isolation des kodierenden Gens aus humanen sowie murinen cDNA-Bibliotheken erfolgte in zwei Forschergruppen unabhängig voneinander unter den Synonymen SLAP-130 (SLP76-Associated Phosphoprotein of 130 kDa) und FYB (Fyn-Binding protein) [64, 65]. Zwei Isoformen von 120 und 130 kDa sind bekannt. Die Splice-Varianten unterscheiden sich durch einen Einschub von 46 Aminosäuren (Position: Glycin 636). Dieser Einschub liegt zwischen den C-terminal gelegenen hSH3-Domänen sowie zwischen der Fyn- und der C-terminal gelegenen SLP76-Bindungsstelle. Die längere Version findet sich hauptsächlich in reifen peripheren T-Zellen, wohingegen die kurze Variante in unreifen T-Zellen gefunden wird. Die mRNA von ADAP wurde in allen haematopoetischen Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten und B-Zellen nachgewiesen [66, 67].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von ADAP. Der N-Terminus von ADAP enthält keine bekannten Strukturelemente. Die prolinreichen Sequenzen sind mit P bezeichnet. Die C-terminal gelegenen und helikal erweiterten SH3-Domänen (hSH3) sowie die Kern-Lokalisationssequenzen (NLS) sind blau bzw. rot eingefärbt. Die Interaktionspartner bzw. deren bindende Domänen sind ober- und unterhalb dargestellt. Phosphotyrosin-abhängige Interaktionen sind mit pY gekennzeichnet.**

Über das erste Drittel der N-terminalen Hälfte der 783 Aminosäure langen Splice-Variante (120 kDa) von ADAP gibt es keine strukturellen und funktionellen Informationen. Im mittleren Drittel von ADAP befinden sich mehrere prolinreiche Sequenzen, eine wird durch die hSH3-Domäne von SKAP55 gebunden (Abbildung 5). Für die C-terminale Hälfte sind zwei hSH3-Domänen sowie mehrere Interaktionspartner bekannt. Diese binden zwischen den hSH3-Domänen phosphorylierungsabhängig an Phosphotyrosine oder an eine prolinreiche Sequenz. Zudem wurden vor den SH3-Domänen Kernlokalisations-Signalsequenzen (NLS, Nuclear Localisation Sequences) vorhergesagt, deren Funktion und Bedeutung bis jetzt nicht bekannt sind [66].



Bei TCR–Stimulation zeigen Jurkatzellen, die mit ADAP, Fyn sowie SLP76 kotransfiziert wurden, eine verstärkte IL-2-Produktion. In ADAP-defizienten Zellen wurden keine Defekte in der T-Zellrezeptor-abhängigen MAP-Kinase-Phosphorylierung (ERK1/2), Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung oder Aktin-Polymerisation beobachtet, jedoch in der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrin-Adhäsion sowie im Clustering von LFA-1. Die Proliferation von ADAP-defizienten Zellen ist nach anti-CD3- sowie anti-CD3/CD28-Stimulation deutlich vermindert. Ebenso sind die Produktion von IL2 und Interferon- $\gamma$  geringer. Zusätzlich zeigen die Zellen nach Aktivierung eine verminderte Expression des IL2-Rezeptors (CD25) und frühen Aktivierungsmarkers CD69 [68-70].

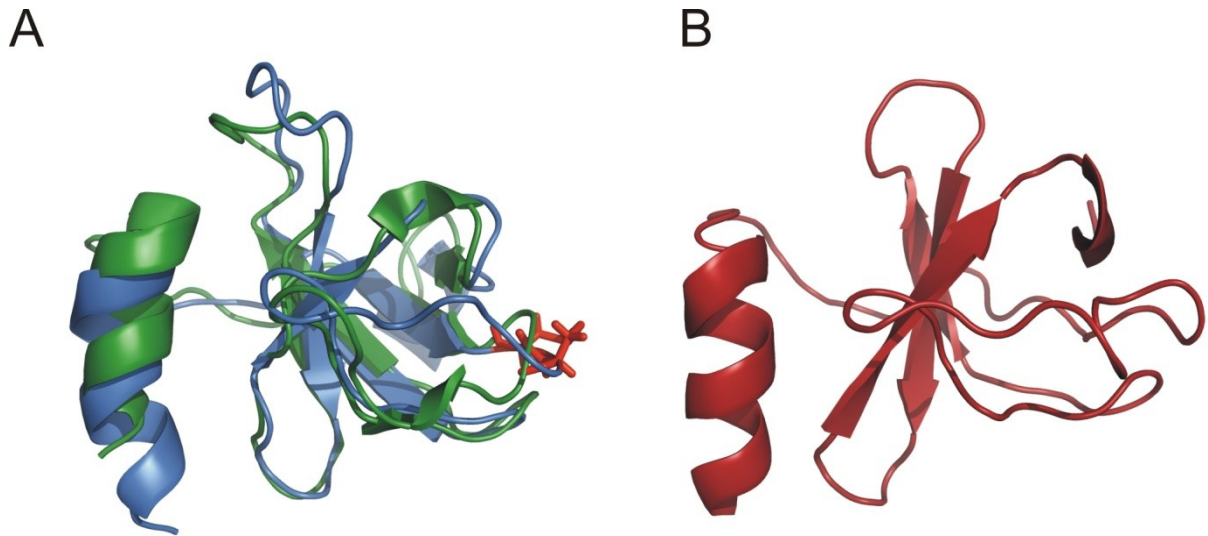
Bei CXCL12/SDF-1 $\alpha$ -Stimulation führt ADAP-Überexpression zu einer verstärkten Migration von T-Zellen. ADAP wird in der TCR- sowie Chemokin-abhängigen Adhäsion und Migration benötigt. Die Chemokin-induzierte Migration ist im Gegensatz zur TCR-induzierten Adhäsion nicht von SLP76 abhängig [71, 72].

ADAP wurde als Substrat von Fyn charakterisiert. Fyn-defiziente Zellen zeigen eine deutlich reduzierte Phosphorylierung von ADAP [64, 65, 70, 73, 74]. An Position 625-628 enthält ADAP ein YDGI (Tyrosin-Aspartat-Glycin-Isoleucin)-Motiv, an das Fyn mit seiner SH2-Domäne bindet. Fyn phosphoryliert Tyrosine des YDDV (Tyrosin-Aspartat-Aspartat-Valin)-Motivs der Positionen 595-598 und 651-654. Diese werden von der SH2-Domäne des SLP76 gebunden. Mutationen dieser Bindungsmotive vermindern die T-Zell-Aktivierung und -Migration [64, 75]. SLP76 bindet Tyrosin-Phosphorylierungs-abhängig Zytoskelett-relevante Proteine wie Vav und Nck. Der GADS-SLP76-Komplex rekrutiert die Phosphatase SHP-2 (SH2 Domain-containing Protein-Tyrosine Phosphatase). Dies führt zur Dephosphorylierung von ADAP durch SHP-2 und somit zu einer geringeren Bindung von SLP76 an ADAP. Durch TCR-Stimulation werden in T-Zellen ROS (Reactive Oxygen Species, Sauerstoffradikale) gebildet, die durch Oxidation des Cysteins im aktiven Zentrum von SHP-2 zur Inaktivierung der Phosphatase führen. Durch diese Inaktivierung wird ADAP verstärkt phosphoryliert und von SLP76 gebunden. TCR-stimulationsabhängig zeigt eine SHP-2-Mutation, die der oxidierten inaktiven Konformation entspricht, eine verminderte T-Zell-Adhäsion. SHP-2 gilt daher als ein möglicher negativer Regulator der Integrinaktivierung [76]. In weiterführenden proteomischen Analysen wurden die Phosphorylierungen sowie phosphorylierungs-abhängigen Proteininteraktionen an ADAP untersucht [77-79]. Sylvester et al. zeigten für das zentrale YDDV–Motiv in ADAP eine phosphorylierungsabhängige Bindung von SLP76, PLC $\gamma$ , PIK3R1, Nck, CRK, GADS und RasGAP. Mutationen der

Phosphotyrosinmotive führten zu einer verminderten Migration sowie Adhäsion der T-Zellen. ADAP stellt eine Verbindung zwischen der Integrinaktivierung und der Aktin-Remodellierung her. Proteine der Ena/VASP-Familie regulieren die Zelladhäsion, Zellform sowie die Zellmigration durch Modulation des Zytoskeletts [80]. Ena/VASP bindet durch die EVH1 (Ena/VASP Homology 1)-Domäne an prolinreiche Sequenzen in ADAP und liegt in einem Komplex mit SLP76, Nck (Non-Catalytic Region of Tyrosine Kinase) und WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) vor. Ebenso wurde EVL (Ena-VASP-like) als ein Bindungspartner identifiziert [81, 82]. Eine direkte phosphorylierungsabhängige Interaktion wurde für die SH2-Domäne von Nck gezeigt [77, 83]. Eine Bindung von Nck an ADAP verstärkt die Aktin-Polymerisation durch Stabilisierung der Bindung zwischen WASP und SLP76 [84]. In ADAP-Knock-out-Mäusen wurden jedoch keine Änderungen des Gesamt-F-Aktin Gehalts der Zelle beobachtet [69].

Im Outside-in-Signalweg werden durch Ligation des VLA-4-Integrins SLP76 und ADAP phosphoryliert. Bei LFA-1-abhängiger Stimulation wird eine ADAP-abhängige Reorganisation des F-Aktins beobachtet. Die Bindung von SLP76 an ADAP ist im Outside-in-Signalweg für die Polarisation der T-Zelle nötig. Ein TCR-Stimulus mit einem anti-CD3-Antikörper oder die Überexpression von ADAP, in Kombination mit einem Stimulus des LFA-1, führt zur Polarisation der T-Zelle. Wird ein SLP76-bindungsdefizientes ADAP eingesetzt, findet sich SLP76 in Clustern, die aber nicht mehr Integrin assoziiert vorliegen. Im Phänotyp dieser Zellen ist sowohl die T-Zell-Polarisation als auch die Bewegung von Jurkat-Zellen auf ICAM-1-beschichteten Platten vollständig inhibiert [85, 86]. Anti-LFA-1-Antikörper führen in Abhängigkeit von ADAP zur Formierung ringartiger Aktinstrukturen („Actin cloud“) [87]. Diese über LFA-1 stimulierten T-Zellen weisen ein niedrigeres Niveau zur Aktivierung durch den TCR auf, sodass LFA-1 mit ADAP eine kostimulatorische Funktion im Outside-in-Signalweg einnimmt.

Zwei SH3-ähnliche Domänen sind für ADAP bekannt. Beide zeigen in der NMR-Struktur N-terminale, für SH3-Domänen untypische helikale Erweiterungen (hSH3 = helical extended SH3). Diese Helix faltet auf die  $\beta$ -Faltblätter der Domäne zurück (siehe Abbildung 6). Die Domänen zeigen keine für SH3-Domänen typische Bindung an prolinreiche Sequenzen, da anstelle des zentralen Tryptophans in der Bindungstasche ein Lysin liegt [53, 88]. Für die C-terminale hSH3<sup>C</sup>-Domäne von ADAP wurde eine phosphorylierungsabhängige Interaktion mit dem RKxxY<sup>294</sup>xxY Motiv in SKAP55 berichtet. Die immunologisch bedeutsamere Interaktion erfolgt durch die Bindung der SKAP55 SH3-Domäne an die prolinreiche Sequenz in ADAP (siehe 1.11) [89].



**Abbildung 6:** NMR-Strukturen der helikal erweiterten hSH3-Domänen von ADAP. Darstellung der Sekundärstrukturelemente. A) hSH3N-Domäne, in reduzierter Konformation in grün sowie in oxidiert Form in blau (PDB: 2GTJ und 2GTO). Der Ringschluss der benachbarten Cysteine in der oxidierten Form ist rot dargestellt, B) hSH3C –Domäne, ebenfalls mit helikaler Erweiterung, ist in rot abgebildet (PDB: 1RI9).

Bei der Aktivierung von T-Zellen werden ROS gebildet [90], die in der N-terminal gelegenen SH3-Domäne (hSH3<sup>N</sup>) einen regulatorischen Mechanismus erfüllen könnten. Dieser begründet sich auf zwei vicinalen Cysteinen, welche abhängig von ihrem Redox-Status eine reversible Disulfidbrücke ausbilden [91]. Die dadurch induzierten strukturellen Veränderungen im RT-Loop der SH3-Domäne öffnen einen hydrophoben Kanal, der mögliche Interaktionspartner binden könnte (siehe Abbildung 6). Die biologische Funktion bzw. Interaktionspartner, die auf diese Redox-Veränderung in der SH3<sup>N</sup>-Domäne reagieren, sind derzeit nicht bekannt. Auch beeinflusst der Redox-Zustand der Cysteine nicht die Bindung an Lipide. Mit einem  $K_D$ -Wert von 133  $\mu\text{M}$  ist die Bindung der SH3<sup>N</sup>-Domäne an Lipidvesikel (Zusammensetzung: 54:44:2- PC:PS:PI(4,5)P2) im Vergleich zur C-terminalen Domäne ( $K_D=20 \mu\text{M}$ ) deutlich schwächer. [88]. Für die SH3<sup>C</sup>-Domäne wurde keine spezifische Kopfgruppenerkennung gezeigt, aber Lipide mit negativen Netto-ladungen werden bevorzugt gebunden. Die Entfernung beider NH-terminaler Helices der hSH3-Domänen führten zu einer verminderten T-Zell-Adhäsion und -Migration in Zellassays, wohingegen die komplette Deletion der hSH3<sup>C</sup>-Domäne keinen Effekt zeigte [92]. Für die ADAP-SH3<sup>N</sup>-Domäne wurde in einer Publikation eine Interaktion mit der CARMA-PDZ-Domäne postuliert [93]. Carma1 (CARD-containing MAGUK protein 1) gehört sowohl zur Familie der Membran-assoziierten Guanin-Kinasen (MAGUK, Membrane-Associated Guanylate Kinase family), als auch zur CARD (Caspase-Associated

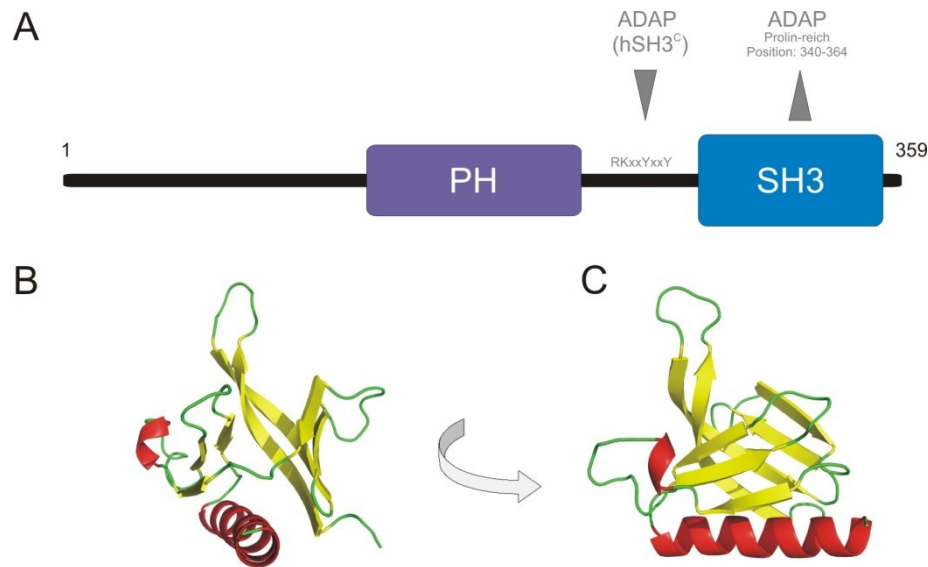
Recruitment Domain)-Familie. Die Ausbildung eines Komplexes aus Carma1/Bcl10/MALT1 ist nötig, um in T-Zellen die inhibitorische IKK-Untereinheit ( $I\kappa B\alpha$ ) durch Ubiquitinylierung abzubauen und so den NF- $\kappa$ B-Signalweg zu aktivieren. CARMA-1-defiziente T-Zellen zeigen einen Defekt in der IL-2-Produktion [94]. Von Medeiros et al. wurde gezeigt, dass in ADAP-defizienten T-Zellen die Carma1/Bcl10/MALT1 (CBM)-Komplexformierung nach TCR-Stimulation gestört ist. Carma1 wird zwar nach TCR-Stimulus in die Membranfraktion rekrutiert, befindet sich dort aber ohne Bcl10 und MALT1. Die Autoren gehen von zwei ADAP-Populationen aus, die einerseits durch Assoziation mit dem Carma1/Bcl10/MALT1-Komplex regulatorisch auf die Gentranskription wirken und andererseits zusammen mit SKAP55 die Integrinaktivierung steuern [95].

### **1.9 SKAP55 (Src Kinase-Associated Phosphoprotein of 55 kDa)**

SKAP55 (alternativ: SKAP1, UniProt: Q86WV1) wurde als ein mit der SH2-Domäne der Src-Kinase Fyn interagierendes Protein identifiziert, das drei bekannte Phosphorylierungsstellen enthält [74]. SKAP55 wird nur in T-Lymphozyten exprimiert [73, 74]. Als Domänen von SKAP55 wurde in der Sequenz eine zentral liegende PH-Domäne sowie C-terminal eine SH3-Domäne beschrieben. Die Struktur der PH-Domäne wurde mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (siehe Abbildung 7). Die Struktur des N-Terminus sowie der SH3-Domäne sind unbekannt.

Bei TCR-Stimulation zeigen T-Zellen von SKAP55-Knock-out-Mäusen einen identischen Phänotyp wie ADAP-defiziente T-Zellen. SKAP55-defiziente Zellen weisen eine stabile ADAP-Expression auf. Neben der verminderten Adhäsion der  $\beta$ 1- sowie  $\beta$ 2- Integrine sowie dem verminderten LFA-1-Clustering ist auch die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Sekretion sowie die Proliferation der T-Zellen gestört [96, 97]. Überexpression von SKAP55 führt zu erhöhter Adhäsion der Zellen sowie zur Ausbildung von stabilen T-Zell-APC-Komplexen [98].

SKAP55-defiziente T-Zellen zeigen bei Chemokin-Stimulation ein normales Migrationsverhalten [99]. Dies bedeutet, dass SKAP55 im Gegensatz zu ADAP eine spezifische Rolle bei der TCR-abhängigen Integrinaktivierung einnimmt, wohingegen ADAP sowohl für die TCR- als auch die Chemokin-abhängige Adhäsion benötigt wird. Die Unterschiede in den Signalwegen bei TCR- bzw. Chemokin-Stimulation sind aktuelle Fragestellungen des Inside-out-Signalwegs.



**Abbildung 7:** Schema der SKAP55-Domänen-Struktur sowie Kristallstruktur der PH-Domäne. A) Die in SKAP55 C-terminal gelegene SH3-Domäne bindet konstitutiv an ADAP. Die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne liegt in der Mitte der Sequenz. Zwischen der PH- sowie SH3-Domäne wurde eine Bindung durch die ADAP hSH3<sup>C</sup> berichtet. Der N-Terminus von SKAP55 wurde bisher nicht weiter charakterisiert. B) und C) Kristallstruktur der PH-Domäne, Darstellung des Proteinrückgrades. Sequenzen ohne Sekundärstruktur sind grün,  $\alpha$ -Helices rot und  $\beta$ -Stränge gelb eingefärbt. PDB-Code: 1U5D

Für den C-Terminus von SKAP55 wurde eine Interaktion mit RasGRP1 gezeigt, die durch die Fyn-Phosphorylierung in Pulldown-Experimenten verstärkt wurde. RasGRP1 (Ras nucleotide-releasing protein, auch CalDAG-GEFII) wirkt als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF: Guanin Nucleotide Exchange Factor) aktivierend auf die GTPase Ras durch den Austausch von GDP zu GTP. Aktives Ras führt durch den Ras-Erk-AP1-Signalweg zur Differenzierung sowie Proliferation (Erk: Extracellular Signal-regulated Kinase; AP1: Activating Transcription Factor 1).

Von Kosco et al. sowie Schneider et al. [100, 101] wurde bei SKAP55-Überexpression und TCR-Stimulation eine Inhibition des Ras-Erk-Signalweges beschrieben. Bei SKAP55-Knock-down wird von Kosco et al. bei TCR-Stimulation eine verminderte ERK-Aktivierung gezeigt. Im Widerspruch dazu wurde von Schneider et al. in SKAP55-defizienten und Knock-down-Zellen eine erhöhte ERK-Aktivität gezeigt. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte ERK-Aktivität ist die Aktivierung von Ras am Golgi-Apparat. In SKAP55-defizienten Zellen verbliebe nach anti-CD3-Stimulation mehr vom Ras-Aktivator RasGRP1 am trans-Golgi-Netzwerk, da es nicht von SKAP55 an die Plasmamembran rekrutiert wird. Umgekehrt wird bei SKAP55-Überexpression RasGRP1 an die

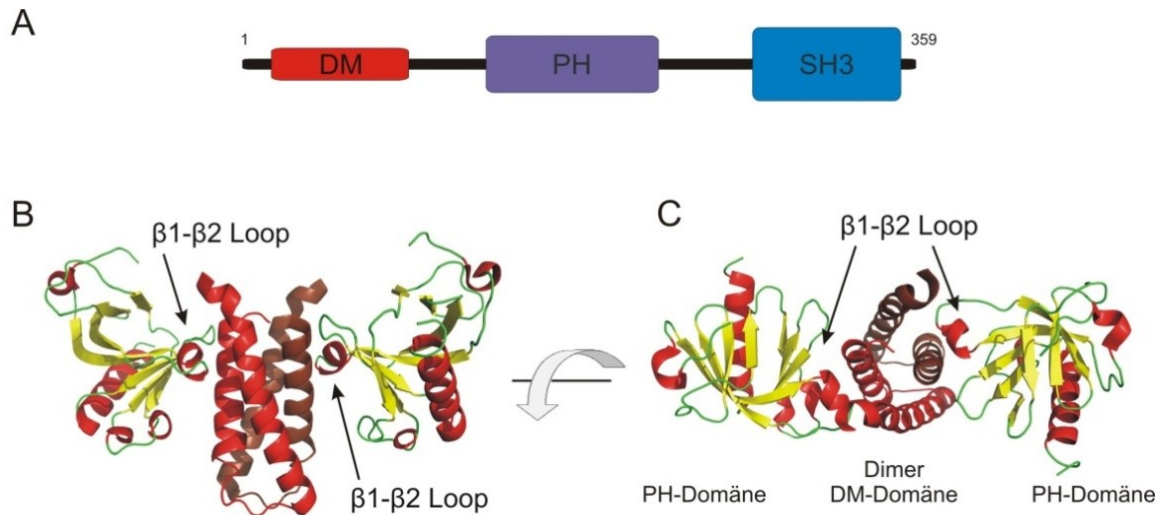
Plasmamembran rekrutiert, sodass am Golgi-Apparat vermutlich keine Ras-Aktivierung erfolgen kann. Die Untersuchungsergebnisse über die Regulation des Ras-Erk-Signalweges durch SKAP55 nach TCR-Stimulation sind widersprüchlich und noch nicht abschließend geklärt [100, 101].

Die Assoziation von SKAP55 mit ADAP ist essentiell für die T-Zellrezeptor-abhängige Regulierung der Integrine in T-Zellen. Nach der Klonierung von SKAP55 wurde ein homologes Protein identifiziert, das aufgrund der Sequenzähnlichkeit als SKAP-HOM (SKAP55 homologue) bezeichnet wird.

### **1.10 SKAP-HOM (SKAP55 homologue)**

SKAP-HOM ist zu 44% mit dem SKAP55 identisch [73, 102, 103]. Der Vergleich der Domänenstruktur zeigt ebenfalls eine zentral gelegene PH-Domäne sowie eine C-terminal gelegene SH3-Domäne. Diese beiden Domänen sind am stärksten konserviert. Zusätzlich wurde für den N-Terminus eine Dimerisierungsdomäne beschrieben.

SKAP-HOM wird wie SKAP55 durch die Interaktion der SH3-Domäne mit der prolinreichen Sequenz in ADAP stabilisiert. SKAP-HOM wird im Gegensatz zu SKAP55 universell exprimiert. SKAP-HOM-defiziente B-Zellen zeigen einen Defekt in ihrer Proliferation sowie in der Adhäsion der  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Integrine [104, 105]. T-Zellen ohne SKAP-HOM zeigen keinen Defekt, d.h. SKAP-HOM und SKAP55 erfüllen spezialisierte Funktionen in B-Zellen bzw. T-Zellen [106]. Die Funktion von SKAP55 kann nicht durch das homologe SKAP-HOM kompensiert werden (siehe 1.9) [96]. Von Swanson et al. wurde für SKAP-HOM der N-terminale Bereich bis einschließlich der PH-Domäne kristallisiert. Die Kristallstruktur zeigt eine Homodimerisierung durch die Bildung einer aus zwei  $\alpha$ -Helices bestehenden Haarnadel-Struktur, die durch hydrophobe Assoziation mit der Haarnadel-Struktur eines zweiten Moleküls ein Dimer bildet, siehe Abbildung 98. Diese N-terminale, zuvor noch nicht beschriebene Domäne, wird als Dimerisierungsdomäne (DM) bezeichnet.



**Abbildung 8: Kristallstruktur der SKAP-HOM DM- und PH-Domäne.** A) Das Schema der SKAP-HOM-Sequenz zeigt die N-terminal gelegene Dimerisierungsdomäne (DM), die darauf folgende PH- sowie C-terminal gelegene SH3-Domäne. B) Jede DM-Domäne besteht aus zwei gegenläufigen aneinander gelagerten  $\alpha$ -Helices (rot und dunkel rot). Die Homodimerisierung der N-terminal gelegenen DM-Domäne erfolgt durch die Ausbildung einer Packung von vier  $\alpha$ -Helices. C) Die PH-Domäne bindet über den  $\beta$ 1- $\beta$ 2-Loop an die DM-Domäne. Darstellung des Proteinrückgrates der Kristallstruktur von SKAP-HOM (PDB-Code: 1U5E). Sequenzen ohne Sekundärstruktur sind grün,  $\alpha$ -Helices rot und  $\beta$ -Stränge gelb eingefärbt.

Die PH-Domäne des SKAP-HOM zeigt den typischen Aufbau von vier  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ 1 bis  $\beta$ 4), die eine Beta-Faltblattstruktur bilden, auf der eine weitere  $\beta$ -Faltblattstruktur aus drei  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ 5- $\beta$ 7) liegt. Eine Besonderheit dieser PH-Domäne stellt der zwischen den Strängen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 liegende Loop dar, welcher eine kurze  $\alpha$ 3-Helix bildet und an das Dimer der DM-Domäne bindet. Ausgehend von dieser Struktur wurde von Swanson et al. ein Modell eines DM-PH-Schalters entwickelt, bei dem durch die intramolekulare Bindung der PH-Domäne an die DM-Domäne eine inaktive Form in Bezug auf die Lokalisation in „membrane ruffles“ vorliegt. Erst durch die Bindung an Phosphoinositolphosphate, insbesondere PIP3, kommt es zu einer Lokalisation an „membrane ruffles“. Durch Mutationsanalysen in der PH-Domäne von Aminosäuren, die an der Lipidbindung bzw. der Interaktion mit der PH-DM-Domäne beteiligt sind, wurde gezeigt, dass die Lokalisation nicht über die PH-Domäne, sondern über die DM-Domäne vermittelt wird. Es wurden noch zu identifizierende Bindungspartner postuliert, die an die DM-Domäne binden [107]. Ob die N-terminale Dimerisierung und die Bindung von Phosphoinositolphosphaten analog für SKAP55 gelten, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

## 1.11 Membranrekrutierung des ADAP-SKAP55-Komplexes und Integrinaktivierung

Die Komplexbildung von ADAP und SKAP55 in humanen T-Zellen wurde durch Immunpräzipitations- sowie Yeast-Two-Hybrid-Experimente nachgewiesen [108]. Es wurde gezeigt, dass in Jurkat-Zellen mehrere Pools von ADAP vorliegen: Zum einen ADAP ohne SKAP55 zu einem kleineren Anteil von 30 % und zum anderen im Komplex mit SKAP55 zu 70 %. SKAP55 wurde zu 100 % im Komplex mit ADAP präzipitiert [109]. Durch Deletionsexperimente der prolinreichen Sequenz in ADAP und der SH3-Domäne in SKAP55 sowie deren Mutation in eine bindungsinkompetente Form (W333K) wurde gezeigt, dass SKAP55 über die SH3-Domäne an eine prolinreiche Sequenz in ADAP bindet. Die prolinreiche Sequenz wurde auf eine 24 Aminosäuren lange Sequenz von Position 340-364 eingegrenzt [108]. Zusätzlich wurde von einer Bindung der ADAP-hSH3<sup>C</sup>-Domäne an das RKxxY<sup>294</sup>xxY-Motiv in SKAP55 berichtet. Diese Interaktion wurde durch keine weiteren Publikationen bestätigt und steht im Widerspruch zu den von Kliche et al. publizierten Deletions- und Mutationsexperimenten der SKAP55-SH3-Domäne [89, 110]. Die Interaktion der SKAP55-SH3-Domäne mit der prolinreichen Sequenz von ADAP stabilisiert sowohl SKAP55 als auch SKAP-HOM [108, 111]. Fehlt die Stabilisierung durch die prolinreiche Sequenz, reduziert sich die Halbwertszeit von SKAP55 auf ca. 20 %, d.h. 15-20 Minuten in Jurkat-Zellen. Knock-out- sowie Knock-down-Studien von ADAP führen gleichzeitig zu einem Verschwinden der SKAP-Proteine. Die beobachteten ADAP-Knock-out-Phänotypen sind im Kontext des fehlenden ADAP sowie von SKAP55 und SKAP-HOM zu betrachten. Der Mechanismus der SKAP55- und SKAP-HOM-Reduktion ist unbekannt. Da die Niveaus der mRNA gleich bleiben, ist von einer Regulation auf Proteinebene auszugehen [97, 108].

Die von Kliche et al. gezeigte Regulation der  $\beta$ 1- bzw.  $\beta$ 2-Integrine durch den TCR-Stimulus ist abhängig von der Interaktion der SH3-Domäne von SKAP55 mit ADAP. Die Deletion der mit SKAP55 interagierenden prolinreichen ADAP-Sequenz oder die Verminderung von SKAP55 durch siRNA oder Gen-Knock-out führt zu einer verminderten  $\beta$ 1- bzw.  $\beta$ 2-Integrin-Adhäsion der Zellen. Die Reduktion der Bindung an die Liganden Fibronectin bzw. ICAM-1 werden nur bei aktivierten T-Zellen beobachtet, die über den T-Zellrezeptor stimuliert wurden. Die basale Bindung ohne Stimulation bleibt unverändert. Durch Wiedereinführen der prolinreichen Sequenz in ADAP bzw. die Expression von SKAP55 oder nur der SKAP55-SH3-Domäne wird überraschenderweise die vollständige



Bindungskompetenz der T-Zellen wieder hergestellt. ADAP wird durch die Reduktion der Menge des SKAP55 weder stabilisiert noch destabilisiert.

In einem Modell von Burbach et al. kann zytoplasmatisches ADAP zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B über den CARMA1-Bcl10-MALT1 (CBM)-Komplex führen. Eine Chimäre aus der PH-Domäne von SKAP55 und dem C-Terminus von ADAP ist immer an der Plasmamembran lokalisiert und ermöglicht so die Integrinaktivierung. Wird diese Chimäre aber in der SKAP55 PH-Domäne (R131M) mutiert, liegt diese konstitutiv im Zytoplasma vor und aktiviert den NF- $\kappa$ B-Signalweg [112].

Die Aktivierung der Integrine in T-Zellen durch den T-Zellrezeptor erfolgt durch die Lokalisation der aktiven Rap1 GTPase [39, 113]. Befindet sich diese in der aktiven, d.h. GTP gebundenen bzw. konstitutiv aktiven Variante (G12VRap1) an der Plasmamembran, aktiviert dies die Integrine [108, 114]. Rap1 lokalisiert an der Plasmamembran sowie in Vesikeln, die dem endosomalen Recycling unterliegen. Durch Exozytose dieser Vesikel kann die Konzentration von Rap1 an der Plasmamembran schnell erhöht werden. Nach T-Zellrezeptor-Stimulation rekrutiert der Komplex aus ADAP und SKAP55 Rap1 an die Plasmamembran. Wird die Interaktion der SKAP55 SH3-Domäne mit der prolinreichen Sequenz in ADAP inhibiert, erfolgt keine Rekrutierung der GTPase Rap1 und somit keine Integrinaktivierung. Wird ADAP oder SKAP55 durch die Fusion mit der Transmembranhelix von LAT (Linker for Activation of T cells) konstitutiv in der Plasmamembran verankert, führt dies zu einer TCR-stimulationsunabhängigen und konstitutiven Aktivierung der Integrine [108]. Wird in den LAT-Fusionschimären die Interaktion mit dem Bindungspartner inhibiert, führt dies zu einem vollständigen Verlust der konstitutiven Integrin-Aktivität. Mit den Fusionschimären wurde zum einen gezeigt, dass die Rekrutierung von Rap1 an die Plasmamembran der Rekrutierung des Komplexes aus ADAP und SKAP55 folgt, zum anderen, dass ADAP und SKAP55 nur im Komplex die Integrinaktivierung regulieren können. Die Interaktion von ADAP und SKAP55 mit Rap1 verläuft nicht direkt. Sowohl RAPL (Regulator for Cell Adhesion and Polarization Enriched in Lymphoid Tissue) als auch RIAM (Rap1 Guanosine Triphosphate-interacting Adapter Molecule), beides Rap1-bindende Proteine, wurden als mögliche direkte Interaktionspartner des ADAP-SKAP55-Komplexes identifiziert [47-49].

RIAM bindet selektiv aktives Rap1. Die Interaktion mit SKAP55 ist konstitutiv und erfolgt sowohl mit der RA- (Ras-association) sowie der PH-Domäne. Die Bindungsstelle in SKAP55 ist nicht bekannt. Überexpression der Tandem-RA-PH-Domäne von RIAM

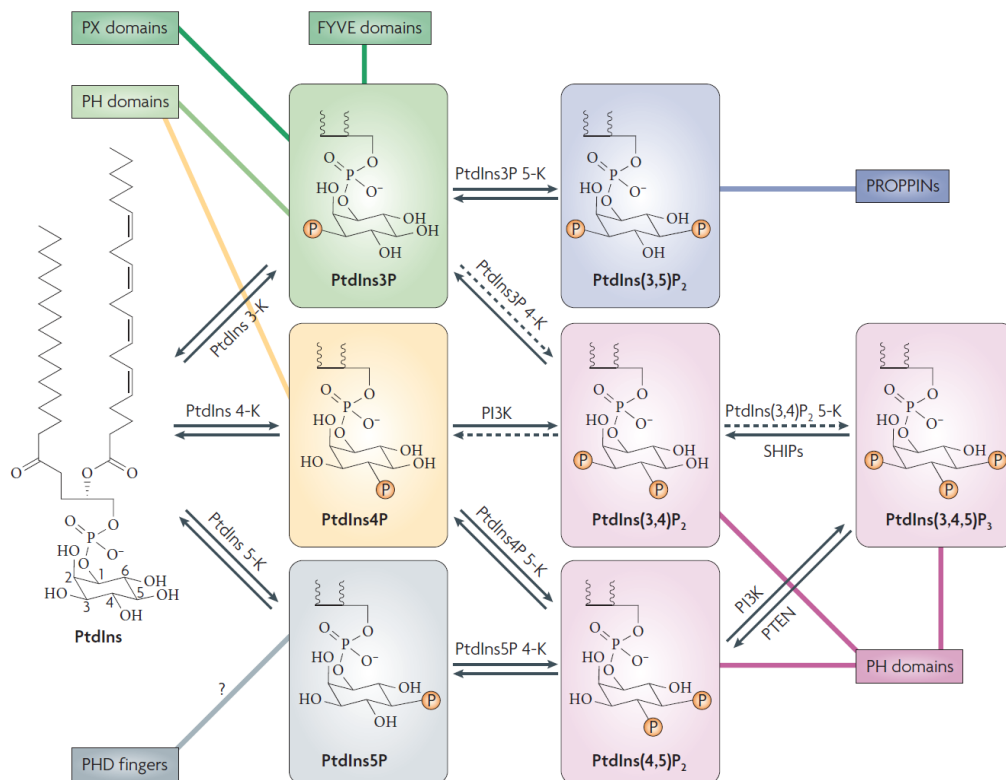
inhibiert die TCR-stimulationsabhängige Integrinaktivierung. Die Phosphatidylinositol-monophosphat bindende PH-Domäne von RIAM ist für eine Rekrutierung des aktiven Rap1 nicht ausreichend. Die Aktivierung von Rap1 ist von SKAP55 unabhängig, für die Lokalisation an die Plasmamembran wird jedoch SKAP55 benötigt [41, 108]. Der ADAP/SKAP55/RIAM/Rap1-Komplex erfüllt die TCR-abhängige Aktivierung und Rekrutierung nur in Anwesenheit von SLP76. Wohingegen die CXCR4-Chemokin-abhängige Rekrutierung des Komplexes und Integrinaktivierung kein SLP76 benötigt [72]. Die Gründe für die beobachteten Unterschiede der Signalwege bei den verschiedenen Rezeptor-Stimuli sind unbekannt.

Für die Interaktion des SKAP55 mit RAPL wurde die C-terminal gelegene SARA (Sav-Rassf-Hpo)-Domäne, die mit dem N-Terminus von SKAP55 interagiert, beschrieben [41]. In ADAP- und/oder SKAP55-defizienten Zellen wurde von Raab et al. keine Membranlokalisation von RAPL beobachtet [115]. Die Lokalisation von RAPL an die Plasmamembran ist von einem anti-CD3-Stimulus abhängig. Die Lokalisation nach Stimulation wird durch Mutation der SKAP55 PH-Domäne (Mutation: R131M, Inhibition der potentiellen Phospholipidbindung) oder Inhibition der PI3-Kinase unterbunden. Die konstitutive Lokalisation von SKAP55 an der Plasmamembran durch Myristylierung führt zu einer TCR-stimulationsunabhängigen Rap1-Lokalisation und LFA-1-Aktivierung [115].

Zusammengefasst wird für die TCR- oder Chemokin-abhängige Integrinaktivierung in T-Lymphozyten die Rekrutierung aktiver Rap1-GTPase an die Plasmamembran benötigt. Die Lokalisation von Rap1 ist abhängig von der Formierung eines Komplexes aus ADAP und SKAP55, der Rekrutierung des Komplexes an die Plasmamembran sowie der Assoziation der Rap1-bindenden Moleküle RIAM bzw. RAPL an SKAP55.

Die Komplexformierung von ADAP und SKAP55 sowie der molekulare Rekrutierungs- bzw. Regulierungsmechanismus soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

## 1.11.1 Phosphoinositide / Lipidmodifikation



**Abbildung 9: Phosphatidylinositolphosphat und die wichtigen natürlich vorkommenden Phosphatmodifizierungen. Pfeil-Beschriftung bezeichnet die modifizierenden Kinasen bzw. Phosphatasen. Farblich unterlegt sind die bindenden Domänen-Typen. Abbildung modifiziert nach [116]**

Zellmembranen stellen zum einen Barrieren dar, die eine Kompartimentierung von Zellen und Zellorganellen erlauben, zum anderen wird an ihnen eine Vielzahl zellulärer Prozesse durchgeführt. Insbesondere die Signalweiterleitung ist ein Prozess von hohem Interesse. In Säugetieren bestehen die sauren Phospholipide der Zellmembranen aus Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylsäure (PA) und Phosphatidylinositol. Ein geringer Teil der Phosphatidylinositole ist an Position 3, 4 bzw. 5 des Inositol-Zuckerrings phosphoryliert (Abbildung 9). Phospholipide machen einen Anteil von weniger als 1 % der Zellmembran aus [116, 117]. Der Phosphorylierungsgrad sowie der Anteil der unterschiedlichen Phospholipide in der Membran sind stark vom Zelltyp und dem Zustand der Zelle abhängig. Phosphatidylinositole haben Funktionen als sekundäre Botenstoffe sowie als Ankerpunkte für das Zytoskelett.

Bei der T-Zell-Aktivierung wird durch die PI3-Kinase (PI3-K, Phosphatidylinositol-3-Kinase) vermehrt PIP3 (Phosphatidylinositol-(3,4,5) Phosphat) gebildet, siehe Abbildung 9 [62, 118]. PIP3 konzentriert sich in der Kontaktzone von T-Zelle und Antigen

präsentierender Zelle [119]. Mutationen der PI3-Kinase zeigen eine Verminderung der Migration, Proliferation sowie der Entwicklung der Lymphozyten [120].

Das an der Plasmamembran durch PI3-Kinase gebildete 3'-Inositolphosphat dient u.a. als ein Ankerpunkt bzw. erfüllt eine Rekrutierungsfunktion insbesondere für Proteine mit PH-Domänen. Die Domäne wurde erstmals im Protein Pleckstrin beschrieben [60, 121-123]. Die nur in Eukaryonten vorkommende Domäne wird in mehreren Proteinen der T-Zell-Aktivierung gefunden, z.B. Akt, Lnk, PLC $\gamma$ 1, Vav und SKAP55 sowie SKAP-HOM.

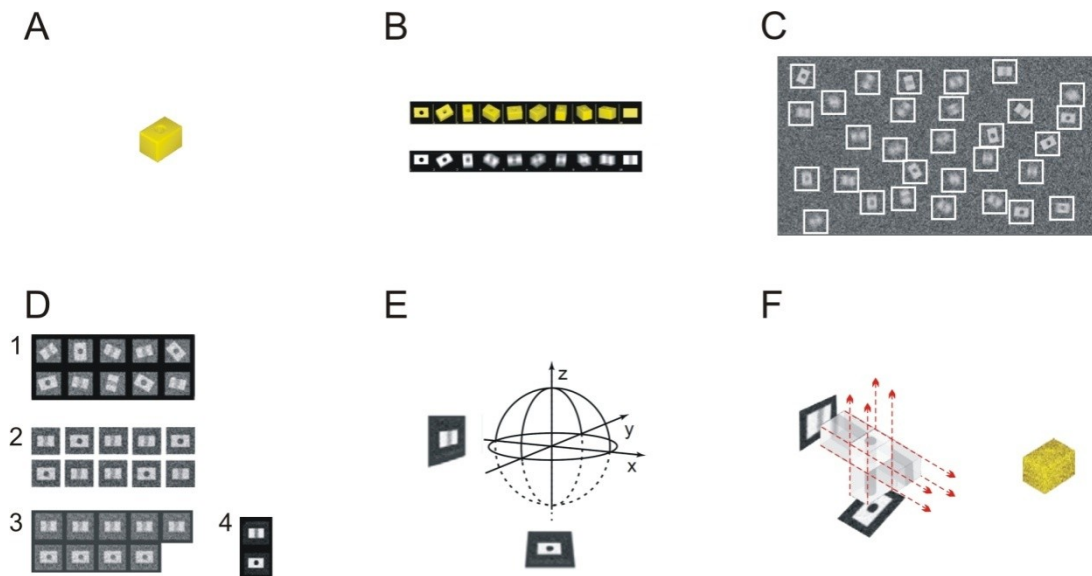
### **1.12 Elektronenmikroskopie (EM)**

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) nutzt zum Abbilden des Objektes die Elektronen, die das Präparat durchstrahlt haben. Mit dem TEM lassen sich Strukturen mit atomarer Auflösung von 0,2 nm bis hin zu ganzen eukaryotischen Zellen von bis zu 100  $\mu$ m darstellen. Limitierend ist die Dicke des Präparats, da sie die Durchlässigkeit für die Elektronen begrenzt. Auch die Stabilität des Objektes ist entscheidend, da es in der negativen Kontrastfärbung im Vakuum dehydriert vorliegt. Zusätzlich kann es durch Wechselwirkungen mit Elektronen zu Schäden an der Struktur kommen. Für biologische Proben ist zusätzlich die Probenpräparation für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entscheidend.

#### **1.12.1 EM- Einzelpartikelenaufnahmen und Prozessierung für die Rekonstruktion**

Die 3D-Rekonstruktion von Einzelpartikeln basiert auf Aufnahmen des Partikels aus unterschiedlichsten Perspektiven und der Rekonstruktion des Partikels aus diesen unterschiedlichen Aufnahmewinkeln.

Die Partikel nehmen zufällige unterschiedliche Orientierungen auf dem elektronenmikroskopischen Netzchen ein, wenn sie nicht durch Interaktion mit dem Träger bzw. dessen Beschichtung eine bevorzugte Richtung einnehmen (siehe Abbildung 10, B). Bei der Transmissionselektronenmikroskopie wird die Partikeldichte durch Projektion zweidimensional abgebildet. Um den Kontrast zwischen Partikel und dem Hintergrund zu erhöhen, werden Schwermetallsalze verwendet. Die Salze führen zu einer stärkeren Streuung des Elektronenstrahls, dadurch erscheinen die eingebetteten Makromoleküle gegenüber dem Hintergrund heller. Dieses Verfahren wird als Negativkontrastierung bezeichnet.



**Abbildung 10: Partikelrekonstruktion in der Elektronenmikroskopie.** A) Beispielpartikel, B) oben: unterschiedliche Orientierungen des Partikels, unten: Projektionen der Dichte dieser Partikel, C) Partikel auf dem elektronenmikroskopischen Träger, D) 1. ausgeschnittene Partikel aus C, 2. orientierte und zentrierte Partikel (aligniert), 3. klassifizierte Partikel, 4. gemittelte Bilder der Klassen, E) Euler-Winkel der einzelnen Klassen, F) Partikeldichte-Rekonstruktion durch Rückprojektion der Klassen oder Einzelbilder den Euler-Winkeln entsprechend, nach [124].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen weisen ein nur geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf. Um ein besseres Verhältnis zu erlangen, werden verschiedene Einzelaufnahmen gemittelt. Um sie miteinander vergleichen bzw. mitteln zu können, werden die einzelnen Partikelansichten extrahiert (siehe Abbildung 10: C, D 1) und ausgerichtet (Alignment), (D 2). Die Einzelaufnahmen, die sich am ähnlichsten sind, werden in Klassen gruppiert und gemittelt. Abbildung 10, D Nummer 3 zeigt die Einzelpartikel einer Klasse. In Abbildung 10, D Nummer 4 sind die Klassenmittel dargestellt. Diese zeigen das durch Mittelung verbesserte Signal-zu-Rausch-Verhältnis [124]. Diese Klassenmittel werden für die initialen Strukturberechnungen verwendet.

### 1.12.2 Einzelpartikelrekonstruktion

In der „common lines“-Methode werden die gemittelten Klassen der unterschiedlichen Ansichten verwendet. Basierend auf dem Projektionstheorem, beschreibt jede Projektion des Objektes eine Ebene im Fourierraum [125]. Dementsprechend stehen zwei unterschiedliche Projektionen des Objektes für zwei verschiedene Ebenen im Fourierraum, die eine gemeinsame Schnittgerade besitzen (die „common line“). D.h. durch Ausrichtung der gemeinsamen Schnittgeraden der fouriertransformierten Projektionen im Fourierraum wird ihre Ausrichtung (Euler-Winkel) der Projektionen im realen Raum zueinander

bestimmt. Hierdurch werden die Euler-Winkel, d.h. die Orientierung der Aufnahmen zueinander, bestimmt. Durch Rückprojektion werden die einzelnen Klassen entsprechend ihres Euler-Winkels projiziert. Daraus ergibt sich die Dichterekonstruktion des Partikels (siehe Abbildung 10, E, F). Durch iterative Verfahren, wie z.B. der erneuten Klassifizierung, basierend auf dem initialen Modell sowie der Projektion der einzelnen Bilder anstelle der Klassen und der Anwendung von Symmetrieoperationen, wird die Qualität des rekonstruierten Modells des Partikels erhöht.

### 1.13 Kernmagnetische Resonanz (NMR)

Die kernmagnetische Resonanz (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) beruht auf dem Verhalten des Eigendrehimpulses (Spin) von Atomkernen in einem Magnetfeld. Entscheidend für magnetisch aktive Kerne ist eine Spinquantenzahl ungleich 0. Demzufolge kommen für die NMR-Spektroskopie von Biomolekülen die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Atome in Frage. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit werden die Isotope  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  bei rekombinanten Proteinen in *E. coli* durch Zugabe in sogenanntem Minimalmedium substituiert.

Im homogenen Magnetfeld richten sich Kernspins aus und führen mit der sogenannten kerntypischen Larmorfrequenz eine Kreiselbewegung um die Magnetfeldrichtung aus. Kerne mit einer Spinquantenzahl von  $\frac{1}{2}$  nehmen zwei Zustände ein. Durch Einstrahlung von elektromagnetischen Wellen werden Übergänge zwischen den Energieniveaus induziert, wenn der Resonanzfall vorliegt. Resonanz tritt ein, wenn die eingestrahlte Frequenz der Larmorfrequenz entspricht, die bei modernen Spektrometern für Protonen zwischen 300 - 1000 MHz liegt. Während der Relaxation kehren die Kern-Spins in den Gleichgewichtszustand zurück. Dies wird als FID (Free Induction Decay, freier Induktionszerfall) bezeichnet und von einer Spule detektiert.

Die chemische Umgebung des Atomkerns bestimmt, wie stark das angelegte Magnetfeld auf den Kern wirkt. Daraus resultieren die unterschiedlichen Resonanzbedingungen der Kerne. Diese Unterschiede werden als chemische Verschiebung bezeichnet und auf die Larmor-Frequenz einer Referenzsubstanz bezogen und in ppm (parts per million) angegeben.

Durch die Abfolge definierter Pulse und inkrementierbarer Wartezeiten zwischen ihnen können Magnetisierungen übertragen werden und dadurch Korrelationen zwischen Atomkernen in mehrdimensionalen Spektren dargestellt werden.

### 1.13.1 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Heteronuclear-Single-Quantum-Coherence (HSQC)-Experimente

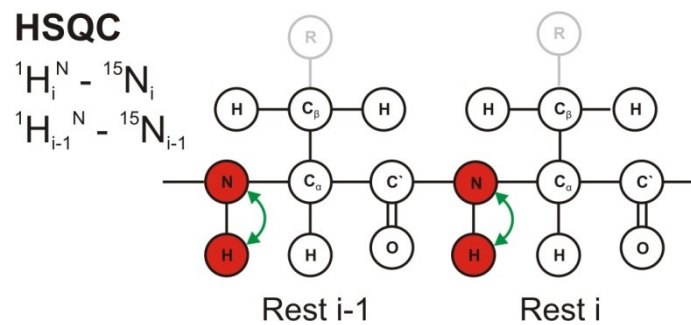


Abbildung 11: Das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment. Die Detektion der NH-Resonanz erfolgt durch Anregung des Protons, mit anschließendem Transfer der Magnetisierung auf das Stickstoffatom und Rücktransfer auf das Proton zur Detektion (grüner Doppelpfeil). Die in den NMR-Spektren detektierten Atomkerne sind rot eingefärbt. Die NH-Resonanzen des Proteinrückgrates werden unabhängig voneinander aufgenommen. Jede Aminosäure mit Ausnahme des Prolins erzeugt eine NH-Resonanz im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum. Abbildung modifiziert [126].

Im zweidimensionalen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum wird die Frequenz des Amidprotons mit der Frequenz des Stickstoffatoms verknüpft (Abbildung 11). D.h. jedes Signal resultiert aus einer Bindung eines Protons an ein Stickstoffatom. Für jede NH-Gruppe des Proteinrückgrates der einzelnen Aminosäure wird ein Signal im Spektrum erzeugt. Dies ermöglicht die Untersuchung eines Peptids oder Proteins bezogen auf die jeweilige Aminosäure. Eine Ausnahme stellt das Prolin dar, welches aufgrund des fehlenden Protons im Rückgrat nicht detektiert wird. Die Aminosäuren Asparagin, Glutamin, Tryptophan und Histidin erzeugen zusätzliche Resonanzen, die aus der  $\text{NH}_2$ - bzw. NH-Gruppe der Seitenkette im Spektrum resultieren.

Das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment wird in der Protein-NMR sehr häufig verwendet, da es verhältnismäßig schnell aufgenommen werden kann und jede Aminosäure mit den oben genannten Einschränkungen ein Signal erzeugt und nur ein zusätzliches Isotop ( $^{15}\text{N}$ ) benötigt wird. Außerdem zeigen gefaltete Proteine ein disperses Spektrum, das bedingt Aussagen über vorherrschende Sekundärstrukturelemente ermöglicht. Durch sensitive Resonanz-Verschiebungen können Rückschlüsse auf strukturelle Änderungen oder Bindungen von Liganden gezogen werden.

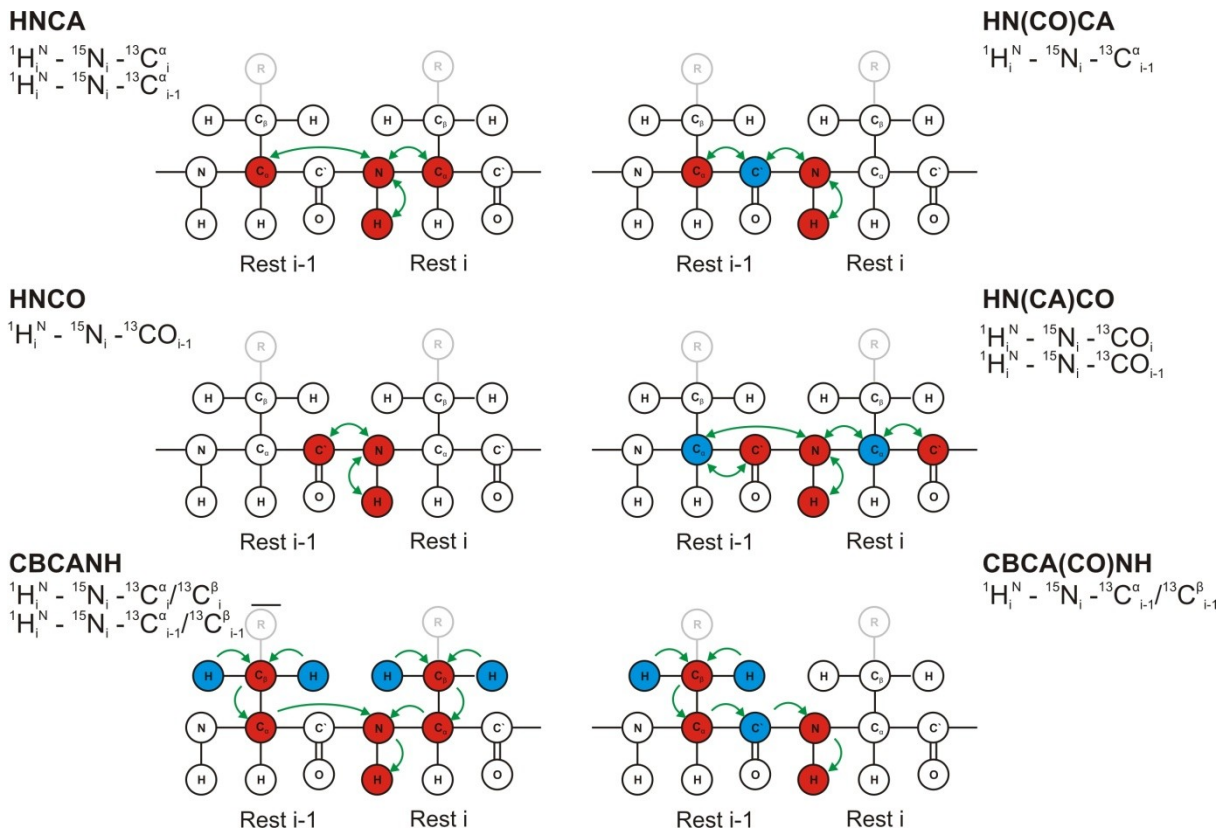
### 1.13.2 Triple-Resonanz-Experimente für die sequentielle Signalzuordnung

Um die Signale des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums der entsprechenden Aminosäure zuzuordnen, werden Triple-Resonanz-Experimente eingesetzt. Hierfür werden neben den Protonen die  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotope verwendet. Das grundsätzliche Vorgehen beinhaltet die sequentielle Zuordnung benachbarter Aminosäuren zueinander. Durch Korrelation von Kernspins des Proteinerückgrates sowie ggf. der  $\text{C}_\beta$ -Atome wird die vorhergehende bzw. nachfolgende Aminosäure zugeordnet (siehe Abbildung 13).

Es werden jeweils Spektrenpaare aufgenommen, deren Bezeichnung der Reihenfolge der übertragenen und detektierten Atomkerne folgt (siehe Abbildung 12, rote Atomkerne). Wird die Magnetisierung ohne Detektion transferiert, werden die entsprechenden Atomkerne zusätzlich in Klammern eingeschlossen (siehe Abbildung 12, blaue Atomkerne).

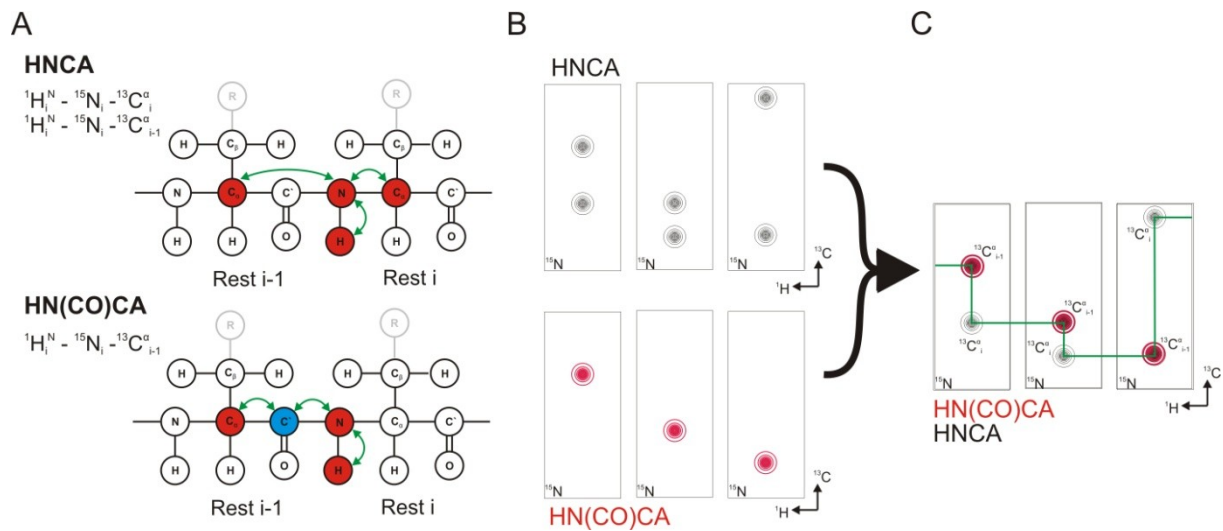
Für die Erhöhung der Sensitivität werden für die Anregung sowie Detektion die  $^1\text{H}$ -Atomkerne verwendet. Dies begründet sich in der hohen Empfindlichkeit der Protonen im NMR, die sich im sogenannten gyromagnetischen Verhältnis ausdrückt. Die Anregung erfolgt meist über das Amidproton und wird auf die anderen Atomkerne übertragen. Anschließend wird es wieder zurück transferiert, um es durch das Amidproton auszulesen. Dies wird als inverses heteronukleares Experiment bezeichnet und ist in Abbildung 12 als Pfeil mit zwei Spitzen dargestellt. In den CBCANH- sowie CBCA(CO)NH-Experimenten ist eine Anregung und Detektion auch bei einem unidirektionalen Magnetisierungstransfer möglich. Das wird durch einen einfachen Pfeil verdeutlicht.





**Abbildung 12: Darstellung von 3D-NMR-Experimenten zur Zuordnung aufeinander folgender Aminosäuren.** Gezeigt sind zwei durch Peptidbindung verknüpfte Aminosäuren mit vereinfachter Darstellung der Seitenketten. Glycin stellt aufgrund des fehlenden  $\text{C}_\beta$ -Atoms einen Sonderfall dar. Die in den NMR-Spektren detektierten Atomkerne sind rot eingefärbt, die zur Übertragung der Magnetisierung genutzten Atomkerne blau. Die mit A gekennzeichneten Experimente geben für die NH-Frequenz des Rückgrates Signale der vorhergehenden Aminosäure, die mit B bezeichneten Experimente geben Resonanzen für die vorhergehende sowie die eigene Aminosäure. Die Pfeile beschreiben den Verlauf der Magnetisierung. Pfeile mit zwei Spitzen bedeuten einen anschließenden Rücktransfer der Magnetisierung zum  $\text{H}^{\text{N}}$ -Atom. Abbildung modifiziert [126].

Im HNCA-Experiment wird die Magnetisierung vom Amidproton auf das Stickstoffatom (1. Dimension) und anschließend auf das CA, also  $\text{C}_\alpha^i$  sowie  $\text{C}_\alpha^{i-1}$  (2. Dimension), übertragen. In der dritten Dimension wird die Resonanzfrequenz der  $\text{C}_\alpha$ -Atome zurücktransferiert und am Amidproton ausgelesen. Durch gezielten Magnetisierungstransfer und selektive Anregung des Carbonyl-Kohlenstoffs  $\text{C}_\text{O}$  im HN(CO)CA ist eine alleinige Detektion der Resonanzfrequenz des vorhergehenden  $\text{C}_\alpha$ -Atoms möglich. Wie Abbildung 13 zeigt, ermöglicht die Überlagerung der beiden einzelnen Spektren die Identifikation der Frequenz des eigenen  $\text{C}_\alpha^i$ -Atoms bzw. die Frequenz des vorhergehenden  $\text{C}_\alpha^{i-1}$ -Atoms. Dadurch lassen sich die  $\text{C}_\alpha$ -Resonanzen sowie die korrespondierenden NH-Resonanzen sequentiell zuordnen.



**Abbildung 13: Sequentielle Zuordnung von NH-Resonanzen im Triple-Resonanzspektrum. A) Im HNCA-Spektrum werden neben der NH-Resonanz auch die Frequenzen der  $\text{C}_\alpha$ -Atomkerne der eigenen Aminosäure sowie der Vorläufer-Aminosäure detektiert. Das HN(CO)CA-Spektrum detektiert nur die  $\text{C}_\alpha$ -Resonanz der vorhergehenden Aminosäure für die entsprechende NH-Resonanz (rot: detektierte Atomkerne, blau: Übertragung der Magnetisierung). B) Ausschnitte des Triple-Resonanzspektrums entlang der  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Ebene zeigen im HNCA-Spektrum die Resonanzen des eigenen sowie des Vorläufer- $\text{C}_\alpha$ -Atoms; im HN(CO)CA werden nur die Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure detektiert. C) Überlagerung der Spektren ermöglicht Zuordnung der eigenen  $\text{C}_\alpha$ -Resonanz sowie Identifikation der Vorläufer-Aminosäure mit der entsprechenden Frequenz für das  $\text{C}_\alpha$ -Atom.**

Die Zuordnung der Resonanzen zur Aminosäuresequenz erfolgt anhand von charakteristischen Verschiebungen der  $\text{C}_\alpha$ -sowie  $\text{C}_\beta$ -Atome. Proline geben aufgrund der fehlenden Amidprotonen keine Signale und können auf diese Weise nicht zugeordnet werden.

Für die Detektion der  $\text{C}_\beta$ -Kernspins werden die CBCANH- und CBCA(CO)NH-Spektren aufgenommen. Das HNCO- und HN(CA)CO-Spektrenpaar bestimmt die Resonanzfrequenz des Kohlenstoffs der Carbonylfunktion des Rückgrates. Insbesondere unterstützt es die Zuordnung von aufeinanderfolgenden Resonanzen, wenn in den übrigen Spektrenpaaren keine genaue Zuordnung erfolgen kann, z.B. bei sich überlappenden Frequenzen im HNCA/HN(CO)CA- oder bei fehlenden Signalen im CBCANH/CBCA(CO)NH-Spektrenpaar. Durch Kombination der unterschiedlichen Spektrenpaare erfolgt die sequentielle und sequenzspezifische Zuordnung der Resonanzen.

## 2. Zielsetzung

Die Proteine ADAP und SKAP55 wurden als Adapterproteine in T-Zellen identifiziert, die maßgeblich an der Signaltransduktion der Integrin-vermittelten Adhäsion beteiligt sind. In dem als Inside-out-Signaling bezeichneten Prozess kommt der Integrinaktivierung durch Rekrutierung der kleinen GTPase Rap1 an die Plasmamembran nach T-Zell-Aktivierung eine zentrale Rolle zu. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die molekulare Assemblierung und den Mechanismus der Membranrekrutierung des ADAP-SKAP55-Komplexes zu verstehen. Für die Untersuchung der Komplexbildung sollten die Proteine rekombinant in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt werden. Nach erfolgreicher Präparation des Proteinkomplexes sollte dieser in Hinblick auf seine Quartärstruktur näher charakterisiert werden.

Insbesondere sollten dabei die mögliche Dimerisierung oder Oligomerisierung des Komplexes mit Hilfe verschiedener Methoden aufgeklärt und die für die Ausbildung höhermolekularer Komplexe verantwortlichen Strukturelemente charakterisiert werden. Die in SKAP55 befindliche PH-Domäne sollte hinsichtlich ihrer Lipidbindungseigenschaften mittels der NMR-Spektroskopie analysiert werden. Mögliche Lipid-Kopfgruppen-Spezifitäten sollten hinsichtlich ihrer Funktion im Kontext der Signalwege bei Adhäsion und Migration interpretiert werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Allgemeine Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analysis“ (p.a.) und wurden, wenn nicht anders benannt, von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze bezogen.

#### 3.1.2 Spezielle Chemikalien

#### 3.1.3 Isotope

$^{15}\text{N}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA

$^{15}\text{N}$ -Lysin, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA

$^{15}\text{N}$ -Phenylalanin, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA

$^{15}\text{N}$ -Leucin, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, USA

$^{13}\text{C}$ -Glucose, Campro Scientific GmbH, Berlin

#### 3.1.4 Phosphoinositolphosphate und Inositolphosphate

**IP3**, Ins(1,4,5)P3, D-myo-Inositol-1,4,5-triphosphat Natriumsalz,  
Sigma-Aldrich Laborchemikalien, GmbH, Seelze

**IP4**, Ins(1,3,4,5), D-myo-Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat Natriumsalz  
Echelon Bioscience Inc., Salt Lake City, USA

**PIP2-C4**, PI(4,5)P2 diC4, 1,2-Dibutanoyl-sn-glycero-3-phospho(1'-myo-inositol-4',5'-  
diphosphat) Natriumsalz

Echelon Biocience Inc., Salt Lake City, USA

**PIP3-C4**, PI(3,4,5)P3 diC4,

1,2-Dibutanoyl-sn-glycero-3-phospho(1'-myo-inositol-3',4',5'-triphosphat) Natriumsalz

Echelon Biocience Inc., Salt Lake City, USA

**PIP3-C8**, PI(3,4,5)P3 diC8,

1,2-Dioctanoyl-sn-glycero-3-phospho(1'-myo-inositol-3',4',5'-triphosphat) Natriumsalz

Cayman Chemical Company, Michigan, USA

## 3.1.5 Oligonukleotide und Expressionskonstrukte

Primer-Nr.:	Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3'-Orientierung)
1	EcoRI-SKAP55-fw	CAGACGAATTCCAGGCCGCCGCCCTCCC
2	SKAP55-KpnI-rw	CAGACGGTACCTCATCTTTCTTCCACTTCAAAGG
3	NheI-StrepSKAP55-fw	CAAAATGGCTAGCATGGAGCCACCCCGCAGTTCCG
4	BamHI-ADAP-fw	CAGACGGATCCATGCACCACCACCACCACC
5	ADAP-StuI-rw	GCATGCAGGCCCTCTAGTCATTGTTCATAGATGCAGC
24	BamHI-ADAP-Pro-fw	CAGACGGATCCATGGCCACCCCGAAACAGAAAGC
25	ADAP-Pro-StuI-rw	GCATGCAGGCCCTCTATGGTGGTCTGTGGGTTTTTGG
28	BamHI-ADAP-del-His-fw	CGACAGGATCCATGGCGAAAATAAACACGGGG
33	ADAP-579-StuI-bw	GCATGCAGGCCCTCTAGTCTTTTTTTCAGTTTCAAAGAATC
34	BamHI-ADAP-92-fw	CAGACGGATCCATGAGATTCCGGAAACACCAGCCAGC
35	BamHI-ADAP-257-fw	CAGACGGATCCATGTGGCCCTTTCCTGGAGTGGTT
36	BamHI-ADAP-224-fw	CAGACGGATCCATGGGGTCCCCAGCTCCCCCTGG
37	BamHI-SKAP55-7-fw	CAGACGGATCCCTGAGGAGATCCGTTGGCTCC
39	SK55-222-Stop-HindIII-XhoI-rw	GCATGCCCTCGAGAAGCTTTAGCTCAGATCCTTTAAACAAGAACTT
41	BamHI ADAP 460-fw	GCAGACGGATCC GAAACATATGAAGACATAGAAGC
42	BamHI ADAP 467-fw	GCAGACGGATCCGGAAGCATCCAAAAGAAAGAGAGAAGA

43	ADAP 503 XhoI-bw	GCAATGCCCTCGAGTCATTTCTTCTTTATTTCTTGTCTTCTTCTT
44	ADAP 576 XhoI-bw	GCAATGCCCTCGAGTCATTTCAAAGAATCATAGTCAATCTC
45	BamHI-RapL366-fw	CAGACGGATCCGGAGAGGTAGAGTGGGATGCC
46	RapL-413-XhoI-bw	GTGTCGCTCGAGTTAGGATTTCTTTAAGGCCCTCCTCC
48	BamHI-SK55-1-fw	CAGACGGATCCATGCAGGCCGCCGCCCTC
49	STPHindSK104-bw	GCAATGCAAGCTTTAATTTCTTGAGCTCCCTTTACGATGCTTCC
50	MST1-432-SARAH-fw	ATCCGGATCCGACTACGAGTTTCTTTAAGAGTTGG
51	MST1-480-SARAH-bw	CGCATCTCGAGTTACTTAGCCTCTATGGCATCCAGG
6	M13-fw	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
7	M13-bw	CACACAGGAAACAGCTATGACCA
29	Polyh-fw	TCCGGATTATTCATACCCGTCC
30	Polyh-bw	TCTAGTACTTCTCGACAAGC
31	P10-fw	CAATCACTCGACGAAGACTTG
32	P10-bw	TCCGTGTTTCAGTTAGCCTCC
21	Gp64-F109098Forward	CGGCGTGAGTATGATTTCTCAA
22	Gp64-R109026Reverse	ATGAGCAGACACGCAGCTTTT
23	Gp64-P109075Probe	[6-FAM]AAAAGTCTACGTTCCACCACGCGCCAAA[BHQ1a-6FAM]

**Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide**

## 3.1.6 Expressionskonstrukte

Protein	Konstruktbezeichnung	Aminosäure-Start	Aminosäure-Ende	Ziel-Vektor	TAG	5'-Oligo-nukleotid	3'-Oligo-nukleotid
SKAP55	Strep-SKAP55 1-359	1	359	pASK-IBA7	Strep	1	2
SKAP55	Strep-SKAP55 221-359	221	359	pFastBac Dual	Strep	3	2
SKAP55	Strep-SKAP55 261-359	261	359	pFastBac Dual	Strep	3	2
SKAP55	Strep-SKAP55 281-359	281	359	pFastBac Dual	Strep	3	2
SKAP55	His-SKAP55 DM-PH	7	222	pET28a	His	37	39
SKAP55	His-SKAP55 DM	1	104	pET28a	His	48	49
SKAP55	His-SKAP55 DM2	7	104	pET28a	His	37	49
SKAP55	His-SKAP55 PH	97	216	pET28a	His	subkloniert	subkloniert
RAPL	His-RAPL SARAH	202	361	pET28a	His	45	46
MST-1	His-MST-1 SARAH	423	480	pET28a	His	50	51

Protein	Konstruktbezeichnung	Aminosäure-Start	Aminosäure-Ende	Ziel-Vektor	TAG	5'-Oligo-nukleotid	3'-Oligo-nukleotid
ADAP	GST-ADAP 460-503	460	503	pGEX 4T	GST	41	43
ADAP	GST-ADAP 467-503	467	503	pGEX 4T	GST	42	43
ADAP	His-ADAP 1-783	1	783	pFastBac Dual	His	4	5
ADAP	ADAP 92-783	92	783	pFastBac Dual		34	5
ADAP	ADAP 224-783	224	783	pFastBac Dual		36	5
ADAP	ADAP 257-783	257	783	pFastBac Dual		35	5
ADAP	ADAP 340-783	340	783	pFastBac Dual		24	5
ADAP	ADAP 1-579	1	579	pFastBac Dual		4	33
ADAP	ADAP 92-579	92	579	pFastBac Dual		34	33
ADAP	ADAP 224-579	224	579	pFastBac Dual		36	33
ADAP	ADAP 257-579	257	579	pFastBac Dual		35	33
ADAP	ADAP 340-579	340	579	pFastBac Dual		24	33
ADAP	ADAP 340-364	340	364	pFastBac Dual		24	25

Tabelle 2: Bezeichnung der Expressionskonstrukte, ihrer Zielvektoren und der dafür verwendeten Oligonukleotide



### 3.1.7 Bakterienstämme

***E. coli* XL1-Blue** wurde für molekularbiologische Arbeiten verwendet, da dieser Stamm Endonuclease- und rekombinationsdefizient ist. (Stratagene corporation, La Jolla, Kalifornien, USA), Genotyp:  $F^-$  *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* mit Episom [*proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)*].

***E. coli* BL21(DE3)** wurde für die Proteinexpression verwendet. Dieser Stamm beinhaltet IPTG induzierbare T7-Polymerase. (Stratagene corporation, La Jolla, Kalifornien, USA). Genotyp : *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*.

***E. coli* DH10Bac** wurde für die Produktion rekombinanter Baculoviren verwendet. Dieser Stamm enthält den Baculovirus-Shuttle-Vektor. (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) Genotyp :  $F^-$  *mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 endA1 araD139 (ara, leu) 7697 galU galK-rpsL nupG /pMON14272 / pMON7124*

***E. coli* DL39 (DE3)** wurde für die selektive Aminosäuren-Markierung verwendet. Der Stamm wurde von Prof. Dr. Volker Dötsch, Universität Frankfurt bezogen und enthält eine intrinsische Kanamycin-Resistenz.

Genotyp :  $F^-$ , *LAM-*, *aspC13, fnr-25, rph- 1, ilvE12, tyrB507, gal λ (DE3), lacI::PlacUV5::T7 gene1*. Der Stamm ist durch fehlende Transaminasen auxotroph für Phenylalanin, Tyrosin, Aspartat, Leucin, Isoleucin und Valin.

### 3.1.8 Bakterienmedien

#### 3.1.8.1 2xYT

Für die Expression von nicht mit Isotopen markierten Proteinen wurde das 2xYT-Medium der Firma Carl Roth, Karlsruhe verwendet.

Chemikalie	Konzentration
Trypton	16 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
Natriumchlorid	5 g/l
<b>pH-Wert:</b> 7,0 ±0,2	

### 3. Material und Methoden

---

#### 3.1.8.2 M9-Minimalmedium

Für die Isotopenmarkierung von Proteinen in *E.coli* für die Kernspinresonanzspektroskopie wurde M9-Minimalmedium mit  $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$  bzw.  $^{13}\text{C}$ -Glucose verwendet.

Spurenelemente (100x)		M9 Konzentrat (10x)	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
EDTA	13,4 mM	FeSO <sub>4</sub>	1,8 mM
FeSO <sub>4</sub>	1,8 mM	ZnCl <sub>2</sub>	0,367 mM
ZnCl <sub>2</sub>	0,367 mM	CuSO <sub>4</sub>	0,04 mM
CuSO <sub>4</sub>	0,04 mM		

#### Stocklösungen für M9 Minimalmedium

#### M9 Minimalmedium (1 Liter)

Komponente	Menge	Sterilisierungsmethode
M9 Konzentrat (10x)	100 ml	autoklaviert
Spurenelemente (100x)	10 ml	autoklaviert
MgSO <sub>4</sub> [1M]	1 ml	autoklaviert
CaCl <sub>2</sub> [1M]	0,3 ml	autoklaviert
Glucose [40 %]/ $^{13}\text{C}$ -Glucose	10 ml/ 2g	autoklaviert / sterilfiltriert
Thiamin/HCl [1mg/ml]	1,5 ml	autoklaviert
Biotin [1mg/ml]	15 ml	sterilfiltriert
NH <sub>4</sub> Cl/ $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$	0,5 g/ 0,5 g	sterilfiltriert
mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen		

Tabelle 3: Pipettierschema für 1 Liter M9-Medium. Die für die  $^{13}\text{C}$ - sowie  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung zu substituierenden Komponenten sind hervorgehoben.

#### 3.1.8.3 SOC-Medium

Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl [1M]	2,5 ml/l

MgCl <sub>2</sub> [1M]	10 ml/l
Glukose [1M]	20 ml/l

Mit 970 ml Wasser auffüllen und autoklavieren. Vor Verwendung und Aliquotierung sterile Glukose sowie steriles MgCl<sub>2</sub> zugeben.

## 3.1.9 Geräte

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller
<b>Chromatographiesysteme</b>	ÄKTA™-Purifier	GE Healthcare, München
	ÄKTA™-FPLC	GE Healthcare, München
	Profinia	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
<b>Chromatographie-Säulen</b>	HiLoad 16/60 Superdex 75	GE Healthcare, München
	Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare, München
	HiLoad 16/60 Superdex 200	GE Healthcare, München
	Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München
	GSTrap 4B (5ml)	GE Healthcare, München
	HiTrap HP (5ml)	GE Healthcare, München
	Strep-Tactin Superflow Plus (5ml)	Qiagen, Hilden
<b>Elektroporationsgerät</b>	Gene Pulser Xcell™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
<b>Elektrophoresesysteme</b>	Owl Separation Systems,	Separation Systems, Portsmouth, USA
	Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
	XCell	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
	SureLock™Mini-Cell	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
<b>Elektrophoresesystem für Western-Blot- Transfer</b>	TransBlot SD	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
<b>Flüssigkulturenschüttler</b>	Multitron II	Infors AG, Battningen, Schweiz
<b>Fluorimeter</b>	LS50B Perkin	Elmer Inc., Waltham, USA
<b>Heiz- und Kühlblöcke</b>	Thermomixer comfort	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Block Heater	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Vereinigtes Königreich
	CHB-202	Bioflux-Bioer, Tokyo, Japan
<b>Thermozyklator</b>	Epgradient S	Eppendorf GmbH, Hamburg
<b>Real-Time-PCR-System</b>	IQ5	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
<b>pH-Meter</b>	Seven Easy	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
	pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte, GmbH & Co. KG, Berlin
<b>Spannungsquellen</b>	PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
	E802	Consort, Turnhout, Belgien
<b>Plattenreader</b>	Saphire Microplate Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
<b>Spektralphotometer</b>	Ultrospec®	Amersham, GE Healthcare, München
	NanoDrop® ND-1000	NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, USA
<b>Ultraschallgerät</b>	Sonifier W250D	Branson Ultrasonics Corp. , Danbury, USA

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller
<b>Dokumentationsanlage</b>	Intas	Intas GmbH, Göttingen
<b>Vortex-Schüttler</b>	Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH, Zürich, Schweiz
<b>Waagen</b>	TP-214	Denver Instrument, Denver, USA
	EW 1500	Kern & Sohn GmbH, Balingen
<b>Wasseraufbereitung</b>	arium® 611UV	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich
<b>Zentrifugen</b>	Avanti J-25	Beckman Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA
	TLX Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA
	Centrifuge 5415R/D	Eppendorf-Netheler Hinz GmbH, Hamburg
	Centrifuge 5804R	Eppendorf-Netheler Hinz GmbH
	Centrifuge 5810R	Eppendorf-Netheler Hinz GmbH
<b>Zell-Inkubator</b>	Thermo Forma, Model: 3951	Thermo Scientific Inc., Asheville, USA
<b>Zell-Magnetprüher</b>	CELLSPIN	INTEGRA Biosciences AG, Schweiz
<b>DLS Gerät</b>	Zetasizer Nano ZS (532 nm Laser)	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, England
<b>Großgeräte:</b>		
<b>Elektronenmikroskop</b>	CM100	Philips, Eindhoven, NL, Kathode: 100 kV LaB6 CCD-Kamera: 1k x1k Fastscan TVIPS, Gauting Standort: Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin
<b>Elektronenmikroskop</b>	Tecnai Spirit	FEI, Eindhoven, NL Kathode: 120 kV LaB6 CCD-Kamera: 4kx4k Eagle, FEI Standort: Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin
<b>NMR-Spektrometer 700MHz</b>	Bruker Avance	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten Standort: Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, Berlin-Dahlem
<b>NMR-Spektrometer 600Mhz</b>	Bruker DRX	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten Standort: Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin-Buch

Tabelle 4: Verwendete Geräte

### 3.1.10 Software

Anwendung	Name	Hersteller/ Referenz
<i>In silico</i> -Analyse von DNA- und Proteinsequenzen (MW, IEP)	Vector NTI Advance™ 11	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
DNA-Sequenzierungsauswertung	Vector NTI Advance™ 11 / ContigExpress	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
EM-Datenprozessierung, Strukturberechnung	Spider	[127]
Auswertung von Real-Time-PCR-Daten für Baculovirus-Titerbestimmung	IQ 5 Standard Edition Version: 2.0.148.60623	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Auswertung der analytischen Gelfiltrationsläufe, Steuerung der Äkta-Geräte	Unicorn 5.11	GE Healthcare, München
NMR-Spektrenauswertung, Assignment, Abbildungen	CCPN-Analysis	[128]
DLS-Auswertung	DTS, Dispersion Technology Software, Version: 5.03	Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, England
NMR-Spektrenaufnahme und Prozessierung	TopSpin	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
K <sub>D</sub> -Wert-Modellierung	Origin 6.0	Microcal, GE Healthcare, Northampton, USA
Datenaufnahme Safire -Gerät	Xluor4, Version 5.1 (in MS Excel implementiert)	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Moleküldarstellung	PyMol, Version 1.4	Schrödinger LLC, Portland, USA
Moleküldarstellung, Homologie-Modell	Swiss-PDB Viewer	[129]

Tabelle 5: Verwendete Software

### 3.1.11 Antikörper

Bezeichnung	Gerichtet gegen	Bezugsquelle
Anti-FYB, SLAP 130, Maus	ADAP	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
SKAP55, C-17, Ziege	SKAP55	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
SKAP55, N-19, Ziege	SKAP55	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
SKAP55, SK 13 B mAK, Ratte	SKAP55	Dr. S. Kliche, Universität Magdeburg
DOCK2, Kaninchen	DOCK2	Dr. S. Kliche, Universität Magdeburg

### 3.1.12 Allgemeine Puffer

**PBS-Puffer:** 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4  
bei RT

**TBS-Puffer:** 20 µM Tris/HCl, 150 µM NaCl, pH=7,4 bei RT

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.2 PCR-basierte Klonierung

Zur Herstellung eines Vektors mit gewünschtem Protein oder Proteinfragment wurde mittels PCR eine Zielsequenz durch PCR amplifiziert. Hierbei diente ein entsprechendes DNA-enhaltendes Plasmid als Matrize. Während für ADAP-Konstrukte das in der Arbeitsgruppe Protein Engineering (AG Freund) vorhandene Plasmid pFastBac1 als Template verwendet wurde, wurden für die folgenden Konstrukte Plasmide von Dr. S. Kliche (Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Universität Magdeburg) verwendet: für SKAP55 das Plasmid pEF BOS3-SKAP55, für MST1 das Plasmid pDNR-hMST1 und für RAPL das Plasmid pGEX 4T-RAPL. Das PCR-Produkt wurde im Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel isoliert. Mittels Restriktions-Endonukleasen wurde das PCR-Produkt sequenzspezifisch hydrolysiert. Der Vektor wurde ebenfalls mit kompatiblen Nukleasen behandelt, also bindungs-kompatibel zum PCR-Produkt. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurde dieser zusätzlich dephosphoryliert. Die proteinkodierende DNA wurde durch Ligation in den vorbehandelten Plasmid-Vektor integriert und in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf Selektionsagarplatten kultiviert (siehe 3.2.8) und anschließend einzelne Kolonien in Flüssigmedium weiter kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und ein Aliquot mit Restriktionsendonukleasen analysiert. Alternativ wurde eine sogenannte „Kolonie-PCR“ durchgeführt. Hierbei wurde die inserierte DNA direkt durch analytische PCR mit Zellmaterial durchgeführt. Positiv identifizierte Klone wurden kultiviert und Plasmid-DNA isoliert. Durch Sequenzierung der Plasmid-DNA (Eurofins MWG Operon, Ebersberg und SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen) wurde die mutationsfreie Integration bestätigt.

#### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionsansätze enthielten je 50 ng Oligonukleotide als Primer sowie je 1 mM dNTPs, 15 bis 100 ng Template-DNA und 2,5 U DNA-Polymerase. Die Reaktionen wurden in 25 bis 35 Zyklen ausgeführt. Zu analytischen Zwecken wurde die *Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus* verwendet, während für Arbeiten mit hoher Genauigkeit die Polymerase von *Thermococcus kodakaraensis* (KOD Hot Start, Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) verwendet wurde. Die Amplifikation wurde mit beheiztem Heizdeckel (104 °C) und folgenden Programmen durchgeführt:

	<i>Taq</i> -Polymerase	KOD-Hot-Start-Polymerase
<b>Polymerase-Aktivierung</b>	entfällt	98°C, 2 Minuten
<b>DNA-Denaturierung</b>	94° C, 30 Sekunden	94° C, 30 Sekunden
<b>Primer-hybridisierung</b>	Primer-abhängig zwischen 50°C und 65°C für 30-45 Sekunden	Primer-abhängig zwischen 50°C und 65°C für 30-45 Sekunden
<b>Elongation</b>	72° C, Längen-abhängig pro 1000bp: 1 Minute	72°C, Längen-abhängig pro 1000bp: 20 Sekunden
<b>Abschließende</b>	72°C, 5 Minuten	72°C, 5 Minuten

### 3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Bei neutralem pH-Wert ist DNA polyanionisch. Dies ermöglicht die Auftrennung der DNA im elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Nettoladung, Größe, Form sowie Porengröße des verwendeten Agarosegels. Es wurden für Fragmente und Plasmide größer als 2000 bp Agarose-Konzentrationen von 0,7 %, für Fragmente kleiner als 500 bp Konzentrationen von 2 % und für dazwischen liegende Größen 1 %-ige Agarose verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und gelöst. Zum Nachweis der DNA wurde die Lösung mit Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 0,5 g pro Liter versetzt. Ethidiumbromid interkaliert mit doppelsträngiger DNA und kann durch Anregung mittels UV-Licht bei 254 nm durch Fluoreszenz detektiert werden. Zur Markierung der Lauffront und Erhöhung der Dichte der DNA-Proben wurden diese mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Dabei entspricht das Laufverhalten von Bromphenolblau einem doppelsträngigen, linearisierten 300 bp-Fragment. Als Molekulargewichtsstandard wurde der 100bp- sowie 1000bp- Marker der Firma NEB verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 8-15 V pro cm Gelbreite in TAE-Puffer. Nach Beendigung der Auftrennung wurden in einem UV-Imager (INTAS, Göttingen) die Nukleinsäurebanden sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera fotografiert.

**TAE-Puffer:** 4,8 g l-1 Tris Base, 0,11 % Essigsäure, 10 mM EDTA, pH=8,0

**10 x DNA-Proben-Puffer:** 12 % (w/v) Glycerin, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, in 1 x TAE-Puffer

### 3.2.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde die DNA durch den Interkalator Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde mit

dem Gelextraktionskit der Firma Qiagen GmbH (Hilden) das Gelstück aufgelöst und die DNA reversibel an die Matrix eines Anionenaustauschers gebunden. Die Elution der DNA von der Matrix erfolgte mit Wasser oder einem schwach alkalischen Puffer.

#### **3.2.6 Restriktionsverdau von DNA**

Präparativ für die Konstruktklonierung oder zur Analyse wurden 0,5 bis 10 µg DNA in Volumina von 25-100 µl mittels Restriktionsenzymen für 1 bis 2 Stunden im Thermoblock bei 37°C verdaut. Der Reaktionsansatz beinhaltet zu 10 % des Volumens 10x konzentrierte Pufferlösung des Enzymherstellers, 1-2 U des bzw. der Restriktionsenzyme sowie, falls für das Enzym erforderlich, 1 % (v/v) 100-fach BSA-Lösung. Für die Auswahl der Puffer bei der Verwendung von mehreren Restriktionsenzymen wurde nach den Angaben des „Double Digest Finder“ der Firma NEB verdaut. Für analytische Anwendungen wurde der Restriktionsansatz mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet (siehe 3.2.4). Für Klonierungen wurde das Fragment entsprechender Größe entweder aus dem Gel isoliert (siehe 3.2.5) oder nach dem Verdau direkt mit dem PCR-Aufreinigungskit der Firma Qiagen (Hilden) isoliert.

#### **3.2.7 Ligation**

Die Verknüpfung von restriktionsenzymatisch behandelten DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase (NEB) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in Volumina von 20-40 µl im Puffer des Enzymherstellers bei 16°C für mindestens 1 bis maximal 24 Stunden. Das Insertionsfragment wurde in 3-fach bis zu 10-fach höherer molarer Konzentration des Vektors eingesetzt. Die Gesamt-DNA-Menge eines Ligationsansatzes betrug zwischen 0,02 und 1 µg DNA.

#### **3.2.8 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen**

Für die Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen wurden die Zellen auf Eis lagernd aufgetaut, mit bis zu 20 µl Plasmidlösung versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch einen 45 Sekunden andauernden Hitzeschock bei 42°C und Abkühlung auf Eis wurde das Plasmid in die Zellen eingebracht. Anschließend wurden die transformierten Zellen in SOC-Medium aufgenommen und wie nach der Elektroporation behandelt.

Für die Elektroporation wurden elektrokompetente *E. coli*-Zellen auf Eis lagernd aufgetaut und mit 0,5-1,5 µl Plasmid-Lösung mit einer Gesamtmenge von bis zu 100 ng DNA



versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem 1,8 kV-Puls in einer auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvette mit 1 mm Kathodenabstand elektroporiert. Nach dem Puls wurden die Zellen zur Regeneration und Entwicklung der Resistenz in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und bei 37°C bei 300 rpm für 1 Stunde inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert. Die Selektionsplatten enthielten 100 mg Ampicillin oder 35 mg Kanamycin pro Liter Agar.

#### **3.2.9 Isolation hochreiner Plasmid-DNA aus *E.coli***

Für die Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA wurden XL1-blue *E. coli*-Zellen verwendet. Die Anzucht erfolgte über 7-14 Stunden bei 37°C und 180 rpm / min. Die Zellen wurden bei 4000 g für 10 Minuten pelletiert und zur Aufreinigung mit den Mini- und Midi-Präparationskits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Hierbei werden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die Proteine sowie die chromosomale DNA durch Präzipitation und anschließende Zentrifugation entfernt, die DNA an eine Ionenaustauschermatrix gebunden und durch mehrere Waschschriffe gereinigt. Anschließend wurde die DNA in einem leicht alkalischen Puffer oder mit Wasser von der Matrix eluiert.

#### **3.2.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA**

Das Absorptionsmaximum von Basen in Nukleinsäuren liegt im Bereich von 260nm. Zur photometrischen Bestimmung doppelsträngiger DNA wurde die Absorption bei 260nm bestimmt und die Konzentration wie folgt berechnet:

$$[dsDNA] = A_{260nm} * 50 \frac{\text{mg}}{\text{l}} * v$$

[dsDNA]: Konzentration der doppelsträngigen DNA, v: Verdünnungsfaktor,  $A_{260nm}$ : Absorption bei 260 nm

## 3.3 Präparative und analytische proteinbiochemische Methoden

### 3.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die von Laemmli entwickelte Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) [130] trennt Proteine nach ihrem scheinbaren Molekulargewicht in einem elektrischen Feld. Durch die Anlagerung der SDS-Moleküle an ein Protein wird dieses entfaltet. Zur vollständigen Denaturierung werden Disulfidbrücken durch Zugabe eines Reduktionsmittels geöffnet. Die Mizelle aus SDS und Protein erscheint hierbei durch die negativ geladenen SDS-Moleküle insgesamt negativ geladen.

Zur Trennung wird eine Polyacrylamid-Matrix als Molekularsieb eingesetzt, durch das sich Proteine abhängig von ihrer Masse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im elektrischen Feld bewegen. Die Dichte des Polymers ist abhängig von der Konzentration des Monomers und des Quervernetzers Acrylamid/*N,N'*-methylen-bisacrylamid (AMBA). Je größer die Massen der aufgetrennten Proteine sind, desto größer sollten die Poren der Gelmatrix sein.

In der diskontinuierlichen PAGE wird die Proteinmischung zunächst in einem Sammelgel mit niedriger Dichte und geringem pH-Wert fokussiert. Beim Eintritt in das Trenngel befinden sich die Proteine zwischen den Ionen des Sammelgels und denen des Trenngels. Dadurch wird die Trennung im Gel erhöht. Die Separierung von Proteinen mit Molekulargrößen zwischen 5 und 160 kD wurde mit SDS-Polyacrylamidgelen im diskontinuierlichen MiniPROTEAN II System der Firma Bio-Rad (Hercules, USA) durchgeführt.

**SDS-Laufpuffer:** 25 mM Tris, 19 mM Glycin, 0,1 % SDS (m/v), pH=8,8

**5 x SDS-Probenpuffer:** 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 3 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, 62,5 mM Tris-HCl, pH=6,8

### 3.3.2 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen durch Western-Blotting

In der SDS-PAGE oder der nativen BN-PAGE aufgetrennte Proteine wurden elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Der Transfer wurde im Semi-Trocken-Verfahren durchgeführt. Hierbei wurden für SDS-Polyacrylamidgele die Nitrozellulose-Membran sowie Filterpapiere entsprechend der Größe des Gelstücks ausgeschnitten und mit Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau, beginnend von der Anode zur Kathode, war wie folgt: zwei

Lagen Filterpapier (Whatman Schleicher & Schuell, GB005), die Membran, das Gel sowie drei weitere Filterpapiere, jeweils luftblasenfrei übereinander geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 25 V für 45 Minuten.

Für Blue Native-Polyacrylamidgele wurde PVDF-Membran verwendet, die für 2 Minuten mit Methanol aktiviert wurde. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei 25 V. Anschließend wurden die Proteine zur Fixierung und Denaturierung auf der Membran 5 Minuten mit 8 % Essigsäure behandelt und vor der Detektion mit TBS reäquilibriert.

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

#### 3.3.3 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde mit einem für das Proteinepitop spezifischen Primärantikörper das Protein markiert. Anschließend erfolgte der Nachweis durch einen gegen den Fc-Teil des Primär-antikörpers gerichteten Fluoreszenzfarbstoff- oder enzymgekoppelten Zweitantikörper.

Nach dem Transfer des Proteins auf die Membran (siehe 3.3.2) wurde diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Blockierpuffer, bestehend aus 5 % Milchpulver in TBS-Puffer, geschwenkt. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte entweder bei 8°C über Nacht oder für 2 h in Inkubationspuffer. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nichtgebundene Primärantikörper wurden durch viermaliges Waschen à 5 Minuten mit Inkubationspuffer entfernt. Anschließend wurde für 60 Minuten mit Sekundärantikörpern in Inkubationspuffer inkubiert und viermal mit TBS-Puffer gewaschen.

Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundär-Antikörper wurden durch Chemolumineszenz nachgewiesen. Hierfür wurden die Komponenten des ECL-Kit („enhanced chemiluminescence“- ECL, GE Healthcare, Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer) zu gleichen Teilen gemischt und die Membran vollständig benetzt und mit einer Folie luftblasenfrei abgedeckt. Aufnahmen wurden im Lumineszenz-Imager (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) mit einer CCD-Kamera erstellt. Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper wurden mit dem Odyssey Infrarot-Scanner (LI-COR) durch Abtastung im nahen Infrarotbereich detektiert. Die Auswertung erfolgte mit der Odyssey-Gerätesoftware.

**TBS-Puffer:** 20  $\mu$ M Tris/HCl, 150  $\mu$ M NaCl, pH=7,4 bei RT

**Blockierpuffer:** TBS-Puffer mit 5 % Milchpulver

**Inkubationspuffer:** Blockierpuffer mit 0,1 % Tween 20 (v/v)

**Waschpuffer:** TBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20 (v/v)

## 3.4 Zellkulturmethoden

### 3.4.1 Zellkultur von Insektenzellen

Die Insektenzelllinien *SF9* und *SF21* wurden für die rekombinante Expression von Proteinen mittels Baculoviren verwendet. Bei den *SF9*-Zellen handelt es sich um einen Subklon der *SF21*-Zelllinie. Sie wurden als immortalisierte Ovarzellen aus der Puppe des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* isoliert. Die Zelllinien unterscheiden sich in ihrer Form und Wachstumsgeschwindigkeit. Die Zellen der *SF9*-Zelllinie haben eine Verdopplungsrate von ca. 55 h und sind gleichmäßig rund. *SF21*-Zellen haben eine Verdopplungsrate von ca. 24 h und sind größer. Für einen Großteil der Expressionen wurden aufgrund der benötigten hohen Zellzahl *SF21*-Zellen verwendet. Die Zelllinien wurden von Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen und adhärent sowie in Suspensionskultur gehalten. Für die Suspensionskultur wurden die Zellen mit einer Dichte von 0,5 bis  $3,5 \cdot 10^6$  Zellen pro ml Kultur bei einer Pendelrotation von 60-75 Umdrehungen pro Minute in Spinnerflaschen gehalten. Die Kultivierung erfolgte in einem nicht CO<sub>2</sub>-regulierten Brutschrank bei 28°C. Als Medium wurden das serumfreie SF 900 II (Invitrogen, Carlsbad, USA) sowie Grace Medium (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 5 % FCS-Zugabe verwendet.

### 3.4.2 Kryokonservierung von Insektenzellen

Adhärenz oder in Suspension wachsende Insektenzellen mit einer minimalen Vitalitätsrate von 90 % und logarithmischem Wachstum wurden bei 500 g für 10 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde mit Kryomedium auf eine finale Konzentration von  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen pro Milliliter verdünnt und in sterilen Kryovials à 1 ml aliquotiert. Das Einfrieren erfolgte mit einer Temperaturabsenkung von 1°C pro Minute im Minus 80°C-Gefrierschrank unter Verwendung eines Einfriercontainers („Mr. Frosty“, Nalgene Labware). Nach 24 Stunden wurden die Vials zur Langzeitlagerung in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Container überführt. Zum Auftauen der Insektenzellen wurde das Vial im 28°C-Wasserbad unter leichtem Schwenken aufgetaut und zweimal mit Medium gewaschen. Die Zelllösung bzw. das Zellpellet wurde in 14 ml Medium aufgenommen und bei 500 g für 10 Minuten

zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in T-Flaschen für die adhärenzte Kultur bzw. in Spinnerflaschen für die Suspensionskultur eingesät.

**Kryomedium für Insektenzellen:** 60 % SF900, 30 % FCS, 10 % DMSO (ROTH, Karlsruhe)

### 3.4.3 Baculovirus-Expressionssystem (BEVS)

Die rekombinante Expression von Proteinen in Insektenzellen stellt für einige rekombinante Proteine die einzige Möglichkeit bzw. Verbesserung gegenüber der Expression in *E. coli* dar. Gründe hierfür sind die bei Insektenzellen möglichen posttranslationalen Modifikationen sowie deren höher entwickeltes System zur Kontrolle der Proteinfaltung und die Bildung von Schwefelbrücken.

### 3.4.4 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Für die rekombinante Proteinexpression werden Baculoviren molekularbiologisch modifiziert. Baculoviren ermöglichen die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen. Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Baculoviren wurden mit dem Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionssystem der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) hergestellt (siehe Abbildung 14). Dieses System basiert auf der *in vitro* ortsspezifischen Transposition eines Genes aus einem Transfervektor in das Bacmid in *E. coli*. Das Bacmid beinhaltet ein gering replizierendes mini-F-Replikon, ein Kanamycin-Resistenz-Gen sowie ein lacZ-Gen. Innerhalb des lacZ-Gens befindet sich eine Erkennungssequenz für das bakterielle Tn7-Transposon. Das Gen von Interesse wird in einen Donorvektor, der die Baculovirus-Promotoren beinhaltet, kloniert. Das Konstrukt ist flankiert durch Tn7-Transposonsequenzen und enthält zusätzlich ein Gentamycin-Resistenzgen sowie ein SV40-Polyadenylierungssignal. Der Donorvektor wird in DH10Bac™-Zellen transformiert. Diese Zellen beinhalten das Bacmid sowie ein Helferplasmid, das für die Transposase kodiert. Das mini-Tn7-Element des Donorvektors wird durch die auf dem Helferplasmid kodierte Transposase in die mini-att-Tn7-Bindungsstelle der Bacmid-DNA transponiert. Die Insertion des Zielgens in das Bacmid führt zur Zerstörung des lacZ-Gens und ermöglicht die Auswahl von Kolonien mit rekombinanten Bacmiden, wenn diese X-gal und IPTG ausgesetzt sind, während Kolonien ohne rekombinante Bacmid-DNA blau erscheinen. Anschließend wird die rekombinante Bacmid-DNA aus den Bakterienzellen isoliert und in Insektenzellen transfiziert (siehe 3.4.5).

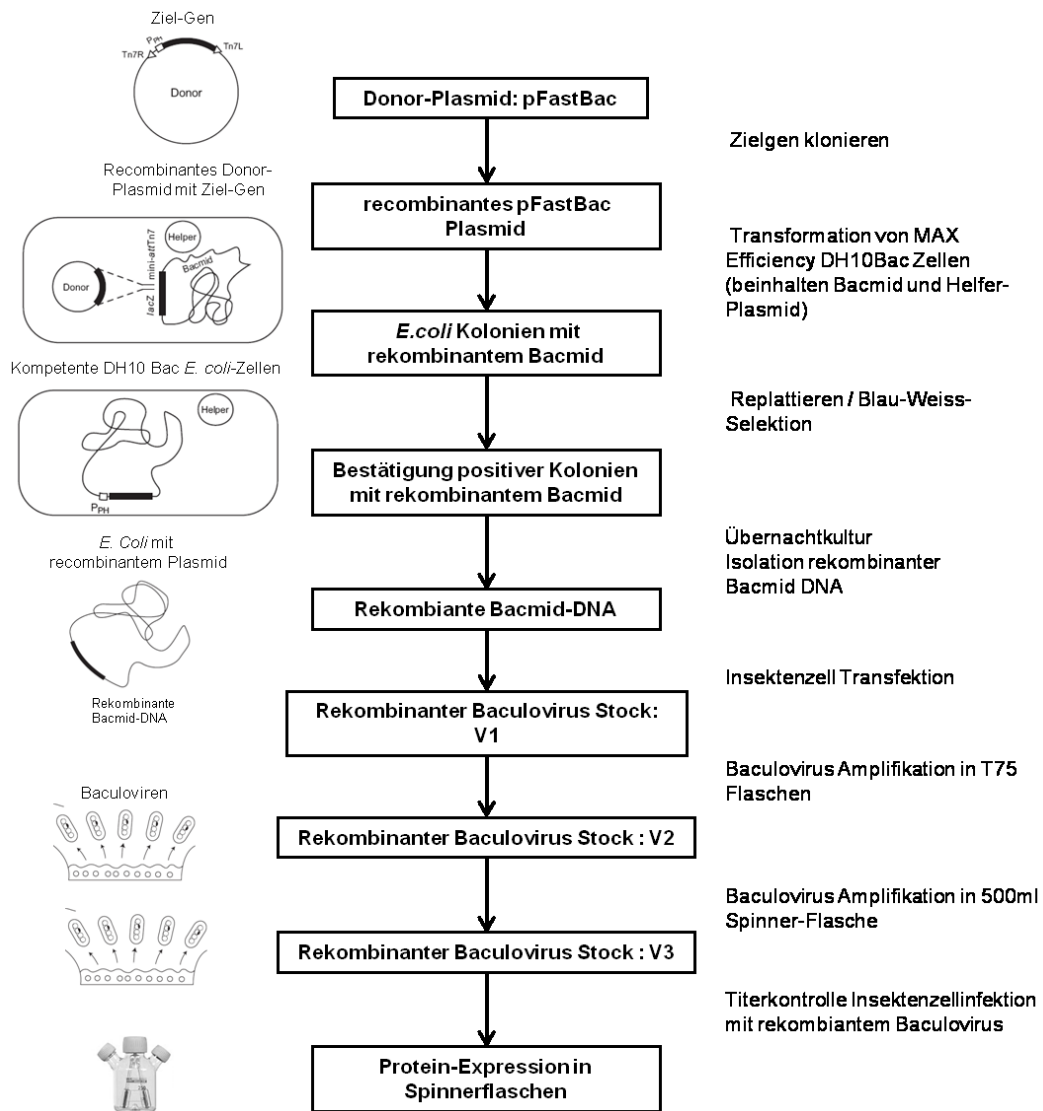
### 3. Material und Methoden

---

Als Donorvektor wurde der pFastBac Dual-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Die kompetenten MAX Efficiency DH10Bac-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und abweichend vom Protokoll des Herstellers mit der 2-10-fachen Menge, d.h. 2-10 ng des Donorvektors, transfiziert. Für die Transfektion wurden nach DNA-Zugabe die kompetenten Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach für 45 Sekunden ohne Schütteln bei 42°C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben und für 5 Stunden bei leichtem Schütteln (300 rpm) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen 10-, 100- und 1000-fach verdünnt und auf 2YT-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin, 150 mg/ml X-gal und 40 µg/ml IPTG ausplattiert. Nach 48 bis zu 72 Stunden Inkubation wurden möglichst große weiße Kolonien erneut ausplattiert und erneut für mindestens 48 h inkubiert. Bei Bestätigung des weißen Phänotyps wurden diese Kolonien für die Isolation der Bacmid-DNA verwendet. Der Klon wurde über Nacht in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamycin, 10 µg/ml Tetracyclin vermehrt. Das Pellet von 10 ml Flüssigkultur wurde mit den Puffern des Qiagen (Hilden) Midi-Prep-Kit (siehe 3.2.9) aufgeschlossen. Die Bacmid-DNA wurde mittels ethanolischer Fällung isoliert. Hierfür wurde der Überstand mit 800 µl Isopropanol gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend die DNA bei 21°C für 15 Minuten und 14.000 g gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Es wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

Die erfolgreiche Insertion des Transposons der rekombinanten Gensequenzen in die Bacmid-DNA wurde mit M13-fw- und M13-bw-Primern bestätigt.

**TE-Puffer:** 0,01 M Tris-HCl, pH=7.4, 0,5 mM EDTA



**Abbildung 14: Flussschema zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren mit dem Bac-to-Bac-System, modifiziert nach dem Benutzerhandbuch (Invitrogen, Carlsbad, USA, Version D, April 2004)**

### 3.4.5 Insektenzelltransfektion und Baculovirus-Amplifikation

Für die Transfektion wurden am Vortag der Transfektion  $0,5 \cdot 10^6$  Insektenzellen in 2 ml Medium in 6-fach Platten mit 35 mm Napfdurchmesser ausplattiert. Sollte die Transfektion noch am selben Tag erfolgen, wurden  $0,9 \cdot 10^6$  Zellen ausplattiert und vor der Transfektion 1-2 Stunden inkubiert, um eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen.

Für die Transfektion wurde Medium ohne Antibiotika und Antimykotika verwendet, da diese die Transfektionseffizienz mindern. Zuerst wurden 1-4  $\mu\text{g}$  Bacmid-DNA mit 100  $\mu\text{l}$  SF-900 II Medium gemischt und in einem zweiten Reaktionsgefäß 6  $\mu\text{l}$  Cellfectin (Invitrogen, Carlsbad, USA) ebenfalls mit 100  $\mu\text{l}$  Medium. Zur Ausbildung der Cellfectin-DNA-Komplexe wurden die beiden Reaktionsgefäße gemischt und bei Raumtemperatur

für 30-45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 800 µl Medium zugegeben und auf die vorbereiteten Zellen gegeben. Zur Vorbereitung wurden die adhären wachsenden Zellen dreimal mit Antibiotika- und Antimykotika-freiem SF-900 II Medium gewaschen. Die Zellen wurden mit der DNA-Cellfektin-Lösung für 5 Stunden im Inkubator inkubiert. Der Überstand wurde nach der Inkubation abgesaugt, die Zellen mit 2 ml Antibiotika- und Antimykotika-haltigem Medium überschichtet und mit Parafilm gegen Austrocknung versiegelt. Die Platten wurden für 3-3,5 Tage inkubiert. Zur Gewinnung des Virusstocks 1 (V1) wurden die Zellen im Mediumüberstand resuspendiert und diese Suspension für die weitere Virus-Amplifikation verwendet (siehe Abbildung 14).

Die Amplifikation des Virus erfolgte in T-Flaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche (T75). Hierfür wurden  $4.4 \cdot 10^6$  Zellen in 15 ml Medium ausgesät und der Virusstock 1 (V1) am Folgetag zugegeben und für drei Tage inkubiert. Der Virusstock 2 (V2) wurde zur Infektion in Spinnerflaschen mit 50-100 ml Insektenzellkultur verwendet. Hierfür wurden 5-10ml des Virusstocks verwandt. Der Überstand wurde als Virusstock 3 (V3) bei 4°C und lichtgeschützt mit 5 % FCS-Zugabe gelagert und für die Proteinexpression verwendet.

#### **3.4.6 Baculovirus-Proteinexpression**

Für die Proteinexpression in Insektenzellen wurden Suspensionskulturen mit  $0,75 \cdot 10^6$  Zellen pro Milliliter in Spinnerflaschen mit bis zu einem Zehntel Virusstocklösung infiziert. Die Infektion erfolgte für drei Tage. Eine effiziente Infektion zeigt sich durch Stagnation des Zellwachstums sowie in einigen Fällen durch geringe Abnahme der Zellzahl. Die Expression der Proteine wurde mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.1) und Western-Blot (siehe 3.3.2) nachgewiesen. Konnte keine bzw. geringe Expression detektiert werden, wurde der Virustiter bestimmt (siehe 3.4.7) und der Virus weiter amplifiziert.

Für Expressionstests in kleinem Maßstab wurden  $3.8 \cdot 10^6$  Zellen in 10 ml Medium in Zellkulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> Bodenfläche (T-25) ausplattiert und mit unterschiedlichen Virenstocks bzw. Stockvolumina infiziert. Zur Bewertung der Expression wurden die Zellen mit einem Zellschaber resuspendiert und das Pellet eines Milliliters in 50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und 2,5 µl für die Analyse auf dem SDS-PA-Gel bzw. im Blot verwendet.



### 3.4.7 Baculovirus-Titerbestimmung

Zur Bewertung des Virustiters eines Virusstocks wurde nach der von Hitchman et al. beschriebenen Methode auf dem Prinzip einer TaqMan-Sonde der Titer mit Real-Time-PCR bestimmt [131]. Die Bestimmung erfolgte durch die Amplifikation einer 72 bp-langen Sequenz des gp64-Gens des Baculovirus. Die gleichen Primersequenzen wurden verwendet. Für die Sonde wurde abweichend am 3'-Ende der effektivere Black Hole Quencher™ verwendet neben dem 6-Carboxy-Fluorescein am 5'-Ende (siehe Tabelle 1). Die Baculovirus-DNA wurde mit dem High Pure Viral Nucleic Acid-Kit (Roche, Mannheim) aufgereinigt. Für einen Ansatz mit 25 µl Gesamtvolumen wurden jeweils 2 µl aufgereinigte Viren-DNA, 12,5 µl Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG-Lösung (Invitrogen, Carlsbad, USA) und die TaqMan-Sonde sowie die flankierenden Primer zu jeweils 100 nM eingesetzt. Die Detektion und Auswertung erfolgte mit dem Gerät und der Software des Bio-Rad iCycler iQ 5 (Bio-Rad, Hercules, USA). Es wurde folgendes Temperaturprogramm zur DNA-Amplifikation verwendet:

Schritt	Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit [Sek.]
Initiale Aktivierung	1	50°C	2
Aktivierung	1	95°C	2
Denaturierung	40	95°C	15
Annealing und Erweiterung		60°C	30

**Tabelle 6: Temperaturprogramm zur quantitativen Real-Time-PCR für Baculovirus-Titerbestimmung**

Da diese Methode auf der Detektion von DNA basiert, werden nicht infektiöse z.B. aggregierte Viren nicht detektiert. Vorteil dieser Methode ist die schnelle Bestimmung des Titers. Um die Anzahl infektiöser Partikel zu bestimmen, wurde gegebenenfalls der Titer mit dem von Hopkins et. al. beschriebenen Verfahren bestimmt [57]. Die benötigten SF9-ET-Zellen wurden vom Protein Expression Laboratory (Advanced Technology Program, SAIC-Frederick, National Cancer Institute at Frederick, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Die SF-9-ET-Zelllinie (SF-9 Easy Titer Zelllinie) codiert für das fluoreszierende Protein eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) und steht in diesen Zellen unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promoters (PH-Promotor) des Baculovirus. Bei Infektion der SF9-ET-Insektenzellen mit Virus wird durch Aktivierung des PH-Virenpromotors die Expression von eGFP induziert. Anhand der eGFP-Fluoreszenz werden die infizierten Zellen identifiziert. Die SF9-

ET-Zellen wurden in SF900 II Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 150 µg/ml G418 kultiviert.

Es wurden jeweils 4 ml SF-9-ET-Zellen mit einer Dichte von  $0.5 \cdot 10^6$  Zellen pro Milliliter in 60 mm Petrischalen ausplattiert und zum Absetzen der Zellen für 1 Stunde inkubiert. Der Überstand und nicht-adhärenzte Zellen wurden abgesaugt und Verdünnungen des Virusstocks in 1 ml Medium für 2-3 Stunden in die Petrischale gegeben. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 4 ml 35°C-warmer, bei niedrigen Temperaturen schmelzender Agarose (Biozym, Plaque GP Agarose) überschichtet. Die Agarose wurde wie folgt hergestellt: 2,5 % (g/v) Agarose wurde in autoklaviertem Wasser gelöst, durch Kochen in der Mikrowelle aufgelöst und im Wasserbad auf 44°C abgekühlt. Anschließend wurde das Medium im 28°C-warmen Brutschrank vorgewärmt und 15 Teile des Mediums mit 10 Teilen Agarose vermischt und bis zur Verwendung im Wasserbad bei 35°C gelagert. Die Zellen wurden in einer feuchten Kammer im Inkubator für mindestens 3 Tage inkubiert und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop observiert.

#### **3.4.8 IPTG-induzierte Genexpression in *E. coli***

Zur Überexpression von GST- oder His-Konstrukten in *E. coli*-Bakterien wurde der Bakterienstamm BL21(DE3) eingesetzt (siehe 3.1.7). Die Bakterien wurden mit dem Plasmid transfiziert und anschließend auf Selektionsplatten ausplattiert (siehe 3.2.8). Am nächsten Tag wurden 100 ml 2YT-Selektionsmedium mit 100 mg/L Ampicillin oder 35 mg/L Kanamycin angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde ein Liter LB-Selektionsmedium mit einer optischen Dichte ( $OD_{600 \text{ nm}}$ ) von 0,1 mit der Vorkultur angeimpft und weiter bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Bei einer optischen Dichte ( $600 \text{ nm}$ ) von 0,5-0,8, wurde durch Zugabe von IPTG bis zu 1 mM für 2,5-5 Stunden induziert. Für die Expression von Proteinen mit geringer Löslichkeit wurde vor der Induktion der Kolben für 45 Minuten auf Eis abgekühlt. Exprimiert wurde bei 20°C über Nacht mit der 3-fachen Konzentration an Antibiotika.

### 3.4.9 Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen und Thrombinverdau

Das mit Ultraschall im Waschpuffer aufgeschlossene Zelllysate wurde durch Zentrifugation bei 16.000 g für 20 Minuten von Zellfragmenten getrennt. Der Überstand wurde durch einen 0,8 µm- und 0,2 µm-Spritzenfilter filtriert. Das GST-Fusionsprotein wurde an einer Glutathion-Sepharose<sup>®</sup>-Matrix (GSTrap<sup>®</sup> 4B-Säule, GE Healthcare, München) immobilisiert und gewaschen. Anschließend wurde mit einem Stufengradienten das Fusionsprotein mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Aufreinigung erfolgte am automatisierten Profinia-Chromatographie-System (Bio-Rad, Hercules, USA).

**Waschpuffer (2x):** 300 mM NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, pH=7,4

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

Zum Abspalten des GST-Affinitätstags wurde das Protein im Profinia-Elutionspuffer mit 5U Thrombin pro 1 mg Protein entweder über Nacht bei 4°C oder für 3-5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mittels Gelfiltration getrennt.

### 3.4.10 Affinitätschromatographie zur Reinigung von His-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von His-Fusionskonstrukten wurde entweder am Profinia-Chromatographiesystem (Bio-Rad, Hercules, USA) oder am Äkta-Purifier-System (GE Healthcare, München) durchgeführt. Als Matrix wurde mit Ni<sup>2+</sup>-komplexierte Nitrilotriessigsäure (NTA)-Agarose verwendet (HisTrap, GE Healthcare, München). Im Profinia-System wurde nach der Immobilisierung des Proteins mit einem zweiten Puffer mit erhöhter Imidazolkonzentration (Waschpuffer II) gewaschen und anschließend mit einer hohen Imidazolkonzentration von der Matrix eluiert (Elutionspuffer). Für die Aufreinigung mit dem Äkta-Purifier-System wurde das Protein mit einem linearen Gradienten von 5- bis 10-fachem Säulenvolumen aus Waschpuffer I und Elutionspuffer von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix eluiert.

**Lyse-/Waschpuffer I (2x):** 600 mM KCl, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Imidazol, pH=8.0

**Waschpuffer II (2x):** 600 mM KCl, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM Imidazol, pH=8.0

**Elutionspuffer (2x):** 600 mM KCl, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM Imidazol, pH=8.0

#### 3.4.11 Affinitätschromatographie zur Reinigung von Strep-Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung von Strep-Fusionskonstrukten aus Insektenzellen wurden diese bei 1500 g für 10 Minuten pelletiert und im Lysepuffer resuspendiert. Zum Abbau von DNA und RNA wurden 1-3 U Benzonase pro ml Lysat zugegeben. Die Insektenzellen wurden durch Sonifikation aufgeschlossen und Zellfragmente durch Zentrifugation bei 10 000 g bei 4°C für 20 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µM-Spritzenfilter filtriert und auf eine mit Waschpuffer regenerierte und equilibrierte Säule (Strep-Tactin Qiagen (Hilden), IBA (Göttingen)) aufgetragen. Nach dem Entfernen nichtgebundener Proteine mit Waschpuffer wurde das Protein bzw. der Proteinkomplex mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Aufreinigungen wurden am Chromatographiesystem (Bio-Rad, Hercules, USA) Äkta-Purifier-System (GE Healthcare, München) vorgenommen oder in selbstgepackten Säulen auf der Arbeitsfläche. Zum Regenerieren wurden die Säulen mit Regenerationspuffer gespült und in Regenerationspuffer gelagert.

**Lysepuffer:** 150 mM Tris pH=8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM β-ME, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Waschpuffer:** 100 mM Tris pH=8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM β-ME

**Elutionspuffer:** 100 mM Tris pH=8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM β-ME, 2,5 mM Desthiobiothin.

**Regenerationspuffer:** 100 mM Tris pH=8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, 0,02 % NaN<sub>3</sub>

#### 3.4.12 Blue Native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die von Schägger und Jagow entwickelte BN-PAGE [132, 133] basiert auf der Bindung des negativ geladenen Coomassie brilliant blue R250-Farbstoffs an Proteine bzw. an Proteinkomplexe. Die Proteine werden im Gegensatz zur SDS-PAGE nicht denaturiert. Durch die Eigenladung des Farbstoffs findet eine Gesamtnegativladung des Coomassie-Protein-Komplexes statt. Dies erlaubt die Auftrennung von Proteinen im nativen Zustand. Zudem ermöglicht diese Methode, dass Proteine mit einem basischen Isoelektrischen Punkt und positiver Ladung durch das Coomassie ebenfalls negativ geladen werden und zur Anode wandern. Weiterhin hat der Farbstoff den Vorteil, dass durch die unspezifische Bindung an hydrophobe Bereiche die Aggregation von Proteinen verringert wird.

Die Blue Native PAGE wurde mit dem NativePAGE™ NOVEX® Bis-Tris-Gelsystem (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die Proben wurden ohne zu kochen und mit

einer maximalen Salzkonzentration von 50 mM auf die Bis-Tris-Gradientengele aufgetragen. Die Gele wurden nach dem Lauf für eine höhere Detektion und bessere Färbung mit Coomassie gefärbt (siehe 3.4.13). Sollten die Gele für die Immunodetektion verwendet werden, wurde der Kathodenpuffer nach dem Lauf eines Drittels des Gels gegen einen Puffer mit nur einem Zehntel Coomassie (0,002 %) ausgetauscht, um ein effizienteres Blotten zu ermöglichen.

#### **3.4.13 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen**

Coomassie brilliant blue R250 ist ein Farbstoff, der mit Proteinen Komplexe bildet. Dadurch können Proteine in Gelen nach der Elektrophorese angefärbt werden. Die Gele wurden dazu für 30 Minuten in Gelfärbelösung geschwenkt oder kurz in einem Mikrowellenherd aufgeköcht: 0,25 % Coomassie brilliant blue R250, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol.

Die Lösung wurde nach dem Ansetzen filtriert. Zum Entfärben wurde das Polyacrylamidgel eine Stunde oder über Nacht in Entfärbelösung mit 10 % Essigsäure, 30 % Methanol geschwenkt. Die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals ausgetauscht. Alternativ wurde das Gel im Mikrowellenherd bis zur gewünschten Entfärbung aufgeköcht.

#### **3.4.14 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen**

Die Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele wurde mit dem ProteoSilver™ Plus Silver Stain-Kit der Firma SIGMA® durchgeführt. Grundsätzlich wurde dabei nach Angaben des Herstellers verfahren. Aufgrund der kleinen Gele wurde jeweils nur ein Drittel der Volumina verwendet. Zusätzlich wurde der Fixierschritt mindestens 45 Minuten durchgeführt.

Die Proteine im Gel wurden durch Trichloressigsäure-haltige Lösungen fixiert. Anschließend werden die Gele in Silbernitrat-Lösungen inkubiert. Hierbei binden Silberionen an funktionelle Gruppen und Peptidbindungen der Proteine, wobei sie durch Reduktion zu Silberkeimen umgewandelt werden. Durch Zugabe von Formaldehyd werden die Silberionen bei alkalischem pH reduziert. Die Umsetzung zu metallischem Silber ist in der Nähe von Silberkeimen beschleunigt. Hierdurch werden die Proteine durch Färbung im Gel sichtbar. Die Reaktion wurde durch Ansäuern gestoppt. Der Vorteil der Silberfärbung liegt in der hohen Sensitivität und ermöglicht den Nachweis von geringen Proteinkonzentrationen von bis zu 1-10 ng pro Bande.

## **3.5 Biophysikalische Methoden zur Proteincharakterisierung**

### **3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bio-Rad-Protein-Assay (Bio-Rad, Hercules, USA) nach der Methode von Bradford durchgeführt. Der Nachweis basiert hauptsächlich auf der Bindung des Coomassie Brilliant Blue G-250-Farbstoffs an basische und aromatische Aminosäuren und auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm im sauren Milieu [134]. Eine Eichreihe mit 0,01 bis 1 mg/ml BSA wurde erstellt. Die Bio-Rad-Protein-Assay-Stocklösung wurde mit einem vierfachen Volumen Wasser verdünnt und mit einem 0,2 µM-Spritzenfilter filtriert. Der Assay wurde in 384 Well-plates (Corning® 384 Well Clear Flat Bottom Polystyrene NBS™ Microplate) angesetzt. Pro Well wurden 5 µl Standard oder Probe vorgelegt und 90 µl Bradford-Lösung zugeben. Die optische Dichte wurde mit dem Sapphire Microplate Reader bei 595 nm nach einer Inkubation von mindestens 5 Minuten bei RT ausgelesen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Kalibrierreihe bestimmt.

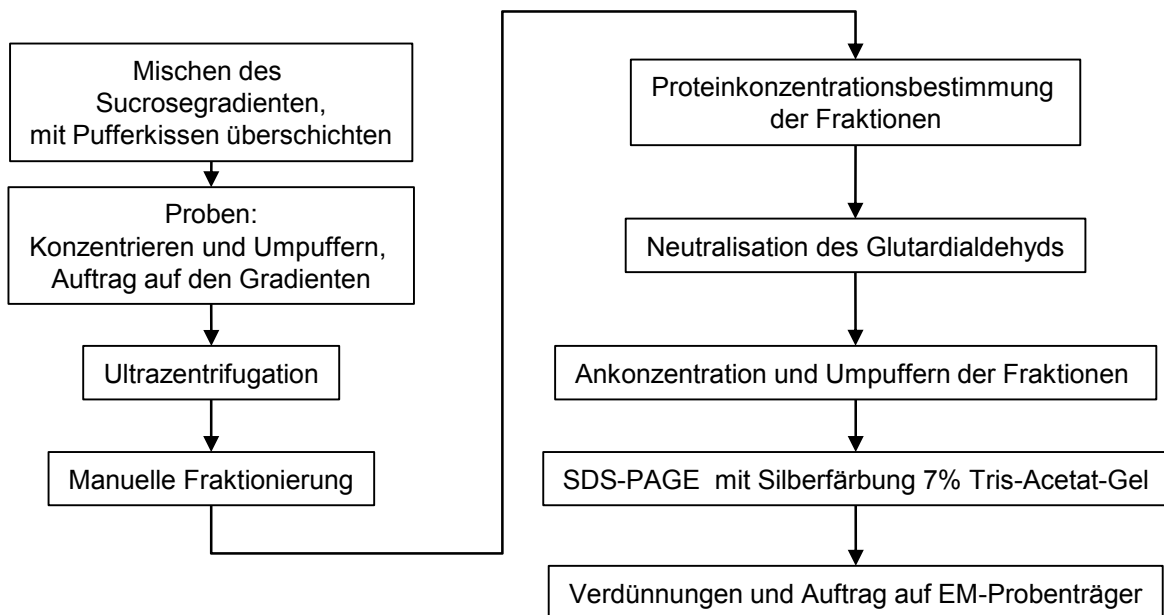
### **3.5.2 Proteinankonzentration**

Die Proteine wurden in Zentrifugations-Konzentrationseinheiten der Firma Sartorius Stedim Biotech S.A. (Aubagne Cedex, Frankreich) bei 8-21°C ankonzentriert. Als Membran wurden PES (Polyethersulfon)- oder HY (Hydrosart: stabilisierte Zellulose Membran)-Membranen der Vivaspin 6/20/15R Reihe mit einem molekularen Ausschlussvolumen von 2.000, 3.000, 10.000, 30.000 Da verwendet. Die Reservoirlösung wurde regelmäßig resuspendiert, um einem Ausfällen der Proteine durch lokale hohe Proteinkonzentrationen vor der Membran entgegenzuwirken.

### 3.6 Elektronenmikroskopische Methoden

#### 3.6.1 GraFix-Methode

Die von Kastner et al. beschriebene Methode ermöglicht die Stabilisierung von Proteinkomplexen für die Einzelpartikel-Mikroskopie. Bei dieser Methode wird die Probe in einem linearen Dichtegradienten zentrifugiert, der mit einem ansteigenden Konzentrationsgradienten aus Kreuzvernetzern versehen ist. Durch die steigende Dichte und den dadurch entstehenden Druck werden schwache und unspezifischere Bindungen aufgelöst und gleichzeitig durch Kreuzvernetzungen die Proteine stabilisiert. Eine Übersicht über den Ablauf der Probenpräparation ist in Abbildung 15 gezeigt:



**Abbildung 15: Flussdiagramm der Probenvorbereitung der GraFix-Methode**

Der lineare Sucrosegradient (siehe 3.6.2) wurde mit der Rotationsapparatur (siehe Abbildung 16) erzeugt. Die Probe wurde mittels Zentrifugalkonzentratoren (Sartorius, Vivaspin 500, MWCO 30, PES) in 20 mM HEPES, pH=8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP umgepuffert und auf ein Volumen von 100-300  $\mu$ l ankonzentriert. Die Probe wurde direkt auf den linearen Sucrosegradienten aufgetragen bzw. vorher ein Sucrosekissen (5 % Sucrose (w/v), 20 mM HEPES, pH=8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP) von 200  $\mu$ l auf dem Sucrosegradienten aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 33 000 g und 4°C für 12-20 Stunden in einem Ausschwingrotor (SW60Ti Rotor, Beckmann, Krefeld). Für die Fraktionierung wurde das Zentrifugenröhrchen mit einer Kanüle (0,60 x 30 mm) am Boden

angestochen und 1 oder 3 Tropfen je Fraktion gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad-Protein-Assay im 384-Well-Format durchgeführt (siehe 3.5). Die Inaktivierung des Kreuzvernetzers erfolgte mit Glycin-Lösung deren finale Konzentration in der Fraktion bei 70 mM lag. Die Proben wurden ankonzentriert und der Puffer in den Konzentrationsröhrchen gegen 20 mM HEPES, pH=8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP ausgetauscht. Zur Kontrolle der erfolgten Kreuzvernetzung wurden Fraktionen aus NOVEX Tris-Acetat-Gelen (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen und eine Silberfärbung durchgeführt (siehe 3.4.14). Einzelne Fraktionen wurden durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat elektronenmikroskopisch untersucht (siehe 3.6.4).

#### **3.6.2 Herstellung eines linearen Sucrosegradienten**

Basierend auf der von Coombs und Watts beschriebenen Methode wurden lineare Sucrosegradienten hergestellt [135]. Die Stammlösungen mit 10 % und 30 % Sucrose (SIGMA, 84097 Ultra) wurden durch 0,22 µM-Spritzenfilter filtriert und entgast. In 11 x 60 mM Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Nr.344062) wurden 1,85 ml leichte Lösung vorgelegt und mit einer Kanüle luftblasenfrei mit der schweren Lösung unterschichtet. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit Deckeln (SW 60 Caps, Science Service, München) luftblasenfrei verschlossen und in die Rotationsapparatur eingespannt. Die Zentrifugenröhrchen wurden für 4 Minuten rotiert. Die Deckel der Röhrchen wurden abgenommen und die Röhrchen für eine Stunde bei 4°C stehen gelassen.

**Leichte Lösung:** 10 % Sucrose (w/v), 20 mM HEPES, pH=8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP

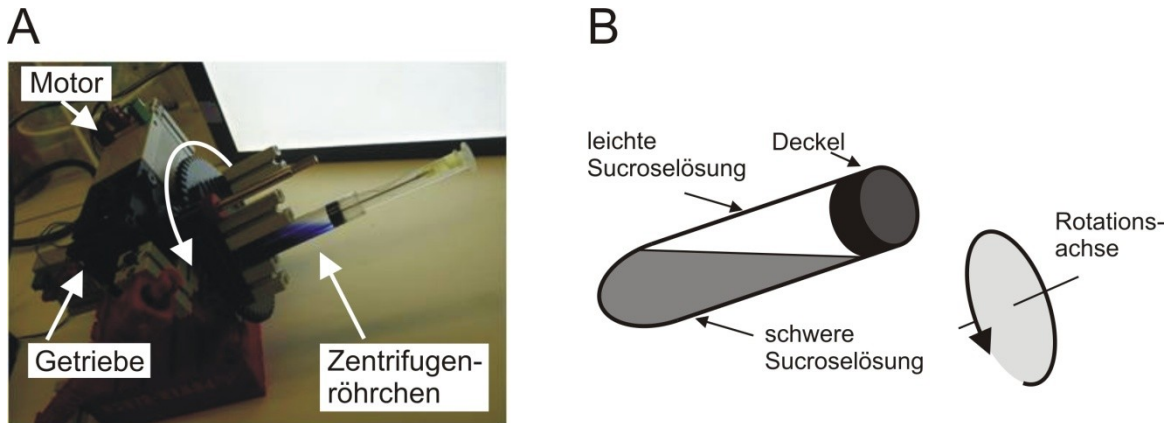
**Schwere Lösung:** 30 % Sucrose (w/v), 20 mM HEPES, pH=8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, 0,15 % Glutardialdehyd (v/v)

Für initiale Versuche der Durchmischung des Gradienten wurde die schwere Lösung mit 0.01 % Trypanblau versetzt und die Gradientenbildung bei einer Wellenlänge von 585 nm bestimmt.



### 3.6.3 Rotationsapparat für die Herstellung linearer Sucrosegradienten

Die Apparatur wurde aus Fischer Technik®-Bauteilen (fischertechnik GmbH, Waldachtal) hergestellt. Als Antrieb diente ein mit 12 V betriebener Fischertechnik-Motor. Durch ein Getriebe wurde die Rotationsplattform angetrieben (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16: Rotationsapparat für die Herstellung linearer Sucrosegradienten. A) Geräteaufbau, B) Justierung des Kippwinkels der Rotationsapparatur. Die schwere Sucroselösung wurde mit 0.01 % Trypanblau angefärbt. Der Kippwinkel wurde eingestellt, so dass die Phasengrenze zwischen schwerer und leichter Sucroselösung an den Übergang vom Deckel zur Zentrifugenröhrchenwand grenzt.**

Die Zentrifugenröhrchen wurden senkrecht auf der Rotationsplattform in 2,5 cm Abstand zur Rotationsachse festgeklemmt. Die Rotationsplattform wurde um ca. 45° zur Arbeitsfläche gekippt. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Phasengrenze der schweren und leichten Lösung am Übergang vom Deckel zur Zentrifugenröhrchenwand liegt (siehe Abbildung 16). Die Rotation wurde auf eine Geschwindigkeit von 10 rpm eingestellt und für einen Gradienten von 10-30 % Sucrose für 4 Minuten ausgeführt.

### 3.6.4 Herstellung negativkontrastierter Proben und elektronenmikroskopischer Einzelpartikelaufnahmen von Proteinkomplexen

Als Objektträger wurden R2/4 bzw. R3/3 Quantifoil™ Trägernetzchen (Grids) (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena) verwendet. Diese wurden mit Chloroform gewaschen und mit einem auf Wasser flotierten, ca. 2 nm starken kontinuierlichen Kohlefilm überschichtet. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Grids in einem Plasmareiniger (Harrick Plasma, Ithaca, USA) unter Vakuum ( $3 \cdot 10^{-1}$  bar) für 30 Sekunden beglimmt. Anschließend wurden 3,5 µl der Probe auf das Netzchen aufgetragen und nach 45 Sekunden wurde überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abgesaugt. Zur Kontrastierung wurden 3,5 µl Uranylacetatlösung (2 % w/v) aufgetragen und nach 15 Sekunden abgesaugt. Die Netzchen wurden

anschließend an der Luft getrocknet. Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden gemeinsam mit Jörg Bürger und Dr. Thorsten Mielke am Max Planck Institut für Molekulare Genetik (Berlin) durchgeführt. Die Abbildung der Proben erfolgte mit einem 100 kV CM100 (Philips) oder Tecnai Spirit (FEI) Transmissionselektronenmikroskop unter „Low-Dose“-Bedingungen (Gesamtdosis  $< 20$  Elektronen/  $\text{\AA}^2\text{s}$ ) und einem Unterfokus von  $-1,5$  bis  $-2,5$   $\mu\text{m}$ . Die Geräte waren mit 1kx1k Fastscan (TVIPS, CM100) bzw. 4kx4k Eagle (FEI, Spirit) CCD-Kamera ausgestattet.

#### **3.6.5 Bildverarbeitung für Elektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion**

Die Bildverarbeitung sowie die Rekonstruktion erfolgten mit dem Programm Spider [136] und wurden von Dr. Jan Giesebrecht am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Charité Berlin durchgeführt. In den digitalen Bildern wurden die Komplexe visuell lokalisiert und mit einem quadratischen Rahmen extrahiert. Auf die Bilder wurden Hoch- sowie Tiefpassfilter angewendet und wurde eine Normalisierung der Intensitäten der Grauwerte durchgeführt. Anschließend wurden die Partikel im Bild zentriert und mit einer Kreismaske isoliert, um störende Bildeffekte auszuschließen. Die Einzelbilder wurden durch Anwendung einer Kreuzkorrelationsfunktion und daraus folgender Translation sowie Rotation zueinander orientiert. Die ausgerichteten Einzelbilder wurden durch Anwendung des K-Means-Verfahrens in Klassen gruppiert [137]. Hierbei wurden schrittweise Einzelbilder sowie Gruppen aus Bildern zu Clustern vereinigt. Die so gebildeten Gruppen wurden zu sogenannten Klassensummen zusammengefasst.

Basierend auf den Klassensummen wurde mit der sogenannten 'common lines'-Methode ein dreidimensionales Modell berechnet. Hierfür wurde die in dem Softwarepaket Spider [136] implementierte Funktion angewandt.

#### **3.6.6 Dynamische Lichtstreuung (DLS)**

Die Bestimmung der Größe von Proteinen in Lösung mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung basiert auf der Streuung des eingestrahnten Lichts in alle Richtungen, wenn die Wellenlänge des Lichts deutlich größer ist als die Partikelgröße (Rayleigh Streuung). Abhängig von ihrer Größe bewegen sich die Partikel unterschiedlich stark (Braunsche Molekularbewegung). Als Folge dessen variieren die Abstände der Partikel. Dies führt zu einer Interferenz des gestreuten Lichts. Diese wird durch einen kohärenten und monochromatischen Laser abgebildet. Aus diesen Fluktuationen wird der Diffusionskoeffizient bestimmt. Durch Verwendung der Stokes-Einstein-Gleichung wird der hydrodynamische

Radius eines sphärischen Partikels und somit im Idealfall das Molekulargewicht eines globulären Proteins berechnet. Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen erfolgte in 20 µl-Mikroküvetten mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, England).

#### **3.6.7 Analytische Gelfiltration**

Zur Bestimmung der Größe von Proteinen bzw. Proteinkomplexen wurden analytische größenausschlusschromatographische Untersuchungen durchgeführt. Zur Kalibrierung der Filtrationssäulen wurden das Niedrig- sowie Hochmolekulargewichts-Gelfiltrations-Kalibrierkit (GE Healthcare, München) mit folgenden Standards verwendet: Aprotinin 6,5 kDa, Ribonuclease A 13,7 kDa, Carbonic Anhydrase 29,0 kDa, Ovalbumin 43,0 kDa, Conalbumin 75,0 kDa, Aldolase 158,0 kDa, Ferritin 440,0 kDa, Thyroglobulin 669,0 kDa sowie Dextran Blau 2000. Als Säulen wurden Superdex 75 10/300 GL, Superdex 200 10/300 GL sowie die Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare, München) verwendet. Das Probenvolumen betrug zwischen 50 und 200 µl mit Proteinmengen zwischen 0,25 und 1 mg. Die Gelfiltrationsläufe wurden mit dem ÄKTA™-Purifier-System durchgeführt. Die Berechnung des Molekulargewichts wurde anhand der Kalibrierkurve mit der UNICORN-Software (GE Healthcare, München) erstellt und ausgewertet.

### **3.7 NMR-Spektroskopie**

#### **3.7.1 NMR-Datenprozessierung und Signalzuordnung**

Die Messungen erfolgten an 600 und 700 MHz NMR-Spektrometern. Die NMR-Spektren wurden mittels der TopSpin Software 3.0 (Bruker BioSpin) prozessiert. Durch mathematische Operationen wurden die Phasen der direkten und indirekten Dimensionen angepasst, niedrige Frequenzen des Wassers unterdrückt, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis durch Fensterfunktionen optimiert sowie Signale durch Lineare Vorhersagen des FID (free induction decay, Signaldämpfung) verstärkt. Für die einzelnen Zeitdomänen wurde eine Fourier-Transformation durchgeführt sowie abschließend eine Basislinienkorrektur. Die Darstellung und Auswertung erfolgte mit TopSpin Software 2.1 und 3.0, Bruker BioSpin und CCPNmr Analysis 2.1 [128].

#### **NMR-Spektrometer:**

600 MHz DRX Spektrometer (Bruker, BioSpin)

5 mM Triple Resonanz Kryoprobekopf (H, C, N)

700 MHz DRX Spektrometer (Bruker, BioSpin)

5 mM Triple Resonanz Kryoprobekopf (H, C, N)

#### **3.7.2 2D-NMR-Spektroskopie**

Für die Aufnahme von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren wurden die rekombinanten Proteine in Minimalmedium mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  exprimiert (siehe 3.4.8) und über Affinitäts-Chromatographie und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Die Proben wurden bei einem pH-Wert von 7,4 in PBS mit 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  bei einer Temperatur von 310 K gemessen. Die Probenkonzentration lag zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 2 mM. Für  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren wurden 1024 x 256 komplexe Datenpunkte mit jeweils 4 oder 8 Scans aufgenommen.

#### **3.7.3 3D-NMR-Spektroskopie**

Für die Aufnahme von Triple-Resonanz-Experimenten wurde das rekombinante Protein mit  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopen markiert. Dafür wurde das Konstrukt mit  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ - sowie  $^{13}\text{C}$ -Glucose-supplementiertem Minimalmedium exprimiert (siehe 3.4.8) und anschließend über Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Die Proben wurden bei einem pH-Wert von 7,4 in PBS mit 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  bei einer Temperatur von 310 K gemessen. Die Probenkonzentration lag zwischen 900  $\mu\text{M}$  und 1,8 mM. Die Messungen erfolgten an einem 700 MHz NMR-Spektrometer der Firma Bruker. Für die NMR-Zuordnung wurden folgende Triple-Resonanz-Experimente durchgeführt: es wurden HNCA-/HN(CO)CA-, HNCN-/(CA)CO-, HN(CO)CACB-/HNCACB-Spektrenpaare aufgenommen. Die Spektren wurden mit 1024 x 96 x 96 komplexen Datenpunkten und 16 Scans aufgenommen.

Die sequenzspezifische Zuordnung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Signale zu den Aminosäuren erfolgte unter Verwendung von Triple-Resonanz-Spektren sowie selektiv markierten Aminosäuren in  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren.

### 3.7.4 Selektivmarkierung von Aminosäuren

Für die Bestätigung sowie die neue Zuordnung von Resonanzen wurde das Konstrukt jeweils mit  $^{15}\text{N}$ -Lysin, Phenylalanin oder Leucin markiert. Alle Aminosäuren wurden in  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -freies Minimalmedium (siehe 3.4.8) gegeben und die jeweils zu markierende Aminosäure mit dem  $^{15}\text{N}$ -Isotop supplementiert (siehe Tabelle 7). Die Expression erfolgte in einem für diese Aminosäuren auxotrophen *E. coli* Stamm (*E. coli* DL39 (DE3), siehe 3.1.7). Aufgrund der NMR-Intensität des natürlich zu 99,6 % vorkommenden  $^{14}\text{N}$ -Stickstoffs weisen nur die mit  $^{15}\text{N}$ -Isotopen supplementierten Aminosäuren im HSQC ein Signal auf. Durch Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Spektren des vollständig mit  $^{15}\text{N}$ -markierten Konstruktes werden die Aminosäuretypen der selektiv markierten Aminosäure den Resonanzen zugeordnet.

Aminosäure	g pro Liter Medium	Aminosäure	g pro Liter Medium
Alanin	0,28	Methionin	0,02
Cystein	0,05	Asparagin	0,35
Aspartat	0,32	Prolin	0,13
Glutamat	0,10	Glutamin	0,21
Phenylalanin	0,08	Arginin	0,29
Glycin	0,33	Serin	0,21
Histidin	0,04	Threonin	0,91
Isoleucin	0,12	Valin	0,16
Lysin	0,20	Tryptophan	0,03
Leucin	0,17	Tyrosin	0,12

Tabelle 7: Aminosäurezusammensetzung für selektive  $^{15}\text{N}$ -Markierung einzelner Aminosäuren in Minimalmedium

#### 3.7.5 NMR-Titrationsexperimente

#### 3.7.6 Berechnung der chemischen Verschiebung

In Titrationsexperimenten wurden Resonanzen im zweidimensionalen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum und deren Positionsveränderung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration ausgewertet. Resultierend aus den Positionsveränderungen der Resonanzen entlang der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Dimensionen wurde die Verschiebung  $\Delta ppm$  berechnet:

$$\Delta ppm = \sqrt{\Delta H^2 + 0.15 * \Delta N^2}$$

$\Delta H$  und  $\Delta N$  bezeichnen die Verschiebungen entlang der  $^1\text{H}$ - bzw. der  $^{15}\text{N}$ -Achse. Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - Positionen der einzelnen Resonanzen bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen wurden mit CCPN-Analysis [138] ausgelesen und in Excel (Microsoft, Redmond, USA) mit obiger Gleichung berechnet. Es wurde jeweils die Veränderung der chemischen Verschiebung zwischen der Resonanz ohne Ligand gegenüber der jeweiligen Resonanz der entsprechenden Ligandenkonzentration berechnet.

#### 3.7.7 $K_D$ -Wert-Bestimmung

Aus den Veränderungen der chemischen Verschiebung  $\Delta ppm$  (siehe 3.7.6) in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration wurde der Verlauf der chemischen Verschiebung durch ein 1:1-Rezeptor-Liganden-Bindungsmodell modelliert. Die Modellierung der Bindungskurve erfolgte mit Origin 6.0 (Microcal, GE Healthcare, München).

$$A_G = A_o * \frac{(P_o + k_D + L) - \sqrt{(P_o + k_D + L)^2 - (4 * P_o * L)}}{2 * P_o}$$

Wobei  $k_D$ : Dissoziationskonstante,  $L$ : Ligandenkonzentration,  $P_o$ : eingesetzte Proteinkonzentration,  $A_G$ : die gemessene Verschiebung und  $A_o$ : maximale Verschiebung im Plateau bezeichnet [139].

### 3.7.8 Initialer Präzipitationstest

Für die Bildung von Kristallen ist ein superkritischer Zustand der Proteinkonzentration nötig, der das Wachstum eines Proteinkristalls ermöglicht. Die Löslichkeit von Proteinen ist sehr unterschiedlich. Um sicherzustellen, dass die Proteinkonzentration für das jeweilige Proteinkonstrukt ausreichend ist, wurden initiale Präzipitationstests durchgeführt. Als Präzipitationsagentien wurden in 5 %-Schritten 0 bis 25 % (w/v) PEG4000 und in 0,5 M-Schritten 0-2,5 M Ammoniumsulfat-Lösungen verwendet [140].

### 3.7.9 „Sitting drop“-Kristallisationsansätze

Kristallisationsexperimente wurden im 96-Well-Format bei 4°C oder 20°C im „sitting-drop“-Verfahren durchgeführt. Hierbei diffundiert das Lösungsmittel aus dem auf einem Steg sitzenden Kristallisationstropfen in die Reservoirolösung. Dadurch wird die Proteinkonzentration im Kristallisationstropfen erhöht. Die Kristallisationsplatten (Low profile Crystal Quick Crystallization, Greiner BioOne, Solingen) wurden mit dem Hydra<sup>®</sup>-Plus-One (Thermo scientific) - Hochdurchsatz-Pipettierroboter angesetzt. Je Präzipitationsansatz wurden 80 µl der Präzipitationslösung als Reservoirolösung vorgelegt und anschließend 300 nl der Proteinlösung mit 300 nl der Reservoirolösung gemischt. Anschließend wurden die Kristallisationsplatten luftdicht versiegelt. Für die Präzipitationslösungen wurden die Kristallisationskits PEG, PEGII, ProComplex, PACT, Compas (Qiagen, Hilden) and Basic 1-4 (Jena Bioscience, Jena) verwendet.

Die Kristallisationsansätze wurden nach einem Zeitplan von 0, 1, 2, 7, 14, 21, 28 Tagen und anschließend in monatlichen Abständen fotografiert und visuell ausgewertet. Die Platten wurden in den voll automatisierten Systemen Homebase (The Automated Partnership, TAB Biosystems, Hertfordshire, UK) und Rock Imager 1000 (Formulatrix, Waltham, USA) bei 20°C oder bei 4°C gelagert. Die Daten wurden mit dem hauseigenen OBSERVATION-Programm verwaltet.

Mögliche Kristalle wurden mit einer Nylonschleife für kurze Zeit (>1 Minute) in eine Gefrierlösung überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Als Gefrierlösung wurde die Reservoirolösung mit 20 % Glycerol versetzt. Die Kristallisationsansätze wurden in der Arbeitsgruppe „Makromolekulare Strukturen und Interaktionen“ von Professor Dr. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin mit Unterstützung von Dr. Yvette Roske angesetzt.

#### 3.7.10 Massenspektrometrie

Die Messung sowie Auswertung der massenspektrometrischen Daten erfolgte durch CovalX (Zürich, Schweiz). Das CovalX-System ermöglicht die Bestimmung von Molekülmassen, die größer als 50 kDa sind. Für die Messungen wurde His-ADAP mit 3 $\mu$ M und der His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplex mit 3,6  $\mu$ M eingesetzt. Je Messung wurden 3 Punkte mit jeweils 300 Laserpulsen beschossen und für die Analyse aufsummiert. Für die Messung wurde ein CovalX's HM2 High-Mass-Detektorsystem verwendet. Die Auswertung erfolgte durch CovalX mit der CovalX's Complex-Tracker-Analysis-Software, Version 2.0. Hierbei wurden die Massenspektren der nicht kreuzvernetzten Proben mit den stabilisierten Proben verglichen. Nach Subtraktion der Masse des Kreuzvernetzers konnte auf diese Weise die Masse des Gesamtkomplexes bestimmt werden.

Als Puffer für die Massenspektrometrie wurde der gleiche Puffer wie für die GraFix- Läufe (siehe 3.6.1) verwendet, um eine Puffersubstanz zu verwenden, die keine primären Amine enthält und somit nicht mit dem Kreuzvernetzer reagiert.

**MS-Puffer:** 20 mM HEPES pH=8.0, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP

#### 3.7.11 Isolation der zytoplasmatischen Fraktion von primären humanen T-Zellen durch hypotonische Lyse

Die pelletierten Zellen wurden in hypotonischen Lysepuffer aufgenommen, je 5\*10<sup>6</sup> Zellen in 50  $\mu$ l Puffer. Anschließend wurden die Zellen durch 15 bis 20-maliges Auf- und Abresuspendieren mit einer Kanüle (27G, 25x0,4 mM) aufgeschlossen. Dabei war darauf zu achten, dass sich kein Schaum bildet. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wurde die Probe für 10 Minuten bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert und die zytosolische Fraktion als Überstand abgenommen.

**Hypotonischer Lysepuffer:** 10 mM HEPES pH=7.4, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA sowie je 10 ml eine Proteaseinhibitor-Tablette (Roche).

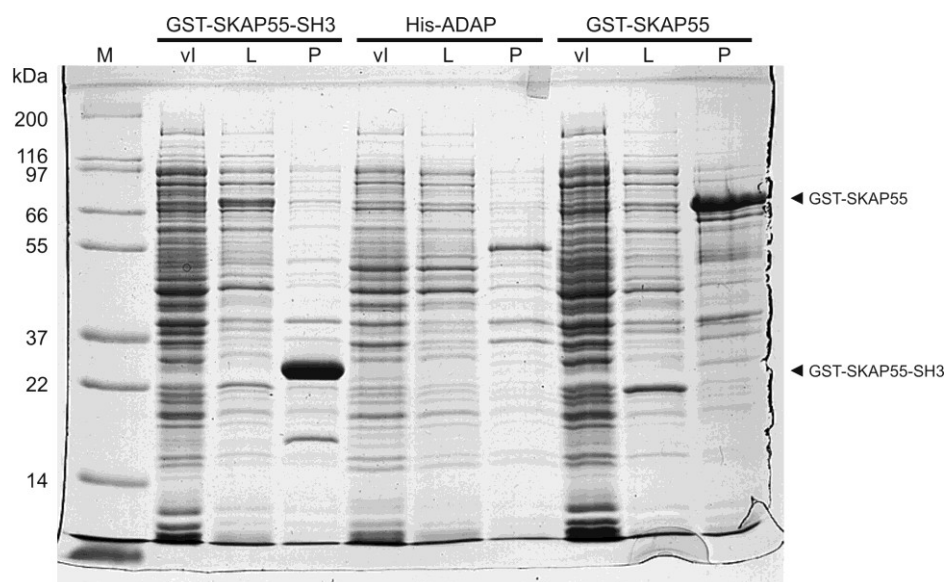


## 4. Ergebnisse

Die Adapterproteine ADAP und SKAP55 wirken in der Regulierung der Adhäsion von Immunzellen. Die Komplexbildung sowie die Funktionsweise des ADAP-SKAP55-Komplexes sind nicht bekannt. Daher wurde der Komplex rekombinant hergestellt und strukturell sowie biochemisch charakterisiert.

### 4.1.1 Expressionsversuche des Volle-Länge-Proteins in *E. coli*

Zur Rekonstitution des Komplexes *in vitro* wurde versucht, ADAP und SKAP55 als Volle-Länge-Konstrukte einzeln in *E. coli* zu exprimieren. Das ADAP His-Fusionskonstrukt zeigte nach Induktion im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel keine Überexpression, weder in der löslichen Fraktion des Überstandes noch in der unlöslichen Fraktion (siehe Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Expressionstest von GST-Fusionskonstrukten der SH3-Domäne sowie vom Volle-Länge-Protein von SKAP55 und His-ADAP in *E. coli* BL21 DE3. Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, vl bezeichnet das Gesamtlysate vor der Induktion, L den löslichen Überstand und P das Pellet der unlöslichen Fraktion nach der Induktion mit 1 mM IPTG bei 37°C für 3h.

Das GST-getagte SKAP55-Konstrukt der vollen Länge sowie der SH3-Domäne zeigte Expression des Fusionskonstruktes allein in der unlöslichen Fraktion (siehe Abbildung 17).

Variation der Expressionsbedingungen durch Senken der Temperatur, der Induktionsstärke, durch niedrigere IPTG-Konzentrationen sowie unterschiedliche Bakterienstämme führten zu keiner löslichen Expression und Aufreinigung der SKAP55-Konstrukte, welche die SH3-Domäne beinhalteten.

ADAP bzw. SKAP55 Volle-Länge-Konstrukte konnten in *E. coli* entweder nicht oder nur unlöslich exprimiert werden. Daher wurde für Arbeiten mit Volle-Länge-Konstrukten sowie Konstrukten mit der SKAP55-SH3-Domäne die Koexpression mittels Baculoviren in Insektenzellen etabliert.

### 4.1.2 Koexpression von ADAP und SKAP55

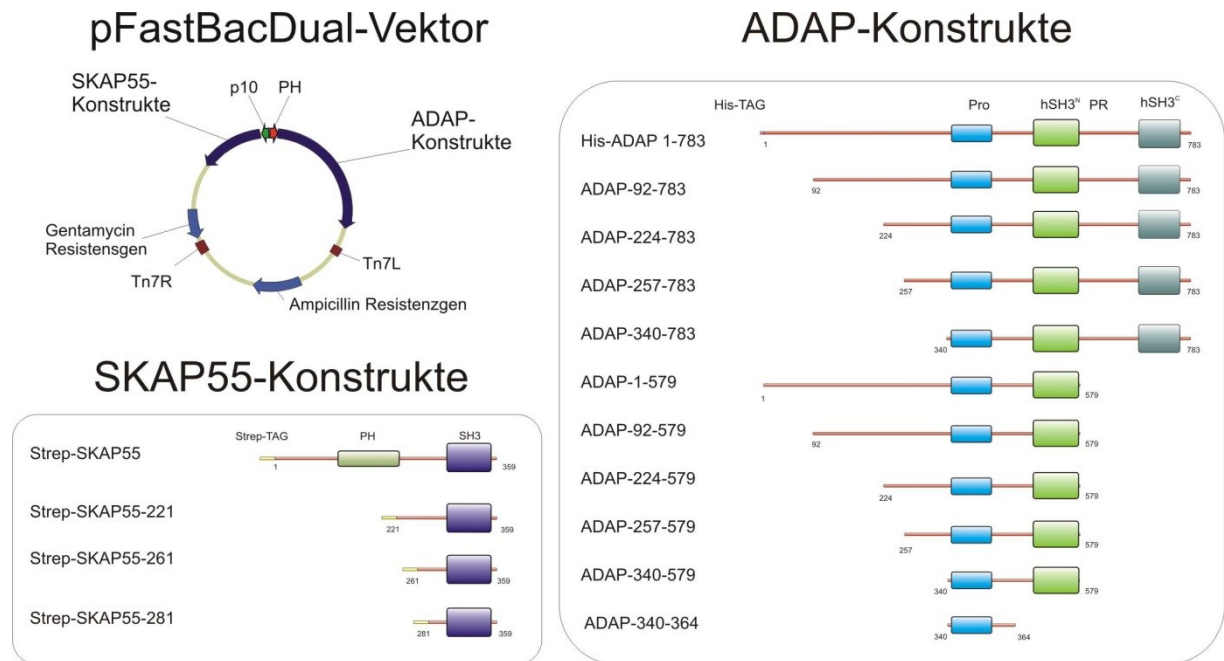
Insektenzellen als eukaryotische Zellen sind im Gegensatz zu den prokaryotischen *E. coli*-Zellen in der Lage, posttranslationale Modifikationen anzufügen, Disulfid-Brücken auszubilden, die Faltung des Proteins durch Chaperone zu unterstützen sowie verhältnismäßig große Proteine zu exprimieren. Die humanen Proteine ADAP und SKAP55 wurden mittels Baculoviren in Insektenzellen erfolgreich rekombinant exprimiert.

### 4.1.3 Klonierungsstrategie für die Koexpression von ADAP- und SKAP55-Konstrukten in Insektenzellen

Für die Herstellung von Baculoviren wurde der pFastBac Dual Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Dieser enthält zwei Promotoren, die es ermöglichen, zwei Proteine parallel in Insektenzellen mittels Baculoviren zu exprimieren. Hierfür wurden die Gensequenzen unter die Kontrolle dieser Promotoren kloniert (Tabelle 2). Der pFastBac Dual Vektor beinhaltet keine Affinitäts-tag-kodierenden Sequenzen, so dass diese bei der Klonierung mit integriert wurden. Zwei unterschiedliche Tags wurden ausgewählt, um durch eine konsekutive Affinitätsaufreinigung die Trennung von nicht komplex-assoziiertem ADAP oder SKAP55 zu ermöglichen.

Aufgrund der Inkompatibilität der ADAP-Sequenz mit den Restriktionsenzymen der MCS des p10-Promotors wurden zuerst Strep-SKAP55-Konstrukte unter p10-Promotorkontrolle in den Vektor integriert und anschließend His-ADAP- und ADAP-Konstrukte unter die Polyhedrin (PH)-Promotorkontrolle kloniert (siehe Abbildung 18 ).

Durch Klonierung der SKAP55-Konstrukte in den pASK-IBA7 (IBA)-Vektor wurden Strep-tag-Fusionskonstrukte erhalten, die anschließend als Strep-Fusionskonstrukt in den pFastBac Dual Vektor subkloniert wurden.



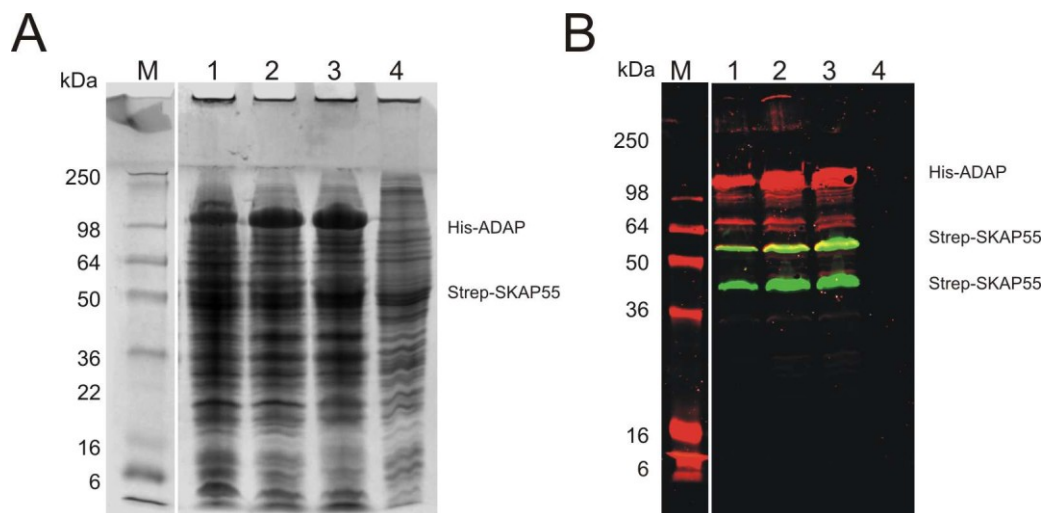
**Abbildung 18:** Schema des pFastBac Dual-Vektors zur Herstellung von Baculoviren für die Koexpression von ADAP- und SKAP55-Konstrukten in Insektenzellen. ADAP-Konstrukte wurden unter Kontrolle des Polyhedrin (PH)-Promotors und SKAP55-Konstrukte unter p10 Promotorkontrolle kloniert. Der Vektor trägt das Gentamycin-Resistenzgen zur Selektion der erfolgreichen Transposition der Expressionskassette durch die Transposons (Tn7R, Tn7L) in das Baculovirus Bacmid sowie das  $\beta$ -Lactamasegen zur Resistenz gegen Ampicillin. Schematische Darstellung der ADAP und SKAP55-Konstrukte, die für die Baculovirus-Expression in Insektenzellen kloniert wurden.

Zentraler Bestandteil für die unterschiedlichen ADAP-Konstrukte bildete die prolinreiche Bindungsstelle der Aminosäuren 340-364, um eine Bindung der SH3-Domäne des SKAP55 an ADAP zu ermöglichen [108, 109]. Der N-Terminus von ADAP ist bisher wenig charakterisiert worden und es ist nichts über Strukturelemente des N-Terminus bekannt. Um die Chancen einer Kristallisation zu erhöhen, wurden die koexprimierten und als Komplex aufgereinigten Volle-Länge-Proteine mit verschiedenen Proteasen verdaut. Aus den durch limitierte Proteolyse gewonnenen Fragmenten wurden die Domänengrenzen, beginnend mit Aminosäure 92 und 224, mit massenspektrometrischer Analyse bestimmt. Für die C-terminalen Domänengrenzen der ADAP-Konstrukte wurden die Enden der bekannten NMR-Struktur der hSH3<sup>N</sup>-Domäne an Position 579 [91] sowie der natürliche C-Terminus gewählt. Die Konstrukte der SKAP55 SH3-Domäne lagen im Labor als Strep-Fusions-Konstrukte vor und wurden subkloniert.

Die Baculoviren für die Insektenzell-Expression wurden nach dem Bac-to-Bac<sup>®</sup> Baculovirus-Expressionssystem (Invitrogen, Carlsbad, USA) erzeugt, amplifiziert und für die Expression eingesetzt (siehe Abschnitt 3.4.5)

#### 4.1.4 Koexpression von ADAP und SKAP55 in Insektenzellen

Die Volle-Länge-Konstrukte aus His-ADAP und Strep-SKAP55 konnten mittels Baculoviren in Insektenzellen exprimiert werden. Im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PA-Gel) konnte die ADAP-Überexpression gezeigt werden. Die Expression von SKAP55-Konstrukten konnte aufgrund der geringen Proteinmengen nur im Western-Blot eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 19, B) oder nach der Aufreinigung im Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gel (siehe Abbildung 20).

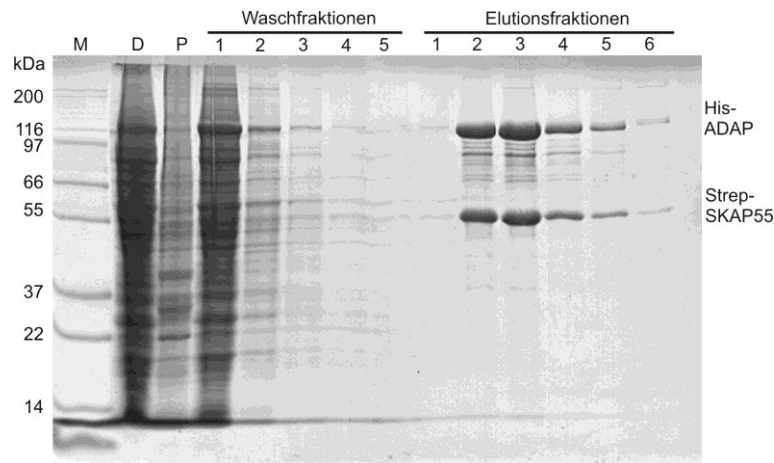


**Abbildung 19: Zeitabhängige ADAP- und SKAP55-Koexpression in mit Baculoviren transduzierten Insektenzellen.** SDS-PAGE A) und Western Blot B) zeigen Koexpression von ADAP und SKAP55 in Abhängigkeit von der Dauer der Infektion von 48 Stunden in Spur 1, 72 Stunden in Spur 2 und 84 Stunden in Spur 3 gegenüber den nicht infizierten Zellen in Spur 4. Im Western Blot sind die spezifischen Antikörper gegen SKAP55 in grün und ADAP in rot übereinander gelegt abgebildet.

#### 4.1.5 Aufreinigung des ADAP-SKAP55-Komplexes

SKAP55 exprimiert in Insektenzellen schwächer als ADAP. Die Stabilität von SKAP55 ist vermutlich limitierend für den Komplex aus ADAP und SKAP55. Daher wurde zuerst eine Affinitätsaufreinigung mit dem hochaffinen Strep-Tag des SKAP55 durchgeführt. Anschließend wurde der Komplex durch Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. Bei der Durchführung der Gelfiltration stellte sich heraus, dass gemeinsam aufgereinigte ADAP- und SKAP55-Konstrukte ein anderes Laufverhalten zeigen als für einen 1:1 Komplex erwartet wird, da sie bei kleineren Elutionsvolumina, d.h. bei höheren Molekulargewichten, von der Gelfiltrationssäule eluierten.

Die starke Bindung zwischen ADAP und SKAP55 ermöglichte eine Koaufrreinigung durch Bindung von Strep-SKAP55 an die Strep-Tactin-Säule (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Koaufrreinigung von koexprimiertem His-ADAP und Strep-SKAP55 aus SF21-Insektenzellen mittels Strep-Tactin-Affinitätssäule. Die gezeigten Elutionsfraktionen entsprechen einem halben Säulenvolumen. Nach einem Säulenvolumen eluiert His-ADAP sowie SKAP55 von der Strep-Tactin-Matrix. D bezeichnet den Durchfluss nach Säulenauftrag und P die unlösliche Fraktion der Insektenzellen nach dem Aufschluss der Zellen. Aufgereinigtes His-ADAP zeigt Abbaubanden im Coomassie-gefärbten 12 % SDS-PA-Gel.

#### 4.1.6 Kristallisationsansätze

Die Struktur eines Proteins ermöglicht diesem seine biologischen Funktionen auszuführen. Daher wurde versucht, die Struktur von ADAP und SKAP55 mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Diese Methode basiert auf der Analyse eines Diffraktionsmusters eines Kristalls, d.h. ein Proteinkristall ist für die Strukturbestimmung nötig. Die Bedingungen, unter denen ein Protein Kristalle bildet, können nicht vorhergesagt und nur experimentell bestimmt werden. Proteine bleiben bis zu einer bestimmten Konzentration in Lösung. Wird diese überschritten, geht Proteinlösung in eine andere Phase wie z.B. Aggregate, Gel oder einen Kristall über. Durch Variation der Kristallisationsbedingungen wie pH-Wert, Salzkonzentration, ausfällende Agentien wird versucht, das Protein zur Bildung eines Kristalls zu zwingen. Bei erfolgreicher anfänglicher Kristallbildung werden die Bedingungen verfeinert, um das Kristallwachstum zu optimieren.

Konstrukte		Kristallisationsplatte (mit jeweils 96 Kristallisationsbedingungen)												
ADAP	SKAP55	Temperatur	JBS-Classic	pH Clear Suite	JCSG Suite	Classic II	pH Clear II Suite	Pro Complex Suite	Classic Lite Suite	CompAS	Classic Suite	AmSO4 Suite	MPD Suite	
340-579	221-359	4°C, 20°C	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	
340-579	-	4°C, 20°C	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	
467-503	-	4°C, 20°C	-	X	X	X	X	-	-	-	X	-	-	
460-503	-	4°C, 20°C	-	X	X	X	X	-	-	-	X	-	-	
340-579	261-359	4°C, 20°C	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-	
340-579	1-359	4°C, 20°C	-	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	
340-783	1-359	4°C, 20°C	-	X	X	X	X	-	X	X	-	-	-	
1-783	1-359	4°C, 20°C	-		X	X	-	X	-	-	X	X	X	
1-783	1-359	4°C, 20°C	-	X	X	X	X	X	X	-	X	-	-	
1-783	1-359	4°C, 20°C	-	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	
0	7-2222	4°C, 20°C	-	X	-	X	X	-	-	X	X	-	-	

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der Konstrukte und der verwendeten Kristallisationskits. Ein Kreuz steht für eine verwendete Platte mit 96 unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen.

Für ADAP- und SKAP55-Konstrukte wurden Kristallisationsbedingungen sowohl für den Komplex als auch für Konstrukte allein angesetzt. Kristallisationsansätze des Komplexes aus ADAP und SKAP55 hatten zur Grundlage, dass die Proteine durch gegenseitige Interaktionen flexible Bereiche im Komplex einbinden und stabilisiert werden. Damit sollte die Wahrscheinlichkeit des Kristallwachstums erhöht werden.

Die rekombinant exprimierten ADAP-SKAP55-Konstrukte wurden aufgereinigt und ankonzentriert. Um sicherzustellen, dass die Proteinkonzentrationen ausreichend hoch sind, wurden initiale Präzipitationstests mit PEG 4000 und Ammoniumsulfat durchgeführt (siehe 3.7.8). Falls die Proteinlösung kein Präzipitat aufwies, wurde die Proteinlösung höher konzentriert und bei erfolgreichem Präzipitationstest für die Kristallisation verwendet. Für die Kristallisationsansätze wurden systematisch die Kristallisationsbedingungen wie pH-Wert und Salzkonzentration (Kits: pH Clear Suite, pH Clear Suite II), unterschiedliche Präzipitationsagentien wie Polymere, Salze und Alkohole (Kits: ComPAS Suite, AmSO<sub>4</sub> Suite, MPD Suite) variiert. Zudem wurden für die Proteinkristallisation erfolgreiche Kristallisationsbedingungen (JBS-Classic, JCSG Suite, Classic, Classic II, Classic Lite Suite) sowie erfolgreiche Bedingungen für Proteinkomplexe (Pro Complex Suite) getestet.

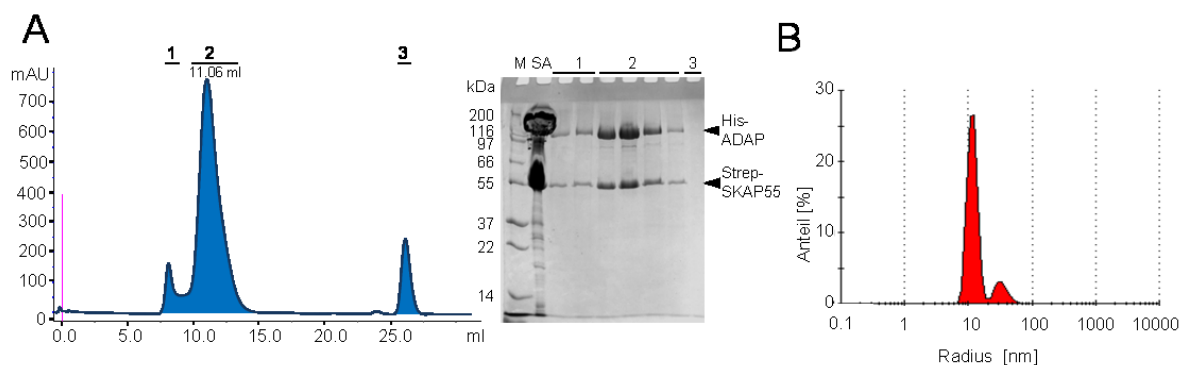
ADAP und SKAP55 Volle-Länge-Konstrukte zeigten bei pH-Werten von 5 bis 8 und bei bis zu 3M NaCl meistens ein lösliches Verhalten. Bei niedrigeren pH-Werten und höheren Salzkonzentrationen wurde nach einer Woche Präzipitation beobachtet. Bei PEG-haltigen Puffern trat häufig eine Phasentrennung ein.

Bei Kristallwachstum wurde der Kristall durch Dr. Yvette Roeske (Max Delbrück Centrum, Berlin-Buch) am Synchrotron der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) vermessen. Für alle getesteten Kristalle konnte aufgrund der Diffraktionsmuster ausgeschlossen werden, dass es sich um Proteinkristalle handelt. Zu einem großen Anteil handelte es sich um Salzkristalle sowie um Kristalle von niedermolekularen Substanzen, die nicht weiter charakterisiert wurden. Es konnten weder der Komplex aus Volle-Länge-Protein ADAP mit SKAP55 noch gekürzte Konstrukte erfolgreich kristallisiert werden. Für die Kristallisationsansätze und die verwendeten Konstrukte siehe Tabelle 8.

## 4.2 Biochemische Charakterisierung des ADAP-SKAP55-Komplexes

### 4.2.1 Analytische Gelfiltration und dynamische Lichtstreuung

Der rekombinante, in Insektenzellen exprimierte Komplex aus ADAP und SKAP55 wurde mittels analytischer Gelfiltration und dynamischer Lichtstreuung untersucht. Beide Methoden bestimmen den hydrodynamischen Radius eines Partikels. Der auch als Stokes' Radius bezeichnete Radius lässt Rückschlüsse auf das Molekulargewicht zu. Bei der Berechnung des Molekulargewichts wird dabei von einem sphärischen Objekt bzw. globulären Protein ausgegangen. Für die analytische Gelfiltration wurde eine Superose 6 Matrix (GE Healthcare, München) verwendet, deren Trennungsbereich zwischen 5 kDa und maximal 5 MDa liegt. Das stärkste Absorptionssignal wurde bei einem Retentionsvolumen von 11,06 ml gemessen. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 1,4 MDa (siehe Abbildung 21, A, Signal 2). Zusätzlich wurde ein schwächeres Signal im Ausschlussvolumen von 8 ml detektiert. Hierbei handelt es sich um Komplexe oder Aggregate von His-ADAP und Strep-SKAP55, die größer als 5 MDa sind. Das SDS-PAGE zeigt, dass beide Proteine in den Fraktionen der Absorptionsmaxima vorliegen (siehe Abbildung 21, A, SDS-PAGE-Gel). Das Signal 3 eluiert nach dem Säulenvolumen von 24 ml. Hierbei handelt es sich um Desthiobiothin, das ebenfalls bei 280 nm absorbiert und aus dem Elutionspuffer der Strep-Tactin-Säule stammt (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Größenbestimmung des His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplexes durch analytische Gelfiltration und dynamische Lichtstreuung. A) Chromatogramm der Superose 6 Säule bei 280nm zeigt, dass der Strep-Tactin koaufgereinigte Komplex bei einem Ausschlussvolumen von 8 ml (Signal 1) läuft. Das stärkste Absorptionssignal bei einem Elutionsvolumen von 11,06 ml entspricht einem Molekulargewicht von 1,4 MDa. Für die Signale 1 und 2 wurden ADAP und SKAP55 im Coomassie-gefärbten 12 % SDS-PAGE nachgewiesen. SA bezeichnet den Säulenauftrag. Die Elutionsmaxima des Chromatogramms sowie die entsprechenden Fraktionen im denaturierenden Gel sind mit 1, 2, 3 gekennzeichnet. B) Dynamische Lichtstreuung: Histogramm der hydrodynamischen Radii zeigt für den rekombinanten ADAP- und SKAP55-Komplex die größte Population (86 %) bei 11,7 nm, dies entspricht einem MW von 1,1 MDa. Die zweite Population (14 %) entspricht einem Molekulargewicht von 11,9 MDa.**



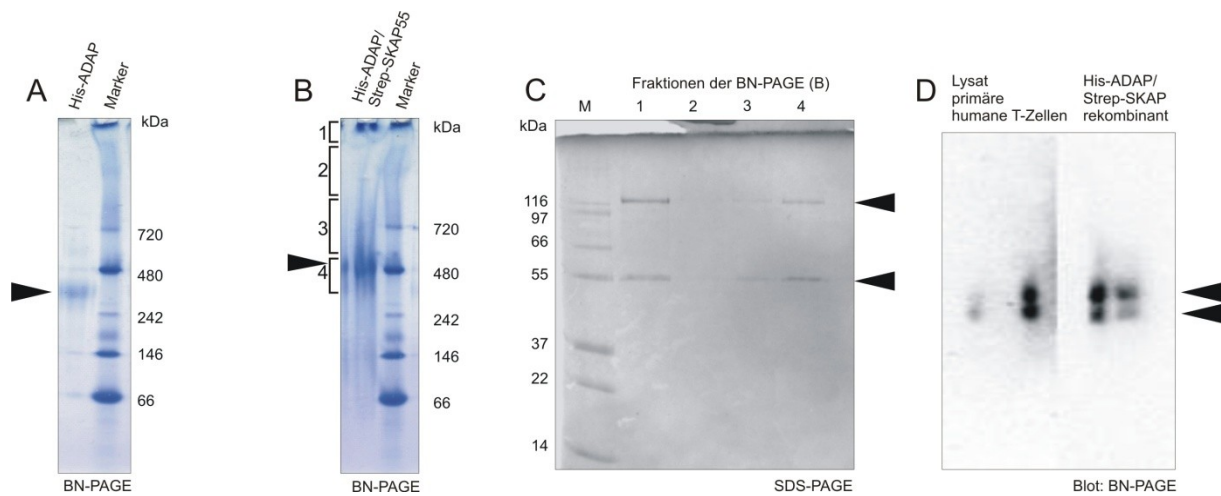
Die dynamische Lichtstreuung zeigt für den rekombinant exprimierten und Strep-Tactin gereinigten Komplex aus His-ADAP und Strep-SKAP55 zwei Maxima von 11,4 nm und 32,8 nm. Dies entspricht Molekulargewichten von 1,1 und 11,9 MDa. Der Vergleich der beiden Methoden zeigt, dass für die größte Population ein Molekulargewicht von über einem MDa bestimmt wurde. Die Größe der großen Aggregate oder Komplexe konnte nicht über Gelfiltration bestimmt werden, da das Signal im Ausschlussvolumen der Säule läuft und somit größer als 5 MDa ist. Für den ca. 1 MDa großen Komplex wurde in der dynamischen Lichtstreuung ein Anteil von 86 % und in der Gelfiltration von 84 % bestimmt. Für Komplexe größer als 5 MDa wurden Anteile von 14 % und 16 % bestimmt. Beide Methoden zeigen das gleiche Verhältnis zwischen den zwei Populationen sowie ein deutlich größeres Molekulargewicht, als für einen ADAP-SKAP55-Komplex mit einer 1:1 Stöchiometrie zu erwarten wäre.

Um die Frage zu beantworten, ob dieser Komplex auch *in vivo* gebildet wird, wurde der rekombinante Komplex mit Lysat von primären humanen T-Zellen mittels BN-PAGE analysiert und verglichen.

#### 4.2.2 Blue Native PAGE (BN-PAGE)

In der Blue Native PAGE bindet der negativ geladene Coomassie brilliant blue-Farbstoff an der Proteinoberfläche. Die Proteine werden nicht wie in der SDS-PAGE denaturiert. Dies ermöglicht eine Auftrennung im nativen Zustand, d.h. miteinander interagierende Proteine können als Komplex aufgetrennt werden (siehe 3.4.12).

Rekombinantes His-ADAP lief unter nativen Bedingungen bei einer Größe von ca. 340 kDa, der Komplex aus ADAP und SKAP55 bei einem Molekulargewicht von ca. 480 kDa (siehe Abbildung 22 A, B, Pfeile). Im denaturierenden SDS Polyacrylamidgel wandern ADAP und SKAP55 bei größeren Molekulargewichten, wie dies bereits in die Namensgebung mit eingeflossen ist. So läuft ADAP, auch SLAP-130 genannt, bei 120 kDa und das 41,4 kDa große SKAP55 bei einem Molekulargewicht von 55 kDa (siehe Abbildung 20). Dieses Laufverhalten kann auch für die BN-PAGE nicht ausgeschlossen werden, so dass eine Größenabschätzung nur ungefähr möglich ist.



**Abbildung 22:** BN-PAGE des rekombinanten ADAP-SKAP55-Komplexes sowie Lysat von primären humanen T-Zellen. A), B) ADAP sowie der Komplex aus ADAP und SKAP55 bilden einen oligomeren Komplex wie das Native Gel des rekombinant exprimierten Proteins zeigt. C) Die Anwesenheit der Proteine ADAP und SKAP55 in den Banden 1-4 wurde durch eine anschließende denaturierende SDS-PAGE nachgewiesen. D) Der rekombinante und koaufgereinigte His-ADAP Strep/SKAP55-Komplex zeigt das gleiche Laufverhalten wie das Lysat primärer humaner T-Zellen, wie der Blot des nativen Gels mit gegen ADAP gerichteten Antikörpern zeigt.

Der Größenunterschied in der BN-PAGE zwischen dem rekombinanten ADAP bzw. dem rekombinanten ADAP-SKAP55-Komplex sind ca. 100 kDa. Dies ist auf die zusätzliche Masse von SKAP55 zurückzuführen und kann mit einem SKAP55-Dimer erklärt werden (siehe Abbildung 22, A, B). SKAP55 konnte nicht alleine exprimiert und aufgereinigt werden und daher nicht mittels BN-PAGE analysiert werden. Um sicher zu stellen, dass es sich um ADAP und SKAP55 im Komplex und nicht um ein Multimer eines der Proteine handelt, wurde die Bande ausgeschnitten und anschließend im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt (siehe Abbildung 22, C). Das denaturierende SDS-Gel der Banden zeigt sowohl His-ADAP als auch Strep-SKAP55 in der Bande 4 des nativen Gels. Zudem wandert ein Teil des Komplexes nicht in das Gelbett der Blue Native PAGE ein, Spur 1.

Um der Frage nachzugehen, ob ein Komplex gleicher Größe *in vivo* gebildet wird, wurden primäre humane T-Zellen (bezogen von Dr. Stefanie Kliche, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) lysiert und die zytosolische Fraktion wurde in der Blue Native PAGE aufgetrennt (siehe 3.7.11). Die Detektion des Komplexes erfolgte im Western-Blot und zeigte für das Lysat sowie den rekombinanten Komplex aus ADAP und SKAP55 das gleiche Bandenmuster bei einer Detektion von ADAP (siehe Abbildung 22, D). Die niedermolekulare Bande lässt sich als ADAP und die höhere Bande als ADAP im Komplex mit SKAP55 erklären, wie auch

schon in der Coomassie-gefärbten BN-PAGE gezeigt wurde (siehe Abbildung 22, vergleiche A und B). SKAP55 konnte im Blot der BN-PAGE nicht nachgewiesen werden. Die SDS-PAGE (C) zeigte, dass sich SKAP55 im Komplex mit ADAP befindet. Dies weist darauf hin, dass der *in vitro* aufgereinigte Komplex in dieser Form auch im Zytosol von T-Zellen vorliegt.

Die Ergebnisse der BN-PAGE, der analytischen Gelfiltration sowie der dynamischen Lichtstreuung entsprechen nicht dem Molekulargewicht eines einfachen ADAP-SKAP55-Hetero-Dimers. Um die Stöchiometrie dieses Komplexes näher zu untersuchen, wurde der Komplex mittels Hochmassen-MALDI-ToF-Massenspektrometrie weiter charakterisiert.

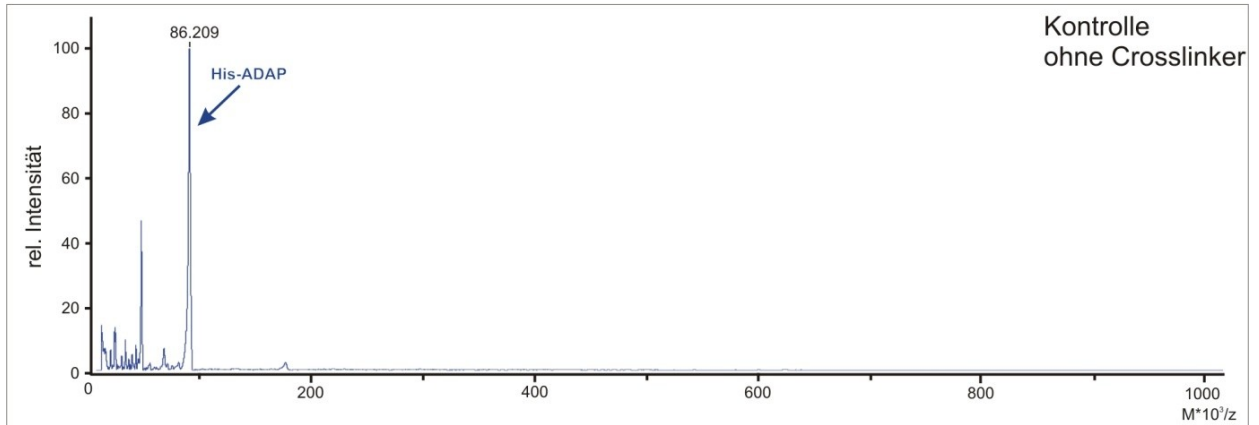
#### **4.2.3 Hochmassen-massenspektrometrische Analyse des ADAP-SKAP55-Komplexes**

Zur Bestimmung der Stöchiometrie des rekombinanten ADAP-SKAP55-Komplexes sowie ADAP alleine wurden massenspektroskopische Untersuchungen durch die CovalX AG (Schlieren, Schweiz) durchgeführt. Es wurde das für große Molekularmassen entwickelte System CovalX's HM2 der Firma genutzt (siehe 3.7.10).

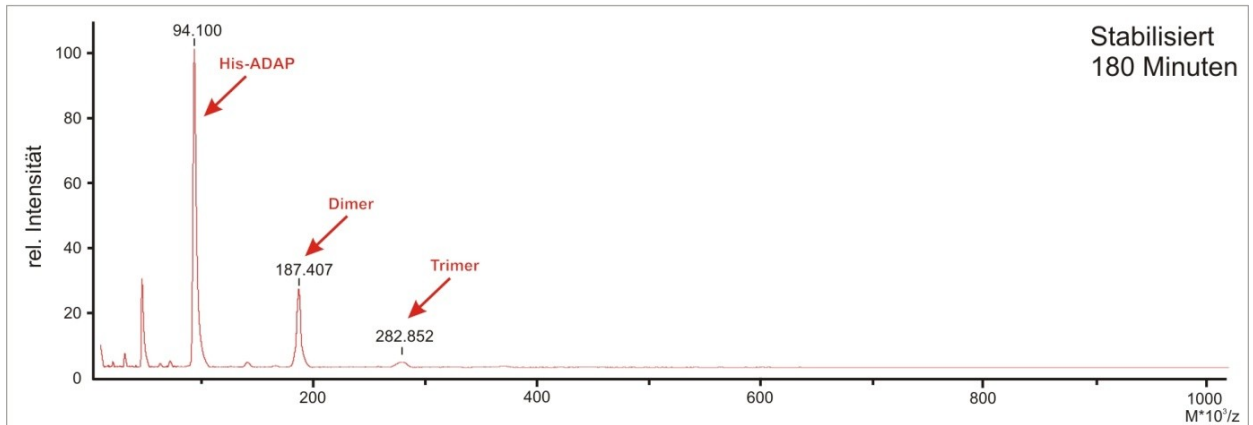
Zur Charakterisierung der Probe wurden jeweils zwei Messungen durchgeführt. Für die Bestimmung der Masse des Komplexes wurde dieser durch eine kreuzvernetzende Substanz (Crosslinker) stabilisiert und die Gesamtmasse bestimmt. Durch Zerfall des Komplexes im Vakuum während der Messung werden die Massen der einzelnen Bestandteile bestimmt, wenn kein Crosslinker eingesetzt wird. Für rekombinant exprimiertes und aufgereinigtes His-ADAP aus Insektenzellen wurde ohne Crosslinker eine Masse für das Monomer von 86.209 Da bestimmt. Dies entspricht nahezu dem theoretischen Wert von 86.238 Da. Für die mit Kreuzvernetzer behandelte Probe wurden Signale von 94.100 Da, 187.407 Da und 282.852 Da detektiert. Nach Überlagerung der Kontrolle sowie der stabilisierten Probe wurde die durch den Kreuzvernetzer eingeführte zusätzliche Masse herausgerechnet. Dadurch ergeben sich Molekulargewichte von 86.203 Da, 172.697 Da und 258.809 Da. Diese Werte entsprechen einem Mono-, Di- sowie Trimer von ADAP. Schließt man von den Intensitäten auf die Verteilung der Multimere zurück, liegt ADAP im Komplex überwiegend als Dimer und ein geringer Anteil als Trimer vor. Den größten Anteil macht das ADAP-Monomer aus.

## 4. Ergebnisse

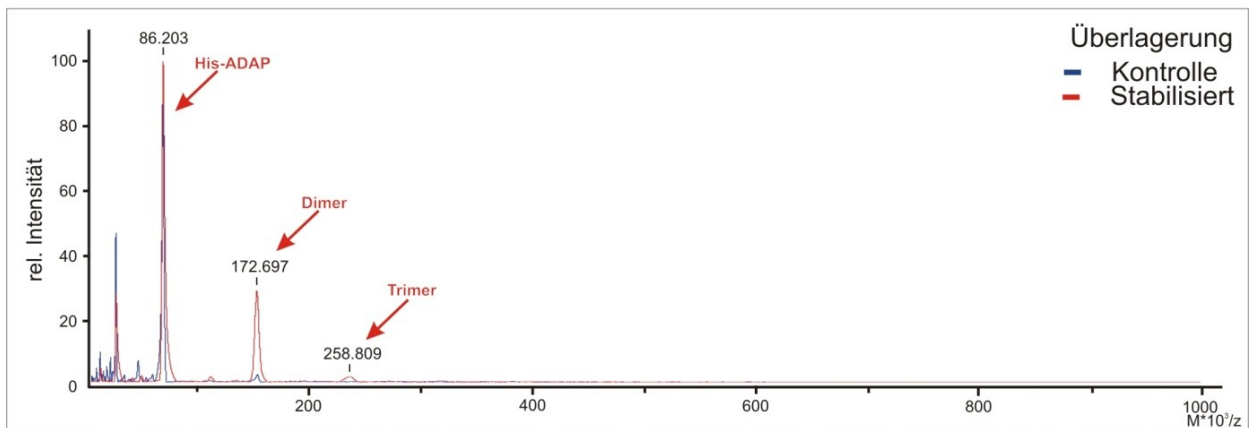
A



B



C

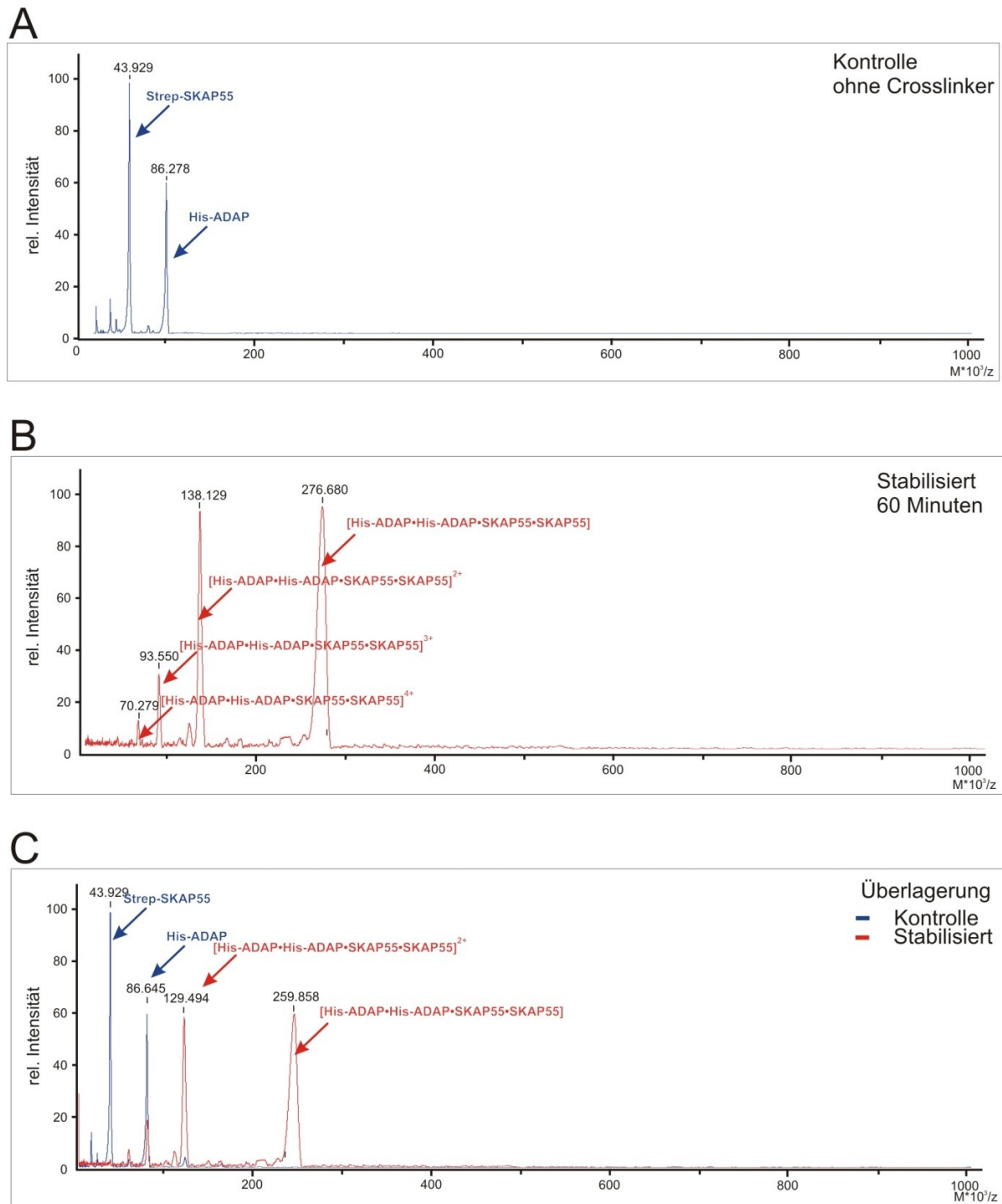


**Abbildung 23: Hochmassen-MALDI-ToF-Analyse von His-ADAP zeigt für die nicht stabilisierte Probe die Masse eines Monomers von 86.209 Da (A). Mit Kreuzvernetzer wurden Massen von 94.100, 187.407 und 282.852 Da gemessen. Nach Korrektur durch Subtraktion der Masse des Kreuzvernetzers wurden diese Molekulargewichte einem ADAP-Monomer, -Dimer bzw. -Trimer zugeordnet (B, C). ADAP liegt überwiegend als Monomer in Lösung vor, zu weiteren Teilen als Dimer und zu einem geringen Anteil als Trimer.**

Für den nicht kreuzvernetzten Strep-SKAP55-His-ADAP-Komplex wurde für Strep-SKAP55 eine Masse von 43.929 Da und für His-ADAP eine Masse von 86.278 Da detektiert. Dies entspricht in etwa den theoretischen Werten von 43.970 Da und 86.238 Da. Der Vergleich der Experimente des nicht stabilisierten Komplexes sowie des nicht stabilisierten ADAP zeigt ein zusätzliches Signal für SKAP55 von 43.929 Da (siehe Abbildung 23, A). Die höhere Intensität des SKAP55-Signals ist vermutlich auf die bessere Ionisierbarkeit des kleineren SKAP55 sowie auf die Überlagerung mit dem zweifach geladenen His-ADAP-Signal zurückzuführen. SKAP55 konnte nicht als Referenz vermessen werden, da es sich nicht allein exprimieren und aufreinigen ließ. Für den vernetzten und dadurch stabilisierten Komplex wurde für den einfach geladenen Komplex eine Masse von 276.680 Da gemessen. Zusätzlich wurden die entsprechenden Massen des zweifach, dreifach sowie vierfach positiv geladenen Komplexes detektiert. Nach Korrektur der durch den Kreuzvernetzer addierten Masse ergibt sich eine Gesamtmasse für den Komplex von 259.858 Da. Dies könnte einer Zusammensetzung von zwei ADAP zu zwei SKAP55 mit theoretisch 260.416 Da oder einem aus drei ADAP-Molekülen bestehenden Komplex von 258.714 Da entsprechen. Der errechnete theoretische Wert für einen 2:2-Komplex liegt mit einer Differenz von 0,556 Da näher an dem bestimmten Wert als der theoretische Wert des nur aus ADAP bestehenden Komplexes mit einem Unterschied von 1.144 Da.

Die Hochmassen-MALDI-ToF-Analyse detektiert für ADAP allein zum größten Teil ein Monomer sowie ein Dimer und zu geringen Anteilen ein Trimer. Für den rekombinanten und koaufgereinigten ADAP-SKAP55-Komplex wurde eine Stöchiometrie von 2:2 bestimmt. Der Komplex wurde weiter charakterisiert und die multimerbildenden Einheiten untersucht.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 24:** Die Hochmassen-MALDI-ToF-Analyse von koaufgereinigten ADAP und SKAP55 zeigt für die nicht kreuzvernetzte Probe Einzelmassen von 43.929 Da für SKAP55 sowie 86.278 Da für ADAP. (A). Mit Kreuzvernetzer wurde für den einfach geladenen Komplex eine Masse von 276.680 Da gemessen. Weitere Peaks von 138.129, 93.550 und 70.279 Da entsprechen dem 2+, 3+ und 4+ geladenen Komplex (B). (C) Die Überlagerung der Spektren zeigt -nach Korrektur der durch den Crosslinker eingeführten Masse- für den Komplex aus ADAP und SKAP eine Masse von 259.858 Da.

### 4.3 Bestimmung der multimerbildenden Einheiten

Um mögliche für die Multimerisierung verantwortliche Domänen zu untersuchen, wurden unterschiedliche Konstrukte von ADAP und SKAP55 in *E. coli* und Insektenzellen exprimiert und weiter untersucht.

#### 4.3.1 Dimerbildung von SKAP55

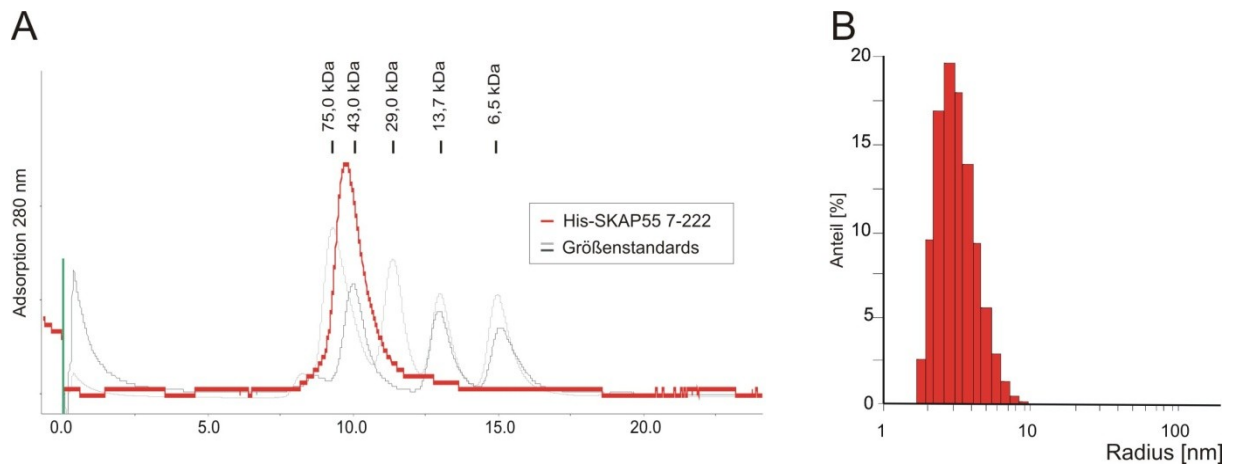
Für das homologe Protein SKAP-HOM wurde während der Anfertigung dieser Arbeit von Swanson et al. eine Dimerisierung des Proteins durch den N-Terminus beschrieben. Die publizierte Kristallstruktur des SKAP-HOM (PDB: 2OTX) - N-Terminus zeigt zwei aufeinander zurückgefaltete  $\alpha$ -Helices, die ein Homodimer ausbilden (siehe Abbildung 8).

Das Struktur-Vorhersageprogramm COILS sagt für SKAP-HOM eine N-terminale Coiled-Coil-Domäne vorher. Für SKAP55 wird für diese Region keine Coiled-Coil-Domäne vorhergesagt (siehe Abbildung 64). Das Alignment der SKAP-HOM-Dimerisierungsdomäne mit dem N-terminalen SKAP55 ergibt einen Konsensus von 66,7 % mit 43,1 % identischen Aminosäuren (siehe Abbildung 25).

Protein:	Amino- säure:	
SKAP-HOM	14-64	PEEIRNLLADVETFFVADILKGENLSKKAKEKRESLIKKIKDVKSIYLQEFQ
SKAP55	7-57	PEEIRWLLLEDAEEFLAEGLRNENLSAVARDHRDHILRGFQQIKARYYWDFQ

**Abbildung 25: Alignment der Proteinsequenz der SKAP-HOM-Dimerisierungsdomäne mit SKAP55. Rot: identische Aminosäuren, grün: biochemisch ähnliche Aminosäuren, schwarz: unterschiedliche Aminosäuren.**

Die analytische Gelfiltration zeigt, dass das SKAP55-Konstrukt der Aminosäuren 7-222 bei einem Retentionsvolumen von 9,74 ml von der Säule eluiert (siehe Abbildung 26). Das Retentionsvolumen des SKAP55-Konstruktes liegt zwischen den Retentionsvolumina des 75 kDa schweren Conalbumins und des 43 kDa schweren Ovalbumins, die als Molekulargewichtstandards eingesetzt wurden. Anhand der Kalibrationsgeraden wurde für das SKAP55 DM-PH (Aminosäuren: 7-222)-Konstrukt ein Molekulargewicht von 55,3 kDa berechnet. Dies entspricht dem Zweifachen des theoretisch 26,43 kDa schweren Monomers. Mit dynamischer Lichtstreuung wurde ein hydrodynamischer Radius von 2,8 nm bestimmt. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 55 kDa und bestätigt die Bildung eines Dimers für SKAP55 (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: Analytische Gelfiltration und dynamische Lichtstreuung des SKAP55 (7-222)-Konstruktes.** A) Chromatogramm der analytischen Gelfiltration des SKAP55-Konstruktes. Das Retentionsvolumen des SKAP55 von 9,74 ml entspricht einem Molekulargewicht von 55,3 kDa. Dies entspricht dem zweifachen Molekulargewicht des Monomers  $2 \times 26,53$  kDa. B) Histogramm der dynamischen Lichtstreuung. Es wird ein hydrodynamischer Radius von 2,8 nm bestimmt, dies entspricht einem Molekulargewicht von 55 kDa.

Eine Aggregation durch Fehlfaltung kann aufgrund der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 47). Zudem zeigt die analytische Gelfiltration sowie die dynamische Lichtstreuung keine Signale für höhere Molekulargewichte, die Hinweise auf Aggregation geben. Somit konnte eine Dimerbildung für den N-Terminus von SKAP55 gezeigt werden.

Dieser Befund ist insbesondere im Zusammenhang mit SKAP-HOM wichtig, da in diesem homologen Protein der N-Terminus mit der PH-Domäne interagiert und diese Interaktion die Bindung an Phospholipide reguliert. Ob SKAP55 an Phospholipide bindet, wurde mit NMR-spektroskopischen Untersuchungen weiter untersucht (siehe 4.5.2 und 4.5.3).

### 4.3.2 Multimerbildung von ADAP

Rekombinant exprimiertes His-ADAP zeigt in der BN-PAGE ein Laufverhalten, das höheren Molekulargewichten entspricht (siehe 4.2.2). Ebenso zeigt die Analyse von His-ADAP mittels Hochmassen-MALDI-ToF-Massenspektrometrie Monomere, Dimere sowie Trimere für ADAP (siehe 4.3.2). Bioinformatische Analysen zeigen für ADAP vor der N-terminalen hSH3-Domäne von Aminosäure 465-503 eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Bildung einer Coiled-Coil-Struktur an. Um die multimerisierenden Eigenschaften von ADAP zu charakterisieren, wurden Konstrukte mit dieser Sequenz mittels analytischer Gelfiltration sowie dynamischer Lichtstreuung analysiert (siehe Tabelle 9).



Konstrukt	Theoretisches Molekulargewicht eines Monomers [kDa]	analytische Gelfiltration Superdex 200/ Superdex 75 [kDa]	dynamische Lichtstreuung [kDa]	Verhältnis: gemessen/ theoretisches Molekulargewicht (GF/DLS)
GST-ADAP 460-503	31,9	92	74	2,9/2,3
GST-ADAP 467-503	31,2	92	80	2,9/2,6
ADAP 460-503	5,7	9,0	9,7	1,6/1,7
ADAP 467-503	4,9	x	8,8	x/1,8
ADAP 340-579	26,8	84,0	83,0	3,1/3,1

**Tabelle 9: Größenanalyse von rekombinant exprimierten ADAP-Konstrukten zur Bestimmung der Multimerisierungsdomäne mit analytischer Gelfiltration (GF) und dynamischer Lichtstreuung (DLS), x: Werte wurden nicht bestimmt.**

Für Konstrukte der vorhergesagten Multimerisierungsdomäne in ADAP mit den Sequenzabschnitten von Aminosäure 460 bis 503 bzw. 467 bis 503 wurden für GST-Fusionskonstrukte das 2,3- bis 2,9-fache des hydrodynamischen Radius bestimmt, als für ein Monomer zu erwarten gewesen wäre. Für GST ist die Bildung von Dimeren bekannt. Um dies als Ursache für größere Massen auszuschließen, wurden die gleichen Konstrukte ohne GST nach Thrombinschnitt analysiert. Hierbei ergaben sich das 1,6- bzw. das 1,8-fache des theoretischen Molekulargewichts. Alle Messungen zeigten ein höheres Molekulargewicht als für ein Monomer zu erwarten wäre. Sie schwankten zwischen dem 1,6-fachen bis zum 3,1-fachen des theoretischen Molekulargewichts. Die Größenbestimmung mit DLS bzw. Gelfiltration ist maßgeblich durch die Form der Partikel bestimmt. Die Berechnungen basieren auf der Annahme, dass es sich um globuläre Partikel handelt. Ist dies nicht der Fall, sind die Größenbestimmungen fehlerbehaftet. Um die Form der ADAP bzw. ADAP-SKAP55-Komplexe zu untersuchen, wurden diese mittels der GraFix-Methode fixiert und durch die Methode des negativen Kontrasts mittels Elektronenmikroskopie charakterisiert (siehe 4.4.3 und 4.4.4).

## **4.4 GraFix-Methodenetablierung und Stabilisierung des ADAP-SKAP55-Komplexes für die Elektronenmikroskopie**

### **4.4.1 Etablierung eines Gradientenmischers für lineare Sucrosegradienten**

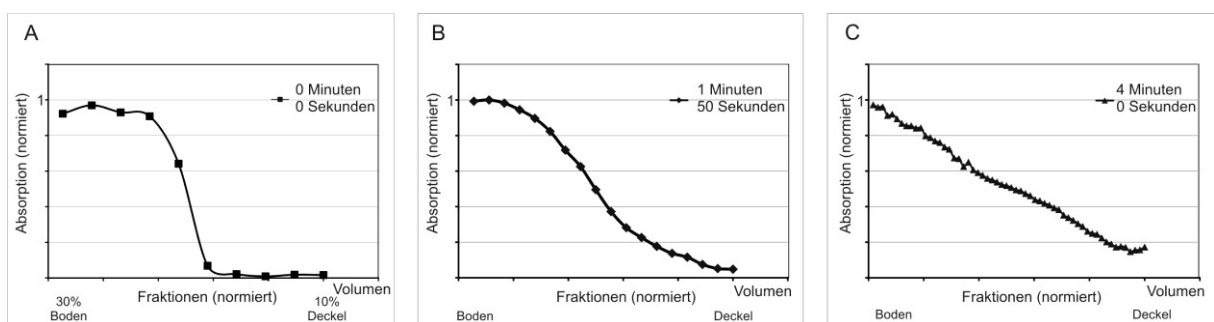
Die von Kastner et al. für die Elektronenmikroskopie entwickelte GraFix -Methode basiert auf der Zentrifugation der Makromoleküle in einem linear ansteigenden Dichtegradienten, der zusätzlich eine ansteigende Konzentration Kreuzvernetzer enthält. Bei dieser Methode wird die Aggregation von Komplexen durch Zentrifugation in den linearen Dichtegradienten verhindert. Durch die ebenfalls linear ansteigende Konzentration an Kreuzvernetzer werden individuelle Makromoleküle durch kovalente Bindungen stabilisiert.

Da die linearen Gradienten aus Kreuzvernetzer sowie der Dichtelösung zentraler Bestandteil dieser Methode sind, wurde eine Methode zur Erstellung linearer Gradienten etabliert. Als Grundlage für die Erstellung des linearen Sucrosegradienten diene die von Coombs und Watts 1985 beschriebene Methode. Im Zentrifugenröhrchen wird die Lösung mit der maximalen Sucrosekonzentration mit der geringsten Konzentration überschichtet und durch Rotation des gekippten Zentrifugenröhrchens gemischt.

Hierfür wurde eine Vorrichtung gebaut, die es ermöglicht, die Rotationsgeschwindigkeit sowie den Kippwinkel einzustellen (siehe 3.6.2). Bei definiertem Kippwinkel und fester Rotationsgeschwindigkeit ist die Dauer der Rotation über die Durchmischung der zwei Phasen und des dabei gebildeten Gradienten entscheidend. Zur Evaluierung des Gradienten wurde der dichteren Lösung Trypanblau zugesetzt, welches nach der Fraktionierung spektroskopisch detektiert wurde.

Der Kippwinkel des Zentrifugenröhrchens ist durch die Phasengrenze bestimmt. Für die Rotation wurde eine Geschwindigkeit von 10 Umdrehungen pro Minute gewählt. Der Grad der Durchmischung der zwei Phasen wird durch die Dauer der Rotation bestimmt, diese musste für die entsprechenden Sucrosegradienten ermittelt werden. Vor der Rotation liegen die 10 %ige und 30 %ige Sucrose-Lösung in getrennten Phasen vor (siehe Abbildung 27, A). Nach Beginn der Rotation findet eine Durchmischung der Phasen statt, die über einen sigmoidalen Konzentrationsverlauf zu einem linearen Konzentrationsverlauf führt (siehe Abbildung 27, B und C).

Durch eine Rotationszeit von 4 Minuten konnte ein nahezu linearer Gradient von 10 bis 30 % Sucrose erzeugt werden (Abbildung 27, C). Im oberen niedrigen Konzentrationsbereich weist der Gradient eine konstante Konzentration auf, die durch eine ungleichmäßige Durchmischung am Deckel des Zentrifugenröhrchens erzeugt wird. Anzeichen dafür können bereits bei kürzeren Rotationszeiten beobachtet werden (siehe Abbildung 27, B). Abbildung 27 C zeigt die Linearität des Gradienten sowie die feinste Auflösung, die durch eine manuelle Fraktionierung erzielt werden konnte. Der etablierte lineare Sucrosegradient wurde für die Fixierung von ADAP bzw. ADAP-SKAP55-Komplexen in der GraFix-Methode verwendet.



**Abbildung 27: Diagramme der Sucrosegradienten nach unterschiedlichen Rotationszeiten. Zur Detektion der Durchmischung wurde die 30 %ige Sucroselösung mit Trypanblau versetzt und anschließend die Absorption der Fraktionen bestimmt.**

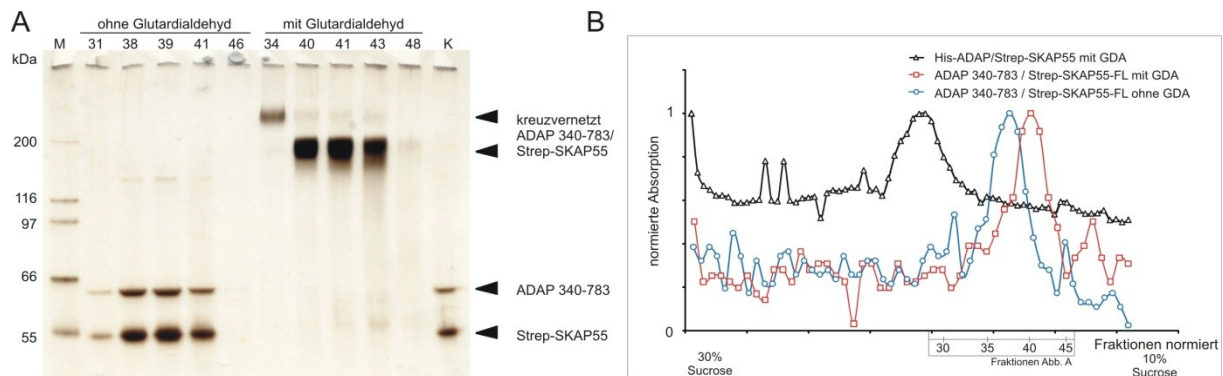
#### 4.4.2 Stabilisierung von Komplexen mit der GraFix-Methode

ADAP-SKAP55-Proben zeigten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen hauptsächlich Aggregate. (siehe Abbildung 29). Durch Etablierung des linearen Sucrosegradienten (siehe 4.4.1) wurden Proteinkomplexe mit der GraFix-Methode stabilisiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Stabilisierung und Fixierung der Proteinkomplexe wurden Fraktionen auf 7 % Acrylamid-Gelen mit einem Tris-Acetat-Puffersystem aufgetrennt. Dieses Gel ermöglicht die Auftrennung von großen Molekulargewichten. Aufgrund der geringen Proteinmengen der Fraktionen wurden die Proteine bzw. kreuzvernetzten Komplexe mittels Silberfärbung im Gel nachgewiesen. Durch die Ungenauigkeit der Gele kann nur eine Molekulargewichtsabschätzung erfolgen, hier für den Komplex aus Volle-Länge-Strep-SKAP55 und ADAP der Aminosäuren 340-783 gezeigt. Das verkürzte ADAP-Konstrukt erlaubt aufgrund des geringeren Molekulargewichts eine bessere Abschätzung des Molekulargewichts des kreuzvernetzten Komplexes im Gel (siehe Abbildung 28).

## 4. Ergebnisse

Das Chromatogramm der Fraktionen ohne bzw. mit Glutardialdehyd im linearen Sucrosegradienten zeigt für die jeweilige Probe das stärkste Signal in der 38. bzw. 41. Fraktion (siehe Abbildung 28). Die Verschiebung des maximalen Signals zwischen den beiden Proben ist auf die manuelle Fraktionierung und dadurch bedingte Schwankungen in der Fraktionsgröße zurückzuführen.



**Abbildung 28: GraFix-Fixierung von ADAP-SKAP55-Komplexen.** A) Fraktionen eines GraFix-Laufs von ADAP 340-783-Strep-SKAP55-Komplex, aufgetrennt in einem 10-30 % Sucrose-Gradienten mit und ohne Glutardialdehyd. Die fixierte Probe zeigt eigene Banden für den ADAP-SKAP55-Komplex aus der kruzvernetzten Probe im silbergefärbten 7 % Tris-Acetat-Gel. B) Gegenüberstellung von GraFix-Läufen im linearen Sucrosegradienten von His-ADAP-Volle-Länge bzw. ADAP340-783 im Komplex mit Strep-SKAP55. ADAP-Volle-Länge im Komplex mit SKAP55 wird in Fraktionen höherer Sucrosekonzentrationen nach Ultrazentrifugation fraktioniert. Aufgrund der verschiedenen Fraktionsgrößen wurden die Fraktionen für den Vergleich auf das Zentrifugenröhrchenvolumen normiert. Die Fraktionen der Abbildung A sind extra ausgezeichnet.

Der Nachweis, dass es sich um einen stabilisierten Komplex handelt, wurde im Vergleich der kruzvernetzten bzw. nicht kruzvernetzten Fraktionen im reduzierenden und silbergefärbten SDS-Gel gezeigt. Fraktionen der Proben ohne GDA zeigen im denaturierenden SDS-PA-Gel die Anwesenheit von ADAP (340-783) und Strep-SKAP55 in ähnlichen Verhältnissen (siehe Abbildung 28, Kontrolle). Zusätzlich ist eine schwache Bande für die Maxima (Fraktion 38, 39) bei ca. 130 kDa zu sehen, die nicht in der Kontrolle wiederzufinden ist und auch nicht in den stabilisierten Proben. Für die äquivalenten Fraktionen des GraFix-Ansatzes mit Zugabe des GDA sind im Gel bei entsprechenden Molekulargewichten nur sehr schwache Banden zu erkennen. Die dominierende Bande für diese Fraktionen läuft bei einem Molekulargewicht von 180-200 kDa. Hierbei handelt es sich um den kruzvernetzten Komplex. Die Anwesenheit von ADAP und SKAP55 in dieser Bande wurde im Western-Blot bestätigt. Bei höheren Sucrosekonzentrationen (Fraktion 34) ist eine weitere schwache Bande bei einem

Molekulargewicht größer als 200 kDa zu sehen. Hierbei könnte es sich um höhere Oligomere handeln, die in geringen Mengen in den anderen Fraktionen vorliegen, wie die schwachen Banden in den übrigen Fraktionen zeigen. Der fixierte Komplex zeigt das gleiche Laufverhalten wie der nicht fixierte Komplex im Sucrosegradienten. Der abgebildete GraFix-Lauf zeigt in der Kontrolle sowie in dem Lauf ohne Glutaraldehyd für das Konstrukt ADAP 340-783 - mit dem theoretischen Molekulargewicht von 49,6 kDa - ein höheres Laufverhalten von ca. 60 kDa. Für das Strep-SKAP55-Volle-Länge-Konstrukt mit dem theoretischen Molekulargewicht von 43,9 kDa wird ebenfalls ein höheres Molekulargewicht im Gel von ca. 55 kDa beobachtet. Der mit GraFix stabilisierte Komplex läuft im Gel bei einem Molekulargewicht von ca. 180-200 kDa, wobei der Einfluss auf das Laufverhalten durch das Glutaraldehyd nicht bekannt ist. Bezogen auf die theoretischen Werte sowie das Laufverhalten im Gel ergeben sich mögliche Stöchiometrien des ADAP 340-783 und Strep-SKAP55-Komplexes von 1:2, 2:1 bzw. 2:2.

Die Stabilisierung des Komplexes mit der GraFix-Methode ermöglichte die elektronenmikroskopische Einzelmolekül-Darstellung von ADAP und SKAP55.

#### **4.4.3 Einzelmoleküldarstellung des ADAP-SKAP55-Komplexes im negativen Kontrast mit Schwermetallsalzen ohne Stabilisierung**

Zur Evaluierung der Probenqualität wurden die Präparationen mit Uranylacetat negativ kontrastiert (siehe 3.6.4). Das Schwermetallsalz Uranylacetat führt zu einer starken Streuung des Elektronenstrahls, wohingegen die eingebetteten Makromoleküle aufgrund ihrer geringeren Dichte den Elektronenstrahl nur gering streuen. Daraus resultiert, dass Makromoleküle in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) heller abgebildet werden als die sie umgebenden Schwermetallsalze. Daher spricht man von negativem Kontrast. Der Vorteil dieser Methode besteht in dem hohen Kontrast zwischen den Proteinen und dem Kontrastmittel, so dass auch verhältnismäßig kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa noch gut dargestellt werden können. Nachteil dieser Methode ist der Entzug von Wasser durch die Trocknung der Makromoleküle und der Schwermetallsalze auf dem Kohlefilm. Dies kann zur Abflachung der Moleküle auf dem Kohlefilm bis hin zur Denaturierung führen [136]. Eine Alternative ist die Cryo-Elektronenmikroskopie. Hierbei wird der Proteinkomplex in Wasser in Form von amorphem Eis eingebettet. Bei der Cryo-EM ist der Kontrast und damit das Signal-zu-

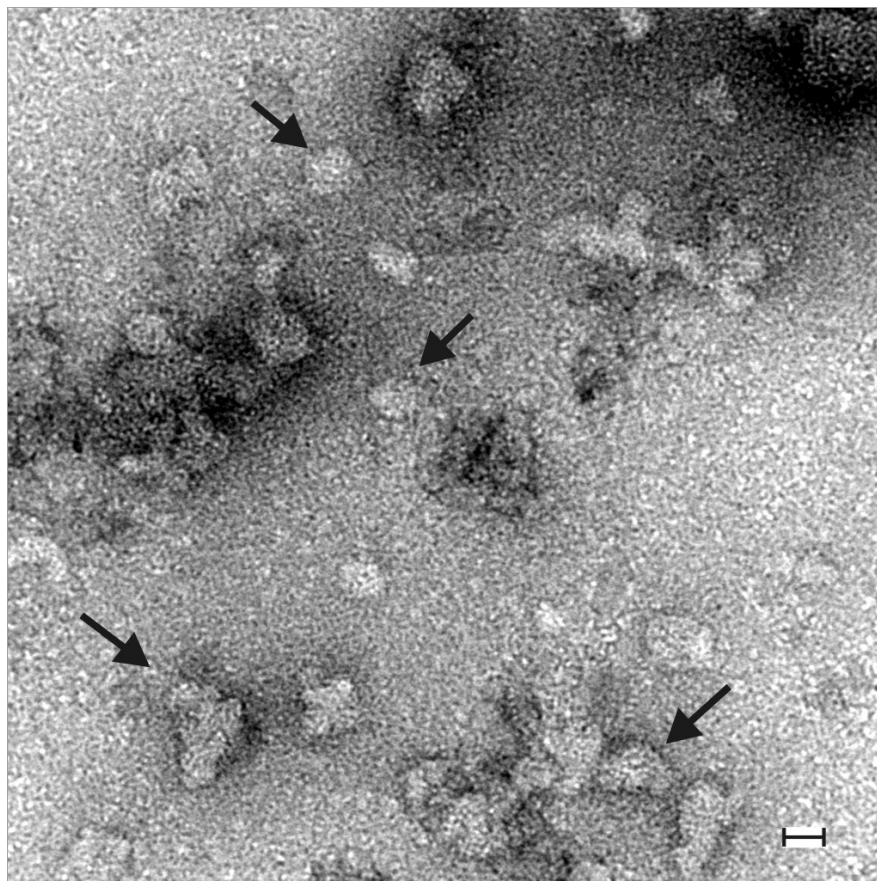
#### 4. Ergebnisse

---

Rausch-Verhältnis noch niedriger. Diese Technik ist insbesondere für kleine Moleküle, wie den ADAP-SKAP-Komplex, schwierig und konnte daher auf dem gegenwärtigen Stand der Analyse im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt werden.

In der Negativkontrastierung wurden für den koaufgereinigten Komplex aus Volle-Länge-Protein-ADAP und SKAP55 ohne Stabilisierung jedoch nur große, ungleichmäßige Partikel gefunden, wobei es sich vermutlich um undefinierte Aggregate des ADAP-SKAP55-Komplexes handelt (siehe Abbildung 29).

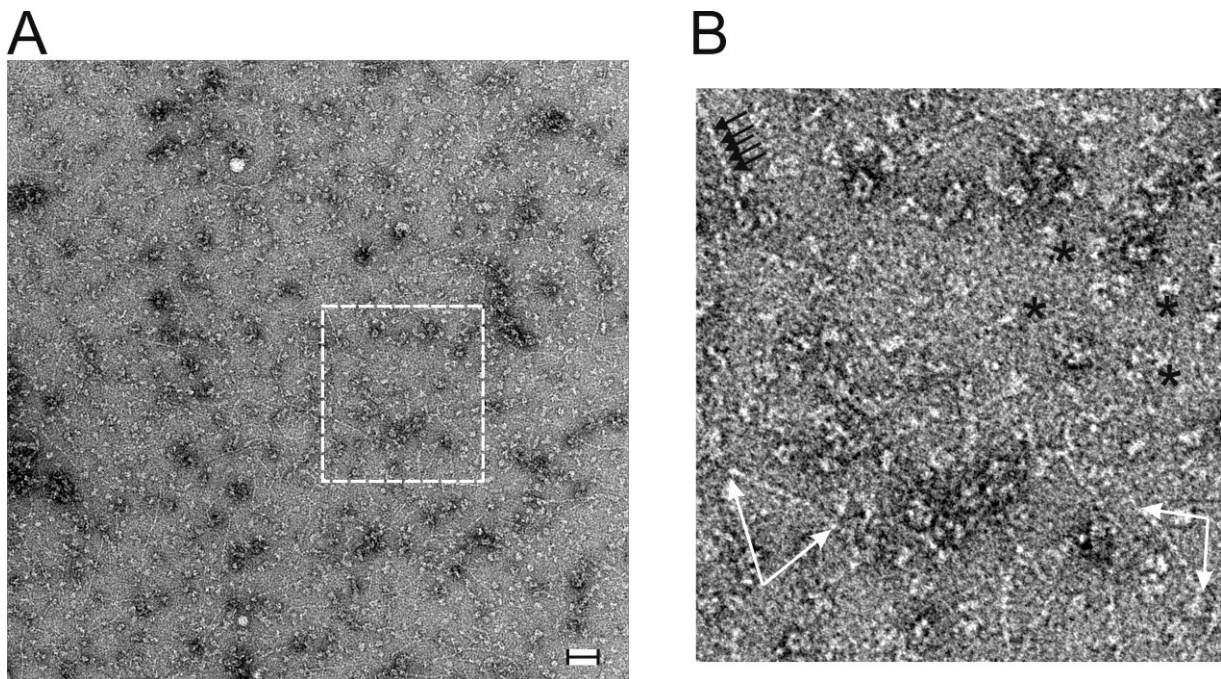
Daher wurde dieser mittels der GraFix-Methode stabilisiert (siehe 4.4.2). Durch die Fixierung des Komplexes konnten Einzelmoleküle nach Negativkontrastierung von ADAP bzw. Komplexe von ADAP und SKAP55-Konstrukten ohne Aggregate dargestellt werden (siehe 4.4.4).



**Abbildung 29: TEM-Aufnahme von negativkontrastierten (2 % Uranylacetat) koaufgereinigten ADAP-SKAP55-Komplexen. Das Bild zeigt große Aggregate (schwarze Pfeile). Vergrößerung: 35.400x, Skalierungsbalken: 200 nm**

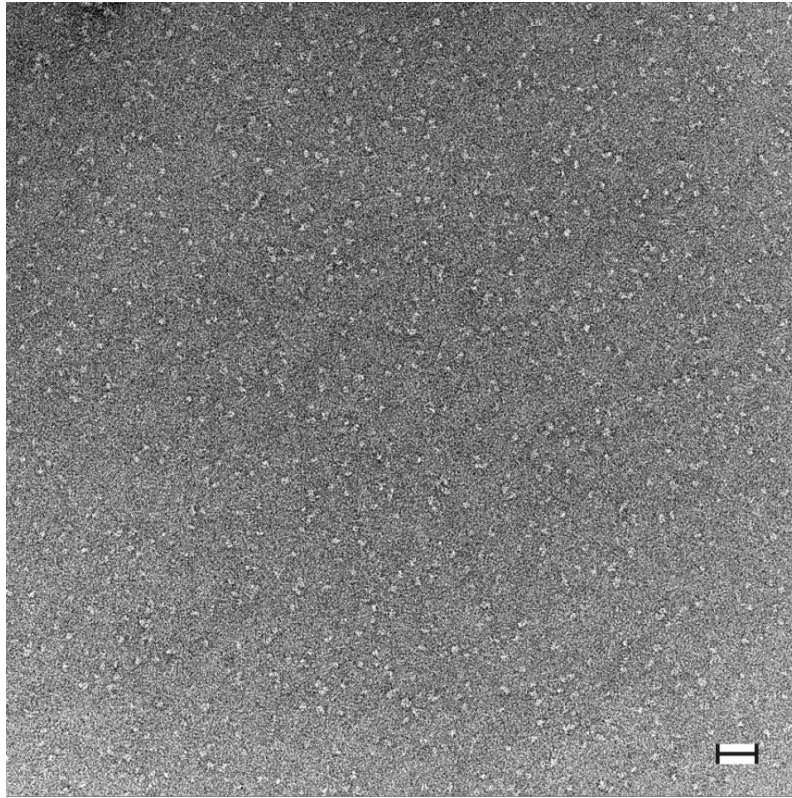
#### 4.4.4 Die Einzelmoleküldarstellung der GraFix-stabilisierten ADAP- und SKAP55-Komplexe im negativen Kontrast mit Schwermetallsalzen

Für den ADAP-SKAP55-Komplex konnten durch Anwendung der GraFix-Methode (siehe 4.4.1 und 4.4.2) einzelne Komplexe ohne Aggregate in der Negativkontrastfärbung dargestellt werden (siehe Abbildung 30, \*). Die Fraktionen zeigen gleichmäßig verteilte Moleküle, wobei in Fraktionen mit höherer Konzentration zusätzliche fibrilläre Strukturen zu erkennen sind (siehe Abbildung 30, B). Diese Strukturen weisen ein wiederkehrendes Muster auf, vergleichbar mit Knoten mit gleichem Abstand in einem Seil (Abbildung 30, B, schwarze Pfeile). Ob es sich bei diesen Strukturen um ADAP und SKAP55 bzw. nur um eines der Proteine bzw. eine Kontamination handelt, konnte nicht bestimmt werden.



**Abbildung 30:** Aufnahme von negativkontrastiertem koaufgereinigtem und GraFix-stabilisiertem His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplex. A) Vergrößerung: 42.000x, Skalierungsbalken: 50nm, B) Ausschnitt aus Abbildung A zeigt einzelne Partikel (\*) sowie fibrilläre Strukturen (weiße Pfeile) mit wiederkehrenden Verdickungen (schwarze Pfeile).

Für His-ADAP wurden nach GraFix-Behandlung in der Uranylacetat-Färbung gleichmäßig verteilte Partikel mit einer Größe von ca. 11 nm abgebildet (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativkontrastierten und GraFix-stabilisierten His-ADAP-Komplexen. Vergrößerung: 42.000x, Skalierungsbalken: 50 nm.**

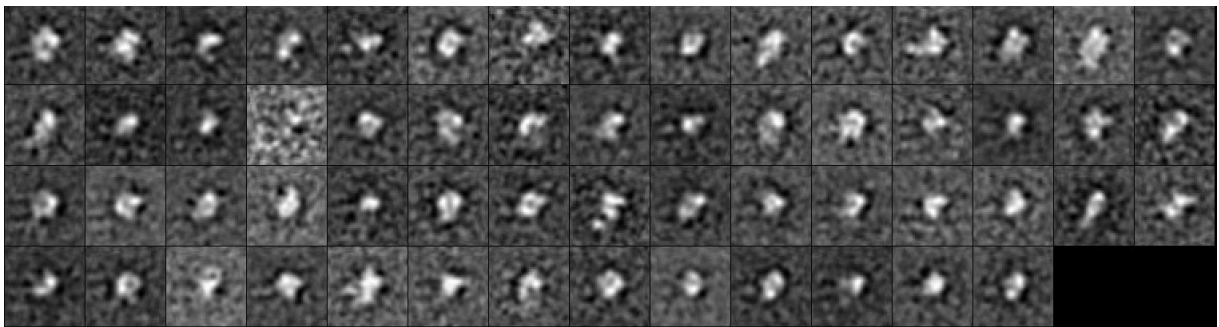
Durch die GraFix-Methode konnten somit ADAP bzw. ADAP-SKAP55-Komplexe erfolgreich stabilisiert werden und homogene einzelne Komplexe ohne Aggregate auf dem Kohlefilm abgebildet werden. Die durch diese Methode gewonnenen Aufnahmen wurden für initiale Strukturberechnungen verwendet.



#### 4.4.5 3D-Rekonstruktion des ADAP-SKAP55-Komplexes

Die initiale 3D-Strukturbestimmung für Einzelpartikel in der Elektronenmikroskopie lässt sich in mehrere Schritte unterteilen. Zuerst findet die biochemische Probenpräparation statt, d.h. der Komplex wird aufgereinigt und im Falle von ADAP und SKAP55 mit der GraFix-Methode fixiert. Anschließend wird die Probe auf dem EM-Grid aufgetragen und es werden mit dem Elektronenmikroskop Projektionen der Elektronendichten der Objekte aufgenommen. Aus den Projektionen eines Objektes wird die dreidimensionale Struktur, basierend auf dem Projektionstheorem, berechnet. Zunächst werden die Orientierungsparameter wie Euler-Winkel sowie die Verschiebung und Drehung in der Ebene bestimmt, da sich die Partikel in einer zufälligen Orientierung auf dem Kohlefilm befinden. Um keine Strahlenschäden und somit Artefakte durch den Elektronenstrahl einzuführen, werden die Aufnahmen mit einer geringen Elektronendosis durchgeführt. Dies hat ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zur Folge.

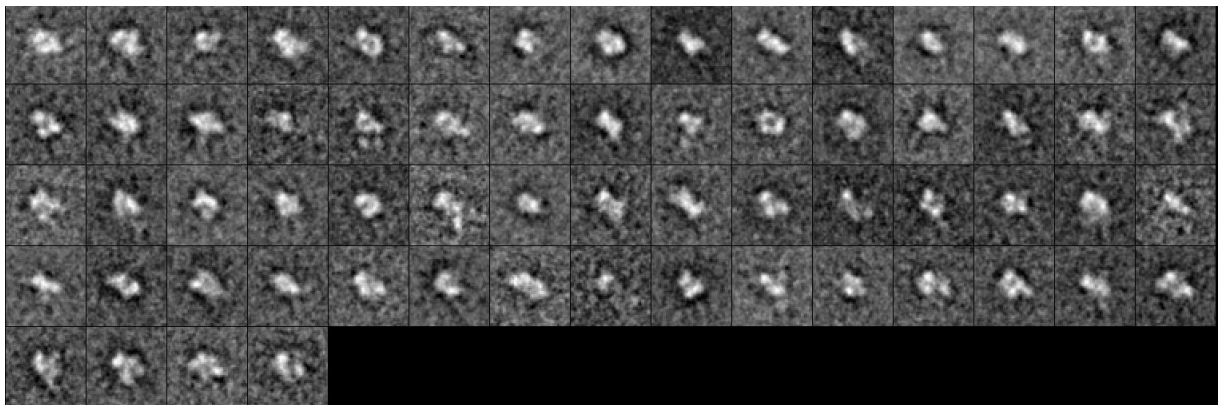
Zur Bestimmung der initialen Struktur der GraFix-stabilisierten Komplexe von ADAP bzw. ADAP-SKAP55 wurde mit Dr. Jan Giesebrecht (Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charité, Universitätsmedizin Berlin) die „common lines“-Methode, basierend auf der statistischen Klassifizierung von Einzelbildern, durchgeführt (siehe 1.12.1)



**Abbildung 32: Klassendurchschnitte des His-ADAP-Komplexes.**

Für ADAP bzw. den ADAP-SKAP55-Komplex wurden die Positionen der Partikel in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifiziert und die einzelnen Partikel ausgeschnitten. Die Bilder wurden zentriert und anschließend zueinander orientiert (aligniert). Um ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen, wurden die Bilder der Einzelpartikel nach der k-Means-Clustering-Methode mit dem Programmpaket SPIDER klassifiziert und Bilder einer Klasse anschließend zu einem Klassendurchschnitt gemittelt (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33).

Für ADAP wurden aus 1175 Partikeln 58 Klassen gebildet. Diese zeigen V-förmige Partikel, runde „Donut“-ähnliche Partikel sowie runde Partikel, die teilweise zusätzliche Dichten außerhalb des Rings aufweisen (siehe Abbildung 32). Für den Komplex aus ADAP und SKAP55 wurden 64 Klassen aus 1157 Partikeln gebildet. Diese zeigen ebenfalls runde Partikel mit „Donut“-ähnlicher Form. Einige Partikel zeigen zusätzliche Dichten außerhalb des Rings, die teilweise verwischt erscheinen. Diese Regionen können auf flexible Bereiche zurückgeführt werden, die in unterschiedlichen Konformationen vorliegen und daher nicht als eine definierte Dichte in der Klasse abgebildet werden (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33: Klassendurchschnitte des rekombinanten His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplexes.**

Die gemittelten Klassen des ADAP und ADAP-SKAP55-Komplexes wurden als Grundlage für die Berechnung der Initialstruktur verwendet. Die mit der „common-line“-Methode berechneten Strukturmodelle zeigen beide „Donut“-ähnliche Strukturen. Für His-ADAP sind in der Ringebene auf einer Seite des Rings zusätzliche Dichten vorhanden. Die Struktur des ADAP-SKAP55-Komplexes unterscheidet sich durch eine zusätzliche Dichte, die zwischen anderen Erweiterungen liegt und leicht aus der Ringebene heraus ragt (siehe Abbildung 34).

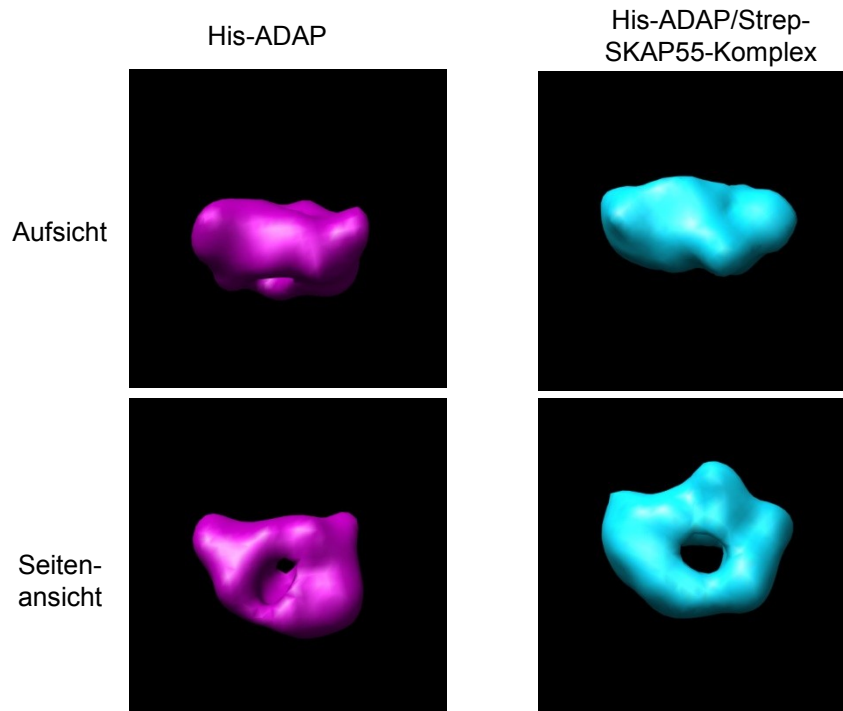


Abbildung 34: 3D-Modell des His-ADAP und His-ADAP/Strep-SKAP55-Komplexes.

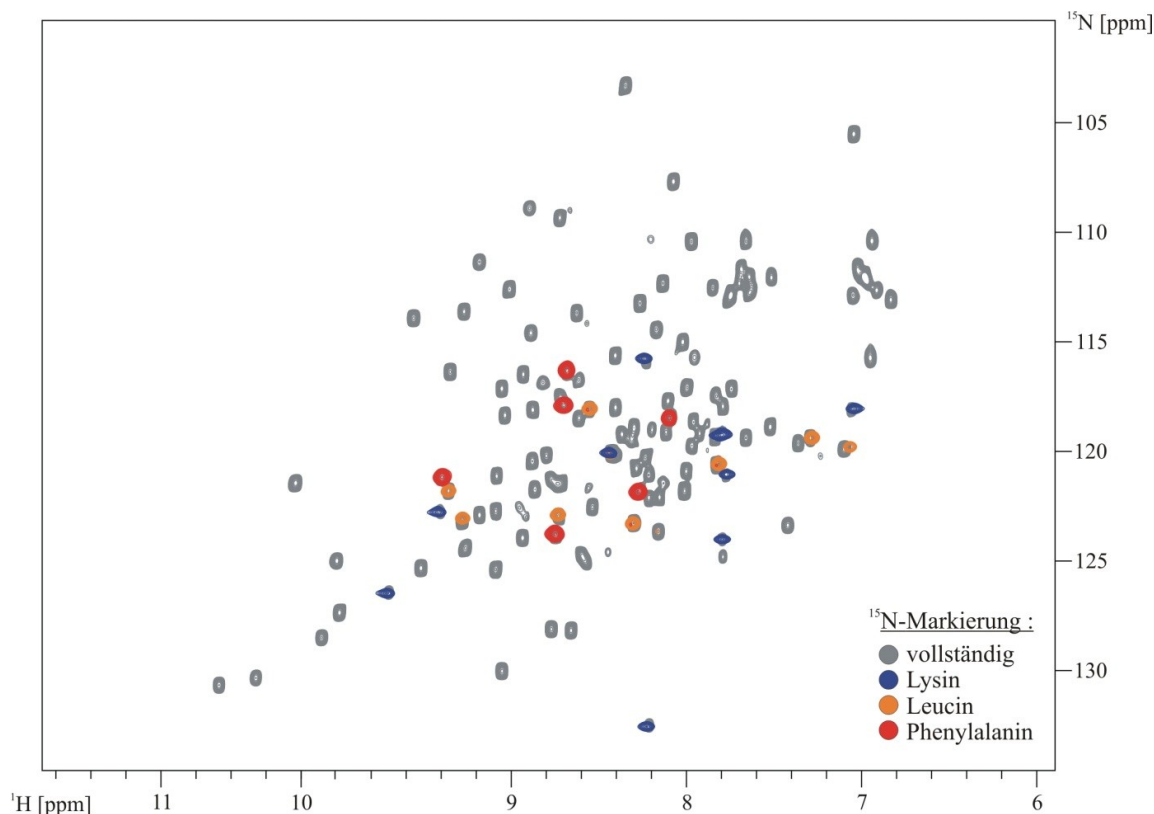
## 4.5 NMR-spektroskopische Untersuchung von SKAP55

Die NMR-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung von dynamischen Prozessen auf atomarer Ebene. Zur Aufklärung der Bindung und Erkennung von Liganden durch SKAP55 wurden die DM-Domäne, die PH-Domäne sowie das natürlich vorkommende Fusionskonstrukt der beiden Domänen NMR-spektroskopisch untersucht.

Zuerst erfolgte eine Zuordnung der NMR-Signale zur Aminosäuresequenz der PH-Domäne von SKAP55. Dieses sogenannte Assignment wurde anschließend zur Auswertung von NMR-Interaktionsstudien mit Phosphoinositolphosphaten verwendet.

### 4.5.1 Sequentielles NMR-Assignment der PH-Domäne von SKAP55

Die Zuordnung der HN-Signale des zweidimensionalen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums zur Sequenz der SKAP55 PH-Domäne erfolgte unter Verwendung von Tripleresonanzexperimenten (siehe 1.13.2) sowie der spezifischen selektiven  $^{15}\text{N}$ -Markierung einzelner Aminosäuren (siehe 3.7.4).



**Abbildung 35:** Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von vollständig und selektiv markiertem His-SKAP55 PH. In grau ist die vollständig mit  $^{15}\text{N}$  markierte Probe dargestellt, überlagert mit den Spektren des jeweils  $^{15}\text{N}$  selektiv markierten Lysin in blau, Leucin in orange und Phenylalanin in rot.

Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der jeweils selektiv markierten Aminosäuren Leucin, Lysin und Phenylalanin zeigten für Phenylalanin 6, für Leucin 9 und für Lysin 9 Signale. Aufgrund der Sequenz wären 11, 8 bzw. 13 Signale zu erwarten gewesen. Gründe für die zu geringe Anzahl liegen in der Überlagerung einzelner Resonanzen sowie in verändertem Relaxationsverhalten flexibler Sequenzbereiche, die im HSQC-Spektrum nicht detektiert werden (siehe Abbildung 35). Für Tripleresonanzexperimente wurde die PH-Domäne in Anwesenheit von  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopen exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurden Paare von dreidimensionalen HNCA/HN(CO)CA-, HNCO/HN(CA)CO- und HN(CO)CACB/HNCACB-Spektren aufgenommen (siehe 3.7.3). In jedem Spektrenpaar wird zur HN-Resonanz die chemische Verschiebung eines Atomtyps wie  $\text{C}_\alpha$ ,  $\text{C}_\beta$  oder  $\text{C}_\text{O}$  zusätzlich detektiert. Das erste Spektrum eines Spektrenpaares bildet für jede HN-Resonanz sowohl die eigene als auch die Resonanz der vorhergehenden Aminosäure ab. Im zweiten Spektrum des Spektrenpaares wird nur die Resonanz der vorhergehenden Aminosäure detektiert. Durch Überlagerung dieser Spektren werden die Signale der eigenen sowie der vorhergehenden Aminosäure zugeordnet. Dadurch wird die Reihenfolge zweier benachbarter HN-Resonanzen zueinander bestimmt. Durch die Identifizierung weiterer vorhergehender oder nachfolgender Resonanzen wird die Sequenzabfolge der Resonanzen erweitert (siehe 1.13.2).

Über markante Verschiebungen der  $\text{C}_\alpha$ - bzw.  $\text{C}_\beta$ -Resonanzen oder durch die Informationen der selektiv markierten Aminosäuren und deren Signale im HSQC wurden diese der SKAP55 PH-Sequenz zugeordnet. Abbildung 36 zeigt die Peptidsequenz Ala144-Asn145-Glu146-Lys147-Ser148 mit den entsprechenden Ausschnitten der dreidimensionalen Spektren. Charakteristische Verschiebungen der Resonanzen der  $\text{C}_\beta$ -Atome zeigt das Alanin 144 mit 18,80 ppm sowie das Serin 148 mit 66,06 ppm. Zusätzlich zeichnet sich Serin durch die charakteristische Verschiebung der  $\text{C}_\alpha$ -Resonanz von 63,17 ppm aus (siehe Abbildung 36, A und C). Lysin 147 wurde ebenfalls in der selektiv markierten Probe als Lysin identifiziert, siehe Abbildung 35 bei 8,25 ppm  $^1\text{H}$  und 115,90  $^{15}\text{N}$  (blaues Signal).

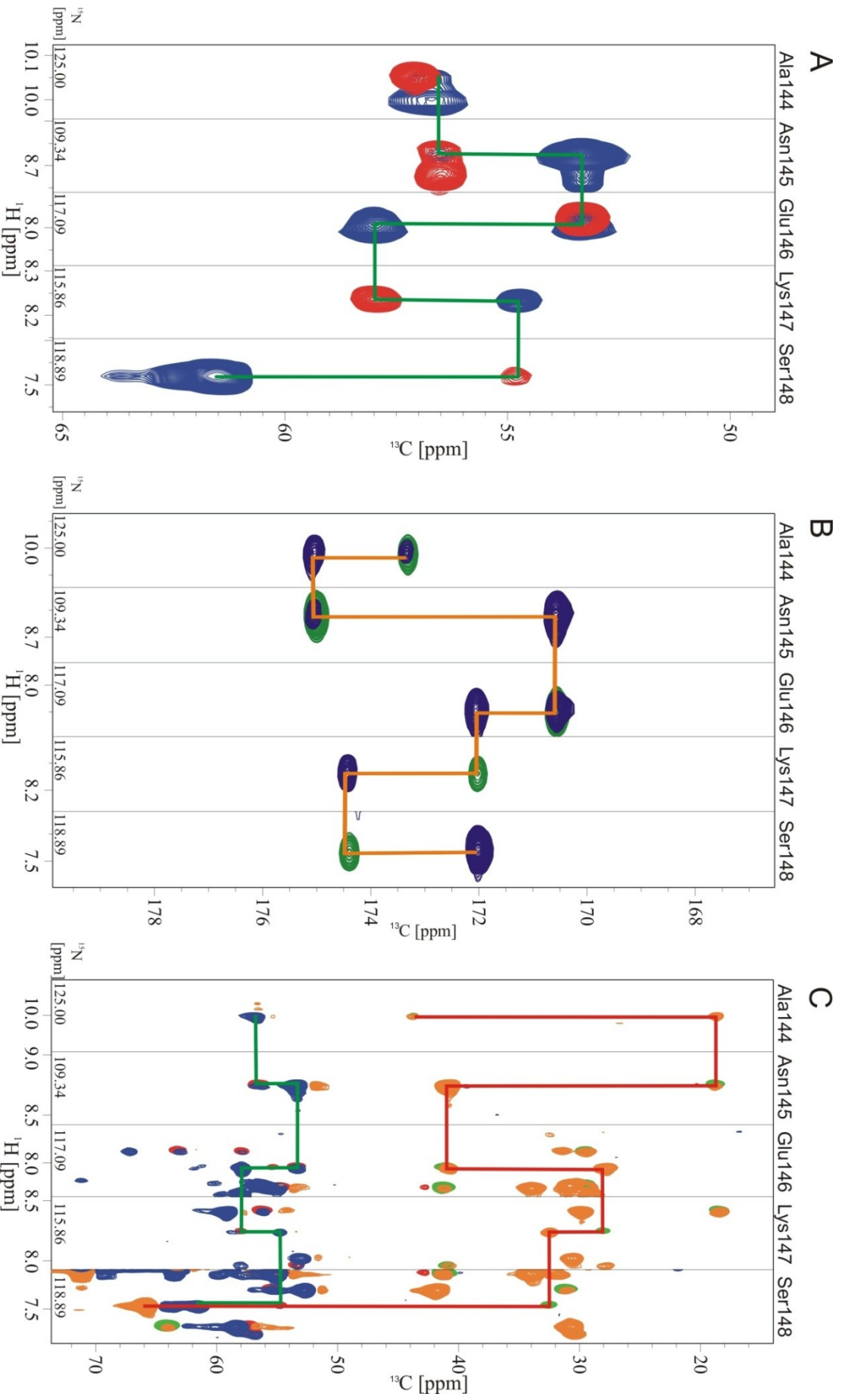
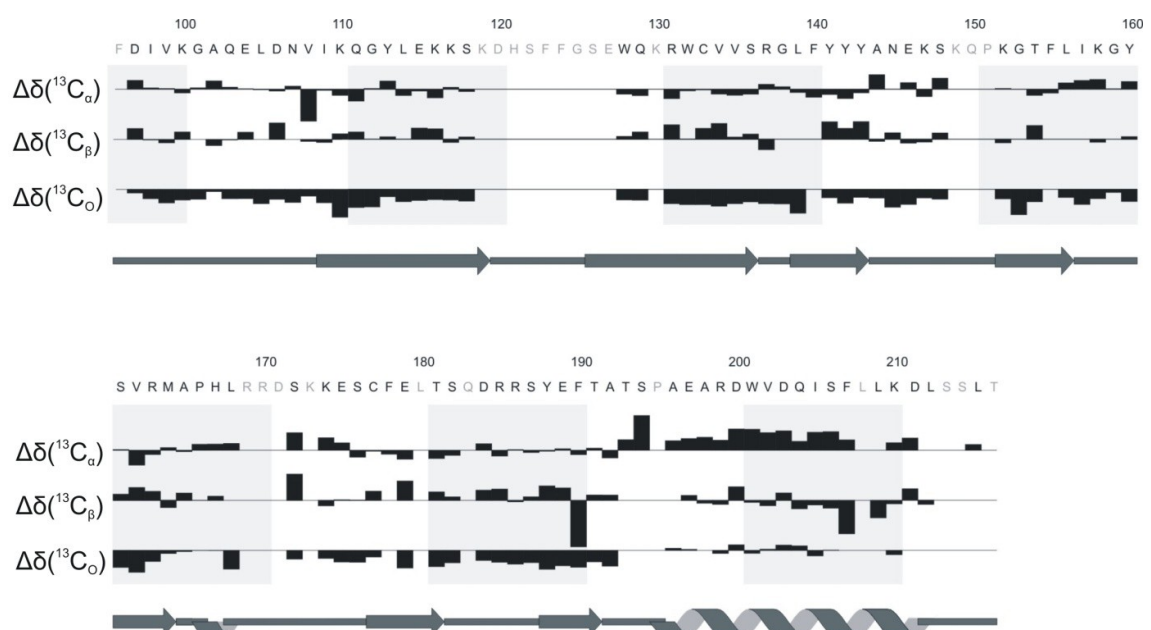


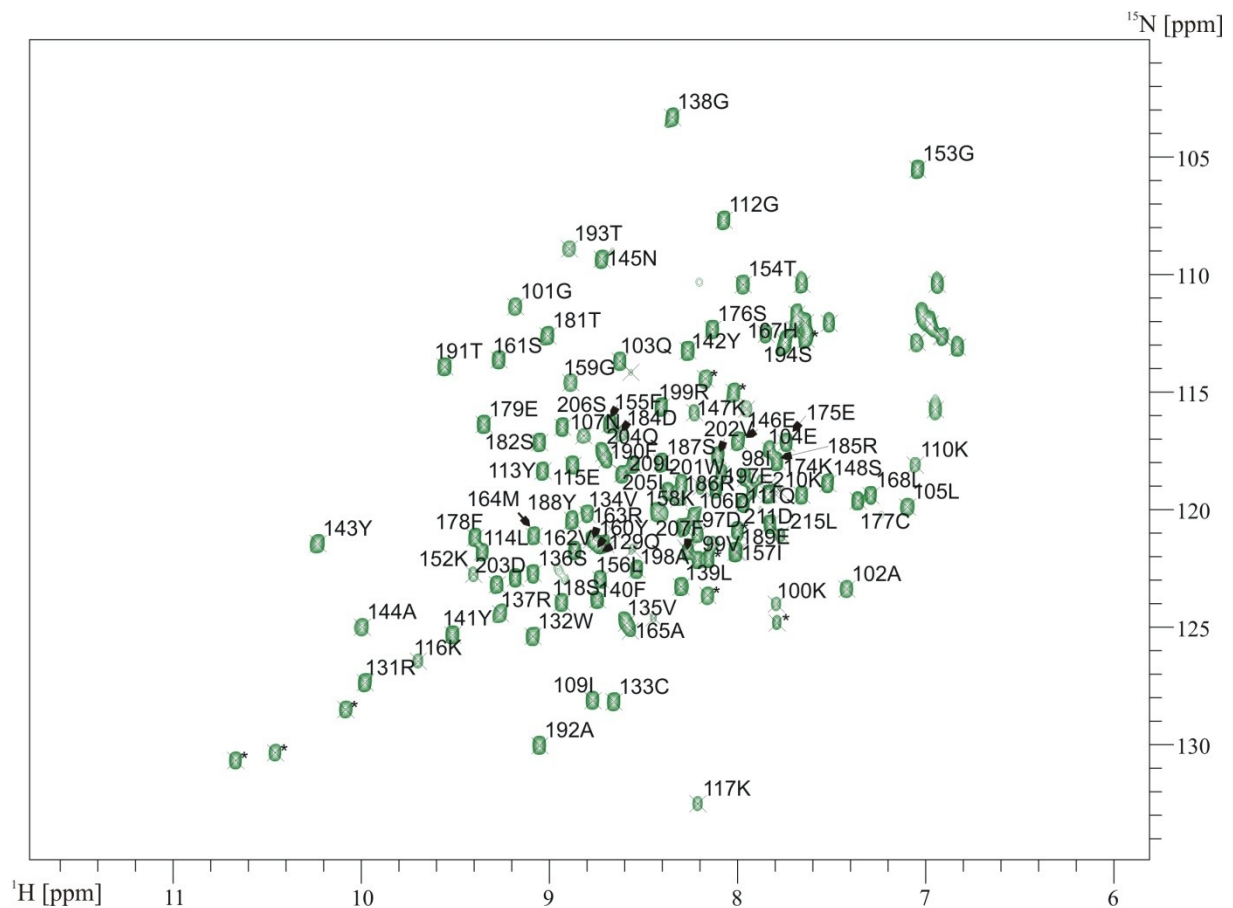
Abbildung 36: Assignment der  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -markierten SKAP55 PH-Domäne. Dargestellt sind die zugeordneten Resonanzen der Aminosäuresequenz Alanin, Asparagin, Glutamat, Lysin und Serin der Positionen 144 bis 148. Die Überlagerung der Tripleresonanzspektren zeigt in A) blau und rot das HN(CO)CA-Spektrum, B) grün und dunkelblau das HN(CO)C- und HN(CO)CACB-Spektrum sowie C) in grün/rot und orange/blau das HN(CO)CACB- und HN(CO)C-Spektrum. Die Linien zeigen die einander zugeordneten Resonanzen: rot:  $\text{C}_\beta$ ; orange:  $\text{C}_\alpha$ ; grün:  $\text{C}_\gamma$ ; grün:  $\text{C}_\delta$ .

Die chemische Verschiebung der Atome ist von der Aminosäureseitenkette abhängig und davon, in welchem Sekundärstrukturelement sich diese Aminosäure befindet. Der  $\Delta\delta$ -Wert beschreibt die Differenz der beobachteten Resonanz zur typischen chemischen Verschiebung dieses Aminosäuretyps. Aminosäuren, die in  $\alpha$ -helikalen Bereichen lokalisiert sind, zeigen für  $C_{\alpha}$ - sowie  $C_O$ -Atome eine zusätzliche positive und in  $\beta$ -Strängen eine negative  $\Delta\delta$ -Wert- Verschiebung. Diese Verschiebungen sind bei  $C_{\alpha}$ -Atomen am stärksten. Bei  $C_{\beta}$ -Atomen verhält sich die Verschiebung umgekehrt. In  $\beta$ -Strängen werden die Resonanzen zu positiveren Werten verschoben.

Für die  $C_{\alpha}$ -Atome der Aminosäuren Alanin 196 bis Aspartat 211 wird eine Verschiebung zu positiven Werten gemessen.  $\beta$ -Stränge weisen negative Verschiebungen für die  $C_{\alpha}$ -Resonanzen auf. Diese sind nicht so stark ausgeprägt wie für helikale Abschnitte, wie z.B. die Aminosäuren Tryptophan 128 bis Serin 136 und Leucin 139 bis Tyrosin 143 zeigen. Bereiche mit keiner definierten Sekundärstruktur zeigen keine zusammenhängenden positiven oder negativen  $\Delta\delta$ -Werte. Der Vergleich der  $\Delta\delta$ -Werte der chemischen Verschiebung der  $C_{\alpha}$ -,  $C_{\beta}$ -,  $C_O$ -Atome mit den Sekundärstrukturelementen der Kristallstruktur (PDB:1U5D) zeigt eine gute Übereinstimmung (siehe Abbildung 37). Damit weist das hier verwendete Konstrukt der SKAP55 PH-Domäne die gleichen Sekundärstrukturelemente auf wie das kristallisierte Protein und nimmt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in Lösung die gleiche Tertiärstruktur ein wie die in der Proteindatenbank abgelegte Kristallstruktur.



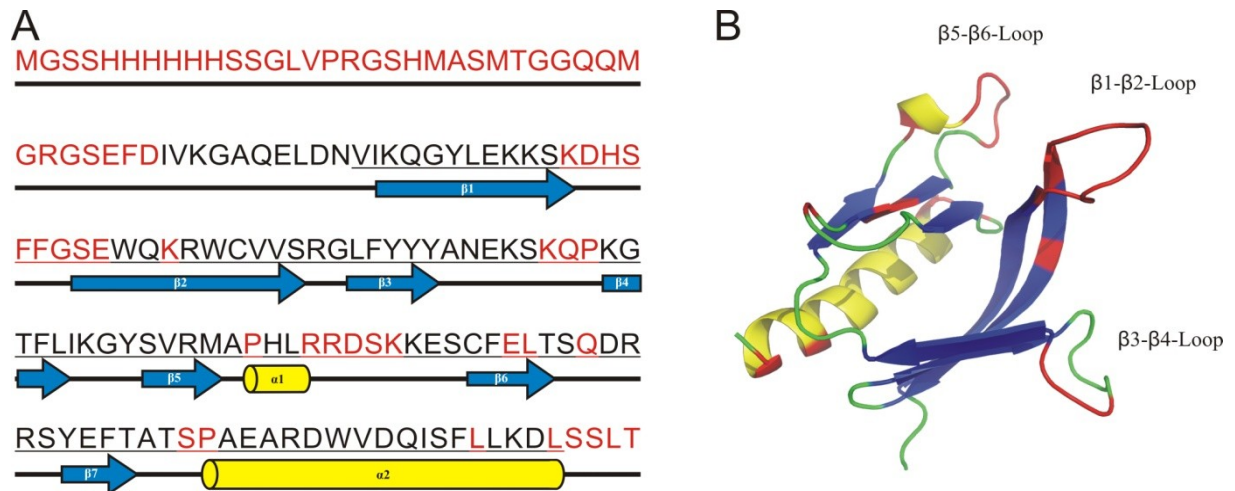
**Abbildung 37:** Chemische Verschiebung ( $\Delta\delta$ ) der  $C_{\alpha}$ -,  $C_{\beta}$ - sowie  $C_O$ -Atome des assignierten His-SKAP55 PH-Konstruktes für die Aminosäuren 96-216. Parallel sind die sekundären Strukturelemente der Kristallstruktur 1U5D von SKAP55 schematisch dargestellt.



**Abbildung 38:** Assignment des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums der His-SKAP55 PH-Domäne. Bezeichnung mit Position und Typ der Aminosäure. Mit Sternen bezeichnet sind nicht zugeordnete Signale.

Die aus den Tripleresonanzexperimenten gewonnenen Zuordnungen wurden auf die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren übertragen (Abbildung 38). Im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum werden Resonanzen direkt verknüpfter Stickstoff- und Wasserstoffatome analysiert, wobei neben den Amidgruppen des Proteinrückgrates auch Amidgruppen innerhalb der Seitenketten detektiert werden. Prolin zeigt aufgrund der nicht vorhandenen HN-Gruppe keine Resonanz im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum. Die Resonanzen von  $^{15}\text{N}$  bei 110-115 ppm sowie von  $^1\text{H}$  bei 6,5-8 ppm sind größtenteils den Amidgruppen der Asparagin- und Glutamin-Seitenketten zuzuordnen. Diese zeichnen sich durch eine Aufspaltung in der  $^1\text{H}$ -Dimension aus. Insgesamt wurden 94 Signale des HSQC-Spektrums zugeordnet.





**Abbildung 39:** Zugeordnete Aminosäuren (Rückgrat) des His-SKAP55 PH-Domänen-Konstruktes. A) Sequenz des His-SKAP55 PH-Konstruktes, rot: Aminosäuren, denen keine HN-Resonanz, schwarz: Aminosäurereste, denen ein HN-Signal im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC zugeordnet wurde. Unterstrichen sind Aminosäuren, die in der SKAP55 PH-Struktur 1U5D enthalten sind sowie schematisch die Sekundärstrukturelemente. B) Kristallstrukturdarstellung der SKAP55 PH-Domäne. Nicht zugeordnete Aminosäuren sind rot markiert (Kristallstruktur, PDB-Code: 1U5D).

Dem 156 Aminosäuren-langen His-SKAP55 PH-Konstrukt der Aminosäuren 97-216 wurden 60 % der Signale des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums durch Tripleresonanz-Experimente und selektive Markierung zugeordnet. Der in der Protein-Data-Bank abgelegten Struktur der SKAP55 PH-Domäne (PDB: 1U5D) wurden 83 % der Aminosäuren Signalen im HSQC-Spektrum zugeordnet (siehe Abbildung 38). Für Regionen mit hoher Flexibilität - wie den Affinitätstag und die folgenden Aminosäuren des Vektors, den N-Terminus, den C-Terminus sowie die Loop-Regionen - konnten teilweise keine Resonanzen identifiziert bzw. zugeordnet werden. Zu diesen Bereichen gehören auch die  $\beta$ 1- $\beta$ 2-,  $\beta$ 3- $\beta$ 4- und  $\beta$ 5- $\beta$ 6-Loops wie in Abbildung 39, B gezeigt.

Das Assignment des Proteinrückgrates der SKAP55 PH-Domäne wurde für die Auswertung der folgenden NMR-Interaktionsstudien verwendet.

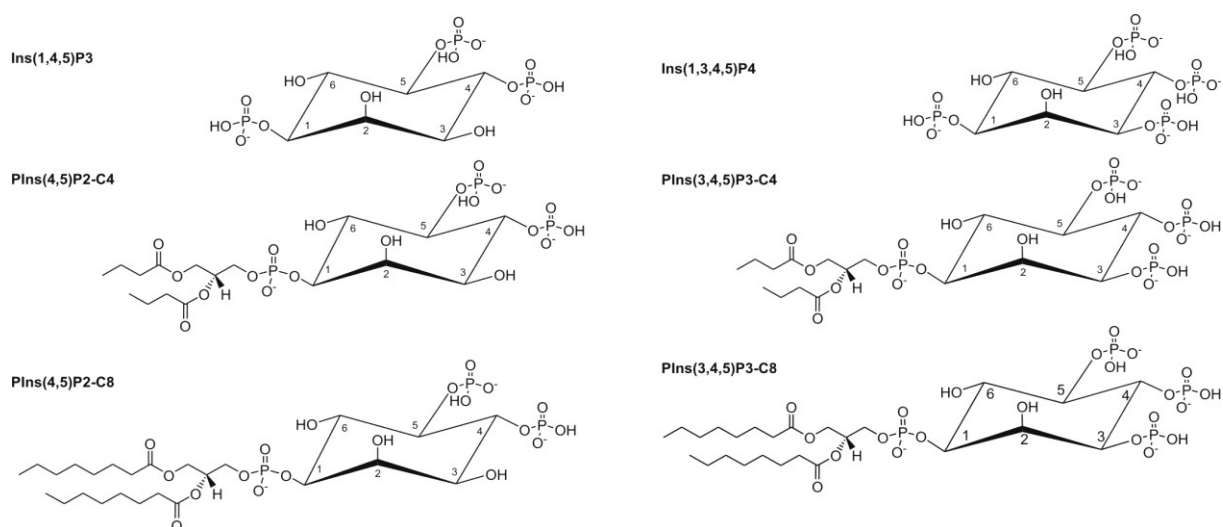
## 4.5.2 NMR-Titrationsexperimente

### 4.5.3 Bindung von Inositolphosphaten an die PH-Domäne von SKAP55

Phospholipide dienen als *second messenger* in Zellen. In T-Zellen führt die Aktivierung zu einem erhöhten Niveau bestimmter Phospholipide an der Plasmamembran (siehe 1.11.1). Für SKAP-HOM wurde von Swanson et al. ein regulatorischer Mechanismus durch die Bindung von Phosphoinositolphosphaten (PIP) an die PH-Domäne beschrieben. Die Bindung von PIP3 hebt eine Autoinhibition durch den N-Terminus auf, so dass SKAP-HOM in Makrophagen in aktinreichen Zellausstülpungen lokalisiert ist.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie wurde untersucht, ob für SKAP55 ebenfalls ein solcher Mechanismus wie in SKAP-HOM vorliegt und ob eine Regulierung durch spezifische Phosphoinositolphosphate stattfindet. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der SKAP55 N-Terminus ebenfalls - wie für SKAP-HOM beschrieben - ein Dimer bildet und somit die strukturellen Voraussetzungen für die beschriebene Inhibition der PH-Domäne durch die Coiled-Coil-Domäne gegeben wären (siehe 4.3.1).

Um die Bindung von SKAP55 an Phospholipide durch die PH-Domäne zu untersuchen, ohne die mögliche Beeinflussung durch den N-Terminus, wurden NMR-spektrometrische Untersuchungen an der isolierten PH-Domäne durchgeführt. Aufgrund der Unlöslichkeit von PIPs mit langen Acylketten wurden Phosphoinositolphosphate mit einer Octyl- bzw. Butyl-Kette oder die Derivate der Kopfgruppen in Form von Inositolphosphaten verwendet (siehe Abbildung 40).

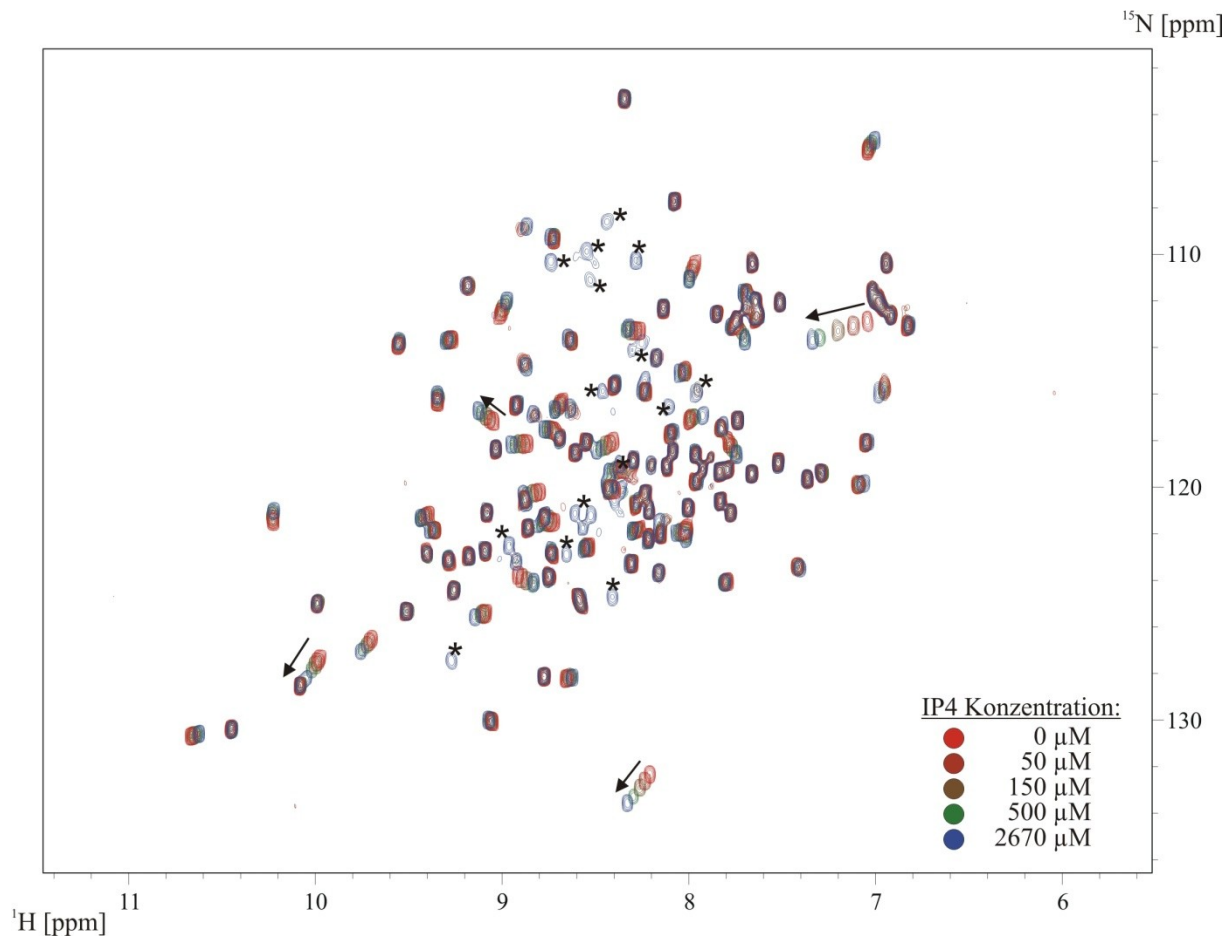


**Abbildung 40:** Chemische Strukturen der für die NMR-Titration verwendeten Phospholipide bzw. Inositol-Phosphate. IP3 [Ins(1,4,5)P3] stellt die Kopfgruppe von PIP2 dar und IP4 [Ins(1,3,4,5)P4] die Kopfgruppe von PIP3, diese wurden als lösliche Analoga für Bindungsstudien verwendet.

#### 4.5.4 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrationsexperimente der His-SKAP55 PH-Domäne

Initiale Versuche der SKAP55 PH-Domäne mit Kopfgruppen der natürlich vorkommenden Phosphoinositolphosphate PIP2 und PIP3 zeigten konzentrationsabhängige Verschiebungen von Resonanzen im HSQC-Spektrum. Zur Bestimmung der an der Inositolphosphatbindung beteiligten Aminosäuren sowie deren Dissoziationskonstanten wurden Titrationsexperimente mit IP3 und IP4 durchgeführt. Bei einer Proteinkonzentration von 150  $\mu\text{M}$  der SKAP55 PH-Domäne wurden jeweils HSQC-Spektren mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen von 0, 50, 150, 300, 500, 750, 1050, 1500, 2000, 2670  $\mu\text{M}$  aufgenommen. Für das schwächer bindende IP3 wurden zwei zusätzliche Konzentrationen von 3200 und 3740  $\mu\text{M}$  vermessen. Bei Zugabe der Liganden bleibt die Gesamtstruktur der Domäne erhalten, wie sich aus den nur gering variierenden Spektren erkennen lässt. Die maßgeblichen Veränderungen der Spektren sind graduelle Verschiebungen einiger Resonanzen in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration. Bei hohen Konzentrationen beider Liganden werden zusätzlich neue Resonanzen detektiert, z.B.: im Bereich von  $^1\text{H}$  8,2-8,8 ppm und  $^{15}\text{N}$ : 108-112 ppm. Bei diesen Resonanzen handelt es sich vermutlich um Aminosäuren, die sich in Loop-Regionen befinden (siehe Abbildung 41, \*) und nach Ligandenzugabe ein verändertes Relaxationsverhalten aufweisen und in Folge dessen detektiert werden. Zur Übersichtlichkeit sind ausgewählte Spektren der Konzentrationen 0, 50, 150, 500, 2670  $\mu\text{M}$  für IP4 (Abbildung 41) sowie für IP3 (Anhang: Abbildung 61) gezeigt.

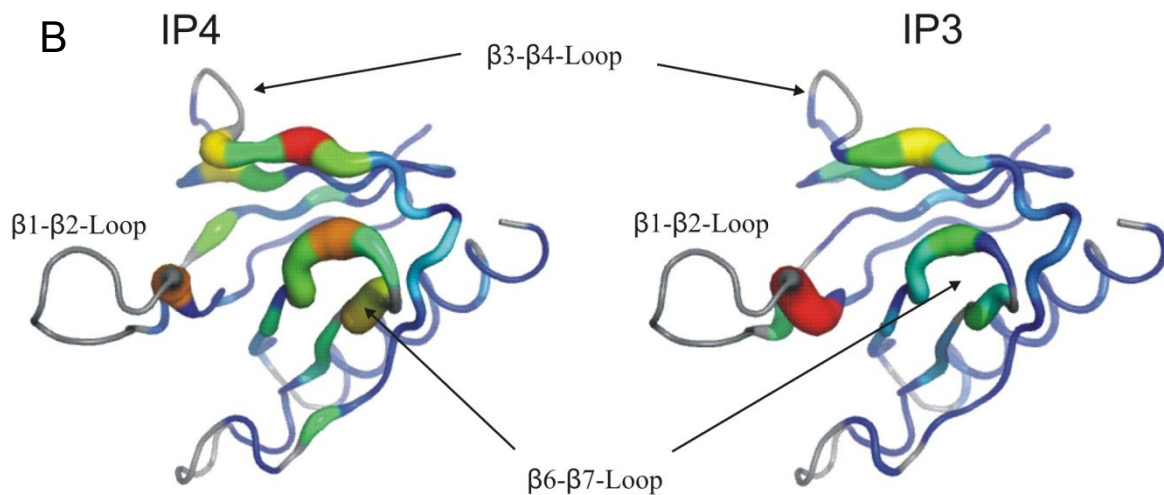
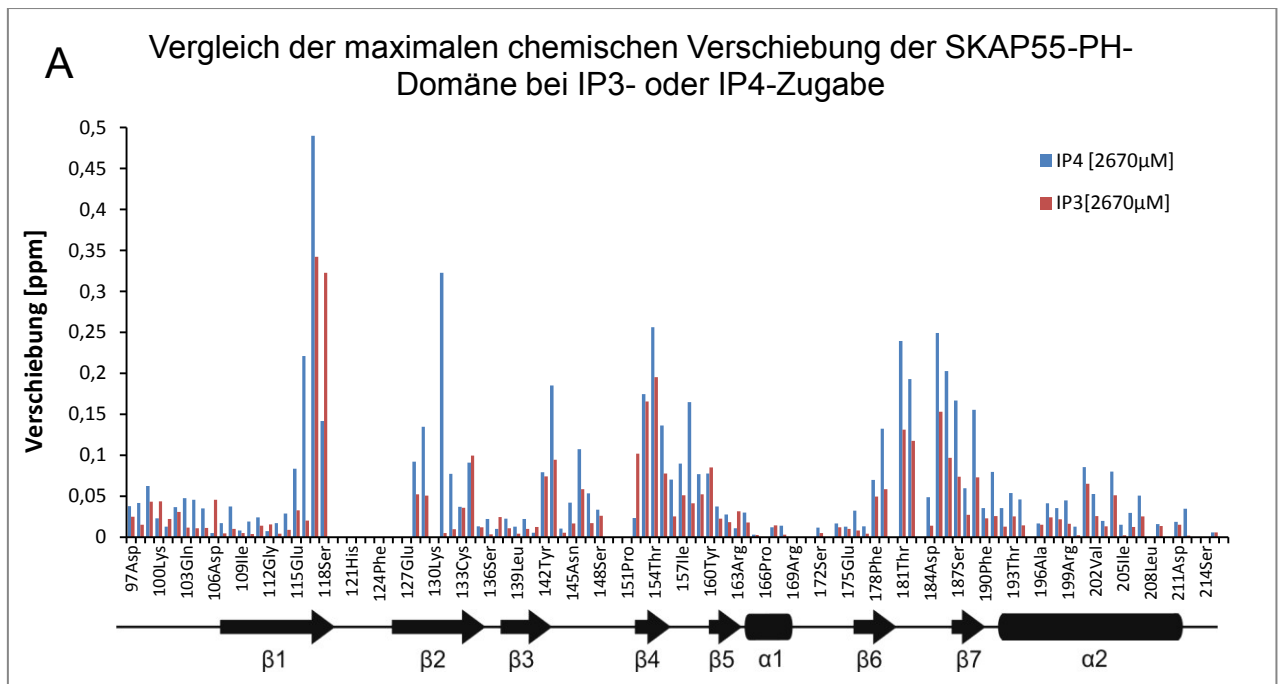
Die Verschiebungen der Resonanzen entlang einer Trajektorie in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration zeigen, dass es sich bezogen auf die NMR-Zeitskala um einen schnellen Austausch des Liganden handelt. Die Bindung an die SKAP55 PH-Domäne wurde weiter charakterisiert.



**Abbildung 41:** NMR-Titration der His-SKAP55 PH-Domäne mit IP4. Die <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren zeigen eine IP4-konzentrationsabhängige Verschiebung einiger Resonanzen beim Vergleich der Spektren mit 0 μM (rot), 50 μM (dunkelrot), 150 μM (braun), 500 μM (grün) und 2670 μM (blau) IP4. Bei hohen Ligandenkonzentrationen werden zusätzliche Resonanzen detektiert, mit \* markiert. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 150 μM, die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Sehr starke Signalverschiebungen sind exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet.

#### 4.5.5 Erkennung der Inositolphosphate durch die SKAP55 PH-Domäne

Um die an der Bindung der Inositolphosphate beteiligten bzw. davon betroffenen Aminosäuren zu identifizieren, wurde das Assignment der SKAP55 PH-Domäne (siehe 4.5.1) jeweils auf die Spektren mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen übertragen. Anschließend wurde die Verschiebung der Resonanzen gegenüber dem Spektrum ohne Ligand berechnet (siehe 3.7.7). Bei IP3- bzw. IP4-Zugabe sind maßgeblich drei Bereiche direkt oder indirekt von der Bindung beeinflusst (siehe Abbildung 42 A, B): Von Aminosäure Glutamat 115 bis Valin 134, von Tyrosin 142 bis Tyrosin 160 sowie Phenylalanin 178 bis Threonin 191. Hierbei handelt es sich um die β1-β2, β6-β7- Loops sowie den β3-β4-Loop bzw. dessen β-Stränge sowie die daran angrenzenden Aminosäuren wie in Abbildung 42, B gezeigt.

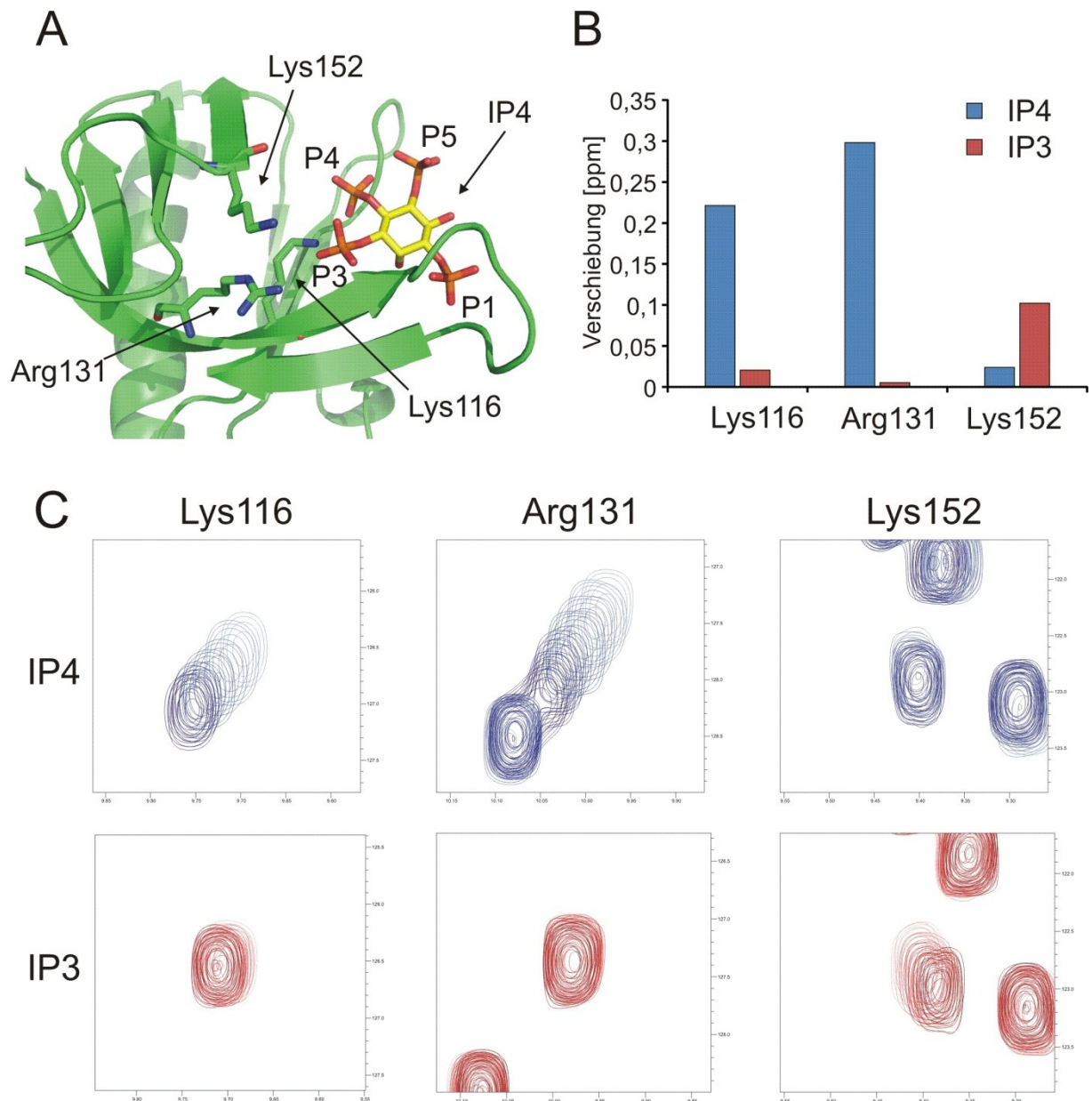


**Abbildung 42: SKAP55 bindet Inositolphosphate über die  $\beta$ 1- $\beta$ 2,  $\beta$ 3- $\beta$ 4- und  $\beta$ 6- $\beta$ 7-Loops. A) Vergleich der chemischen Verschiebung der Resonanzen der SKAP55 PH-Domäne im HSQC-Spektrum bei Zugabe von 2670  $\mu$ M IP4 bzw. IP3. B) Chemische Verschiebung der Aminosäuren bei 2670  $\mu$ M IP3- bzw. IP4-Zugabe. Die Stärke und Farbe des Proteinrückgrates repräsentieren die Größe der Verschiebung. Die Intensität der Verschiebung ist ansteigend von blau, über grün, gelb, orange bis zur maximalen Verschiebung in rot dargestellt. Nicht zugeordnete Aminosäuren sind grau eingefärbt.**

Die von der Bindung betroffenen Aminosäuren ähneln sich bei IP3- und IP4-Zugabe (siehe Abbildung 42 A). Um Unterschiede der chemischen Verschiebungen zu identifizieren, wurde der Quotient aus der IP4- und IP3- Verschiebung bzw. der umgekehrte Quotient gebildet (siehe Anhang: Abbildung 59). Die Aminosäuren Lysin 116 und 152 sowie Arginin 131 weisen den größten Unterschied in der chemischen Verschiebung bei der IP3- bzw. IP4-Zugabe auf (siehe Abbildung 42 A und Abbildung 43).

Der Quotient aus den Verschiebungen bei der Zugabe von 2670  $\mu\text{M}$  IP4 bzw. IP3 ergibt für Arginin 131 bzw. Lysin 116 eine 62- bzw. 11-fach stärkere Verschiebung. Lysin152 weist eine um den Faktor 4 stärkere Verschiebung auf bei IP3-Zugabe gegenüber einer IP4-Zugabe (siehe Anhang, Abbildung 50). Die Unterschiede bei IP3- und IP4-Zugabe der Aminosäuren Lysin 116 und 152 und Arginin 131 zeigen, dass sie wahrscheinlich direkt an der Erkennung der 3'-Phosphatgruppe beteiligt sind. Die räumliche Nähe dieser Aminosäuren verdeutlicht die Überlagerung der Kristallstrukturen der PH-Domänen von SKAP55 mit dem kokristallisierten Inositolphosphat der PH-Domäne der Akt-Kinase (PDB: 1UNQ, siehe Abbildung 43).

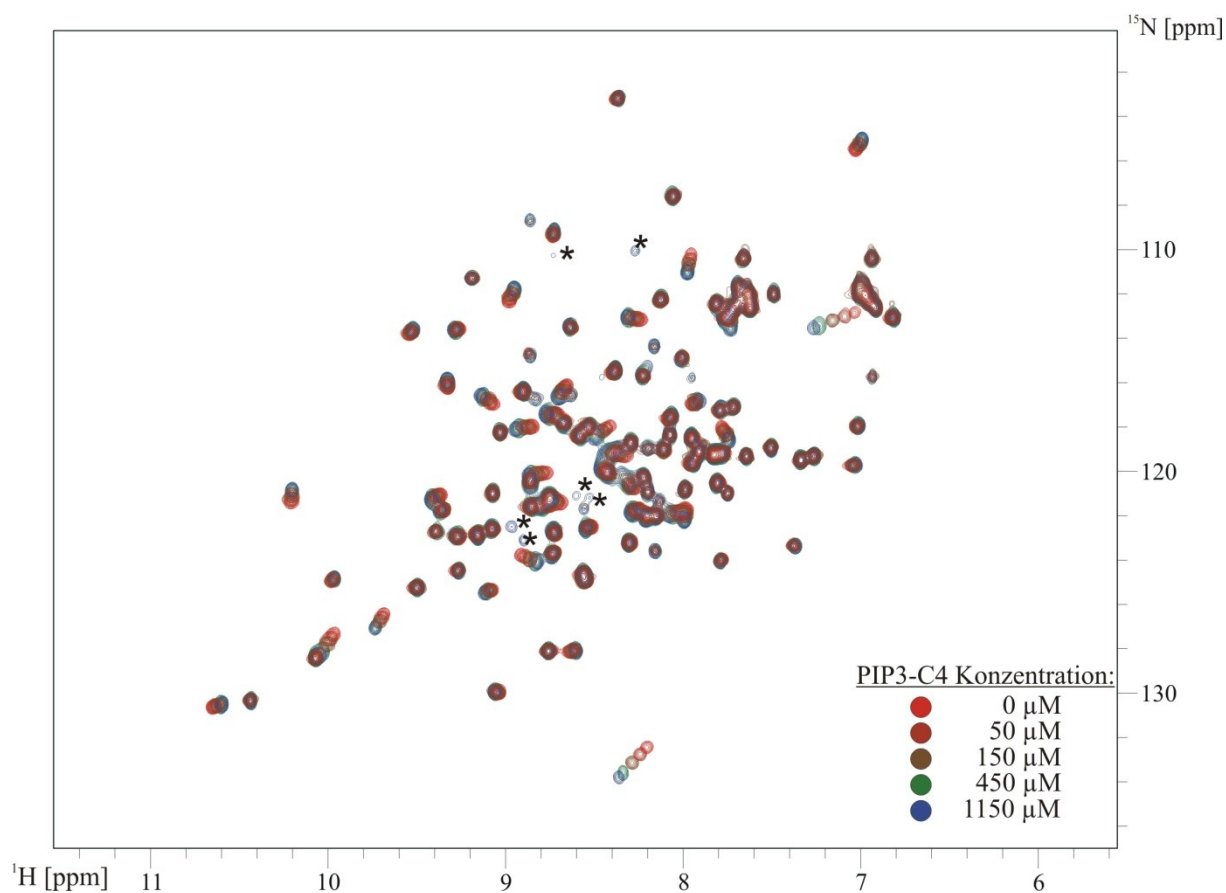
Die verwendeten Inositolphosphate IP3 und IP4 stellen die Kopfgruppe der Phosphoinositolphosphate dar. Um die Bindungen zu vergleichen, wurden die Dissoziationskonstanten bestimmt (siehe Abbildung 46, Tabelle 10). Mögliche Interaktionen mit der Acylkette der natürlich vorkommenden PIPs wurden durch weitere NMR-Titrationsexperimente mit kurzkettigen PIPs untersucht.



**Abbildung 43: Inositol P3-Phosphatgruppen-Erkennung der SKAP55 PH-Domäne. Gegenüberstellung von Lysin 116, Lysin 152 und Arginin 131. A) Überlagerung der Kristallstruktur 1U5D der SKAP55 PH-Domäne mit dem kokristallisierten IP4 der Akt-Kinase (Struktur 1UNQ). P1-P5 bezeichnet die Position der Phosphatgruppen am Inositolring. Gezeigt sind die SKAP55-Sekundärstrukturelemente sowie die Aminosäuren und deren räumliche Nähe zur P3-Position des IP4. B) Verschiebung der Resonanzen bei 2670  $\mu\text{M}$  IP3- bzw. IP4-Zugabe. C) Überlagerung von Ausschnitten der  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQC-Spektren, IP4 in blau und IP3 in rot. Die Farbintensität der Spektren nimmt mit Ligandenkonzentration zu. Konzentrationen siehe Text.**

#### 4.5.6 Phosphoinositolphosphatbindung der SKAP55 PH-Domäne

Phosphoinositolphosphate werden an Membranen gebildet (siehe 1.11.1). Hier dienen sie u.a. als Bindungspartner für PH-Domänen. Die natürlich vorkommenden PIPs mit ihren zwei Acylketten sind in Lipidmembranen integriert und nicht in PBS löslich und damit für NMR-Titrationsexperimente nicht geeignet. Um einen möglichen Einfluss der Acylketten auf Bindung mit NMR untersuchen zu können, wurden Phosphoinositolphosphate mit Butylketten verwendet. Diese Phosphoinositolphosphate werden im Folgenden als PIP2-C4 und PIP3-C4 bezeichnet (siehe Abbildung 40).

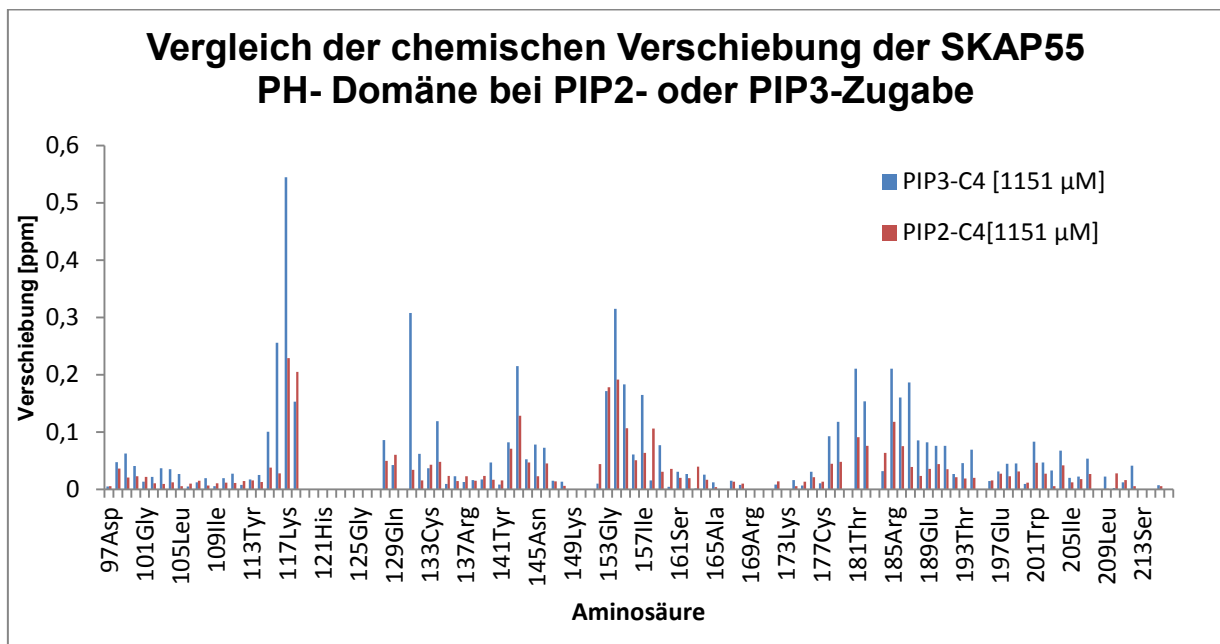


**Abbildung 44: NMR-Titration der His-SKAP55 PH-Domäne mit Zugabe von unterschiedlichen PIP3-C4-Konzentrationen. Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren zeigt eine konzentrationsabhängige Verschiebung für einige Resonanzen. Gezeigt sind Konzentrationen von 150  $\mu\text{M}$  PH-Domäne in Anwesenheit von 0  $\mu\text{M}$  (rot), 50  $\mu\text{M}$  (dunkelrot), 150  $\mu\text{M}$  (braun), 500  $\mu\text{M}$  (grün) und 1150  $\mu\text{M}$  (blau) PIP3-C4. Bei hohen Ligandenkonzentrationen werden zusätzliche Resonanzen detektiert, die mit \* markiert sind. Die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt.**

Die SKAP55-PH-Domäne wurde vergleichbar mit den Titrationsexperimenten der Inositolphosphate mit einer Konzentrationen von 150  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Es wurden jeweils  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren mit Ligandenkonzentrationen von 0, 50, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1151  $\mu\text{M}$  für PIP2-C4 und PIP3-C4 sowie einer zusätzlichen Konzentration von 1340  $\mu\text{M}$  für PIP2-C4 gemessen. Die Spektren mit zunehmenden Konzentrationen von PIP2-C4



bzw. PIP3-C4 zeigen konzentrationsabhängige Verschiebungen von Resonanzen (siehe Abbildung 44).



**Abbildung 45: Vergleich der chemischen Verschiebung der Aminosäuren des SKAP55 PH-Konstruktes bei 1150  $\mu\text{M}$  PIP2-C4- bzw. PIP3-C4-Zugabe.**

Nahezu die gleichen Aminosäuren zeigen bei der PIP2-C4- bzw. PIP3-C4-Zugabe Verschiebungen, jedoch sind bei gleicher Konzentration die Verschiebungen bei PIP3-C4 – Zugabe deutlich größer (siehe Abbildung 45). Dies deutet auf eine stärkere Bindung gegenüber PIP2-C4 hin.

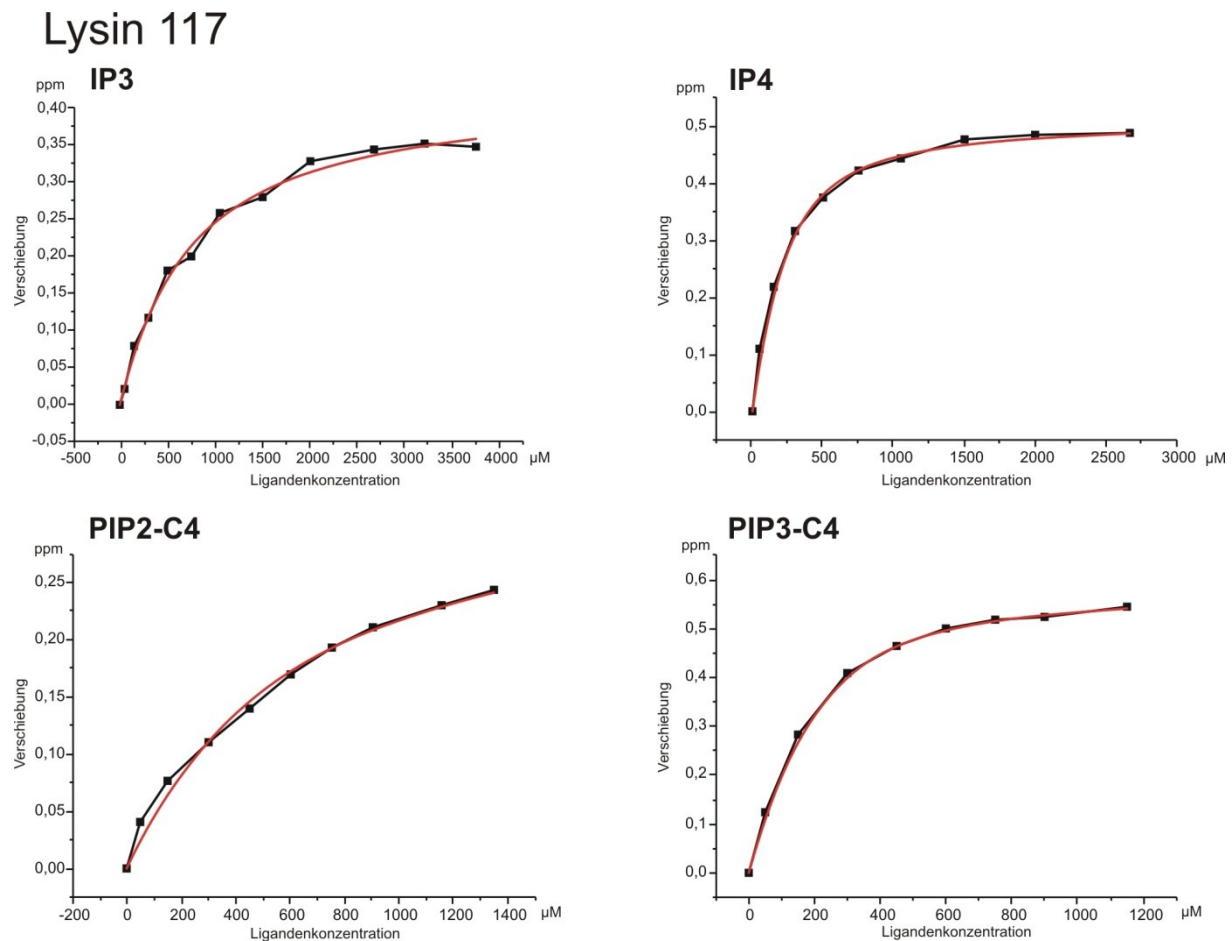
Um die Bindungen an die SKAP55 PH-Domäne zu vergleichen und zu bewerten, wurden die Dissoziationskonstanten für die Liganden bestimmt.

#### **4.5.7 Dissoziationskonstanten der SKAP55 PH-Domäne für Phosphoinositolphosphate und deren Kopfgruppen**

Durch die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor findet lokal eine Veränderung der chemischen Umgebung statt. Diese Veränderung kann durch NMR-Spektroskopie gemessen werden. Die Grundlage für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der SKAP55 PH-Domäne für IP3, IP4, PIP2-C4 und PIP3-C4 stellen die vorhergehenden NMR-Titrationsexperimente dar (siehe 4.5.2)

## 4. Ergebnisse

Das Assignment (siehe 4.5.1) der PH-Domäne ohne Liganden wurde auf die Spektren mit der entsprechenden Ligandenkonzentration übertragen. Einige Resonanzen verschieben sich durch Ligandenbindung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration. Diese Verschiebungen zeigen ein hyperboles Sättigungsverhalten, exemplarisch für Lysin 117 gezeigt (siehe Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Verschiebung der Lysin 117  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Resonanz in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration von IP3, IP4, PIP2-C4 und PIP3-C4. Die gemessenen Verschiebungen sind schwarz, die auf einem 1:1 Interaktionsmodell berechneten Bindungskurven mit dem niedrigsten  $R^2$ -Wert in rot dargestellt.

Für die zehn sich am stärksten durch die Ligandenzugabe verschiebenden Resonanzen der Titrationsserie wurden die  $K_D$ -Werte mit einem Eins-zu-Eins-Liganden-Rezeptor-Modell und nicht linearer Regressionsanalyse modelliert und bestimmt (siehe 3.7.7 und Abbildung 46, Tabelle 10).

	IP3 [kD]	Nr.	R <sup>2</sup>	PIP2-C4 [kD]	Nr.	R <sup>2</sup>	IP4 [kD]	Nr.	R <sup>2</sup>	PIP3-C4 [kD]	Nr.	R <sup>2</sup>
117Lys	636	1	0.995	497	1	0.992	124	1	0.996	82	1	0.999
118Ser	631	2	0.996	577	2	0.986	27	13	0.945	40	14	0.995
153Gly	134	3	0.993	883	3	0.993	134	9	0.989	103	10	0.997
154Thr	506	4	0.986	666	4	0.996	53	3	0.993	63	2	0.998
185Arg	481	5	0.975	1034	6	0.992	101	4	0.997	81	7	0.999
181Thr	726	6	0.988	514	8	0.992	93	5	0.998	67	6	0.999
182Ser	719	7	0.989	453	9	0.989	98	7	0.994	--	13	--
143Tyr	441	8	0.961	459	5	0.989	68	8	0.995	62	5	0.998
131Arg	--	>35	--	--	>35	--	276	2	0.991	66	3	0.994
116Lys	--	>35	--	--	>35	--	114	6	0.992	75	4	0.998
187Ser	--	21	--	--	31	--	134	10	0.989	76	8	0.995
155Phe	--	18	--	629	7	0.995	--	14	--	67	9	0.998
160Tyr	700	10	0.82	--	38	--	--	26	--	--	>35	--
142Tyr	--	14	--	325	10	0.960	--	25	--	--	21	--
<b>Mittelw.</b>	<b>641</b>			<b>604</b>			<b>119</b>			<b>74</b>		
Std.	276			202			58			12		

**Tabelle 10: Dissoziationskonstanten der SKAP55 PH-Domäne für einzelne Aminosäuren für die Inositol- und Phosphoinositol-phosphate IP3, IP4, PIP2-C4 und PIP3-C4. Die Nummer bezeichnet die Rangfolge der Verschiebungstärke, wobei 1 die größte Verschiebung darstellt.**

Für IP3 und PIP2-C4 ergeben sich  $K_D$ -Werte von  $641 \pm 276 \mu\text{M}$  und  $604 \pm 202 \mu\text{M}$ . Mit höherer Affinität binden IP4 und PIP3-C4. Für diese wurden niedrigere Werte von  $119 \pm 58 \mu\text{M}$  und  $74 \pm 12 \mu\text{M}$  bestimmt. Die Liganden gleicher Kopfgruppen haben einen  $K_D$ -Wert gleicher Größenordnung. Der Ligand mit Acylkette und IP3-Kopfgruppe weist einen um 6 % und der Ligand mit Acylkette und IP4 einen um 37 % niedrigeren  $K_D$ -Wert auf als die Liganden ohne die Acylkette.

Ein möglicher inhibitorischer Mechanismus auf die Inositolphosphatbindung der PH-Domäne durch intramolekulare Bindung der N-terminalen DM-Domäne an die PH-Domäne wurde weiter untersucht.

#### 4.5.8 NMR-Titration des SKAP55 DM-PH-Konstruktes

Die Titrationsexperimente mit der SKAP55 PH-Domäne mit IP3 und IP4 sowie PIP2-C4 und PIP3-C4 zeigen eine kopfgruppenspezifische Interaktion mit den Phosphoinositolphosphaten. Ob diese Interaktion durch die N-terminale SKAP55-Dimerisierungsdomäne, wie in SKAP-HOM beschrieben, inhibiert wird, wurde mit dem N-terminal um die DM-Domäne erweiterten SKAP55 PH-Domänen-Konstrukt untersucht (Aminosäuren 7-222). Das HSQC-Spektrum zeigt Linienverbreiterung und insgesamt schwächere Signale im

Vergleich zur SKAP55 PH-Domäne. Dies lässt sich durch die Dimerisierung erklären, die zur Veränderung der Beweglichkeit des Moleküls in der Lösung führt und somit zu veränderten Relaxationsraten mit Signalverlust durch Linienverbreiterung (siehe Abbildung 47). Das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Spektrum des SKAP55 DM-PH-Konstruktes deckt sich für die PH-Domäne größtenteils mit den Signalen der Spektren der isolierten PH-Domäne. Resonanzverschiebungen größer als 0,5 ppm werden bei folgenden über die Struktur verteilten Aminosäuren beobachtet: 154Thr, 118Ser, 100Lys, 107Asp, 147Lys, 159Gly und 182Ser (siehe Abbildung 47). Die PH-Domäne bleibt in ihrer Gesamtstruktur alleine oder in Anwesenheit der benachbarten Domäne erhalten. Die Phospholipidbindung dieses Konstruktes wurde mittels NMR-Titration untersucht.

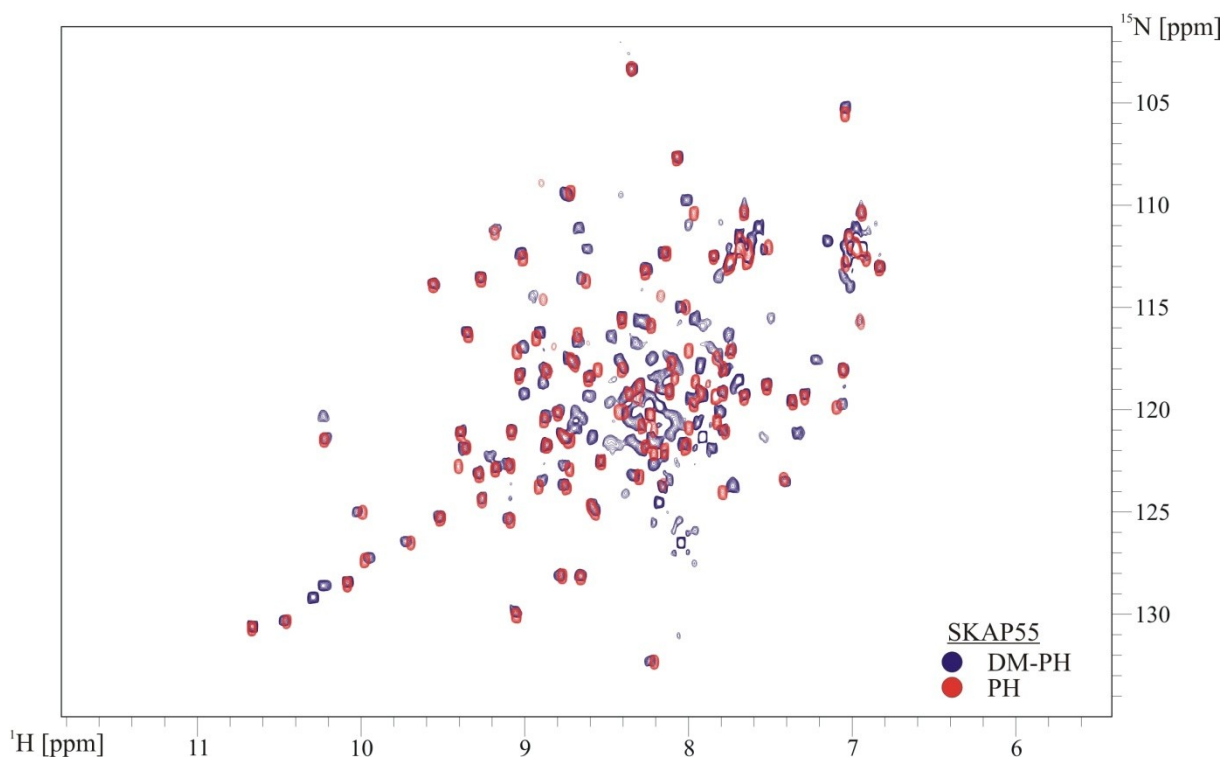


Abbildung 47:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des SKAP55 DM-PH-Konstruktes, überlagert mit dem Spektrum der PH-Domäne.

#### 4.5.9 Dissoziationskonstanten des SKAP55 DM-PH-Konstruktes für Inositolphosphate

Für die Charakterisierung der Phosphoinositolphosphat-Bindung an das SKAP55 DM-PH-Konstrukt wurden die Kopfgruppen der Inositolphosphate IP3 und IP4 verwendet.

Die  $K_D$ -Wert-Bestimmung des DM-PH-Konstruktes ist erschwert, da zum einen die Signale schwach und zum anderen die zusätzlichen Signale der DM-Domäne die Signale der PH-Domäne überlagern (siehe Abbildung 47). Daher konnte keine vollständige

Übertragung des Assignments der SKAP55 PH-Domäne auf das Spektrum des DM-PH-Domänenkonstruktes erfolgen. Wie für das PH-Domänen-Konstrukt zuvor wurden zur  $K_D$ -Wert-Bestimmung Inositolphosphate zum SKAP55 DM-PH-Konstrukt titriert.

Aminosäure	IP3 [kD]	Ranking	+/-	R2	IP4 [kD]	Ranking	+/-	R2
187Ser	--	>35	--	--	2501	1	1369	0,95
181Thr	N.N.	8	N.N.	N.N.	783	2	260	0,95
143Tyr	N.N.	3	N.N.	N.N.	509	3	221	0,91
131Arg	--	16	--	--	2875	4	1751	0,94
182Ser	--	11	--	--	924	5	195	0,98
118Ser	4104	1	1456	0,977	958	6	383	0,95
179Glu	--	30	--	--	1940	7	2759	0,6
153Gly	N.N.	5	N.N.	N.N.	631	8	466	0,76
142Tyr	N.N.	9	N.N.	N.N.	133	9	61	0,89
154Thr	N.N.	4	N.N.	N.N.	1893	10	1893	0,77
137Arg	N.N.	2	N.N.	N.N.	--	13	--	--
100Lys	N.N.	6	N.N.	N.N.	--	>35	--	--
159Gly	N.N.	7	N.N.	N.N.	--	29	--	--
108Val	N.N.	10	N.N.	N.N.	--	>35	--	--

**Tabelle 11: Dissoziationskonstanten des SKAP55 DM-PH-Domänen-Konstruktes, abgeleitet aus dem Fit der  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -Verschiebungen einzelner Aminosäuren, für die Inositolphosphate IP3 und IP4. Mit N.N. gekennzeichnete Werte konnten nicht bestimmt werden.**

Im SKAP55 DM-PH-Konstrukt sind die chemischen Verschiebungen im Vergleich zur isolierten PH-Domäne bei gleicher IP4-Konzentration deutlich geringer. Bei einer IP4-Konzentration von 2670  $\mu\text{M}$  weist z.B. Arginin 131 im DM-PH-Konstrukt eine Verschiebung von 0,15 gegenüber 0,29 ppm im PH-Konstrukt auf. Die bestimmten  $K_D$ -Werte der einzelnen Aminosäuren schwanken stark. Die Daten sind aufgrund der nur geringen Verschiebungen sehr fehlerbehaftet (siehe Tabelle 11). Für IP4 ergibt sich für die 10 sich am stärksten verändernden Aminosäuren ein Mittelwert von  $\sim 1300 \pm 870 \mu\text{M}$ . Für IP3 konnten aufgrund der minimalen Verschiebungen bei Ligandenzugabe keine Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Die geringen chemischen Verschiebungen im DM-PH-Konstrukt zeigen bei IP4 eine verminderte bzw. bei IP3 eine nahezu nicht vorhandene Bindung. Der Einfluss von Lipiden auf die PIP-Bindung an das DM-PH-Konstrukt wurde mit Octylketten-modifizierten Phosphoinositolphosphaten untersucht.

#### 4.5.10 Octyl-Phosphoinositolphosphat-Titration des SKAP55 DM-PH-Konstruktes

Um einen Einfluss der Membran auf die Öffnung des DM-PH-Konstruktes zu untersuchen, wurden Titrationsversuche mit Inositolphosphaten mit Octylketten (PIP3-C8/PIP2-C8) durchgeführt. Für das Phosphoinositolphosphat PIP2-C8 konnten keine Spektren aufgenommen werden, da das Protein nahezu vollständig präzipitierte. Für PIP3-C8 zeigt das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum schwache konzentrationsabhängige Verschiebungen einiger Signale. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 mM PIP3-C8 sind starke Veränderungen im Spektrum sichtbar (siehe Abbildung 48). Unter den 10 am stärksten Verschiebungen aufweisenden Aminosäuren sind die lipophilen Aminosäuren Valin 134, Isoleucin 205 sowie die Phenylalanine 140, 178, 190. Diese Aminosäuren mit Ausnahme des Valins bilden den lipophilen Kern des Proteins. Bei den beobachteten Veränderungen handelt es sich daher wahrscheinlich nicht um eine spezifische Interaktion der Kopfgruppe, sondern um einen detergenzähnlichen Effekt durch die lipophile Acylkette des PIP3-C8.

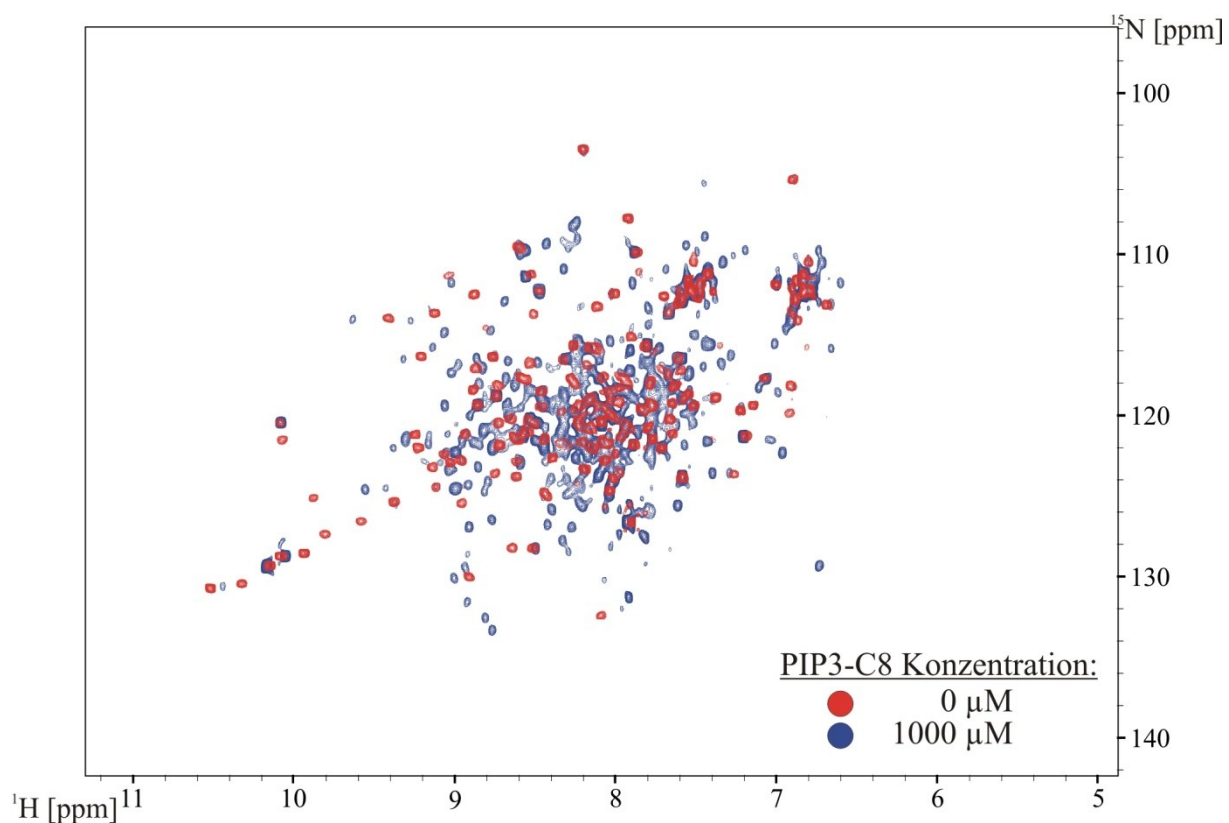
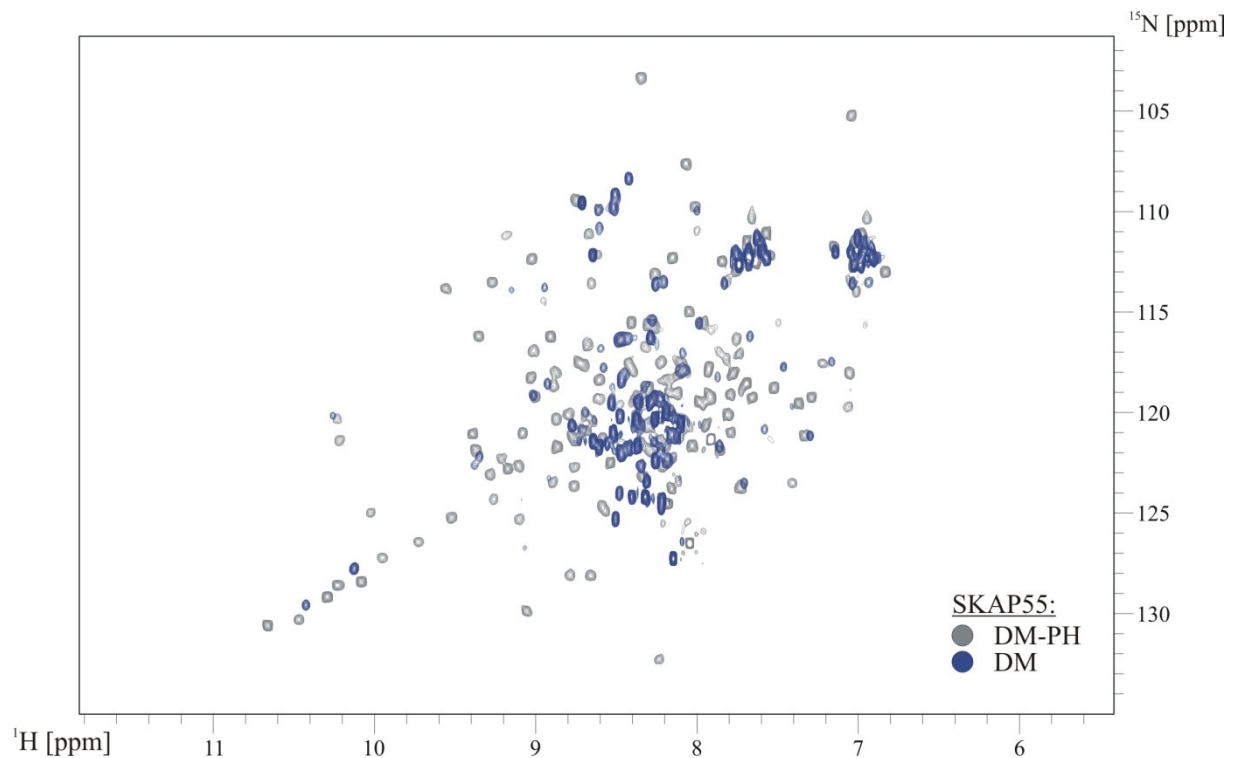


Abbildung 48:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des SKAP55 DM-PH-Konstruktes ohne und mit 1 mM PIP3-C8.

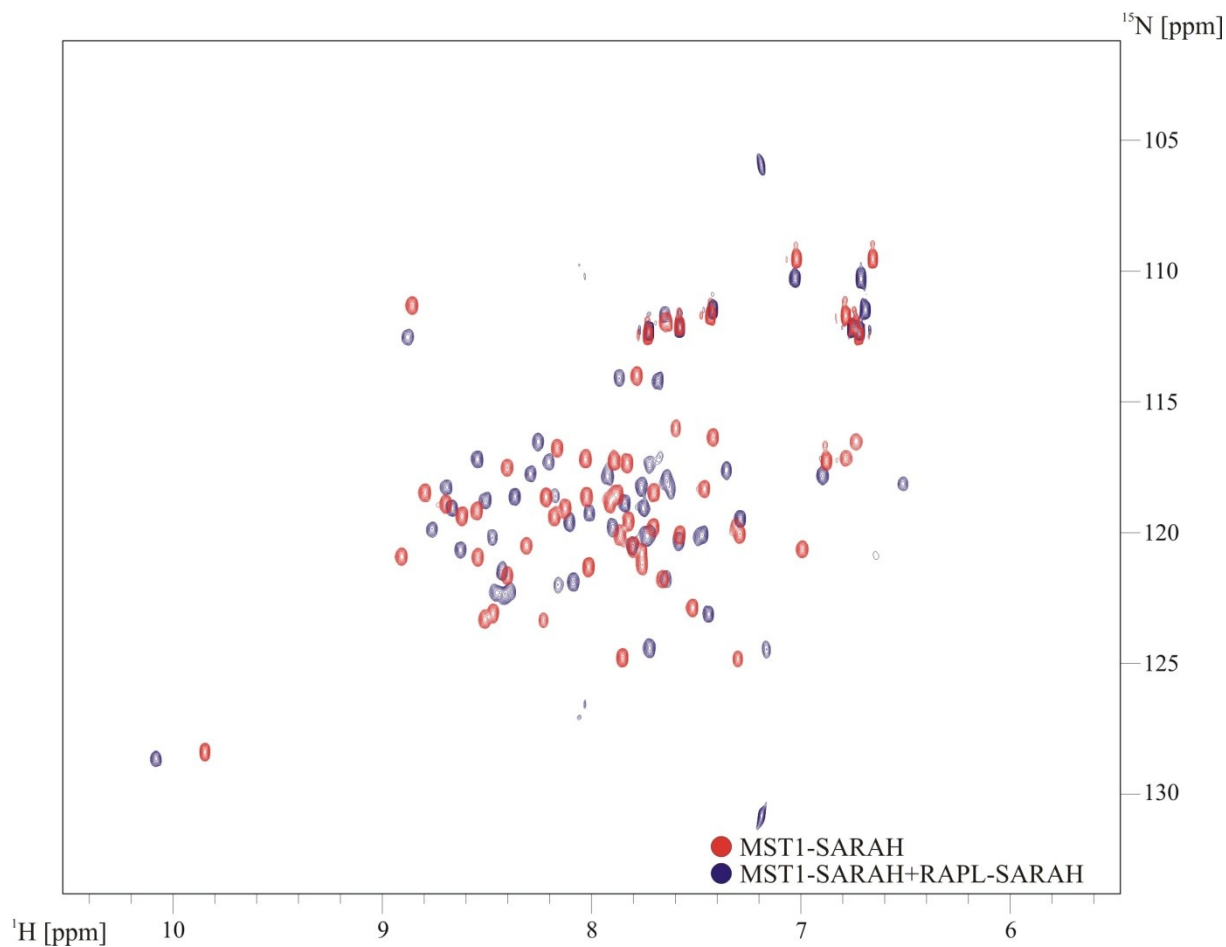
#### 4.5.11 SKAP55 DM-Domänen-Interaktion mit der RAPL-SARAH-Domäne

Die von Raab et al. 2011 beschriebene Interaktion des SKAP55 N-Terminus mit der RAPL-SARAH-Domäne wurde mittels NMR näher untersucht. Von SKAP55 wurde die N-terminal gelegene Dimerisierungsdomäne exprimiert und aufgereinigt. Die DM-Domäne alleine zeigt bis auf geringe Verschiebungen ein dem SKAP55 DM-PH-Konstrukt gleiches  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum (siehe Abbildung 49). D.h., es nimmt sowohl als einzelne Domäne als auch in Fusion mit der PH-Domäne eine ähnliche Struktur an.



**Abbildung 49:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der SKAP55 DM-Domäne (1-104). Überlagerung des SKAP55 DM-PH-Konstruktes mit dem DM-Domänenkonstrukt (blau).

Um die Bindungskompetenz der RAPL-SARAH-Domäne zu prüfen, wurde ein NMR-Bindungsexperiment mit der MST1-SARAH-Domäne durchgeführt und mit den publizierten Spektren verglichen. Das Spektrum der MST1-SARAH-Domäne zeigt chemische Verschiebungen, die mit den publizierten Spektren identisch sind (siehe Abbildung 50, [141]). D.h., die hier verwendete RAPL-SARAH-Domäne ist nativ gefaltet und bindungskompetent.



**Abbildung 50:** Interaktion der RAPL-SARAH-Domäne mit der MST1-SARAH-Domäne. Gezeigt ist die Überlagerung der <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektren der isotopenmarkierten MST1-SARAH-Domäne ohne Ligand (100 μM in rot) und nach Zugabe der unmarkierten RAPL-SARAH-Domäne (600 μM in blau).

Im HSQC-Spektrum der SKAP55 DM-Domäne wurden bei Zugabe der RAPL-SARAH-Domäne nur geringe Verschiebungen beobachtet (siehe Abbildung 51). Für die zehn sich am stärksten verschiebenden Signale ergeben sich  $K_D$ -Werte zwischen 41 und 2339 μM, mit einem Mittelwert von  $570 \pm 660$  μM. Die großen Unterschiede der  $K_D$ -Werte sowie der große Fehler zeigen, dass diese Werte nicht in sich schlüssig und nicht belastbar sind. Die Verschiebungen lassen sich sowohl durch eine schwache und lokale Bindung erklären, können aber auch auf Effekte, wie z.B. geringe pH-Wert-Veränderungen oder geringe strukturelle Veränderungen durch die hohe Proteinkonzentration in der Lösung, zurück geführt werden. Eine Bindung der RAPL-SARAH-Domäne an die SKAP55 DM-Domäne konnte in diesem Versuchsaufbau nicht bestätigt, aber auch nicht widerlegt werden.



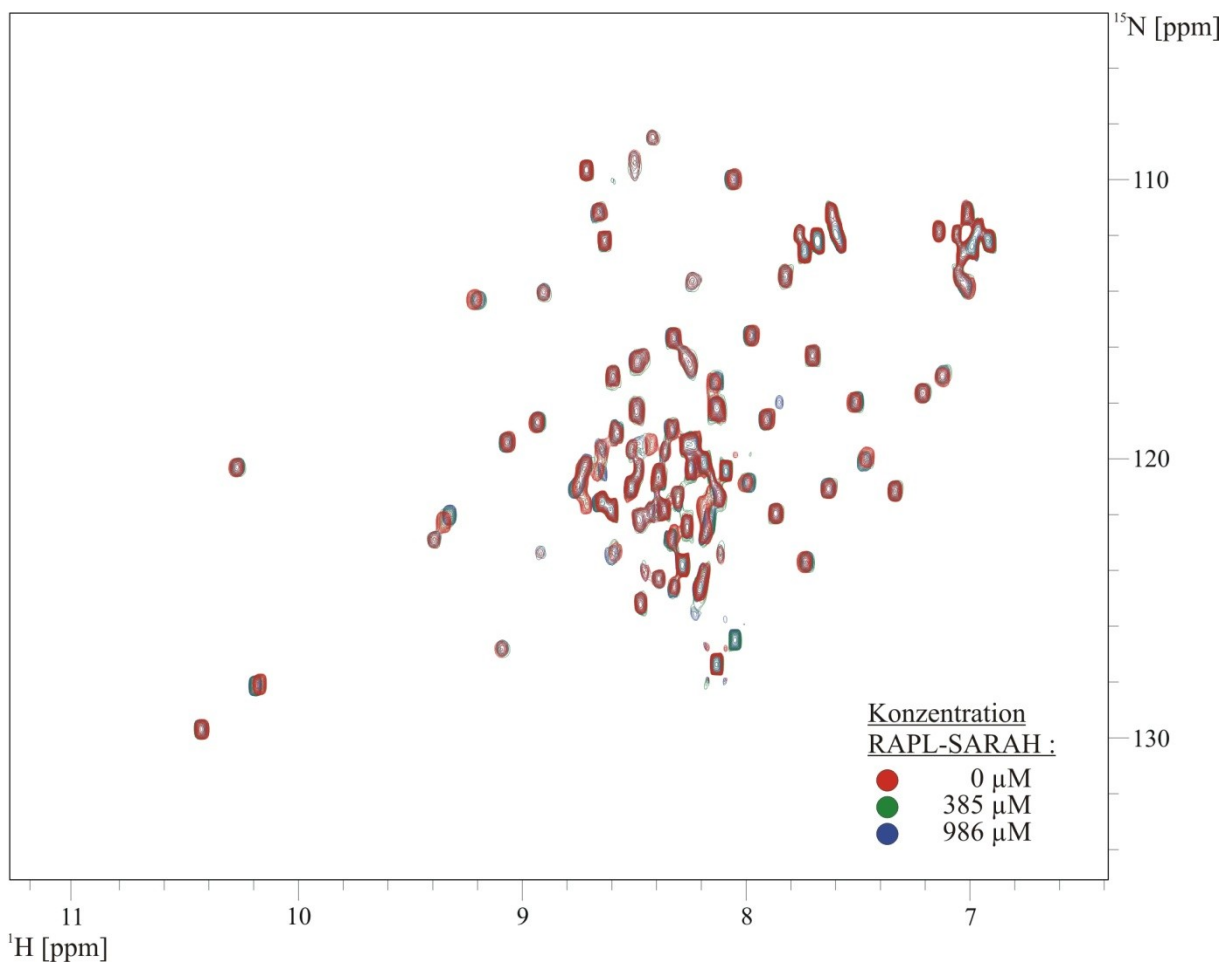
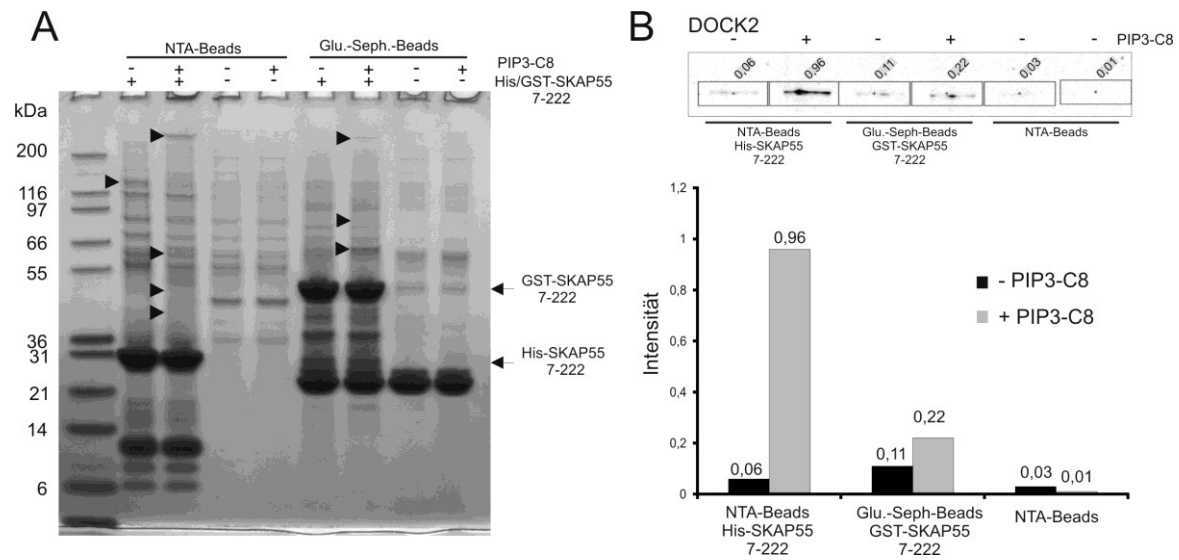


Abbildung 51:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der Titration der SKAP55 DM-Domäne (AS 1-104, 110  $\mu\text{M}$ ) mit der RAPL-SARAH-Domäne.

#### 4.5.12 SKAP55-Pulldown in Anwesenheit von PIP3-C8

Für SKAP-HOM wurde eine Aufhebung der Autoinhibition durch Bindung von Phosphoinositolphosphatgruppen an die PH-Domäne beschrieben. Um die mögliche Aufhebung des autoinhibierten Effekts der Lipidinteraktion mit der SKAP55 PH-Domäne und möglicher Interaktionspartner quantitativ zu untersuchen, wurde der SKAP55 N-Terminus an Beads gebunden und mit Jurkat-Lysat inkubiert. Eine Probe wurde mit 1 mM PIP3 Lipid inkubiert, um eine Aufhebung der Autoinhibition herbeizuführen und die Bindung von Interaktionspartnern an den N-Terminus zu ermöglichen. PIP3 wurde gewählt, da die IP4-Kopfgruppe die stärkste Bindungskonstante an die PH-Domäne aufwies und somit am ehesten eine Aufhebung der inhibitorischen Bindung erzielen könnte.



**Abbildung 52: Pulldown mit Lysat von Jurkat-Zellen des N-terminalen SKAP55 mit und ohne Phospho-lipidzugabe von PIP3-C8. A) SDS-PAGE, B) Western-Blot.**

Der Vergleich des Pulldown in An- bzw. Abwesenheit von PIP3-C8 zeigt im Coomassie-Gel unterschiedliche Proteinbandenmuster (siehe Abbildung 52, Pfeile). Diese Unterschiede sind nicht auf unspezifische Interaktionen mit der Ni-NTA-Matrix zurückzuführen, da die Kontrolle der Matrix ohne SKAP55 keine Unterschiede in den Proben mit und ohne PIP3-C8-Zugabe zeigte (siehe Abbildung 52). Das in einer massenspektrometrischen Untersuchung als Interaktionspartner beschriebene Protein DOCK2 wurde im Western-Blot nachgewiesen. Durch die Zugabe des Phosphoinositolphosphats zum His- oder GST-Fusionskonstrukt des SKAP55 DM-PH-Konstruktes wurde DOCK2 um das 16- bzw. 2-fache aus Jurkat-Lysat an den Beads angereichert (siehe Abbildung 52, B). Ob es sich um eine direkte Interaktion handelt, ist durch weitere Experimente zu bestätigen.

## 5. Diskussion

Eine erfolgreiche Immunantwort ist von der T-Zell-Migration in Lymphknoten und in Infektionsherde abhängig. Die Extravasation der T-Zellen ins Gewebe und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wird maßgeblich vom Integrin LFA-1 vermittelt. Die Aktivierung des Integrins wird durch den Komplex aus ADAP und SKAP55 reguliert (siehe Abbildung 4). Die Rekrutierung des Komplexes an die Plasmamembran sowie die Komplexformierung sind entscheidende Schritte bei der Integrinaktivierung. Über die molekularen Mechanismen der Rekrutierung, Komplexformierung und Wirkungsweise des Komplexes aus ADAP und SKAP55 ist wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde daher die Komplexformierung sowie die mögliche Regulation und Rekrutierung durch Phospholipidbindung untersucht.

### 5.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung des ADAP-SKAP55-Komplexes

Für die strukturelle Charakterisierung mit NMR und mit Kristallographie ist gereinigtes Protein im mg-Mengenbereich nötig. Um ausreichende Proteinmengen zu erhalten, wird das Protein in der Regel rekombinant überexprimiert. Bisher beschreibt keine Publikation die Expression von Volle-Länge-Proteinen von ADAP und SKAP55 für strukturelle Untersuchungen. Die rekombinante Überexpression und Aufreinigung wurde in dieser Arbeit erfolgreich etabliert. In bisherigen Studien wurde ADAP meist in Jurkat-Zellen oder primären humanen Zellen exprimiert, um die Funktionsveränderung durch Mutation bzw. Interaktionspartner in Immunpräzipitations-Experimenten zu charakterisieren.

Versuche, sowohl ADAP als auch SKAP55 als Volle-Länge-Konstrukte in *E. coli* in löslicher Form überzuexprimieren, waren nicht erfolgreich. Entweder zeigten die Konstrukte keine Expression oder befanden sich in der unlöslichen Pelletfraktion (siehe Abbildung 17). Durch Koexpression von ADAP und SKAP55 in Insektenzellen konnten erstmals humanes ADAP und humanes SKAP55 als Komplex rekombinant überexprimiert und aufgereinigt werden.

Die stabile Bindung von ADAP an SKAP55 ermöglichte eine Koaufrreinigung (siehe Abbildung 20). Die Koexpression mit dem Baculovirus-Expressionssystem zeigte eine höhere Expression von ADAP im Vergleich zu SKAP55. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Promotoren PH (Polyhedrin) für ADAP bzw. p10 für SKAP55 zurückzuführen. Aufgrund der Einschränkung der verfügbaren Restriktionsschnittstellen

und der potentiellen Schnittstellen innerhalb der Konstrukte konnten die Promotoren nicht variiert werden. Zudem entspricht dies den in T-Zellen beschriebenen Beobachtungen, dass SKAP55 durch Bindung an ADAP stabilisiert wird und konstitutiv mit ADAP assoziiert vorliegt [111]. ADAP konnte alleine als Volle-Länge-Konstrukt mit dem Baculovirus-System in Insektenzellen exprimiert werden.

Versuche, SKAP55 ohne ADAP zu exprimieren, zeigten im Western-Blot nur eine sehr schwache Expression. Die Koaufrreinigung des ADAP-SKAP55-Komplexes erfolgte durch die hochaffine Bindung von Strep-SKAP55 an die Strep-Tactin-Säule. Anschließend wurde der Komplex mittels Gelfiltration weiter gereinigt. Das Chromatogramm sowie die dynamische Lichtstreuung zeigten größere Komplexe bzw. Aggregate (siehe Abbildung 21) als für einen 1:1-Komplex erwartet. Dass es sich bei dem rekombinant exprimierten Protein um einen höher oligomeren Komplex handelt, wurde durch BN-PAGE, Gelfiltration, dynamische Lichtstreuung, GraFix und Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Zusammensetzung des Komplexes aus ADAP und SKAP55 wurde durch SDS-PAGE, Western-Blots sowie Massenspektrometrie bestimmt. Die Assoziation von ADAP und SKAP wurde mehrfach in der Literatur dokumentiert, jedoch wurde bisher in keiner Publikation ein höher oligomerer Komplex von ADAP und SKAP55 beschrieben. Die Stöchiometrie war bisher unbekannt und wurde daher in dieser Arbeit weitergehend charakterisiert.

### **5.2 Stöchiometrie und Aufbau des ADAP-SKAP55-Komplexes**

Die rekombinante Expression und Aufreinigung des Komplexes aus ADAP und SKAP55 ermöglichte die Bestimmung der Masse und somit der Stöchiometrie des Komplexes. Die durch Blue Native PAGE, dynamische Lichtstreuung und analytische Gelfiltration bestimmten Massen von ca. 480, 1400, 1100 kDa sind um ein Vielfaches größer als die mittels Hochmassen-MALDI-ToF-Analyse bestimmte Masse von 259,858 kDa. Die Unterschiede der Massenbestimmungen lassen sich dadurch erklären, dass die Massenspektrometrie nicht von der Partikelform beeinflusst wird, wohingegen die anderen Methoden sich auf sphärische Partikeln bzw. globuläre Proteine beziehen. Dass es sich beim Komplex aus ADAP und SKAP55 nicht um einen sphärischen Komplex handelt, zeigt die Rekonstruktion des Komplexes, basierend auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 34). Bedingt durch die Donut-ähnliche Form ist der hydrodynamische Radius größer als für einen Komplex dieser Molekülmasse bei globulärer Form anzunehmen ist. Daraus ergeben sich in der Berechnung der Molekülmasse mit den zuvor erwähnten Methoden höhere Werte. Die Gesamtmassenbestimmung des Komplexes mittels MALDI-ToF-Analyse ist ebenfalls

begrenzt. Diese Methode bestimmt die Masse für den durch Kreuzvernetzer stabilisierten Komplex. Die Masse des Kreuzvernetzers muss anschließend herausgerechnet werden, was die Genauigkeit dieser Methode u.a. limitiert.

Mit der Charakterisierung der Dimerformierung des SKAP55 N-Terminus (siehe 4.3.1) ergibt sich für den Komplex aus His-ADAP und Strep-SKAP55 eine Stöchiometrie von zwei SKAP55 zu zwei ADAP Molekülen pro Komplex. Die Komplexformierung *in vivo* wurde durch ein ähnliches Laufverhalten des rekombinanten Komplexes im Vergleich zum Komplex aus dem Lysat primärer humaner T-Zellen in der Blue Native PAGE nachgewiesen (siehe 4.2.2).

Die Analyse mit einem Vorhersageprogramm (Coils) zeigt insbesondere für die Sequenz vor der hSH3<sup>N</sup>-Domäne multimerbildende Sequenzen voraus (siehe Abbildung 64). Die vermessenen Konstrukte, die jeweils die multimerbildende Sequenz von Position 460-503 beinhalten, zeigten ein um den Faktor 2-3 höheres Molekulargewicht (siehe Tabelle 9), als für das Monomer erwartet wird. In der Hochmassenspektrometrie wurden in der His-ADAP-Probe neben Signalen für ein Monomer auch Massenpeaks für das Dimer und in sehr geringen Anteilen für ein ADAP-Trimer detektiert.

Es ist davon auszugehen, dass ADAP über die N-terminal zu der hSH3-Domäne liegende Sequenz multimerisiert. Diese Sequenz schließt eine für ADAP vorhergesagte Kernlokalisationssequenz (NLS) ein. Für die Mammalian STE20-like Kinase (MST1) wurde eine Dimerisierung beschrieben, die zu einem Verbleib des Dimers im Zytoplasma führt. Als Monomer sowie durch Phosphorylierung wird MST1, vermittelt durch eine NLS, schnell in den Zellkern transportiert [142]. Für ADAP wäre ein ähnlicher Mechanismus denkbar. Durch Phosphorylierung des Multimers wird dieses aufgelöst, die potentielle NLS erkannt und ADAP in den Zellkern transportiert. Das Tyrosin 462 (YEDI-Motiv) im Bereich der vorhergesagten multimerbildenden Sequenz in ADAP weist eine hohe Phosphorylierungswahrscheinlichkeit auf (siehe Dissertation Marc Sylvester, [93]). Injektionsversuche von Marc Sylvester in HeLa-Zellen mit in *E. coli*-exprimierten NLS-hSH3-Konstrukten zeigten keine Kernlokalisierung. Diese Beobachtung könnte auf der Multimerisierung und der fehlenden Phosphorylierung, wie für MST1 beschrieben, beruhen. Basierend auf massenspektroskopischen Analysen, Fraktionierungsanalysen und immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen postulierte Roland Lehman in seiner Dissertation eine mögliche Lokalisation von ADAP im Zellkern [143]. Das in dieser Arbeit gereinigte ADAP aus Insektenzellen wies im Phosphotyrosin-spezifischen Western Blot keine Phosphorylierung auf. Weiterführende Experimente mit phosphoryliertem ADAP,

z.B. durch die Fyn-Kinase, wären insbesondere bezüglich der Multimerisierung und der möglichen Strukturveränderungen des ADAPs und des ADAP-SKAP55-Komplexes interessant.

Für den N-terminalen Bereich in SKAP55 wurde durch Gelfiltration und dynamische Lichtstreuung eine Dimerisierung gezeigt (siehe 4.3.1). Die verhältnismäßig breiten NMR-Resonanzen des DM-PH-Konstruktes weisen auch auf einen höhermolekularen Komplex hin. Wu et al. beschreiben ebenfalls eine Dimerisierung für SKAP55, führen dies jedoch in Immunpräzipitationsexperimenten auf die Bindung der am C-Terminus gelegenen SH3-Domäne an eine prolinreiche Sequenz in SKAP55 zurück [144]. Im Anhang der von Swanson et al. publizierten SKAP-HOM-Struktur wurde für SKAP55 wie in der vorliegenden Arbeit eine Dimerisierung durch den N-Terminus mittels dynamischer Lichtstreuung nachgewiesen. Ein Homologie-Modell der N-terminalen Domäne des SKAP55 auf Grundlage der SKAP-HOM-Struktur (PDB: 1U5E) zeigt unter anderem unterschiedliche Aminosäuren zwischen SKAP55 und SKAP-HOM in Positionen, die sich im Modell gegenüber liegen. In SKAP-HOM befindet sich in Helix 1 an Position 24 ein Valin. Dem gegenüber befindet sich in Helix 2 an Position 45 ein Isoleucin. In SKAP55 befinden sich an diesen Positionen ein Alanin und ein Phenylalanin (siehe Tabelle 12).

Das Einfügen von Punktmutationen an diesen Positionen, d.h. V24D, V28E sowie F27D, inhibierte die Dimerbildung von SKAP-HOM [107].

Helix 1		Helix 2	
SKAP-HOM	SKAP55	SKAP-HOM	SKAP55
V24	A17	I52	F45
V28	L21	L48	I41

**Tabelle 12: Gegenüberstellung der in der Helix 1 und 2 gegenüberliegenden Aminosäuren der SKAP-HOM-Struktur (PDB: 1U5E) im Vergleich zum SKAP55-Homologie-Modell**

Aufgrund dieser Mutationen ist davon auszugehen, dass diese Aminosäuren entscheidend für die Dimerisierung sind und SKAP55 und SKAP-HOM keine Heterodimere bilden können. Zudem wurde gezeigt, dass SKAP-HOM in primären humanen T-Zellen nicht die Funktionen von SKAP55 in der Chemokin-induzierten Migration ersetzen kann [99]. Expressionsversuche des in *E. coli* gut exprimierenden SKAP55-Konstruktes (DM-PH) mit den Domänengrenzen 7-222 mit Mutationen der SKAP-HOM-homologen Position, d.h. A17D, F20D und L21E, zeigten weder in der löslichen noch unlöslichen Fraktion eine

Expression. Diese Punktmutationen scheinen einen großen Effekt auf die Expressionsfähigkeit des Proteins, zumindest in *E. coli*, zu haben.

### 5.3 Elektronenmikroskopisches Strukturmodell des ADAP-SKAP55-Komplexes

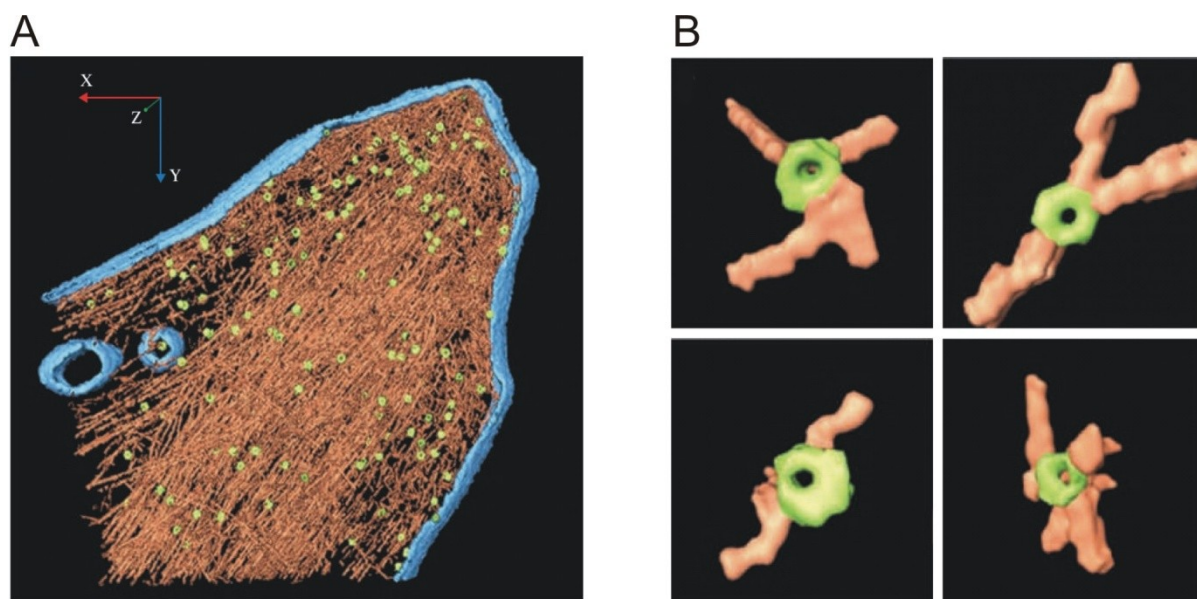
Durch Stabilisierung des Komplexes aus ADAP und SKAP55 mit Glutardialdehyd im linearen Sucrosegradienten konnten Einzelpartikel im Elektronenmikroskop abgebildet werden (siehe Abbildung 29). His-ADAP und der Komplex aus His-ADAP und Strep-SKAP55 wird in Fraktionen unterschiedlicher Sucrosekonzentration des linearen Gradienten fraktioniert (siehe Abbildung 28). Der ADAP-SKAP55-Komplex findet sich in höheren Sucrosekonzentrationen als ADAP allein. Dies begründet sich in den unterschiedlichen Massen der Komplexe, d.h. durch die Bindung von Strep-SKAP55 an His-ADAP. Die Analyse des Komplexes aus SKAP55 und verkürztem ADAP und zeigt Stabilisierung durch die GraFix-Methode (siehe Abbildung 28). Die anhand des Massenmarkers abgeschätzte Masse dieses stabilisierten Komplexes lässt sich ebenfalls mit einer 2:2 Stöchiometrie erklären.

Die selektierten Einzelpartikel sowohl des ADAP als auch des ADAP-SKAP55-Komplexes und die daraus gebildeten Klassen zeigen ringförmige Strukturen sowie mögliche Seitenansichten einer Ringstruktur. Die mit der „common line“-Methode rekonstruierten Modelle für ADAP mit und ohne SKAP55 zeigen eine Donut-ähnliche Struktur mit gleichem Radius aber unterschiedlicher Dichte im Zentrum und Rand. Die Chiralität des Strukturmodells kann mit der Methode nicht bestimmt werden. Durch die „Random Connical Tilt“-Methode könnte die Struktur sowie deren Chiralität bestätigt werden. Prinzipiell ist die 3D-Rekonstruktion aufgrund der geringen Größe bzw. Masse des ADAP-SKAP55-Komplexes und einer nicht offensichtlichen Symmetrie erschwert, so dass aufgrund der für die Rekonstruktion verwendeten geringen Partikelzahl nur von einem Initialmodell gesprochen werden kann. Die nur geringen Unterschiede zwischen den beiden Modellen von ADAP-SKAP55 im Komplex bzw. ADAP allein lässt sich mit einer möglichen hohen strukturellen Flexibilität des zusätzlichen SKAP55 erklären. Diese führt zu einer Verteilung der Dichte, die bei zu geringer Partikelzahl nicht als eine eigene Klasse erkannt und daher bei Mittelung der Klasse nicht als Dichte abgebildet wird. Zur Erfassung von flexiblen Bereichen bzw. Zuständen mit unterschiedlichen Bindungspartnern sind mehr Partikelaufnahmen nötig.

Die in dieser Arbeit vorgestellte, initiale Struktur von ADAP und dem ADAP-SKAP55-Komplex ist einer von Patla et al. beschriebenen Struktur sehr ähnlich. In der

Veröffentlichung wurden die Zell-Matrix-Adhäsionsflächen (focal adhesions) in REF52-Zellen bezüglich der Integrin-assoziierten Multiproteinkomplexe im Zytoplasma untersucht. Die Zellen wurden auf Fibronectin beschichteten elektronenmikroskopischen Trägernetzen adhärent wachsend kultiviert. Anschließend wurden die Adhäsionsflächen mittels tomographischer Aufnahmen untersucht.

Die 3D-Rekonstruktion der tomographischen Schnitte zeigt Filamente, die an den Fibrillen-Membran-Interaktionsflächen mit runden Donut-ähnlichen Partikeln von 20-30 nm Durchmesser assoziiert sind, sowie Partikel mit geringerer Anzahl auch außerhalb der focalen Adhäsionsflächen (siehe Abbildung 53, A).



**Abbildung 53: 3D-Oberflächendarstellung der tomographischen Rekonstruktion der Adhäsionsregion aus Patla et al. 2010, ausgewählte Bilder aus Abbildung 1 und 2. A) Oberflächendarstellung der Focaladhäsion aus Sicht der Zelladhäsionsfläche. B) Ausschnitte der Rekonstruktion von Knoten. Färbung der Membranen in blau, vermutliches Aktin in braun und die wahrscheinlichen adhäsionsassoziierten Partikel in grün [145].**

Unterschiedliche Orientierungen zu den vermutlichen Aktinfilamenten sowie Variationen der Partikelformen lassen auf unterschiedliche Komplexkompositionen schließen. Die Vermittlung der Assoziation des Zytoskeletts in der Zelle mit der extrazellulären Matrix erfolgt über die Plasmamembran mittels der Integrine. Eben an solchen Stellen wurden die Donut-artigen Partikel in Interaktion mit der Plasmamembran rekonstruiert. Eine direkte Interaktion mit den Integrinen, bzw. die Frage, ob weitere Proteine in die Interaktion involviert sind, konnte von Patla et al. nicht aufgelöst werden.

Die von Patla et al. 2010 beschriebenen Donut-artigen Strukturen weisen starke Ähnlichkeiten mit den in dieser Arbeit berechneten ADAP- und ADAP-SKAP55-



Strukturen auf (siehe Abbildung 34). ADAP und SKAP55 sind mit der Regulation der Integrine im Zytoplasma assoziiert. Der in den „focal adhesions“ beschriebene Komplex von Patla et al. findet sich in Clustern in direkter räumlicher Nähe zu den Integrinen an der Zytoplasmamembran. Zusätzlich interagiert dieser Komplex in den Tomographieaufnahmen direkt mit der Membran des Zytoplasmas. Patla et al. identifizierten Komplexe sowohl an der Membran als auch im Zytoplasma [145]. Für den ADAP-SKAP55-Komplex wurde eine Rekrutierung an die Plasmamembran nach T-Zell-Aktivierung und damit einhergehend eine Integrinaktivierung beschrieben, siehe 1.11.

Der Komplex in den tomographischen Aufnahmen zeigt direkte Assoziation mit Filamenten, die von den Autoren als vermutliche Aktinfilamente bezeichnet werden. Die im GraFix-Gradienten fixierten Proben mit höherer Sucrosekonzentration (siehe Abbildung 30) zeigten teilweise filamentöse Strukturen. Für die Struktur aus den „focal adhesions“ wurden Interaktionen mit tangentialen Fibrillen berichtet. Ob es sich bei den in dieser Arbeit beobachteten Fibrillen um ADAP-SKAP55 in einer anderen Konformation oder Kontaminationen wie Aktin aus den Insektenzellen handelt, kann nicht beantwortet werden. Eine mögliche Erklärung für diese fibrillären Strukturen wären z.B. die lokal hohe Proteinkonzentration und damit verbundene Aggregation oder die Assoziation von ADAP-SKAP55-Multimeren. Aufgrund der geordneten und systematisch wiederkehrenden Muster ist dies unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit der Identifizierung der sich auf dem Netzchen befindenden Partikel wäre eine massenspektroskopische Analyse, wie in einer Publikation von Richter et al. beschrieben wurde [146]. ADAP kolokalisiert in Mastzellen nach Rezeptorstimulation in den filamentösen und aktinreichen Zellausstülpungen, den „membrane ruffles“ [147, 148]. Für ADAP wurde das Aktin regulierende Protein Nck als ein Interaktionspartner identifiziert. Zusätzlich wird ADAP vermutlich durch die EVH1-Domäne des EVL gebunden, das an der Aktinpolymerisierung beteiligt ist (siehe 1.8) [79].

Die Größe der mit Tomographie bestimmten Partikel wurde zu  $25 \pm 5$  nm bestimmt. Dies ist ein zweifach so hoher Wert im Vergleich zu den rekombinant exprimierten und aufgereinigten ADAP bzw. ADAP-SKAP55-Komplexen mit einer Größe von ca. 11 nm. Für den ADAP-SKAP55-Komplex wurde in T-Zellen eine Assoziation von weiteren Proteinen mit den zytoplasmatischen Enden der Integrine beschrieben. Im Komplex mit der Integrin- $\beta$ -Kette wurden RIAM/MST1/Kindlin-3/Talin und in Verbindung mit der  $\alpha$ -Kette RAPL/MST1 im Komplex mit ADAP und SKAP55 nachgewiesen [42]. Diese in der Rekonstruktion des rekombinanten ADAP-SKAP55-Komplexes fehlenden Proteine könnten die Größenunterschiede erklären. Die Zusammensetzung der Partikel in der Tomographie ist unbekannt. Wurden die Zellen mit Rho-kinase-, Kinase- oder

Actinomyosin-Inhibitor behandelt, reduzierte sich die Größe der in den „focal adhesions“ assoziierten Partikel auf 15 nm. Diese entspricht eher der Größe des ADAP-SKAP55-Komplexes. Bei den verwendeten REF52-Zellen handelt es sich um eine Fibroblastenzelllinie, die kein ADAP bzw. SKAP55 exprimiert. Es könnte sich um eine strukturell konvergent entwickelte Struktur handeln, welche als Verbindungsglied zwischen den Integrinen und dem Aktinzytoskelett dient.

Das in dieser Arbeit gezeigte Initialmodell enthält keine weiteren Proteine. Interessant wäre daher die Zugabe von weiteren Komponenten des Inside-out-Signalweges sowie von Zytoskelett-assoziierten Proteinen, um den Komplex weiter aufzubauen und mit den tomographischen Aufnahmen zu vergleichen. Da ADAP und SKAP55 nach T-Zell-Aktivierung phosphoryliert werden, wäre es zudem aufschlussreich zu untersuchen, ob die Phosphorylierungen z.B. durch die Fyn-Kinase zu strukturellen Änderungen führen.

### 5.4 Kristallisationsversuche

Der Prozess der Proteinkristallisation ist trotz des heute verfügbaren Wissens immer noch kein rational planbarer Prozess. Um die Chancen einer Kristallisation zu erhöhen, wird ein möglichst großes Spektrum an unterschiedlichen Bedingungen getestet. In einer zusammenfassenden Übersicht von Strukturprojekten mit über 100 000 Zielkonstrukten konnten 25,0 % der Zielkonstrukte aufgereinigt und nur bei einem Anteil von 3,6 % die Struktur erfolgreich mit der Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden [149].

In dieser Arbeit wurden systematisch unterschiedliche Salz-, PEG-, Lösungsmittel- und pH-Kristallisationsbedingungen sowie bekannte erfolgreiche Kristallisationsbedingungen und Zusätze bei 4°C und 20°C getestet. Kristallisationsansätze mit Volle-Länge-Proteinen von ADAP und SKAP55 zeigten bei den unterschiedlichsten Kristallisationsbedingungen keine Proteinkristalle. Auch die durch limitiert-proteolytischen Verdau bestimmten, exprimierten und aufgereinigten kürzeren Konstrukte zeigten keine Kristallbildung. Die eingesetzten Konstrukte erfüllten die Voraussetzungen einer homogenen Probe sowie einer ausreichenden Proteinkonzentration, wie in Präzipitationstests nachgewiesen wurde.

Mögliche Gründe für die erfolglosen Kristallisationsversuche können die Proteingröße, die als unstrukturiert vorhergesagten Sequenzen in ADAP sowie mögliche Coiled-Coil- und prolinreiche Sequenzen sein [150]. Da Vorhersageprogramme nicht alle Sekundärstrukturelemente und Domänen erkennen, wurde von vornherein nicht ausgeschlossen, dass der Interaktionspartner SKAP55 zur induzierten Stabilisierung und Ausbildung neuer

Strukturen führt und dadurch die Kristallisation begünstigt [151, 152]. Die induzierte Stabilisierung wurde durch den limitiert proteolytischen Verdau adressiert. In der Behandlung mit den Proteasen zeigt ADAP eine stärkere proteolytische Spaltung als SKAP55. Dies lässt sich mit den längeren Abschnitten und der für die Proteasen zugänglichen flexiblen Sequenzen erklären. Für ADAP wurden für die N-terminale Sequenz vor der hSH3<sup>N</sup>-Domäne Coiled-Coil-Strukturen vorhergesagt. In dieser Arbeit konnten multimerisierende Eigenschaften dieser Sequenz nachgewiesen werden. Versuche, diese Sequenzabschnitte allein zu kristallisieren, zeigten allerdings keinen Erfolg. Trotz des Tests von ca. 5000 unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen unterschiedlicher Hersteller bei unterschiedlichen Temperaturen und mit unterschiedlichen Expressionskonstrukten konnten keine Proteinkristalle von ADAP und SKAP55 gezüchtet werden.

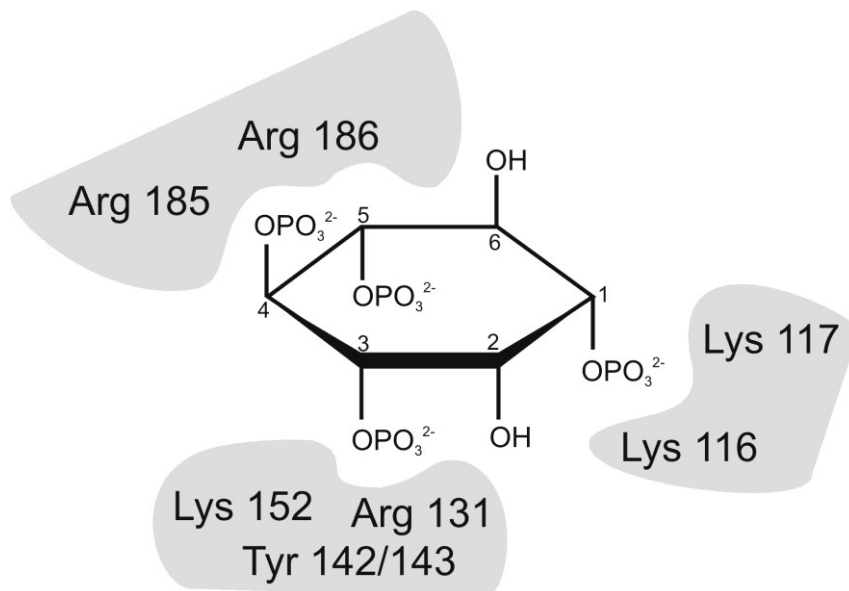
### 5.5 Assignment der SKAP55 PH-Domäne

Von der PH-Domäne von SKAP55 wurden von der Kristallstruktur 1U5D 83 % der Aminosäuren <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Signalen zugeordnet (siehe Abbildung 39). Die Aminosäuren des N-Terminus, des C-Terminus sowie einiger Loop-Regionen konnten nicht zugeordnet werden. Dies beruht vermutlich auf Konformationsgleichgewichten, die zu einer starken Linienverbreiterung der entsprechenden NMR-Resonanzen führen. Die verminderte Anzahl der Signale der mit selektiv markierten Aminosäuren markierten Proben lässt sich ebenfalls mit diesem Relaxationsverhalten sowie mit der Überlagerung von Signalen erklären. Durch die Bindung der Inositolphosphate werden die Loops stabilisiert, wodurch zusätzliche Resonanzen im <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum sichtbar werden (siehe Abbildung 41 und Abbildung 44). Diese Beobachtung wurde z.B. ebenfalls für NMR-Spektren der PH-Domänen des humanen Pleckstrins sowie der Akt-Kinase gemacht. Durch Ligandenzugabe konnten die Loops detektiert und teilweise zugeordnet werden [153, 154]. Dies wäre ebenfalls für die SKAP55 PH-Domäne mit dem am stärksten bindenden IP4 bzw. PIP3-C4 möglich und würde sehr wahrscheinlich zu einem vollständigeren Assignment führen.

### 5.6 Kopfgruppenerkennung und Inositolphosphatbindung der SKAP55 PH-Domäne

Die Zugabe von Inositolphosphaten zur PH-Domäne führt zu konzentrationsabhängigen Signalverschiebungen im <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrum. Die Bindung erfolgt in den β1-β2, β3-β4-, β6-β7-Loopregionen und angrenzenden Sekundärstrukturelementen. Die

Schleifenregionen („Loops“) konnten teilweise nicht zugeordnet werden (siehe Abbildung 38). Dennoch kann aufgrund der Verschiebung der an die Loops angrenzenden und zugeordneten Aminosäuren auf bindungsbedingte strukturelle Änderungen der Loops geschlossen werden sowie auf strukturelle Änderungen innerhalb der angrenzenden Sekundärstrukturelemente.



**Abbildung 54: Modell der beteiligten Aminosäuren der SKAP55 PH-Domäne bei IP4-Bindung.**

Basierend auf der Kristallstruktur der IP4-gebundenen Akt-PH-Domäne, die wie SKAP55 sowohl PIP3 als auch PIP2 bindet [155], sowie auf den beschriebenen Bindungsmotiven wurden mögliche Aminosäuren bei der Inositolphosphatbindung der SKAP55 PH-Domäne mit den beobachteten chemischen Verschiebungen verglichen.

Die PH-Domänen von Grp1, Btk, Dapp1, Akt weisen eine hohe Variabilität in den Bindungsschleifen auf. Für diese PI3-Kinase abhängig Inositolphosphat-bindenden PH-Domänen wurde ein basisches Bindungsmotiv Lys-Xaa<sub>m</sub>-(Arg/Lys)-Xaa-Arg-Xaa<sub>n</sub> (Tyr/N), beschrieben, das mit einem Lysin am C-terminalen Ende des  $\beta$ 1-Stranges beginnt, wobei Xaa jegliche und Xaa<sub>m/n</sub> verschiedene Sequenzlängen beschreiben [58]. SKAP55 enthält eine basische Sequenz der Aminosäuren Glu-Lys<sup>116</sup>-Lys<sup>117</sup>-Ser-Lys-Asp. Bei IP3- und IP4-Zugabe weist in der SKAP55 PH-Domäne das am C-terminalen Ende des  $\beta$ 1-Stranges gelegene Lysin 117 die größten Verschiebungen auf. Auch Lysin 116 könnte an der Bindung beteiligt sein. Lysin 117 weist in die entgegengesetzte Richtung der Bindungstasche. Eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rückgrat des Lysin 117 würde die starke chemische Verschiebung bei Inositolphosphatbindung im <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H-HSQC-Spektrum erklären. Interaktionen zwischen der Amidgruppe des Rückgrates im  $\beta$ 1-

$\beta$ 2-Loop wurden in PH-Domänen für Akt mit dem 1'-Phosphat und in Btk und Grp1 mit dem 5'-Phosphat beschrieben [58]. In der C-terminal gelegenen PH-Domäne des humanen Pleckstrins wurden in NMR-Bindungsstudien ebenfalls bei Inositolphosphatbindung die größten chemischen Verschiebungen am C-Terminus des  $\beta$ 1-Stranges gezeigt [153].

Für ein vermeintliches PtdIns(3,4,5) $P_3$ -Bindungsmotiv wurde in einem Abstand von 6-11 Aminosäuren zu dem basischen Bindungsmotiv eine Arg/Lys-Xaa-Arg-Hyd-Hyd-Sequenz im  $\beta$ 2-Strang der PH-Domäne von Dowler et al. beschrieben, wobei Hyd hydrophobe Aminosäuren bezeichnet [153, 156]. In der PH-Domäne von SKAP55 wird dieses Motiv im  $\beta$ 2-Strang nur in der verkürzten Form Lys-Arg<sup>131</sup>-Trp-Cys gefunden.

Arginin 131 innerhalb dieses Motivs zeigt neben Lysin 116 und 152 die größten Unterschiede in den Verschiebungen im Vergleich zu den ligandgebundenen IP3- bzw. IP4- sowie PIP2- und PIP3-HSQC-Spektren (siehe Abbildung 43, Tabelle 10). Die Unterschiede der chemischen Verschiebung lassen sich auf die 3'-Phosphatgruppe des Inositolrings zurückführen. Die Überlagerung mit dem kokristallisierten IP4 der Akt-PH-Domäne zeigt die räumliche Nähe von Arginin 131 und Lysin 116 (siehe Abbildung 40). Die Bindung des negativ geladenen Phosphats erfolgt durch die basischen Seitenketten des Lysin 116 und Arginin 131, wie der Vergleich der Spektren zeigt und wie sich im Verhältnis des IP4/IP3-Quotienten der chemischen Verschiebung ausdrückt (Abbildung 40 und Abbildung 59). Die umgekehrt stärkere chemische Verschiebung des Lysin 152 bei IP3 gegenüber der IP4-Zugabe könnte auf der stärkeren Beteiligung an der 1'-Phosphatbindung in der IP3-gebundenen Form beruhen.

SKAP55 enthält das für den  $\beta$ 3-Strang und die Inositolphosphatbindung beschriebene Tyrosin in der Sequenz Phe-Tyr-Tyr<sup>142</sup>-Tyr-Ala. Die Resonanzen von Tyrosin 142 und 143 verschieben sich bei Inositolphosphatzugabe, was die Bindung durch eines der Tyrosine nahelegt. Die Interaktion erfolgt vermutlich mit der 4'-Phosphatgruppe des Inositols (siehe Abbildung 43).

Die Phosphatgruppen 4 und 5 werden wahrscheinlich maßgeblich durch Arginin 185 und oder Arginin 186 des  $\beta$ 6- $\beta$ 7-Loop gebunden, wobei die Verschiebung der Resonanzen innerhalb des gesamten Loops auf eine Öffnung der Bindungstasche durch Bewegung des gesamten Loops bei Bindung hinweist (siehe Abbildung 54). Für die PH-Domäne von Akt wurde in Kristallstrukturen für den  $\beta$ 6- $\beta$ 7-Loop eine Positionsveränderung der  $C_\alpha$ -Atome von 7,4 Å in der IP4-gebundenen gegenüber der ungebundenen Struktur beschrieben. Vermutlich ermöglicht diese Konformationsänderung bei Bindung von 3-Phosphoinositiden

die Exposition des Aktivierungsloops und anschließende Akt-Aktivierung durch PDK1-Phosphorylierung [157].

Die Erkennung und Bindung des Inositolphosphats durch die SKAP55 PH-Domäne erfolgt somit an der „klassischen“, für viele PH-Domänen beschriebenen Bindungstasche, die maßgeblich durch die variablen  $\beta$ 1- $\beta$ 2-,  $\beta$ 3- $\beta$ 4- und  $\beta$ 6- $\beta$ 7-Loops gebildet wird. SKAP55 enthält im basischen Motiv des  $\beta$ 1-Strangs mit Ausnahme des Serin 118 alle Aminosäuren an homologer Position, die für die Kopfgruppen-Erkennung des SKAP-HOM vorhergesagt wurde [107]. Da weder für SKAP55 noch für SKAP-HOM eine Kristallstruktur mit Ligand publiziert ist, konnten die Kopfgruppenerkennungen nur aufgrund von Modellen und Sequenzhomologien entwickelt werden (siehe Abbildung 54).

Die aus den chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration bestimmten  $K_D$ -Werte der Liganden PIP3-C4 bzw. der Kopfgruppe IP4 haben mit  $119 \pm 58$  und  $74 \pm 12$   $\mu$ M eine 5- bzw. 8-fach niedrigere Dissoziationskonstante als PIP2-C4 und dessen Kopfgruppe IP3 alleine. Die Phospholipide mit Acylkette zeigen jeweils etwas höhere Bindungskonstanten. Dies könnte sich auf Interaktionen mit dem vorhergesagten Membraninsertionsloop  $\beta$ 1- $\beta$ 2 zurückführen lassen (siehe 5.8). In dieser Arbeit konnte die bevorzugte Bindung der SKAP55 PH-Domäne an IP4 bzw. PIP3-C4 gegenüber IP3 und PIP2-C4 gezeigt werden.

Für SKAP-HOM wurde mittels fluoreszenzmarkierter Kopfgruppen für PIP3 auch eine um den Faktor 5 stärkere Bindung als an das PIP2-Derivat bestimmt. Die Werte liegen mit 8 bzw. 40  $\mu$ M unter den für SKAP55 bestimmten Werten. Diese Unterschiede könnten auf den unterschiedlichen Methoden beruhen. Mittels NMR bestimmte  $K_D$ -Werte sind höher als die mit anderen Methoden bestimmten  $K_D$ -Werte. Für die PH-Domäne von Dynamin wurden für die Bindung der freien Kopfgruppe des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ohne Lipidkette  $K_D$ -Werte zwischen 1,2 und 4,3 mM bestimmt. Durch Dimerisierung änderten sich diese  $K_D$ -Werte nicht. Für Lipidvesikel mit entsprechender Kopfgruppe wurde für das Dimer ein  $K_D$ -Wert von 9  $\mu$ M bestimmt und für das natürlich vorkommende Tetramer ein apparenter  $K_D$ -Wert von 0,1 nM vorhergesagt [158]. D.h. bei Dimerisierung bzw. Multimerisierung führen die Aviditätseffekte zur Verstärkung der Bindung an der Membran. Daher wird der  $K_D$ -Wert *in vivo* für SKAP55 aufgrund des SKAP55-Dimers deutlich höher vorhergesagt als für das Monomer. Zudem wird vermutlich die Bindung an die Membran durch einen Membraninsertionsloop verstärkt (siehe 5.8). Die Lipidbindungseigenschaften der hSH3-Domänen von ADAP führen vermutlich zur zusätzlichen Steigerung des apparenten  $K_D$ -

Werts des ADAP-SKAP55-Komplexes. Aufschlussreich wären weitere Bindungsexperimente in Anwesenheit von Lipiden, wie z.B. in Liposomenassays.

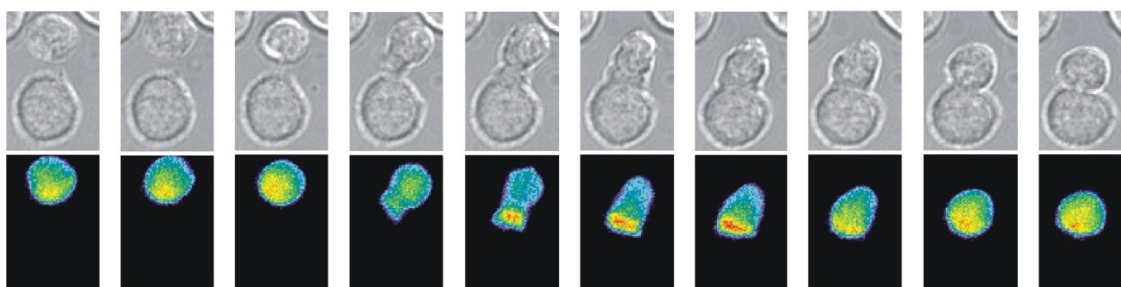
Arginin 131 ist maßgeblich an der Erkennung der 3'-Phosphatgruppe beteiligt. Die Mutation dieser Aminosäure führt zu einer Delokalisation von der Membran (siehe Abbildung 56). Die funktionelle Bedeutung der PIP3-Erkennung wurde durch Mutation des Arginin 131 zudem in mehreren Publikationen untersucht und beschrieben. Für SKAP-HOM wurde durch Mutation der homologen Aminosäure Arginin 140 in Makrophagen gezeigt, dass SKAP-HOM nicht mehr in Membranausstülpungen lokalisiert ist [107]. Durch Mutation von Arginin 131 zu Methionin in SKAP55 (R131M-Mutante) wird nach CD3-Stimulation von Jurkat-Zellen im Vergleich zum Wildtyp weniger SKAP55 und ebenfalls weniger RAPL in der Membranfraktion gefunden. In dieser Publikation zeigen die Zellen eine nahezu normale Rap1-Lokalisation, aber die Bindung an ICAM-1 ist vermindert. Das gleiche Ergebnis wird für den SKAP55-Wildtyp beobachtet, wenn die Zellen mit PI3K-Kinase-Inhibitoren inkubiert werden. Die Membranverankerung des Wildtyps oder der R131M-Mutante von SKAP55 durch Myristylierung führte zu einer Lokalisation von RAPL in der Plasmamembran und einer TCR- sowie PI3K-unabhängigen Aktivierung der Integrine [115]. Die Bedeutung der Rekrutierung von SKAP55 an die Membran wurde bereits durch die Verankerung von ADAP bzw. SKAP55 in der Plasmamembran mit LAT-Fusionskonstrukten gezeigt. Hierbei wurde jedoch im Gegensatz zur vorhergehenden Publikation eine zentrale Rolle des ADAP-SKAP55-Komplexes in der Membranrekrutierung von aktivem Rap1 mittels RIAM beschrieben [41, 108].

Neben dem parallel und/oder zusammenwirkenden RIAM- und RAPL-Signalweg zur Integrinaktivierung hat die Lokalisation des ADAP-SKAP55-Komplexes an die Plasmamembran durch die SKAP55 PH-Domäne einen regulatorischen Effekt auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg, wie in ADAP-defizienten Zellen gezeigt wurde. Nach TCR-Stimulation erfolgt die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors. Diese Aktivierung ist in ADAP-Knock-out-Zellen gestört. Ein Fusionskonstrukt von SKAP55 ohne SH3-Domäne mit Volle-Länge-ADAP führt zu einer Kolo-kalisation der Chimäre an LFA-1 innerhalb von 2-5 Minuten nach CD3/CD28-Stimulation und zu keiner NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Wird in der SKAP55-ADAP-Chimäre die R131M-Mutation eingeführt und die Zelle über den T-Zellrezeptor stimuliert, interagiert die Chimäre mit dem CBM-Signalkomplex und die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wird wiederhergestellt. Die Autoren schließen daraus, dass durch die ADAP-Lokalisation, vermittelt durch SKAP55, entweder die Integrine oder der NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert wird bzw. werden [112]. Da vermutet wird, dass die Integrinaktivierung durch RIAM-Rap1- oder RAPL-Rap1-Bindung an den SKAP55 N-

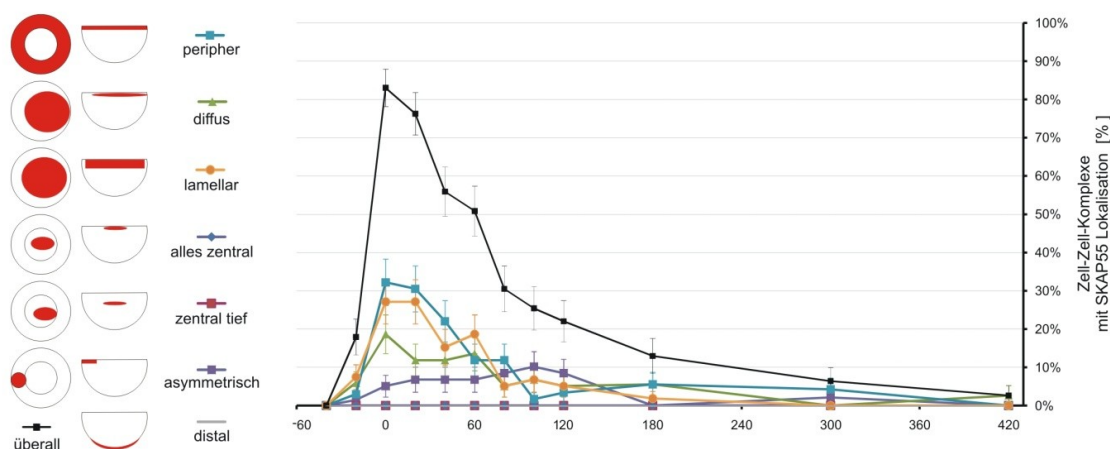
Terminus vermittelt wird, wären eine Chimäre nur mit der SKAP55 PH-Domäne ohne DM-Domäne und deren vermutlich Integrin-bindungsdefizienter Phänotyp zur Bestätigung der Integrinaktivierung sehr interessant.

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Prof. Dr. Christoph Wülfing mit GFP-SKAP55-Volle-Länge-Protein wurde in der zeitabhängigen Clusteranalyse von T-Zellen der Maus eine Kolo­kalisierung insbesondere mit PIP2 sowie PIP3 gezeigt (siehe Abbildung 65). Als Sensor für PIP2- und PIP3 wurden GFP-Fusionskonstrukte der PLC- $\delta$ - bzw. Cytohesin PH-Domänen verwendet [159].

A



B



**Abbildung 55: Zeitliche Lokalisation von GFP-SKAP55 in murinen T-Zell-APC-Komplexen. A) oben: mikroskopische Hellfeldaufnahmen, unten: Fluoreszenzaufnahme des GFP-SKAP-55, Intensität von blau über grün, gelb, rot ansteigend. Zeitabstand der Bilder: 20 Sekunden. T-Zellen: 5C.C7, APCs: CH27, Antigenes Peptid: MCC 10  $\mu$ M, von Professor Dr. C. Wülfing (University of Texas Southwestern Medical Center) [159] siehe auch Abbildung 65.**

Das GFP-SKAP55-Fusionskonstrukt lokalisiert bei der Zell-Zell-Komplexformierung zu über 75% in der Immunologischen Synapse. Der größte Anteil von 33% wird in der Peripherie, d.h. an der Membran der Synapse, aber außerhalb der cSMAC-Region sowie über der kompletten Interaktionsfläche mit etwas Abstand zur Membran im Zellinneren, dem sogenannten Lamellum detektiert (siehe Abbildung 55). Überraschenderweise zeigt SKAP55 in der Clusteranalyse nur eine sehr geringe Kolo­kalisierung mit LFA-1, das sich im



Laufe der Synapsenausbildung in der Peripherie konzentriert. Die fehlende Kolokalisation könnte auf der Abnahme des SKAP55-Signals im Laufe der Messung zurückgeführt werden. Dies erschwert Aussagen über 60 Sekunden hinaus. Insbesondere die zeitabhängige Klassifizierung der ADAP-Lokalisation wäre aufschlussreich, um die Kolokalisation mit SKAP55 und die mögliche Lokalisation der nicht SKAP55-gebundenen Population von ADAP bei der T-Zell-APC-Zell-Komplexbildung zu charakterisieren. Zusätzlich könnten die Lokalisation von RIAM und RAPL und die Verteilung des ADAP/SKAP55-Komplexes zum Verständnis der Funktion der unterschiedlichen Komplexe beitragen.

### 5.7 Inhibition der Lipidbindung von SKAP55 durch die DM-Domäne

Für SKAP-HOM wurde eine Inhibition der Lipidbindung durch die DM-Domäne berichtet. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob dies auch für SKAP55 gilt. Dies wurde mit einem SKAP55 DM-PH-Domänenkonstrukt untersucht. Das SKAP55 DM-PH-Konstrukt unterscheidet sich vom PH-Konstrukt, das für das Assignment verwendet wurde, durch die Erweiterung des Konstruktes zum N-Terminus hin. Dies führt zur Dimerisierung von SKAP55 (siehe 4.3.1). Für SKAP-HOM wurde von Swanson et al. eine Dimerisierung des N-Terminus (DM-Domäne) und eine Inhibierung der Lipidbindung durch diese DM-Domäne berichtet. Um den Einfluss der DM-Domäne auf die Phosphoinositolphospholipid-Bindung zu untersuchen, wurde das SKAP55 DM-PH-Konstrukt NMR-spektroskopisch untersucht.

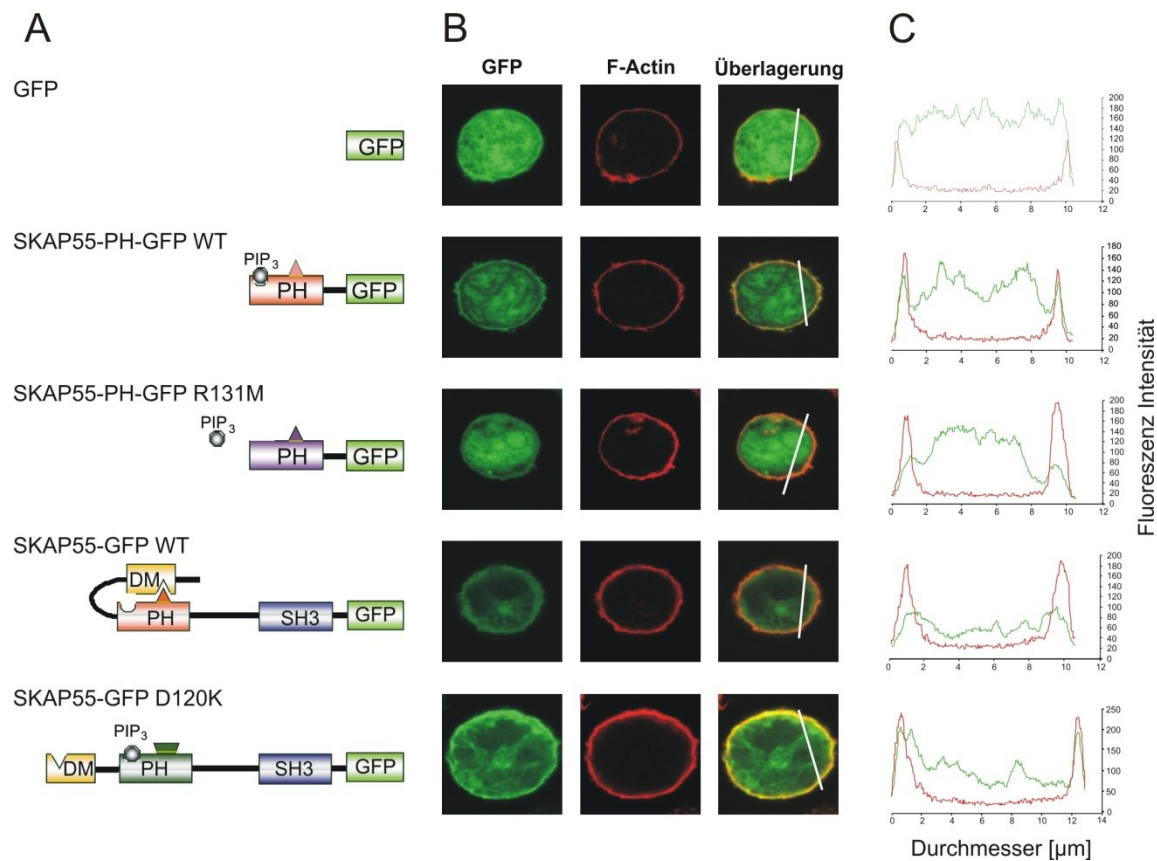
Die NMR-Signale des SKAP55 DM-PH-Konstruktes zeigen im Vergleich zum PH-Konstrukt schwächere Signale. Dies beruht vermutlich auf der Größenzunahme durch Dimerisierung. Durch Titration von Phosphoinositolphosphaten wurde versucht, die  $K_D$ -Werte wie bereits für die PH-Domäne durchgeführt zu bestimmen. Die Bestimmung der  $K_D$ -Werte mittels NMR ist bei diesem größeren Konstrukt durch mehrere Faktoren erschwert. Zum einen ist die Übertragung und Zuordnung aufgrund der zusätzlichen Signale der DM-Domäne nicht eindeutig. Zum anderen sind die Signale im HSQC schwächer und die Verschiebungen bei Inositolphosphatzugabe sehr gering.

Für IP3 und das stärker an das PH-Domänen-Konstrukt bindende IP4 konnten aufgrund der nur sehr geringen Verschiebungen und der damit großen Fehler bei der chemischen Verschiebung keine  $K_D$ -Werte bestimmt werden. Für das DM-PH-Konstrukt von SKAP-HOM wurden  $K_D$ -Werte für PIP2 und PIP3 von 30 und 90  $\mu\text{M}$  bestimmt [107]. In dem verwendeten Fluoreszenz-Polarisationsassay wurden bereits für die PH-Domäne um den Faktor 5 niedrigere Werte bestimmt. Geht man von dem gleichen Einfluss der DM-

Domäne in SKAP55 aus, wäre mit NMR ein  $K_D$ -Wert von mehr als 150  $\mu\text{M}$  zu erwarten gewesen. Aufgrund der geringen Besetzung der Population des gebundenen Proteins bei sehr niedrigen  $K_D$ -Werten eignet sich NMR-Spektroskopie in diesen Fällen nicht für die Bestimmung der  $K_D$ -Werte.

Für das SKAP55 DM-PH-Konstrukt konnte zwar kein  $K_D$ -Wert bestimmt werden, aber der Vergleich mit dem SKAP55 PH-Domänen-Konstrukt zeigt, dass die DM-Domäne mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Inhibition der PIP-Bindung führt.

Von Amelie Witte (Arbeitsgruppe von Dr. Stefanie Kliche, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg) wurde für SKAP55-Volle-Länge mittels GFP-Fusionskonstrukten der Inhibitionsmechanismus in lebenden Zellen untersucht (siehe Abbildung 56).



**Abbildung 56: Lokalisationsstudien von SKAP55-Wildtyp und -Mutanten, transfiziert in Jurkat-T-Zellen. A) Schematische Übersicht der Konstrukte, GFP: Green Fluorescent Protein mit SKAP55 Fusionskonstrukten, B) Immunfluoreszenzbilder des GFP sowie F-Aktin-Kanals und deren Überlagerung, C) Darstellung der Fluoreszenz-Intensität entlang der weißen Trajektorie in der Überlagerung (von Amelie Witte, Otto-von-Guericke-Universität, Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Magdeburg, modifiziert).**

In der Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert die GFP-PH-Domäne an der Plasmamembran. Im Volle-Länge-Konstrukt hingegen verbleibt mehr SKAP55 im Zytoplasma. Basierend auf der Kristallstruktur wurde von Swanson et al. in SKAP-HOM eine Mutation

eingeführt, die zu einer nicht inhibierten PH-Domäne führt. Mutation der homologen Aminosäure in SKAP55 (D120K) führt ebenfalls zu einer vermehrten Lokalisation des Expressionskonstruktes an der Plasmamembran, wie auch schon für das PH-GFP-Konstrukt ohne DM-Domäne zu sehen war. D.h. die Rekrutierung von SKAP55 an die Plasmamembran wird durch die DM-Domäne inhibiert (siehe Abbildung 56).

Die Rekrutierung in den verwendeten Jurkat-Zellen erfolgt stimulusunabhängig. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es sich um eine Leukämie-Zelllinie handelt, deren Membranzusammensetzung nicht der von primären T-Zellen entspricht. Für Jurkat-Zellen wurde ein Mangel der 3'-Inositolphosphatase PTEN beschrieben, die zu einer erhöhten PI-(3,4)-P<sub>2</sub>- und PI-(3,4,5)-P<sub>3</sub>-Konzentration in der Plasmamembran führt [160].

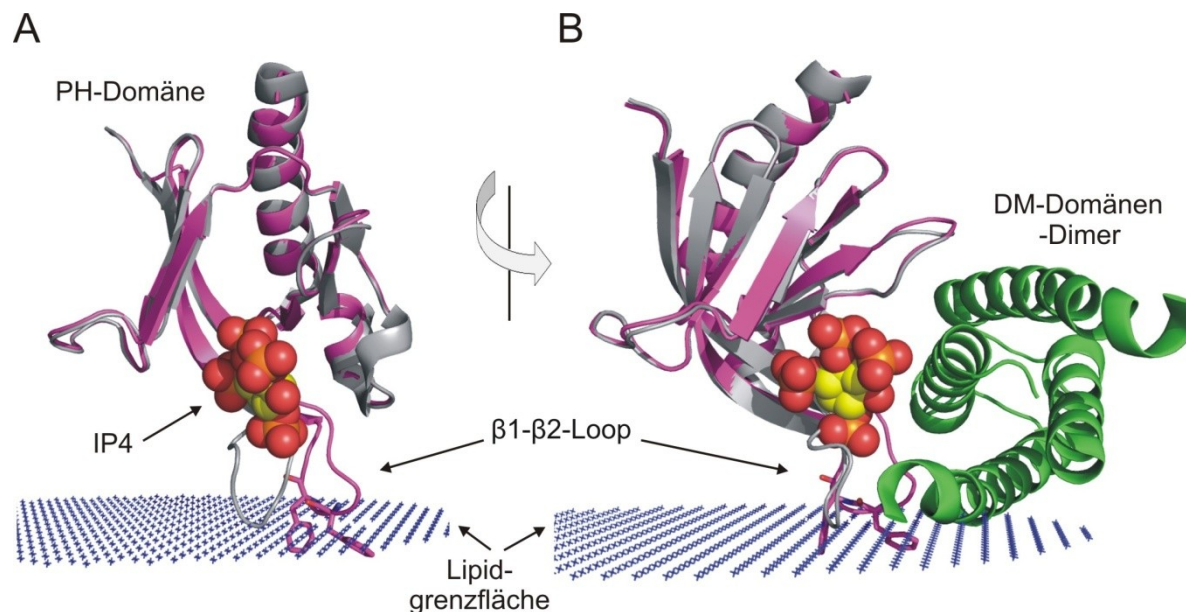
## 5.8 Modell der SKAP55-Lipidbindung und des Öffnungsmechanismus'

In der NMR-Titration des SKAP55 DM-PH-Konstruktes mit den Inositolphosphaten wurden keine strukturellen Veränderungen, weder in der PH- noch in der DM-Domäne, beobachtet. Die nicht erfolgte Bindung der SKAP55 PH-Domäne an Phospholipide im DM-PH-Konstrukt könnte auf das Fehlen der Lipidmembran zurückzuführen sein. Die großen Veränderungen im Spektrum bei hohen Konzentrationen des Phosphoinositolphosphats mit Octylkette sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Bindung der Octylkette an hydrophobe Aminosäuren des Proteins zurückzuführen.

Die OPM-Datenbank (Orientations of Proteins in Membranes Database, <http://opm.phar.umich.edu/>, [161]) berechnet die Insertion von Proteinen in Membranen sowie die Bindung an Membranen. Hierbei werden unter anderen Kriterien wie Energieminimierungen durch Löslichkeitseffekte, Polaritäten von interagierenden Flächen, Lipidzusammensetzung sowie die Homologie der membranassoziierten Domäne in den Berechnungen berücksichtigt.

Für die SKAP55 PH-Domäne wurde in der OPM-Datenbank eine Insertion der Phenylalanine 123 und 124 des  $\beta$ 1- $\beta$ 2-Loops in die Membran vorausgesagt (siehe Abbildung 57, A). Die in der NMR-Titration eingesetzten Phosphoinositolphosphate mit Butylketten zeigten eine stärkere Bindung an die PH-Domäne als die Kopfgruppen alleine. Dies könnte auf zusätzliche Interaktionen der Phospholipidketten mit lipophilen Seitenketten des  $\beta$ 1- $\beta$ 2-Loops - ähnlich wie an der Membran - zurückgeführt werden. Der  $\beta$ 1- $\beta$ 2-Loop ist in der SKAP-HOM-Struktur (2OTX) an der Bindung der DM-Domäne

beteiligt, und auch im Homologie-Modell des SKAP55 tritt diese Domänen-Domänen-Interaktion auf (siehe Abbildung 57, B).



**Abbildung 57:** Modell der autoinhibierten PH-DM-Domäne des SKAP55 basierend auf der Kristallstruktur von SKAP-HOM (PDB:1U5E). Vorhergesagtes Modell der OPM-Datenbank für die Membranassoziation der SKAP55 PH-Domäne in lila eingefärbt, basierend auf der PH-Domänen-Kristallstruktur 1U5D in grau dargestellt. Die Lipidgrenzfläche ist durch blaue Kreuze markiert. A) PH-Domäne an der Membran mit Darstellung des IP4 aus der gebundenen Akt-Kristallstruktur (PDB: 1UNQ), B) Darstellung wie in A mit Homologie-Modell der SKAP55 DM-Domäne, basierend auf der SKAP-HOM Kristallstruktur, Darstellung der DM-Domäne in grün.

Es ist denkbar, dass der  $\beta 1$ - $\beta 2$ -Loop als molekularer Vermittler zwischen der offenen und geschlossenen Konformation dient. Unterschiedliche Interaktions- und Hierarchiemodelle sind möglich. Diese Modelle werden durch Publikationen unterstützt, die eine PI3-Kinase bzw. TCR-abhängige Aktivierung der Integrine und RAPL-Lokalisation durch SKAP55 gezeigt haben [115]. In einem Modell führt die TCR-Stimulation zu erhöhten zellulären Konzentrationen von PI3-Kinase-Produkten (siehe 1.11.1). Die PH-Domäne bindet PIP3. Infolgedessen wird der  $\beta 1$ - $\beta 2$ -Loop in die Membran integriert. Dadurch wird die hydrophobe Bindung an die DM-Domäne aufgehoben. Die nun freie DM-Domäne könnte z.B. das an Rap1 bindende Molekül RAPL binden. In einem anderen Modell würde ein weiteres Protein wie z.B. RAPL erst an die DM-Domäne binden und somit die Inhibition für die Phosphoinositolphosphate aufheben und die Interaktion mit der Membran ermöglichen. Dieses Modell wird durch eine Publikation von Kliche et al. gestützt, welche eine stimulationsunabhängige und konstitutive Interaktion von RAPL bzw. RIAM mit ADAP und SKAP55 zeigt [42]. Eine dritte Möglichkeit ist, dass die Integrine erst durch Koinzidenz der Bindung eines Partners an die DM-Domäne sowie Bindung von Phosphoinositolphosphaten an die PH-Domäne aktiviert werden.

Die PI3K-unabhängige und konstitutive Aktivierung der Integrine durch Lokalisation von SKAP55 an der Membran durch myristylierte oder LAT-Fusionskonstrukte (1.8) steht im Widerspruch zu der beschriebenen Regulation durch PIPs. Ohne Stimulus, d.h. PIP-Produktion, ist von einer Inhibition durch die DM-Domäne auszugehen. Eine Erklärung könnten die verbliebenen Konzentrationen der Phosphatidylinositole PIP2 und PIP3 in den Jurkat-Zellen sein, die durch die hohe lokale Konzentration zu einer Öffnung führen könnten. Eine andere Erklärung wären Signalwege, die zwar über ADAP und SKAP55 aber ohne PIP vermittelt werden.

Bei TCR-Stimulation wird PI3K (PIP3) für die Adhäsion benötigt. Der von Swanson et al. für SKAP-HOM beschriebene Mechanismus und die hier nachgewiesene PIP3-Bindung von SKAP55 könnten zur Rekrutierung von RAPL über den SKAP55 N-Terminus führen, nachdem PIP3 zur Öffnung desselben geführt hat. Die Interaktion der RAPL-SARAH-Domäne an den SKAP55 N-Terminus konnte jedoch in diesem Versuchsaufbau weder bestätigt noch widerlegt werden.

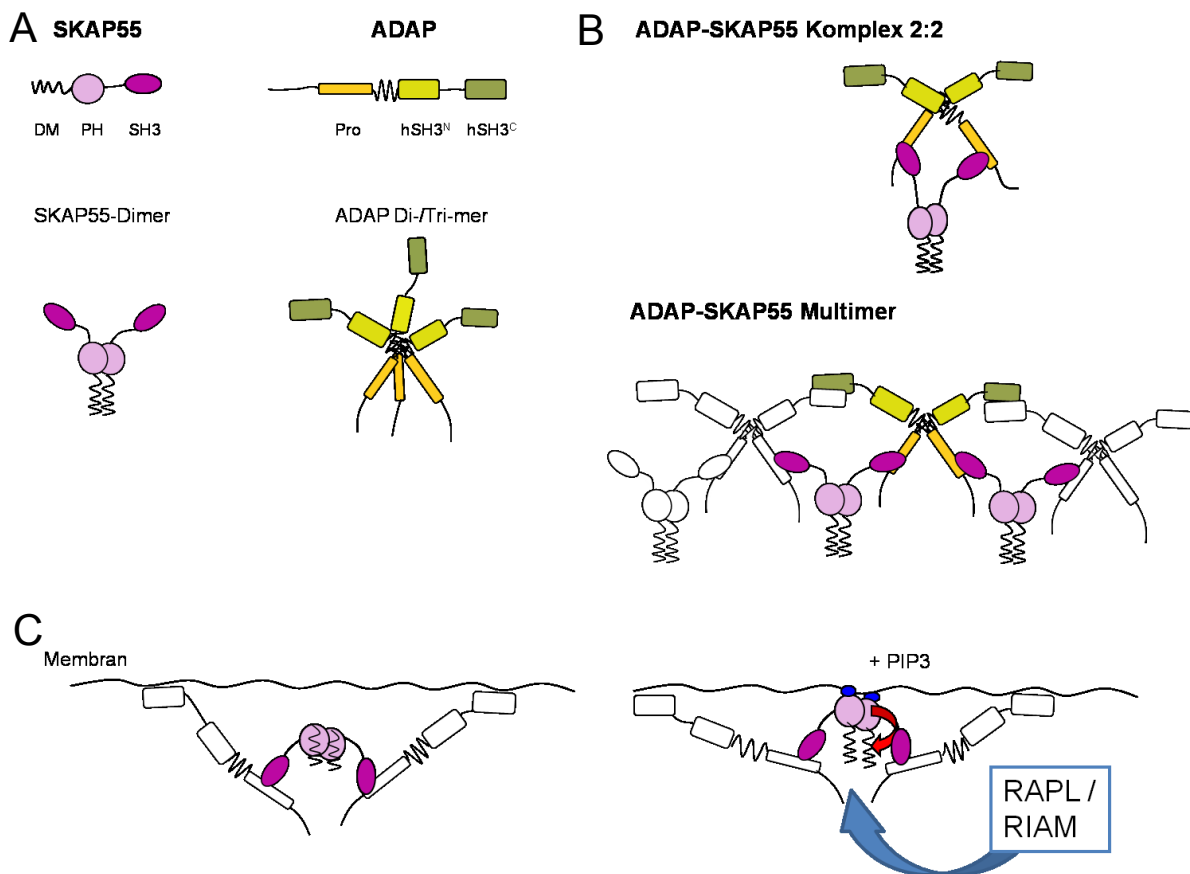
Die Bindung zwischen RAPL und MST1 über die SARAH-Domänen konnte mittels NMR-Spektroskopie nachvollzogen werden [141] (siehe 4.5.11). Für SARAH-Domänen wurden Trimerisierungsmodelle von Scheel und Hofmann beschrieben [162], so dass ein Trimer, bestehend aus dem SKAP55 N-Terminus (DM-Domäne) und RAPL-SARAH und MST1-SARAH, gebildet werden könnte. Für SKAP und ADAP wurde eine konstitutive Bindung von RIAM bzw. RAPL jeweils im Komplex mit MST1 bei Chemokin-Stimulation gezeigt [42]. Dem widerspricht die von Raab et al. beschriebene kompetitive Bindung von SKAP55 an RAPL gegenüber MST1 [49]. Der kompetitive Effekt von SKAP55 wurde bisher nur in Immunpräzipitations-Experimenten gezeigt und konnte mit den RAPL- und MST1 SARAH-Domänen und dem SKAP55 DM-Konstrukt (siehe 4.5.11) NMR-spektroskopisch weder bestätigt noch widerlegt werden.

Ein möglicher PIP3-abhängiger SKAP55 Interaktionspartner könnte DOCK2 sein. DOCK2 wurde in massenspektrometrischen Untersuchungen von ADAP in SILAC-Experimenten mit Jurkatzellen neben SKAP55 als ein potentieller Interaktionspartner angereichert [79]. DOCK2 aktiviert die GTPase Rac und reguliert die Aktin-Polymerisation und die Chemokin-abhängige Migration von Lymphozyten [163]. DOCK2 wurde in Pulldown-Experimenten in Anwesenheit von PIP3 im Western-Blot verstärkt nachgewiesen (siehe 4.5.12). ADAP-defiziente Zellen zeigen jedoch keine Defekte in der TCR- oder Chemokin-vermittelten Rac-Aktivierung. DOCK2 bindet ebenfalls PIP3, diese Bindung könnte zur Membran-Dissoziation von DOCK2 und so zur Anreicherung im Western-Blot führen.

## 5.9 Modell des ADAP-SKAP55-Komplexes und seine Funktionen

### 5.9.1 Stöchiometrie und Aufbau

Aus der Stöchiometrie von 2:2 und den bekannten Interaktionen zwischen der SKAP55-SH3-Domäne mit ADAP sowie der in dieser Arbeit identifizierten Dimer- bzw. Multimerbildenden Domäne des SKAP55 N-Terminus sowie der vermutlichen Coiled-Coil-Domäne vor der hSH3<sup>N</sup>-Domäne in ADAP kann nun eine mögliche Assemblierung des ADAP-SKAP55-Komplexes vorgeschlagen werden (siehe Abbildung 58). SKAP55 und ADAP bilden jeweils ein Homodimer und SKAP55 bindet über seine SH3-Domäne an ADAP (siehe Abbildung 58, B). Die beschriebene Bindung der ADAP hSH3<sup>C</sup>-Domäne an SKAP55 wurde aufgrund der derzeit ungeklärten immunologischen Bedeutung nicht ins Modell integriert (siehe 1.8). Aus den beiden Homodimeren lässt sich ein 2:2 Komplex zusammensetzen oder ein kettenartiger oligomerer Komplex, der abwechselnden aus ADAP- und SKAP55-Dimeren besteht (siehe Abbildung 58, B).



**Abbildung 58: Modelle der ADAP-SKAP55-Komplexe.** A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Homodimerisierung von ADAP und SKAP55; DM: Dimerisierungsdomäne; Pro: prolinreiche Sequenz, (h)SH3: SH3-Domäne bzw. helikal erweiterte SH3-Domäne, B) Mögliche Multimerisierung als 2:2 Komplex sowie fibrilläre Multimerisierung, C) Assoziation des ADAP-SKAP55-Komplexes an die Membran ohne PIP3 und mögliche SKAP55-Membranbindung und induzierte Konformationsänderung zur Rekrutierung von Rap1 bindendem RAPL bzw. RIAM (ADAP-Komplex vereinfacht dargestellt).

Mit dem kettenförmigen Komplex ließen sich die fibrillären Strukturen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erklären (siehe Abbildung 30). Der ADAP-SKAP55-Komplex könnte in der linearen Form z.B. an der Membran als Ankerpunkt für die Integrin-assoziierten Proteine dienen und so z.B. Abstände beim Integrin-Clustering definieren. Der 2:2-Komplex könnte der in der Elektronentomographie von Patla et al. beschriebenen sowie mit dem Aktinzytoskelett interagierenden Konformation entsprechen (siehe Abbildung 34).

Der ADAP-SKAP55-Komplex nimmt eine zentrale, regulative und integrative Funktion in der T-Zell-Adhäsion sowie -Migration ein. Hierbei sind verschiedene Stimuli und Funktionen zu unterscheiden. Während die Migration von Chemokinen gesteuert wird, erfolgt die Ausbildung des T-Zell-APC-Komplexes und die Aktivierung der T-Zelle durch Signale des TCR. Wie die Integrine durch unterschiedliche Signale aktiviert werden, welche Funktionen unterschiedliche Protein-Pools dabei einnehmen und ob die Signalwege allein oder synergetisch wirken, sind zentrale Fragestellungen.

Von Kliche et al. wurden zwei Proteinpools von ADAP und SKAP55 identifiziert, die unabhängig voneinander jeweils RIAM oder RAPL binden. An der  $\beta$ -Kette des LFA-1-Integrins wurde ein Komplex aus ADAP/SKAP55/RIAM/MST1/Talin/Kindlin3 identifiziert, an der  $\alpha$ -Kette ein Komplex aus ADAP/SKAP55/RAPL/MST1 nachgewiesen. Für die Lokalisation beider Protein-Signalkomplexe an das Integrin ist der Komplex aus ADAP und SKAP55 essentiell [42].

Sowohl für die TCR- als auch die Chemokin-Aktivierung der Integrine wird RIAM benötigt [41]. Im Gegensatz dazu hat das Fehlen von RAPL keinen Effekt auf die Chemokin-abhängige Integrinaktivierung und wird nur bei der TCR-abhängigen Aktivierung benötigt [48]. Es wäre möglich, dass die beiden unabhängigen, an den zytoplasmatischen Enden der Integrine identifizierten Proteinpools, die als zentralen Komplex aus ADAP und SKAP55 bestehen, bei TCR-Stimulation synchron zur stabilen Integrinaktivierung führen. Wohingegen bei Chemokin-Stimulation der Komplex an der  $\alpha$ -Kette ADAP/SKAP55/RAPL/MST1 den Inside-out-Signalweg und der ADAP/SKAP55/RIAM/MST1/Talin/Kindlin3-Komplex an der  $\beta$ -Kette den Outside-in-Signalweg vermittelt.

### 6. Zusammenfassung

Die Integrin-vermittelte Migration und Adhäsion von T-Zellen ist entscheidend für ein funktionierendes Immunsystem. Essentielle Komponenten der Regulation der Affinität und Avidität der Integrine nach T-Zellrezeptor-Stimulation sind die Adapterproteine ADAP (Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein) und SKAP55 (Src Kinase-Associated Phosphoprotein of 55 kDa). Über die molekulare Funktionsweise und die Struktur des gesamten ADAP-SKAP55-Komplexes war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Beide Aspekte wurden in der vorliegenden Arbeit adressiert. Nach der rekombinanten Expression der Proteine über einen transient in Insektenzellen produzierten Baculovirus konnte der Komplex aufgereinigt werden. Erstmals wurde für den ADAP-SKAP55-Komplex ein höher oligomerer Komplex beschrieben. Mit Hochmassenspektrometrischen Analysen wurde für den Komplex eine Masse von ca. 259 kDa bestimmt. Dies entspricht einer 2:2 Stöchiometrie der beiden Interaktionspartner. Biochemische Charakterisierungen ergaben eine Dimerisierung von SKAP55 durch den N-Terminus und eine wahrscheinliche Dimerisierung von ADAP über eine potentielle Coiled-Coil-Struktur N-terminal zur hSH3<sup>N</sup>-Domäne. Nach Etablierung der GraFix-Methode konnten geeignete Komplexe für die Elektronenmikroskopie erhalten werden. Durch Einzelpartikelrekonstruktion wurden initiale Strukturmodelle des ADAP-SKAP55- sowie des ADAP-Komplexes berechnet, die eine ringförmige, Donut-ähnliche Struktur aufweisen. Zusätzlich wurden fibrillenförmige Partikel in den negativ kontrastierten, elektronenmikroskopischen Aufnahmen der ADAP-SKAP55-Präparationen nachgewiesen. Die Lokalisation des ADAP-SKAP55-Komplexes an der Plasmamembran nach T-Zellstimulation ist entscheidend bei der Aktivierung der Integrine. Die SKAP55 PH-Domäne wurde daher bezüglich ihrer Bindung an verschiedene Phosphoinositolphosphate charakterisiert. Voraussetzung für eine strukturelle Interpretation waren NMR-Resonanzzuordnungen des PH-Domänen-Rückgrats mit Hilfe sogenannter Triple-Resonanzspektren. In den folgenden Interaktionsstudien wurden die  $\beta 1$ - $\beta 2$ -,  $\beta 3$ - $\beta 4$ - und  $\beta 6$ - $\beta 7$ -Loops als die an der Bindung beteiligten Strukturelemente identifiziert. In NMR-Titrationsexperimenten wurden die Dissoziationskonstanten für die Bindung der Kopfgruppen bzw. der löslichen kurzkettigen Derivate der Phosphoinositolphosphate bestimmt. Die PH-Domäne bindet bevorzugt die Kopfgruppe des PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> mit einem K<sub>D</sub>-Wert von 119 $\pm$ 58  $\mu$ M, die Kopfgruppe des PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> nur mit 641 $\pm$ 276  $\mu$ M. Derivate mit kurzkettigen Acylketten führten zur Verstärkung der Bindung. Dies könnte auf Interaktionen der Acylkette mit dem  $\beta 1$ - $\beta 2$ -Loop zurückzuführen sein. Ein für das homologe Protein SKAP-HOM beschriebener, von Phosphoinositid abhängiger Regulationsmechanismus wurde auf SKAP55 übertragen und weiterentwickelt.



## 7. Summary

Integrin mediated migration and adhesion is essential for T cell function. The adapter proteins ADAP (Adhesion and degranulation promoting adaptor protein) and SKAP55 (Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa) are needed for regulation of affinity and avidity of integrins after T-cell receptor stimulation. Little was known about the molecular mechanism and structure of these proteins at the beginning of this study. For a better understanding the proteins ADAP and SKAP55 were co-expressed using the Baculovirus Expression System and co-purified. Several techniques proved for the first time that ADAP and SKAP55 form dimeric and higher oligomeric complexes. High mass spectrometric analysis revealed a complex of 259 kDa. Further characterizations showed dimerisation of SKAP55 via its N-terminal part and probable dimerisation of ADAP by a potential coiled-coil-structure localized at the N-terminal part of the hSH3<sup>N</sup>-domain. These results suggest a complex comprising a 2:2 stoichiometry of ADAP and SKAP55.

Upon implementation of the GraFix method that utilizes a glutaraldehyde gradient to stabilize and crosslink the complex we were able to obtain negatively stained single particles by electron microscopy. Initial single-particle reconstruction revealed a Donut-shaped complex for ADAP alone and in complex with SKAP55. Additional fibrous structures were detected in ADAP-SKAP55 preparations.

The localisation of the ADAP-SKAP55-complex to the plasmamembrane upon TCR-stimulation is a decisive step for integrin activation. To understand the role of the SKAP55 PH domain in this process the domain was analysed. NMR backbone resonance assignments were made on the basis of so-called triple resonance experiments of the SKAP55 PH-domain. Titrations with different phosphatidylinositolphosphates showed that the  $\beta 1$ - $\beta 2$ -,  $\beta 3$ - $\beta 4$ - and  $\beta 6$ - $\beta 7$ -loops are involved in headgroup recognition. NMR titration experiments allowed to determine the  $K_D$ -values of different inositol-phosphate headgroups and short chain lipid derivatives thereof. The PH domain bound with a  $k_D$  of  $119 \pm 58 \mu\text{M}$  to  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  while  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  bound with a  $k_D$  of  $641 \pm 276 \mu\text{M}$ . Derivatives of phosphatidylinositolphosphate with short acylchains enhanced binding. This might be related to  $\beta 1$ - $\beta 2$ -loop interactions with the acylchain of the lipid. Further, an autoinhibitory regulatory mechanism, similar to that previously proposed for SKAP-HOM, could be derived from the data presented here.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Gough, P.J. and S. Gordon, *The role of scavenger receptors in the innate immune system*. *Microbes Infect*, 2000. **2**(3): p. 305-11.
2. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
3. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. *Science*, 1996. **272**(5258): p. 50-3.
4. Rajewsky, K., *Clonal selection and learning in the antibody system*. *Nature*, 1996. **381**(6585): p. 751-8.
5. Gounni, A.S., et al., *High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites*. *Nature*, 1994. **367**(6459): p. 183-6.
6. Villadangos, J.A., et al., *MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation*. *Immunity*, 2001. **14**(6): p. 739-49.
7. Germain, R.N., *MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 287-99.
8. Gromme, M. and J. Neefjes, *Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways*. *Mol Immunol*, 2002. **39**(3-4): p. 181-202.
9. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 139-76.
10. Surh, C.D. and J. Sprent, *T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus*. *Nature*, 1994. **372**(6501): p. 100-3.
11. McBride, J.M. and C.G. Fathman, *A complicated relationship: fulfilling the interactive needs of the T lymphocyte and the dendritic cell*. *Pharmacogenomics J*, 2002. **2**(6): p. 367-76.
12. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 621-67.
13. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(6): p. 401-9.
14. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(12): p. 933-44.
15. Willinger, T., et al., *Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets*. *J Immunol*, 2005. **175**(9): p. 5895-903.
16. Hammarlund, E., et al., *Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination*. *Nat Med*, 2003. **9**(9): p. 1131-7.
17. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 301-14.
18. Shulman, Z., et al., *Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 384-96.
19. Smith, A., et al., *The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration*. *Immunol Rev*, 2007. **218**: p. 135-46.
20. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. *Nature*, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
21. Yokosuka, T. and T. Saito, *Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters*. *Immunol Rev*, 2009. **229**(1): p. 27-40.
22. Dustin, M.L. and J.A. Cooper, *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(1): p. 23-9.
23. Combs, J., et al., *Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(40): p. 14883-8.

24. Shaw, A.S. and M.L. Dustin, *Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation*. *Immunity*, 1997. **6**(4): p. 361-9.
25. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. *Science*, 1999. **285**(5425): p. 221-7.
26. Swamy, M. and W.W. Schamel, *Purification of the T cell antigen receptor and analysis by blue-native PAGE*. *Methods Mol Biol*, 2009. **514**: p. 135-50.
27. Hegedus, Z., et al., *Contribution of kinases and the CD45 phosphatase to the generation of tyrosine phosphorylation patterns in the T-cell receptor complex zeta chain*. *Immunol Lett*, 1999. **67**(1): p. 31-9.
28. Greenfield, E.A., K.A. Nguyen, and V.K. Kuchroo, *CD28/B7 costimulation: a review*. *Crit Rev Immunol*, 1998. **18**(5): p. 389-418.
29. Burkhardt, A.L., et al., *Temporal regulation of non-transmembrane protein tyrosine kinase enzyme activity following T cell antigen receptor engagement*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(38): p. 23642-7.
30. Liu, S.K., et al., *The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors*. *Curr Biol*, 1999. **9**(2): p. 67-75.
31. Simeoni, L., et al., *Adaptors and linkers in T and B cells*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(3): p. 304-13.
32. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 591-619.
33. Hogg, N., et al., *T-cell integrins: more than just sticking points*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 23): p. 4695-705.
34. Adair, B.D. and M. Yeager, *Electron microscopy of integrins*. *Methods Enzymol*, 2007. **426**: p. 337-73.
35. Luo, B.H. and T.A. Springer, *Integrin structures and conformational signaling*. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(5): p. 579-86.
36. Dustin, M.L., T.G. Bivona, and M.R. Philips, *Membranes as messengers in T cell adhesion signaling*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(4): p. 363-72.
37. Bos, J.L., et al., *The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 1): p. 83-6.
38. Ghandour, H., et al., *Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion*. *Blood*, 2007. **110**(10): p. 3682-90.
39. Bivona, T.G., et al., *Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion*. *J Cell Biol*, 2004. **164**(3): p. 461-70.
40. Mochizuki, N., et al., *Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1*. *Nature*, 2001. **411**(6841): p. 1065-8.
41. Menasche, G., et al., *RIAM links the ADAP/SKAP-55 signaling module to Rap1, facilitating T-cell-receptor-mediated integrin activation*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(11): p. 4070-81.
42. Kliche, S., et al., *CCR7-mediated LFA-1 functions in T cells are regulated by two independent ADAP/SKAP55-modules*. *Blood*, 2011.
43. Lee, H.S., et al., *RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(8): p. 5119-27.
44. Lafuente, E.M., et al., *RIAM, an Ena/VASP and Profilin ligand, interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1-induced adhesion*. *Dev Cell*, 2004. **7**(4): p. 585-95.
45. Svensson, L., et al., *Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation*. *Nat Med*, 2009. **15**(3): p. 306-12.
46. Katagiri, K., et al., *RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(8): p. 741-8.
47. Kinashi, T. and K. Katagiri, *Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL*. *Immunol Lett*, 2004. **93**(1): p. 1-5.

48. Ebisuno, Y., et al., *Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners*. Blood, 2010. **115**(4): p. 804-14.
49. Raab, M., et al., *T cell receptor "inside-out" pathway via signaling module SKAP1-RapL regulates T cell motility and interactions in lymph nodes*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 541-56.
50. Katagiri, K., M. Imamura, and T. Kinashi, *Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 919-28.
51. Koretzky, G.A. and N.J. Boerth, *The role of adapter proteins in T cell activation*. Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(11-12): p. 1048-60.
52. Flynn, D.C., *Adaptor proteins*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6270-2.
53. Pawson, T. and J.D. Scott, *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2075-80.
54. Ball, L.J., et al., *Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity*. EMBO J, 2000. **19**(18): p. 4903-14.
55. Kofler, M., et al., *Proline-rich sequence recognition: I. Marking GYF and WW domain assembly sites in early spliceosomal complexes*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(11): p. 2461-73.
56. Freund, C., et al., *The GYF domain is a novel structural fold that is involved in lymphoid signaling through proline-rich sequences*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(7): p. 656-60.
57. Musacchio, A., et al., *SH3--an abundant protein domain in search of a function*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 55-61.
58. DiNitto, J.P., T.C. Cronin, and D.G. Lambright, *Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains*. Sci STKE, 2003. **2003**(213): p. re16.
59. Seet, B.T., et al., *Reading protein modifications with interaction domains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 473-83.
60. Mayer, B.J., et al., *A putative modular domain present in diverse signaling proteins*. Cell, 1993. **73**(4): p. 629-30.
61. Chishti, A.H., et al., *The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(8): p. 281-2.
62. Harriague, J. and G. Bismuth, *Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1090-6.
63. Peyron, J.F., et al., *T cell activation: distinct pathways involve phosphorylation of different cellular proteins*. Eur J Immunol, 1988. **18**(7): p. 1139-42.
64. Musci, M.A., et al., *Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 11674-7.
65. da Silva, A.J., et al., *Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7493-8.
66. Veale, M., et al., *Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28427-35.
67. Peterson, E.J., *The TCR ADAPts to integrin-mediated cell adhesion*. Immunol Rev, 2003. **192**: p. 113-21.
68. Griffiths, E.K., et al., *Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap*. Science, 2001. **293**(5538): p. 2260-3.
69. Peterson, E.J., et al., *Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb*. Science, 2001. **293**(5538): p. 2263-5.

70. Raab, M., et al., *FYN-T-FYB-SLP-76 interactions define a T-cell receptor zeta/CD3-mediated tyrosine phosphorylation pathway that up-regulates interleukin 2 transcription in T-cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21170-9.
71. Hunter, A.J., et al., *Cutting edge: a novel function for the SLAP-130/FYB adapter protein in beta 1 integrin signaling and T lymphocyte migration*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1143-7.
72. Horn, J., et al., *Src homology 2-domain containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa Is mandatory for TCR-mediated inside-out signaling, but dispensable for CXCR4-mediated LFA-1 activation, adhesion, and migration of T cells*. J Immunol, 2009. **183**(9): p. 5756-67.
73. Liu, J., et al., *FYB (FYN binding protein) serves as a binding partner for lymphoid protein and FYN kinase substrate SKAP55 and a SKAP55-related protein in T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8779-84.
74. Marie-Cardine, A., et al., *Molecular cloning of SKAP55, a novel protein that associates with the protein tyrosine kinase p59fyn in human T-lymphocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16077-80.
75. Geng, L., M. Raab, and C.E. Rudd, *Cutting edge: SLP-76 cooperativity with FYB/FYN-T in the Up-regulation of TCR-driven IL-2 transcription requires SLP-76 binding to FYB at Tyr595 and Tyr651*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 5753-7.
76. Kwon, J., et al., *Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP*. EMBO J, 2005. **24**(13): p. 2331-41.
77. Sylvester, M., et al., *Adhesion and degranulation promoting adapter protein (ADAP) is a central hub for phosphotyrosine-mediated interactions in T cells*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11708.
78. Lange, S., et al., *Identification of phosphorylation-dependent interaction partners of the adapter protein ADAP using quantitative mass spectrometry: SILAC vs (18)O-labeling*. J Proteome Res, 2010. **9**(8): p. 4113-22.
79. Lehmann, R., et al., *A novel S3S-TAP-tag for the isolation of T-cell interaction partners of adhesion and degranulation promoting adaptor protein*. Proteomics, 2009. **9**(23): p. 5288-95.
80. Krause, M., et al., *Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 541-64.
81. Krause, M., et al., *Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton*. J Cell Biol, 2000. **149**(1): p. 181-94.
82. Coppolino, M.G., et al., *Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcgamma receptor signalling during phagocytosis*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 23): p. 4307-18.
83. Lettau, M., et al., *The adapter protein Nck: role of individual SH3 and SH2 binding modules for protein interactions in T lymphocytes*. Protein Sci, 2010. **19**(4): p. 658-69.
84. Pauker, M.H., et al., *Functional Cooperation between the Proteins Nck and ADAP Is Fundamental for Actin Reorganization*. Mol. Cell. Biol., 2011. **31**(13): p. 2653-2666.
85. Wang, H., et al., *SLP-76-ADAP adaptor module regulates LFA-1 mediated costimulation and T cell motility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(30): p. 12436-41.
86. Baker, R.G., et al., *The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(20): p. 5578-89.
87. Suzuki, J., et al., *The actin cloud induced by LFA-1-mediated outside-in signals lowers the threshold for T-cell activation*. Blood, 2007. **109**(1): p. 168-75.
88. Heuer, K., et al., *Lipid-binding hSH3 domains in immune cell adapter proteins*. J Mol Biol, 2006. **361**(1): p. 94-104.

89. Kang, H., et al., *SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55*. *Embo J*, 2000. **19**(12): p. 2889-99.
90. Jackson, S.H., et al., *T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(8): p. 818-27.
91. Zimmermann, J., et al., *Redox-regulated conformational changes in an SH3 domain*. *Biochemistry*, 2007. **46**(23): p. 6971-7.
92. Heuer, K., et al., *The helically extended SH3 domain of the T cell adaptor protein ADAP is a novel lipid interaction domain*. *J Mol Biol*, 2005. **348**(4): p. 1025-35.
93. Sylvester, M., *Biochemische Charakterisierung des Immunzellproteins ADAP*, in *FB Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2008, FU Berlin: Berlin.
94. Lin, X. and D. Wang, *The roles of CARMA1, Bcl10, and MALTI in antigen receptor signaling*. *Semin Immunol*, 2004. **16**(6): p. 429-35.
95. Medeiros, R.B., et al., *Regulation of NF-kappaB activation in T cells via association of the adapter proteins ADAP and CARMA1*. *Science*, 2007. **316**(5825): p. 754-8.
96. Jo, E.K., H. Wang, and C.E. Rudd, *An essential role for SKAP-55 in LFA-1 clustering on T cells that cannot be substituted by SKAP-55R*. *J Exp Med*, 2005. **201**(11): p. 1733-9.
97. Wang, H., et al., *Functional defects of SKAP-55-deficient T cells identify a regulatory role for the adaptor in LFA-1 adhesion*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(19): p. 6863-75.
98. Wang, H., et al., *SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 366-74.
99. Wang, H., Y. Lu, and C.E. Rudd, *SKAP1 is dispensable for chemokine induced; migration of primary T-cells*. *Immunol Lett*, 2009.
100. Kosco, K.A., et al., *SKAP55 modulates T cell antigen receptor-induced activation of the Ras-Erk-AP1 pathway by binding RasGRP1*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(2): p. 510-22.
101. Schneider, H., et al., *Adaptor SKAP-55 Binds p21 Activating Exchange Factor RasGRP1 and Negatively Regulates the p21-ERK Pathway in T-Cells*. *PLoS ONE*, 2008. **3**(3): p. e1718.
102. Marie-Cardine, A., et al., *SKAP-HOM, a novel adaptor protein homologous to the FYN-associated protein SKAP55*. *FEBS Lett*, 1998. **435**(1): p. 55-60.
103. Kouroku, Y., et al., *RA70 is a src kinase-associated protein expressed ubiquitously*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **252**(3): p. 738-42.
104. Reinhold, A., et al., *Expression of SKAP-HOM in DCs is required for an optimal immune response in vivo*. *J Leukoc Biol*, 2009. **86**(1): p. 61-71.
105. Togni, M., et al., *Regulation of in vitro and in vivo immune functions by the cytosolic adaptor protein SKAP-HOM*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(18): p. 8052-63.
106. Konigsberger, S., et al., *HPK1 associates with SKAP-HOM to negatively regulate Rap1-mediated B-lymphocyte adhesion*. *PLoS ONE*, 2010. **5**(9).
107. Swanson, K.D., et al., *The Skap-hom dimerization and PH domains comprise a 3'-phosphoinositide-gated molecular switch*. *Mol Cell*, 2008. **32**(4): p. 564-75.
108. Kliche, S., et al., *The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(19): p. 7130-44.
109. Marie-Cardine, A., et al., *Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(40): p. 25789-95.
110. Duke-Cohan, J.S., et al., *Regulation and function of SKAP-55 non-canonical motif binding to the SH3c domain of adhesion and degranulation-promoting adaptor protein*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13743-50.

111. Huang, Y., et al., *Deficiency of ADAP/Fyb/SLAP-130 destabilizes SKAP55 in Jurkat T cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23576-83.
112. Burbach, B.J., et al., *The pleckstrin homology domain in the SKAP55 adapter protein defines the ability of the adapter protein ADAP to regulate integrin function and NF-kappaB activation*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6227-37.
113. Mor, A., M.L. Dustin, and M.R. Philips, *Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 114-25.
114. Sebzda, E., et al., *Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 251-8.
115. Raab, M., et al., *SKAP1 Protein PH Domain Determines RapL Membrane Localization and Rap1 Protein Complex Formation for T Cell Receptor (TCR) Activation of LFA-1*. J Biol Chem, 2011. **286**(34): p. 29663-70.
116. Lemmon, M.A., *Membrane recognition by phospholipid-binding domains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 99-111.
117. Kane, L.P. and A. Weiss, *The PI-3 kinase/Akt pathway and T cell activation: pleiotropic pathways downstream of PIP3*. Immunol Rev, 2003. **192**: p. 7-20.
118. Ward, S.G., et al., *Regulation of D-3 phosphoinositides during T cell activation via the T cell antigen receptor/CD3 complex and CD2 antigens*. Eur J Immunol, 1992. **22**(1): p. 45-9.
119. Costello, P.S., M. Gallagher, and D.A. Cantrell, *Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1082-9.
120. Huang, Y.H. and K. Sauer, *Lipid signaling in T-cell development and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(11): p. a002428.
121. Lemmon, M.A. and K.M. Ferguson, *Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains*. Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 1-18.
122. Musacchio, A., et al., *The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(9): p. 343-8.
123. Haslam, R.J., H.B. Koide, and B.A. Hemmings, *Pleckstrin domain homology*. Nature, 1993. **363**(6427): p. 309-10.
124. Colin W. Taylor, P.C.A.d.F.a.E.P.M., *IP3 receptors: the search for structure*. TRENDS in Biochemical Sciences, 2004. **29**(4): p. 9.
125. Hoppe, W., *Das Endlichkeitspostulat und das Interpolationstheorem der dreidimensionalen elektronenmikroskopischen Analyse aperiodischer Strukturen*. Optik, 1969. **29**: p. 617-621.
126. Lottspeich F., Z.H., *Bioanalytik*. 1998, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
127. Shaikh, T.R., et al., *SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs*. Nat Protoc, 2008. **3**(12): p. 1941-74.
128. Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock, *Predicting coiled coils from protein sequences*. Science, 1991. **252**(5009): p. 1162-4.
129. Guex, N. and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, 1997. **18**(15): p. 2714-23.
130. Liang, X., et al., *The N-terminal SH4 region of the Src family kinase Fyn is modified by methylation and heterogeneous fatty acylation: role in membrane targeting, cell adhesion, and spreading*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 8133-9.
131. Hitchman, R.B., et al., *Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles*. Biotechnol Bioeng, 2007. **96**(4): p. 810-4.
132. Wittig, I., H.P. Braun, and H. Schagger, *Blue native PAGE*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 418-28.
133. Meier, R., et al., *Indocyanine green-enhanced imaging of antigen-induced arthritis with an integrated optical imaging/radiography system*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(8): p. 2322-7.

134. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
135. Coombs, D.H. and N.R. Watts, *Generating sucrose gradients in three minutes by tilted tube rotation*. Anal Biochem, 1985. **148**(1): p. 254-9.
136. Serwer, P., *Flattening and shrinkage of bacteriophage T7 after preparation for electron microscopy by negative staining*. J Ultrastruct Res, 1977. **58**(3): p. 235-43.
137. Bishop, C.M., in *Pattern Recognition and Machine Learning*. 2006.
138. Vranken, W.F., et al., *The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline*. Proteins, 2005. **59**(4): p. 687-96.
139. Fielding, L., *NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants*. 2007. **51**(4): p. 219-242.
140. Collins, B., R.C. Stevens, and R. Page, *Crystallization Optimum Solubility Screening: using crystallization results to identify the optimal buffer for protein crystal formation*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2005. **61**(Pt 12): p. 1035-8.
141. Hwang, E., et al., *Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9236-41.
142. Lee, K.K. and S. Yonehara, *Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian STE20-like kinase (MST)*. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 12351-8.
143. Lehmann, R., *Development of a novel S3S-TAP-tag for a proteomic interactome analysis of the human T cell adaptor protein ADAP*. 2011.
144. Wu, L., Z. Yu, and S.H. Shen, *SKAP55 recruits to lipid rafts and positively mediates the MAPK pathway upon T cell receptor activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40420-7.
145. Patla, I., et al., *Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(9): p. 909-15.
146. Richter, F.M., et al., *Merging molecular electron microscopy and mass spectrometry by carbon film-assisted endoprotease digestion*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(8): p. 1729-41.
147. Geng, L., et al., *Adaptor FYB (Fyn-binding protein) regulates integrin-mediated adhesion and mediator release: differential involvement of the FYB SH3 domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11527-32.
148. Pauker, M.H., et al., *Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(13): p. 2653-66.
149. Chayen, N.E. and E. Saridakis, *Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal*. Nat Methods, 2008. **5**(2): p. 147-53.
150. Slabinski, L., et al., *XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability*. Bioinformatics, 2007. **23**(24): p. 3403-5.
151. Vedadi, M., et al., *Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(43): p. 15835-15840.
152. Warke, A. and C. Momany, *Addressing the Protein Crystallization Bottleneck By Cocrystallization†*. Crystal Growth & Design, 2007. **7**(11): p. 2219-2225.
153. Edlich, C., et al., *Structure and phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphate binding of the C-terminal PH domain of human pleckstrin*. Structure, 2005. **13**(2): p. 277-86.
154. Auguin, D., et al., *Solution structure and backbone dynamics of the pleckstrin homology domain of the human protein kinase B (PKB/Akt). Interaction with inositol phosphates*. J Biomol NMR, 2004. **28**(2): p. 137-55.
155. Rameh, L.E., et al., *A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22059-66.



156. Dowler, S., et al., *Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities*. *Biochem J*, 2000. **351**(Pt 1): p. 19-31.
157. Milburn, C.C., et al., *Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change*. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 3): p. 531-8.
158. Klein, D.E., et al., *The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42): p. 27725-33.
159. Singleton, K.L., et al., *Spatiotemporal patterning during T cell activation is highly diverse*. *Sci Signal*, 2009. **2**(65): p. ra15.
160. Shan, X., et al., *Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(18): p. 6945-57.
161. Lomize, M.A., et al., *OPM: orientations of proteins in membranes database*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(5): p. 623-5.
162. Scheel H, H.K., *A novel interaction motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor*. *Curr Biol* , 2003. **13**(23): p. 899-900.
163. Shulman, Z., et al., *DOCK2 regulates chemokine-triggered lateral lymphocyte motility but not transendothelial migration*. *Blood*, 2006. **108**(7): p. 2150-8.
164. Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock, *Predicting coiled coils from protein sequences*. *Science*, 1991. **252**(5010): p. 1162-4.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Å	Ångstrom
A (Ala)	Alanin
ADAP	Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein
AG	Arbeitsgruppe
Akt	Akt-Kinase alias Protein Kinase B (PKB)
AMBA!	Acrylamid/ <i>N,N'</i> -methylen-bisacrylamid
AP-1	Activator protein 1 (Transkriptionsfaktor)
APC	antigen presenting cell
Arp2/3	Arp2/3 Proteinkomplex
As	Aminosäure
BamHI	Restriktionsendonuclease aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Bcl10	B-cell lymphoma/leukemia 10
BN-PAGE	Blue Native PAGE
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C (Cys)	Cystein
C3G	Alternativname: RapGEF1
Carma1	CARD-containing MAGUK protein 1
CCD	Charge-coupled Device
CCL	CC chemokine ligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CRK	chicken retrovirus kinase
c-SMAC	central supramolecular activation cluster
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
D (Asp)	Asparaginsäure
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DM	Dimerisierungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
d-SMAC	distal Supramolecular Activation Cluster
DTT	1,4-Dithiotreitol
E (Glu)	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EcoRI	Restriktionsendonuclease <i>Escherichia coli</i> Stamm R
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ERK1/2	Extracellular-Signal-Regulated Kinase 1/2
et al.	et alii
EVH1	Ena/VASP homology 1
EVL	Ena-VASP-like
F (Phe)	Phenylalanin
FCS	fetal calf serum
FERM	Four-point-one/Ezrin/Radixin/Moesin-Domäne
FID	Free Induction Decay
Fyb	Fyn binding protein (ADAP)
g	Lastvielfaches der Fallbeschleunigung der Erde (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G (Gly)	Glycin
GADS	Grb2-Related Adaptor Downstream of Shc
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor (Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor)
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSH	Glutathion

GST	Glutathione S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H (His)	Histidin
HABA	2-[4'-hydroxy-benzeneazo]benzoic acid
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
hSH3	helical extended SH3
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
I (Ile)	Isoleucin
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-2	Interleukin-2
Ins(1,3,4,5)P4	<i>D</i> -myo-Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat
Ins(1,4,5)P3	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-triphosphat
IP3	<i>D</i> -myo-Inositol-1,4,5-triphosphat
IP4	<i>D</i> -myo-Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
K (Lys)	Lysin
kb	Kilobasenpaare
$K_D$	Dissoziationskonstante
KpnI	Restriktionsendonuclease aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>
L	Liter
L (Leu)	Leucin
lacZ	Gen der $\beta$ -Galactosidase
LAD-III	Leukocyte adhesion deficiency-III
LAT	Linker for Activation of T cells
Lck	Lymphocyte-specific Protein Tyrosine Kinase
LFA-1	Leucoyte Function-Associated Antigen-1
m	Meter
M (Met)	Methionin
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation
MALT1	Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Protein 1
MAP	Mitogen-Activated Protein
MCS	Multiple Cloning Site
MDa	Mega Dalton
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MST1	Mammalian Sterile20-like
MTOC	Microtubule Organizing Center
MW	Molecular Weight
N (Asn)	Asparagin
Nck	Non catalytic region of tyrosine kinase
NF-AT	Nuclear Factor of activated T-cells
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear Localisation Sequences
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
P (Pro)	Prolin
PA	Phosphatidylsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethyleneglycol
PH-Domäne	Pleckstrin Homology-Domäne
PH-Promotor	Polyhedrin-Promoter
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIP2-C4	1,2-Dibutanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho(1'- <i>myo</i> -inositol-4',5'-diphosphat)

## 9. Abkürzungsverzeichnis

PIP2-C8	1,2-Dioctanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho(1'- <i>myo</i> -inositol-4',5'-diphosphat)
PIP3-C4	1,2-Dibutanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho(1'- <i>myo</i> -inositol-3',4',5'-triphosphat)
PIP3-C8	1,2-Dioctanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho(1'- <i>myo</i> -inositol-3',4',5'-triphosphat)
PKC	Kalzium-abhängigen Proteinkinase C
PLC $\gamma$	Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase C $\gamma$
ppm	parts per million
PS	Phosphatidylserin
p-SMAC	peripheral supramolecular activation cluster
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
Q (Gln)	Glutamin
R (Arg)	Arginin
RA	Ras-Rap1 binding domain
Rap1	Ras-proximity-1
RAPL	Regulator of adhesion and cell polarization enriched in lymphoid tissues
Ras	Rat sarcoma
RasGRP1	Ras Nucleotide-Releasing Protein, Alternativname: CalDAG-GEF1
RIAM	Rap1 Interacting Adapter Molecule
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
S (Ser)	Serin
SARAH	Sav-Rassf-Hpo-Domäne
SDF-1 $\alpha$	stromal cell-derived factor-1
SDS	sodium dodecyl sulfate
SF 9/21	<i>Spodoptera frugiperda</i> Zelllinie: 9/21
SH2-Domäne	SRC Homology 2 Domain
SH3-Domäne	SRC Homology 3 Domain
SHP-2	SH2 containing protein tyrosine phosphatase
SKAP55	Src kinase-associated phosphoprotein of 55kDa
SKAP-HOM	SKAP55 homologue
SLP-76	SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SMAC	Supramolecular Activation Cluster
SOS	Son Of Sevenless
StuI	Restriktionsendonuclease aus <i>Streptomyces tubercidicus</i>
SV40	Simian-Virus 40
T (Thr)	Threonin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCR	T-Zellrezeptor
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tn7	Tn7 Transposon
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units/Einheiten
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
V (Val)	Valin
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
VCAM-1	Vascular Cell-adhesion Molecule-1
VLA	Very Late Antigen
W (Trp)	Tryptophan
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
XhoI	Restriktionsendonuclease aus <i>Xanthomonas holcicola</i>
Y (Tyr)	Tyrosin
ZAP70	$\zeta$ -associated protein
$\beta$ -ME	2-Mercaptoethanol

## 10. Anhang

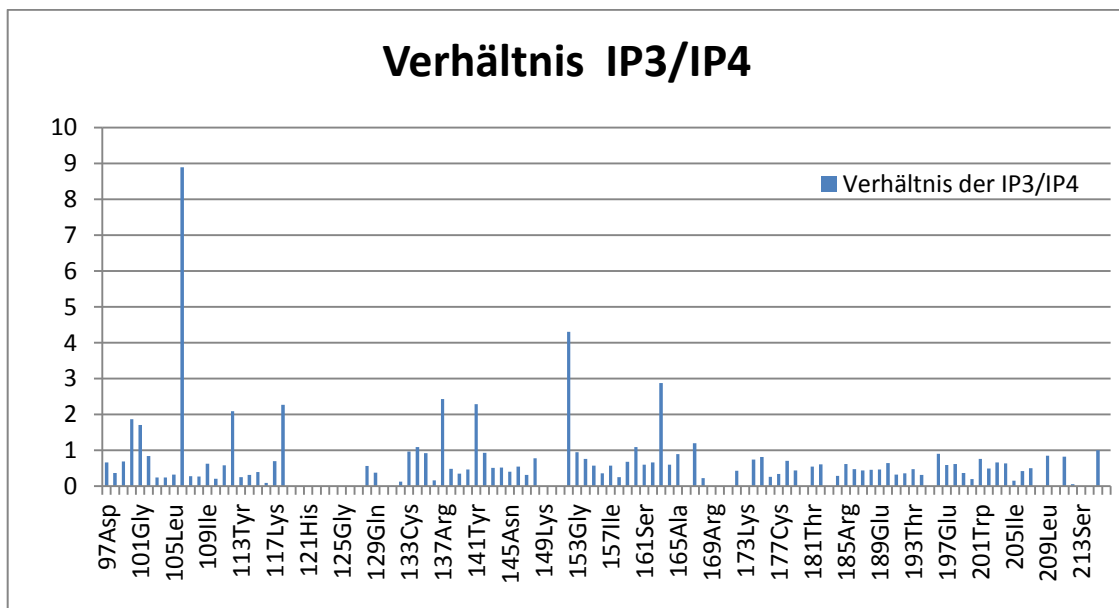
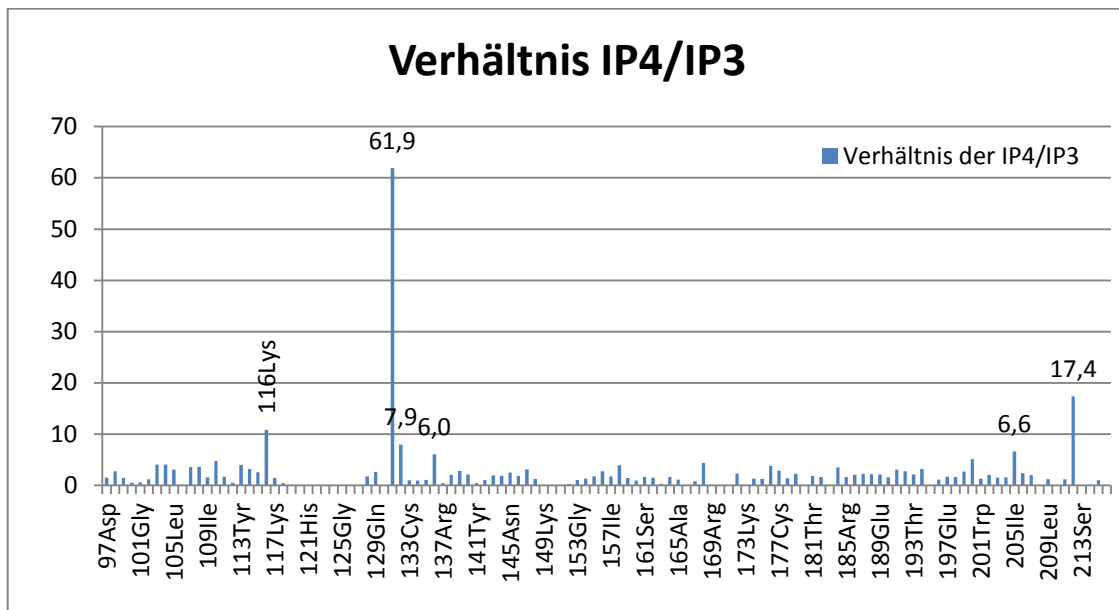
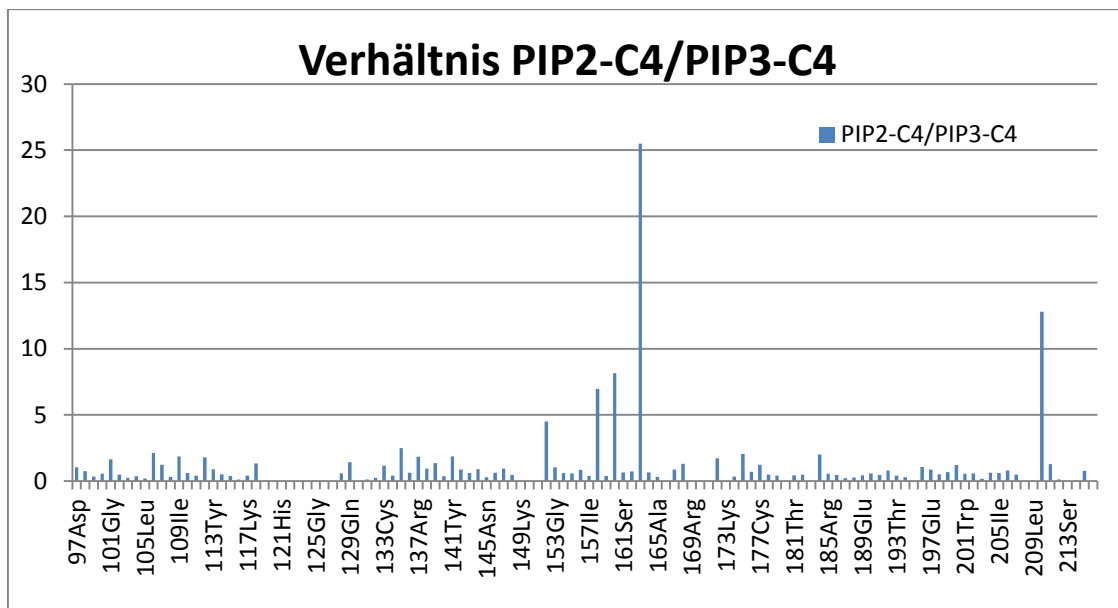
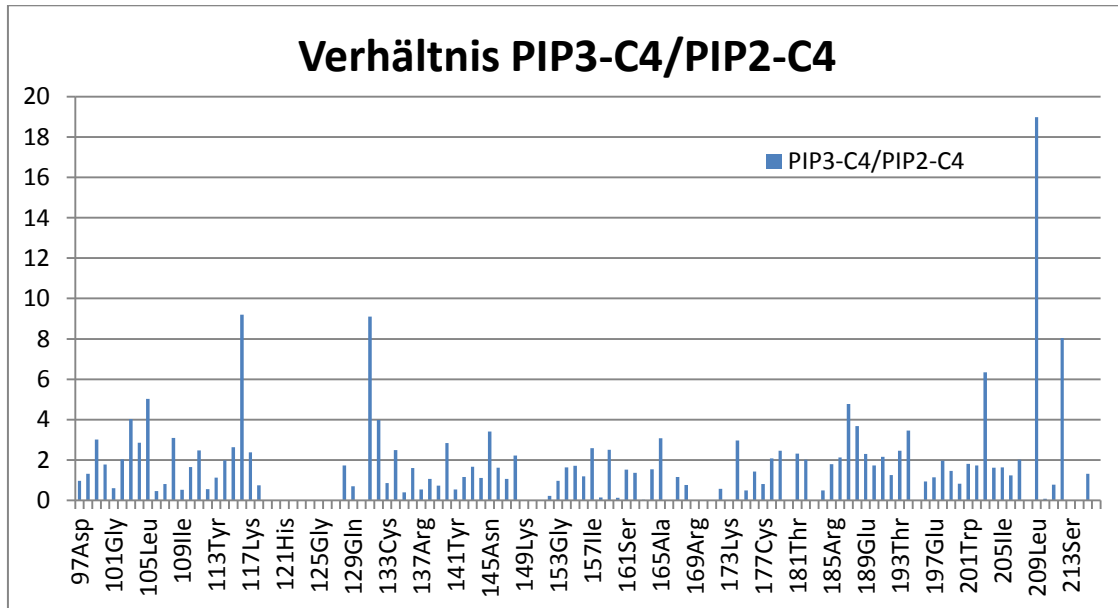


Abbildung 59: Vergleich der chemischen Verschiebung der SKAP55 PH-Domäne bei 2670  $\mu\text{M}$  IP4- bzw. IP3- Zugabe. Arginin 131 und Lysin 116 weisen bei IP4-Zugabe eine um 62- und 11-fach stärkere Verschiebung auf. Lysin 152 weist bei IP3-Zugabe eine 4-fach stärkere Verschiebung gegenüber der IP4 Zugabe auf.



**Abbildung 60:** Vergleich der chemischen Verschiebung der SKAP55 PH-Domäne bei 1150  $\mu$ M PIP3-C4 bzw. PIP2-C4-Zugabe.

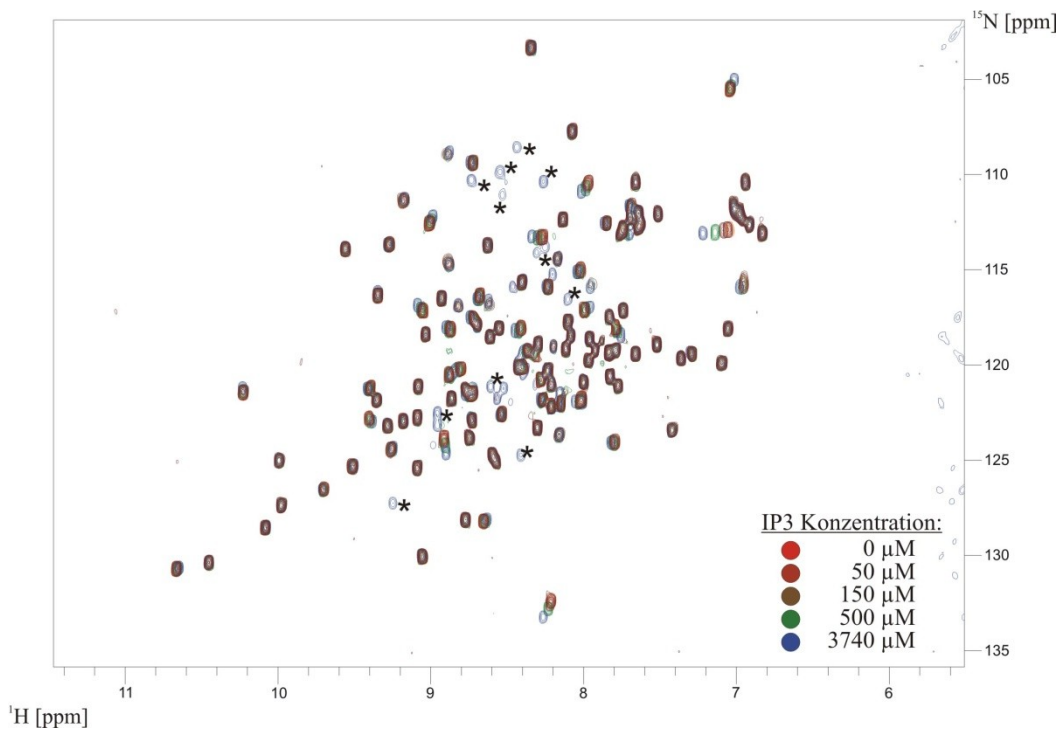


Abbildung 61: NMR-Titration der His-SKAP55 PH-Domäne mit IP3. Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren zeigen eine IP3-konzentrations abhängige Verschiebung von 0  $\mu\text{M}$  (rot), 50  $\mu\text{M}$  (dunkelrot), 150  $\mu\text{M}$  (braun), 500  $\mu\text{M}$  (grün) und 3740  $\mu\text{M}$  (blau). Bei Hohen Ligandenkonzentrationen werden zusätzliche Resonanzen detektiert, mit \* markiert. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 150  $\mu\text{M}$ , die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt

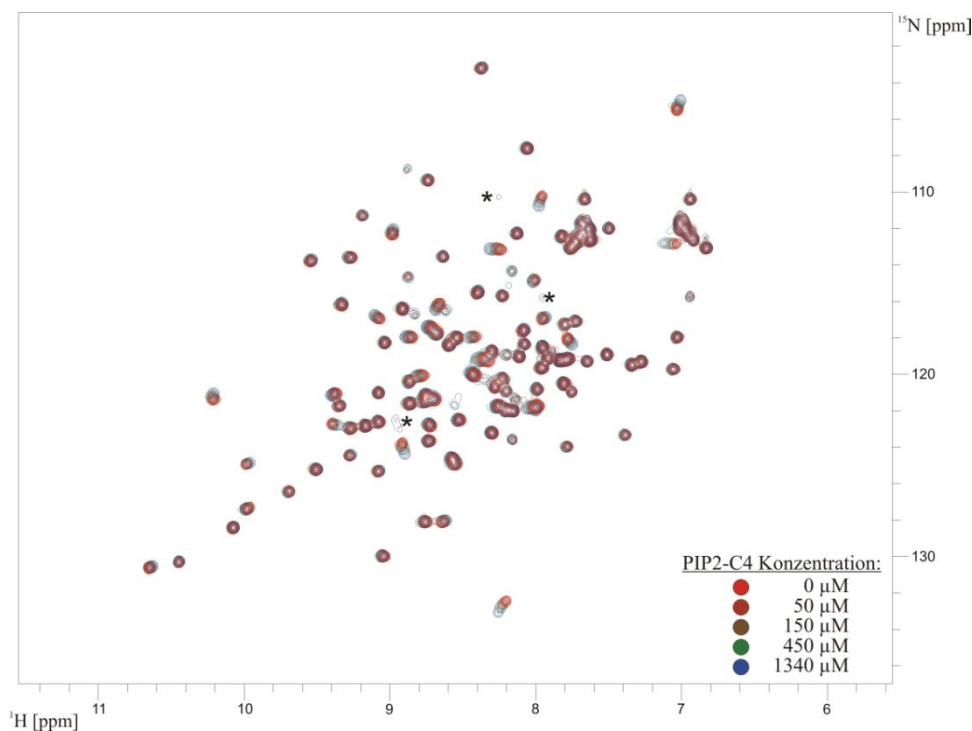


Abbildung 62: : NMR-Titration der His-SKAP55 PH-Domäne mit PIP2-C4.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum zeigt eine PIP2-C4-konzentrationsabhängige Verschiebung von 0  $\mu\text{M}$  (rot), 50  $\mu\text{M}$  (dunkelrot), 150  $\mu\text{M}$  (braun), 450  $\mu\text{M}$  (grün) und 1340  $\mu\text{M}$  (blau). Bei Hohen Ligandenkonzentrationen werden zusätzliche Resonanzen detektiert, mit \* markiert. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 150  $\mu\text{M}$ , die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt.

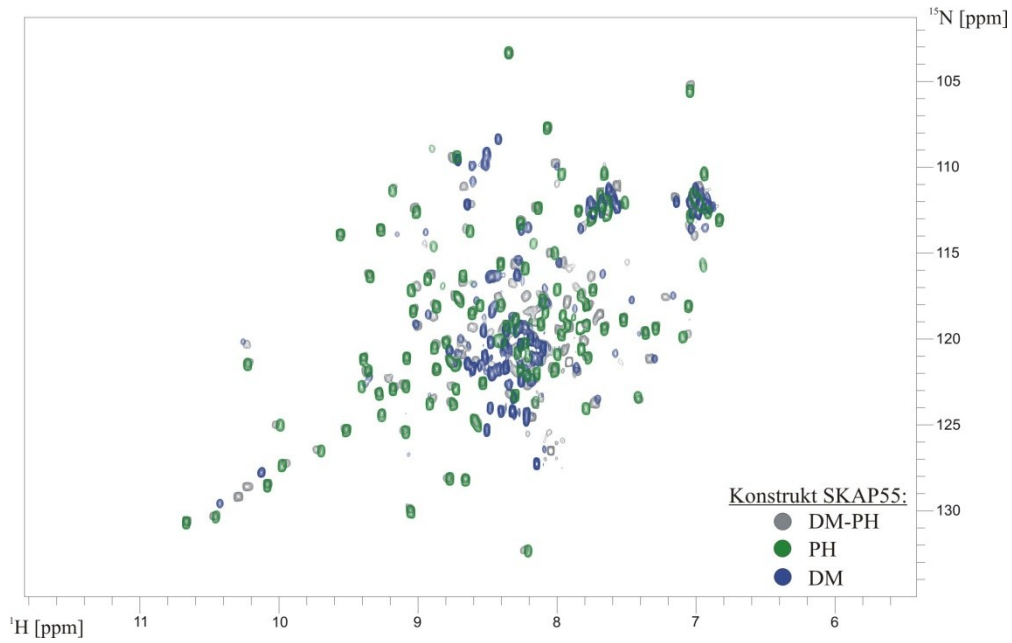


Abbildung 63: Überlagerung der  $^1\text{H}$   $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von SKAP55-Konstrukten. SKAP55 DM-PH-Konstrukt: grau; einzelne PH-Domäne: grün; einzelne DM-Domäne: blau.

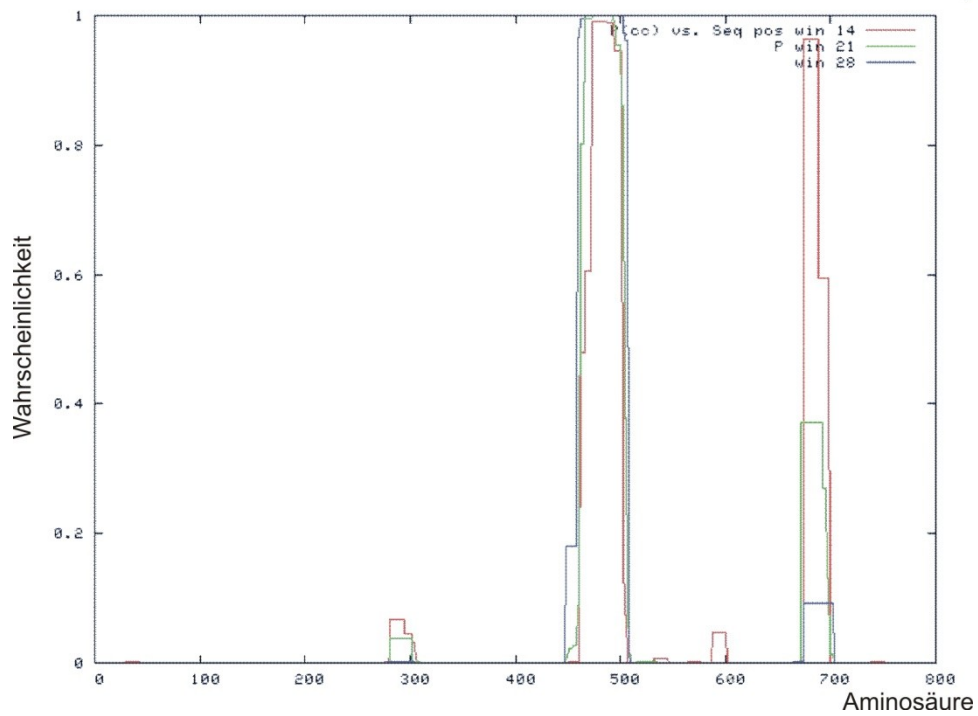


Abbildung 64: Wahrscheinlichkeitsvorhersage des Programms COILS [128, 164] für die Bildung von Coiled-Coil-Strukturen in ADAP, berechnet für Sequenzabschnitte mit einer Länge von 14, 21, 28 Aminosäuren.



## 10.1 Assignment-Tabelle der PH-Domäne von SKAP55

Nr.	As	H [ppm]	N [ppm]	Co [ppm]	C <sub>α</sub> [ppm]	C <sub>β</sub> [ppm]
97	Asp	8,22	121,07	173,88	55,17	41,24
98	Ile	7,96	118,66	173,88	173,37	173,91
99	Val	8,21	122,13	172,68	62,67	31,88
100	Lys	7,8	124,04	174,24	55,75	35,16
101	Gly	9,18	111,34	171,24	45,61	-
102	Ala	7,42	123,43	177,32	55,01	17,61
103	Gln	8,63	113,69	173,62	56,77	29,39
104	Glu	7,83	117,48	173,57	56,13	30,79
105	Leu	7,09	119,87	173,48	55,37	-
106	Asp	8,24	120,34	172,22	52,46	42,73
107	Asn	8,83	116,91	171,7	54,15	-
108	Val	8,3	118,91	174,42	54,13	32,28
109	Ile	8,77	128,13	172,78	61,21	38,1
110	Lys	7,05	118,1	169,29	55,05	34,7
111	Gln	7,96	119,7	171,49	52,96	31,48
112	Gly	8,07	107,71	169,01	45,43	45,46
113	Tyr	9,03	118,35	174,12	60,34	39,43
114	Leu	9,36	121,83	174,12	53,74	-
115	Glu	8,89	118,1	173,01	55,52	31,87
116	Lys	9,7	126,51	173,88	54,39	35,99
117	Lys	8,23	133,08	132,53	133,08	173,85
118	Ser	8,91	123,89	124,48	171,48	57,93
128	Trp	8,28	120,72	173,45	56,28	30,51
129	Gln	8,73	121,47	173,01	54,45	31,46
131	Arg	9,98	127,41	172,13	53,79	34,79
132	Trp	9,09	125,4	172,09	57,08	29,74
133	Cys	8,65	128,17	170,11	58,21	31,25
134	Val	8,81	120,21	171,4	61,15	37,05
135	Val	8,59	124,78	172,47	60,92	33,39
136	Ser	9,09	122,72	171,36	57,29	65,43
137	Arg	9,26	124,44	172,98	57,92	28,14
138	Gly	8,35	103,33	169,98	45,85	-
139	Leu	8,31	123,29	170,7	54,31	-
140	Phe	8,75	123,81	-	55,73	-
141	Tyr	9,51	125,31	173,08	56,66	43,63
142	Tyr	8,28	113,25	171,7	55,63	41,84
143	Tyr	10,23	121,4	173,34	57,16	43,65
144	Ala	10	125,02	175,04	56,71	18,71
145	Asn	8,73	109,4	170,58	53,34	40,81
146	Glu	7,97	117,07	172,06	57,98	27,87
147	Lys	8,24	115,86	174,43	54,76	32,45
148	Ser	7,52	118,93	172,02	61,48	65,75
152	Lys	9,39	122,82	174,67	56,95	32,27
153	Gly	7,04	105,43	167,51	45,29	-
154	Thr	7,98	110,47	171,33	60,18	73,7
155	Phe	8,69	116,41	-	57,00	-
156	Leu	8,73	122,89	175,07	57,00	-
157	Ile	8,01	121,9	172,33	63,87	-
158	Lys	8,41	120,13	174,45	59,26	32,4
159	Gly	8,89	114,65	172,93	45,30	-
160	Tyr	8,76	121,48	172,84	60,21	39,65
161	Ser	9,27	113,65	169,97	58,72	65,7

162	Val	8,87	121,72	170,32	58,72	36,23
163	Arg	8,77	121,33	173,4	55,44	33,33
164	Met	9,08	121,12	174,81	56,12	31,02
165	Ala	8,57	124,98	175,07	50,38	21,21
166	Pro	-	-	-	64,58	-
167	His	7,84	112,55	174,42	56,95	30,21
168	Leu	7,29	119,42	172,42	57,26	-
172	Ser	7,84	119,33	172,33	63,5	71,05
174	Lys	7,8	119,21	174,48	59,95	31,76
175	Glu	7,74	117,15	173,03	57,96	29,04
176	Ser	8,14	112,35	171,25	56,77	64,1
177	Cys	7,36	119,63	172,43	58,28	30,79
178	Phe	9,4	121,21	-	57,06	-
179	Glu	9,35	116,28	171,2	53,63	34,05
181	Thr	9	112,43	170,7	59,75	72,26
182	Ser	9,07	117,04	171,43	57,35	65
184	Asp	8,62	116,76	172,42	54,72	41,02
185	Arg	7,78	118,13	173,21	55,12	33,96
186	Arg	8,33	119,45	172,54	56,48	30,57
187	Ser	8,42	118,07	171,01	57,87	65,03
188	Tyr	8,88	120,48	170,72	58,04	42,78
189	Glu	8,02	121,85	171,49	56,32	32,2
190	Phe	8,7	117,79	171,49	56,93	27,36
191	Thr	9,55	113,89	171,41	62,46	71,45
192	Ala	9,06	130,02	173,8	50,88	20,66
193	Thr	8,89	108,89	-	64,57	-
194	Ser	7,74	112,91	-	66,07	-
196	Ala	8,19	119,06	178,35	55,3	-
197	Glu	8,12	119,11	176,15	59,14	30,21
198	Ala	8,54	122,59	175,41	56,24	18,49
199	Arg	8,4	115,62	175,36	59,22	29,83
200	Asp	7,92	119,21	176,13	58,42	41,95
201	Trp	8,38	119,28	175,52	63,25	29,22
202	Val	8,1	117,68	176,33	67,31	31,4
203	Asp	9,17	122,92	176,28	57,95	40,31
204	Gln	8,73	117,56	177,18	58,69	27,29
205	Ile	8,61	118,49	174,76	66,29	37,71
206	Ser	8,93	116,47	174,31	63,37	61,96
207	Phe	8,27	121,82	-	60,92	30,86
209	Leu	8,55	118,08	176,88	-	37,79
210	Lys	7,82	119,31	175,43	58,74	32,27
211	Asp	8	120,9	175,33	56,17	41,38
212	Leu	8,42	120,13	-	56,35	41,35
215	Leu	7,78	121,07	-	57,12	-

Tabelle 13: Assigte Resonanzen der His-SKAP55 PH-Domäne.

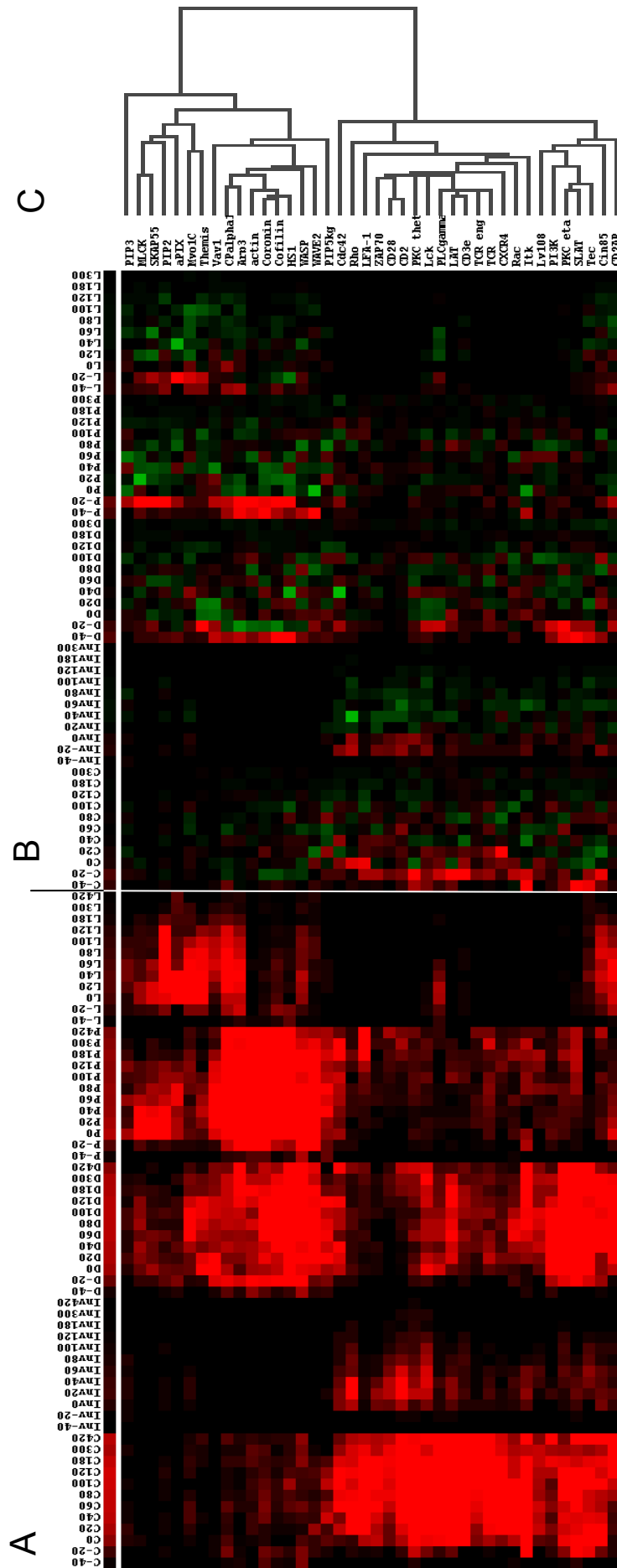


Abbildung 65: Zeitabhängige Clusteranalyse der Proteinlokalisierung nach T-Zell-APC-Kontakt. Klassifizierung der Lokalisationen in C: zentral, Inv: eingestülpt, D: diffus, P: peripher, L: lamellar (siehe Abbildung 55). Ziffern bezeichnen Zeitpunkte des T-Zell-APC-Kontakts, beginnend 40 Sekunden vor Zell-Zell-Kontakt. A) Prozentuale Signalverteilung; rot-Intensität entspricht besetzter Population, B) Prozentuale Veränderung der Lokalisation im Vergleich zum vorhergehenden Zeitintervall, rot entspricht einer Zunahme, grün einer Abnahme. C) Cluster-Baum der zeitlichen und örtlichen Ähnlichkeit der Signalverteilung. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Christoph Wülfing, University of Texas Southwestern Medical Center [129].

## 11. Lebenslauf

### Bernhard Manuel Meineke

Geburtsdatum: 08.10.1979  
Geburtsort: Tübingen  
Familienstand: ledig  
Kinder: keine

08/1986-07/1987      Grundschule am Tannenweg, Glinde  
08/1987-08/1990      Grundschule Trittau  
09/1990-06/1999      Gymnasium Trittau, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
09/1999-07/2000      Zivildienst, Jugendheim Lichtensee, Hoisdorf  
10/2000-10/2001      Studium „Diplom-Biologie“, Universität Hamburg  
10/2001-07/2004      Bachelor-Studium „Molekulare Biotechnologie“, Universität zu  
Lübeck  
Bachelorarbeit:  
„Identifizierung und Charakterisierung des Erdnuss-Oleosins“,  
Laborgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie, Abteilung  
Klinische Medizin, Leibniz-Zentrum für Medizin und  
Biowissenschaften, Borstel  
07/2004                Abschluss: Bachelor of Science, Universität zu Lübeck  
10/2004-12/2006      Master-Studium „Molecular Life Science“, Universität zu Lübeck  
Masterarbeit:  
„Charakterisierung der Proteininteraktionen der  $\alpha$ -Glukosyl-  
transferase des Bakteriophagen T4“, Institut für Biologie, Universität  
zu Lübeck  
12/2006                Abschluss: Master of Science, Universität zu Lübeck  
seit 01/2007            Promotion,  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Institut für Molekulare  
und Klinische Immunologie, Gastwissenschaftler am Leibniz-Institut  
für Molekulare Pharmakologie (FMP), Arbeitsgruppe Protein  
Engineering, Berlin

Berlin, .....

---

Bernhard Manuel Meineke

## 12. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. **Christian Freund** und Herrn Professor Dr. **Burkhard Schraven** für die Überlassung des Themas. Herrn Professor **Schraven** danke ich für die zuverlässige Unterstützung und **Christian** zudem für sein starkes Interesse, die stete Gesprächsbereitschaft und die konstruktiven Diskussionen.

Der **Arbeitsgruppe Freund** gilt mein besonderer Dank für das kollegiale und hilfsbereite Arbeitsklima. Meinen „Labor-Mitbewohnern“ (Raum: C. 3.07) **Daniela Kosslick**, **Marc Sylvester** und **Andreas Schlundt** danke ich für den Spaß während und neben der Arbeit. Ich danke **Andreas** für die Zeit und die Erklärungen am NMR-Spektrometer. Für die gute organisatorische Arbeit im Labor sage ich einen herzlichen Dank an **Kathrin Motzny**, **Katharina Thiemke** und **Sindy Blank**. Meinen Kolleginnen und Kollegen **Gesa Albert**, **Fabian Gerth**, **Sebastian Günther**, **Stefan Klippel**, **Benno Kuroпка**, **Roland Lehmann**, **Kirill Piotukh**, **Jana Sticht** und **Marek Wieczorek** danke ich für die freundliche Atmosphäre. Zudem danke ich den Mitarbeitern des gesamten **FMP** für das offene und gute Arbeitsklima, vor allem **Peter Schmieder** und **Monika Beerbaum**.

Allen Kooperationspartnern danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere **Stefanie Kliche** (Universität Magdeburg) für die hilfreichen und guten Diskussionen, Informationen und Materialien zu den Signalwegen. **Amelie Witte** (Universität Magdeburg) danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Für die Unterstützung bei der Kristallisation danke ich **Yvette Roeske** (Max-Delbrück-Centrum, Berlin). Für die guten Einweisungen, Erklärungen, Zeit und Spaß am Elektronenmikroskop danke ich **Thorsten Mielke** und **Jörg Bürger** (MPI für molekulare Genetik, Berlin). **Jan Giesebrecht** (Arbeitsgruppe Christian **Spahn**, Charité, Berlin) danke ich für seine Hilfe bei den EM-Strukturberechnungen.

Vielen herzlichen Dank allen, die zum Werden dieser Arbeit beigetragen haben wie meine Freunde und meine Familie. Meinen Brüdern **Georg**, **Jens** und **Dirk** danke ich für die wissenschaftlichen und vor allem nicht wissenschaftlichen Diskussionen und die viel zu seltenen gemeinsamen Touren.

Ich danke meinen **Eltern**, die mich immer unterstützt haben und auf die ich stets bauen konnte. Meiner Mutter danke ich besonders für die Hilfe gegen Ende der Arbeit.

**Jessica** danke ich für ihr Verständnis, die Ermutigungen, die Unterstützung und das schöne gemeinsame Zusammenleben.

## 13. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema „Molekulare Eigenschaften des Integrin-regulierenden ADAP-SKAP55-Signalkomplexes“ selbstständig verfasst und nicht schon als Dissertation verwendet habe und dass die Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Berlin, .....

\_\_\_\_\_  
Bernhard Manuel Meineke