

**Molekulare Erkennung von
Cellulose und Cellulose-Fragmenten
durch Cellulose-Bindemodule
&
Interaktionsstudien zwischen den
zytoplasmatischen Domänen von
Integrin- β 1/ β 3 und dem
fokalen Adhäsionsprotein Paxillin**

Marcus Michaelis

Univ.-Diss.

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin "Analytische Chemie"

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Institut für Chemie

der Universität Potsdam

Disputation: 25.05.2022

Die hier vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2016 bis Dezember 2021 in der Arbeitsgruppe „Analytische Chemie“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Heiko M. Möller am Institut für Chemie der Universität Potsdam angefertigt.

1. Betreuer: Prof. Dr. Heiko M. Möller, Universität Potsdam
2. Betreuer: Prof. Dr. Pablo Wessig, Universität Potsdam

1. Gutachter: Prof. Dr. Heiko M. Möller, Universität Potsdam
2. Gutachterin: Prof. Dr. Petra Wendler, Universität Potsdam
3. Gutachter: Prof. Dr. Valentin Wittmann, Universität Konstanz

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

<https://doi.org/10.25932/publishup-55516>

<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-555162>

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt wurde. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde noch nicht veröffentlicht oder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Potsdam, 24.11.2021

Marcus Michaelis

Für Oma

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2016 bis Dezember 2021 im Fachbereich Chemie in der Arbeitsgruppe „Analytische Chemie“ von Prof. Dr. Heiko M. Möller an der Universität Potsdam angefertigt.

Prof. Dr. Heiko M. Möller gilt mein größter Dank, da er nicht nur Themengeber und Hauptbetreuer dieser Arbeit war, sondern mich auch schon während des Vertiefungspraktikums und der Masterarbeit begleitet, unterstützt und für das Thema biomolekulare NMR-Spektroskopie begeistert hat. Er gab mir zugleich die Gelegenheit, gleich zwei spannende Hauptthemen parallel zu bearbeiten, sodass der Fokus immer wieder neu gesetzt und erweitert werden konnte. Er hat immer ein offenes Ohr gehabt, zahlreiche neue Ideen eingebracht, jederzeit Weiterbildungen jeglicher Art ermöglicht und vor allem sehr viel Geduld mit mir gehabt. Dafür meinen allerherzlichen Dank!

Prof. Dr. Petra Wendler und Prof. Dr. Valentin Wittmann gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats. Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten Prüfungskommission.

Ich möchte mich auch bei allen Kooperationspartner*innen bedanken, die stets einen intensiven wissenschaftlichen Austausch möglich gemacht und so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dazu zählen Prof. Dr. Christof R. Hauck und Dr. Timo Baade aus der Arbeitsgruppe „Zellbiologie“ der Universität Konstanz, Prof. Dr. Alexander Böker, Dr. Ulrich Glebe, Dr. Maria Mathieu-Gaedke sowie Johannes Martin aus der Arbeitsgruppe „Protein-Polymer-Materialien“ des Fraunhofer IAP in Golm und Prof. Amir Goldbourt sowie Meital Bachar aus der Arbeitsgruppe „Solid-State NMR“ der Universität Tel-Aviv. Letzteren möchte ich noch einmal besonders für die herzliche Aufnahme und Gastfreundschaft während meines wissenschaftlichen Aufenthalts in Israel danken.

Der gesamten aktuellen und ehemaligen AG Möller möchte ich für die wunderschöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors und Büros meinen Dank aussprechen. Sowohl während meiner Bachelorarbeit unter Prof. Dr. Erich Kleinpeter als auch seit dem Start des Vertiefungspraktikums habe ich mich in der Gruppe wohlfühlt und sowohl die wissenschaftlichen Diskussionen, die Kaffeerunden als auch die außeruniversitären Aktivitäten sehr genossen. Ein besonderer Dank gilt hier Karis Linke, die jegliche administrative Aufgaben in

unglaublicher Geschwindigkeit erledigt hat und dabei immer ein Strahlen auf den Lippen hatte, Dr. Ines Starke, welche mit ihrer massenspektrometrischen Expertise viele Projekte dieser Arbeit voranbringen konnte sowie Dr. Ruslan Nedielkov, der jederzeit Ansprechpartner bei spektroskopischen oder biotechnologischen Fragestellungen war.

Dr. Marija Vranic, Marcel Stebner und Nikolai Klishin danke ich für die unglaublich unterhaltsame gemeinsame Bürozeit, welche manch eine schwierige Phase im Labor schnell wieder ausgleichen konnte. Lukas Gallandi und Till Friesewinkel halfen nicht nur bei jeglichen IT-Problemen, sondern waren auch wunderbare Gesprächspartner in wissenschaftlichen wie nichtwissenschaftlichen Themen. Nicht zu vergessen sind alle wissenschaftlichen Hilfskräfte, Vertiefungspraktikant*innen, Bachelorand*innen und Masterand*innen, welche ich betreuen durfte und von denen ich auch lernen konnte, die da wären Monique Gallandi, Konstantin Seibel, Elisa Raschdorff, Daniel Manuel Haller, Alyna Lange, Niklas Bier, Christin Coswig als auch Dr. Magdalena Roth.

Allen Mitglieder*innen der Research Training Group 2473/1 „Bioactive Peptides“ möchte ich für eine schöne und interessante Zeit sowohl bei den Seminaren, Ausflügen als auch bei den Retreats danken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit mit vielen hilfreichen Anmerkungen, Ideen und Kommentaren möchte ich mich ganz herzlich bei Josefin Gericke, Dr. Ines Starke und Dr. Ruslan Nedielkov bedanken.

Zuletzt und zugleich am wichtigsten waren sowohl beim Gedanken an das Antreten dieser Herausforderung, der Durchführung dieses intensiven Prozesses als auch der Finalisierung dieser Arbeit meine Familie, meine Freunde als auch meine Freundin Jule. Diese Menschen haben mich zu jeder Zeit ungehalten unterstützt, sich bei positiven Ereignissen mit mir gefreut und bei Rückschlägen oder Zweifeln mich aufgebaut. Sie standen hinter mir und haben nie an mir gezweifelt. Die Dankbarkeit, die ich dafür empfinde, ist nur schwer in Worte zu fassen. Aber eines ist für mich sehr klar. Ich weiß nicht, ob ich diese Reise ohne euch besondere Menschen geschafft hätte. Und dafür möchte ich euch von Herzen danken.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
AMINOSÄURENVERZEICHNIS	VI
1 METHODEN	1
1.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION	1
1.2 REKOMBINANTE PROTEINEXPRESSION	2
1.3 PROTEINREINIGUNG	4
1.4 MASSENSPEKTROMETRIE	6
1.5 NMR-SPEKTROSKOPIE	8
1.5.1 GRUNDLAGEN	8
1.5.2 PROTEIN-NMR-SPEKTROSKOPIE	11
1.5.3 CHEMICAL SHIFT PERTUBATION MAPPING	13
TEIL I - MOLEKULARE ERKENNUNG VON CELLULOSE UND CELLULOSE-FRAGMENTEN DURCH CELLULOSE-BINDEMOMDULE	
2 EINLEITUNG	16
2.1 CELLULOSE – BEDEUTUNG UND VERWENDUNG	16
2.2 DAS CELLULOSOM – ENZYMKOMPLEX MIT BIOTECHNOLOGISCHER RELEVANZ	21 21
2.3 KOHLENHYDRAT-BINDENDE MODULE – FUNKTIONEN UND FUNKTIONSWEISEN	24 24
2.4 CBM3B AUS DER CELLOBIOHYDROLASE 9A AUS <i>CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM</i>	28 28
3 ZIELSETZUNG	32
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	33
4.1 EXPRESSION UND REINIGUNG	33
4.2 H-D-AUSTAUSCH	35
4.3 UNTERSUCHUNG DER CELLULOSE-BINDEEIGENSCHAFT	39
4.4 UNTERSUCHUNG DER CALCIUM-BINDESTELLE	48
4.5 CBH9A CBM3B ^{N126W} ALS MODELL FÜR PROTEIN-POLYMER-KONJUGATE	53

4.5.1	KONJUGATION MITTELS DER <i>GRAFTING FROM</i> METHODE	54
4.5.2	KONJUGATION MITTELS DER <i>GRAFTING TO</i> METHODE	56
5	ZUSAMMENFASSUNG - TEIL I	61
<hr/>		
TEIL II - INTERAKTIONSTUDIEN ZWISCHEN DEN ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNEN VON INTEGRIN-B1/B3 UND DEM FOKALEN ADHÄSIONSPROTEIN PAXILLIN		
6	EINLEITUNG	64
<hr/>		
6.1	ZELLMIGRATION – EIN ESSENZIELLER PROZESS	64
6.2	FOKALE ADHÄSIONEN – MULTIPROTEINKOMPLEXE, DIE VERBINDEN	67
6.2.1	INTEGRIN – BINDEGLIED ZWISCHEN INNEN- UND AUßENWELT	69
6.2.2	PAXILLIN – ADAPTERPROTEIN FÜR KOMPLEXE REKRUTIERUNGEN	71
7	ZIELSETZUNG	73
<hr/>		
8	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	74
<hr/>		
8.1	EXPRESSION- UND REINIGUNGSSTRATEGIEN	74
8.1.1	PAXILLIN-KONSTRUKTE	74
8.1.2	INTEGRIN-KONSTRUKTE	75
8.1.3	PROTEOLYTISCHER ABBAU DER ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNE VON INTEGRIN-B3	77
8.2	INTERAKTIONSTUDIEN VON INTEGRIN-B1/B3 MIT DER LIM2/3-TANDEM-DOMÄNE VON PAXILLIN	83
8.2.1	BINDUNGSSTUDIE DER ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNE VON INTEGRIN-B3 MIT DER LIM3-DOMÄNE VON PAXILLIN	83
8.2.2	BINDUNGSSTUDIE DER VERKÜRZTEN ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNE VON INTEGRIN-B3 MIT DER LIM2/3-TANDEM-DOMÄNE VON PAXILLIN	86
8.2.3	BINDUNGSSTUDIE DER ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNE VON INTEGRIN-B1 MIT DER LIM2/3-TANDEM-DOMÄNE VON PAXILLIN	90
8.3	STABILITÄTSTUDIEN VON PAXILLIN-MUTANTEN	93
9	ZUSAMMENFASSUNG – TEIL II	99
<hr/>		
10	EXPERIMENTALTEIL	101
<hr/>		
10.1	GERÄTELISTE	101

10.2	CHEMIKALIENLISTE	103
10.3	VERWENDETE NÄHRMEDIEN	106
10.4	ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE	107
10.5	TRANSFORMATION	109
10.6	PLASMIDSEQUENZIERUNG	109
10.7	PROTEINEXPRESSION	110
10.7.1	CbH9A CBM3B ^{WT} UND CbH9A CBM3B ^{N126W}	110
10.7.2	INTEGRIN- UND PAXILLIN-KONSTRUKTE	111
10.8	PROTEINREINIGUNG	111
10.8.1	SDS-PAGE	111
10.8.2	ZELLAUFSCHLUSS	113
10.8.3	CHROMATOGRAPHISCHE REINIGUNG	114
10.9	SYNTHESE DER PROTEIN-POLYMER-KONJUGATE	117
10.9.1	SYNTHESE DES MAKROINITIATORS (CBM-MI)	117
10.9.2	SYNTHESE DER CBM-PNIPAM-KONJUGATE VIA <i>GRAFTING-FROM</i>	118
10.9.3	SYNTHESE DER CBM-PNIPAM-KONJUGATE VIA <i>GRAFTING-TO</i>	118
10.10	CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE	119
10.11	MASSENSPEKTROMETRIE	119
10.11.1	PROBENPRÄPARATION	119
10.11.2	ESI-MS/ESI-MSMS	119
10.11.3	HPLC-MS	120
10.12	NMR-SPEKTROSKOPIE	121
11	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	
12	<u>ANHANG</u>	155
12.1	MATERIAL UND METHODEN	155
12.1.1	PROTEINSEQUENZEN	155
12.2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	158
12.2.1	MOLEKULARE ERKENNUNG VON CELLULOSE UND CELLULOSE-FRAGMENTEN DURCH CELLULOSE-BINDEMOMODULE	158
12.2.2	EXPRESSION & REINIGUNG DER CbH9A CBM3B-KONSTRUKTE	158
12.2.3	UNTERSUCHUNG DER CELLULOSE-BINDEEIGENSCHAFT DER CbH9A CBM3B KONSTRUKTE	159
12.2.4	UNTERSUCHUNG DER CALCIUM-BINDESTELLE	162
12.2.5	CbH9A CBM3B ALS MODELL FÜR PROTEIN-POLYMER-KONJUGATE	163

12.3	INTERAKTIONSTUDIEN ZWISCHEN DEN ZYTOPLASMATISCHEN DOMÄNEN VON INTEGRIN-B1/B3 UND DEM FOKALEN ADHÄSIONSPROTEIN PAXILLIN	165
12.3.1	EXPRESSION- UND REINIGUNGSSTRATEGIEN	165
12.3.1.1	Paxillin-Konstrukte	165
12.3.1.2	Proteolytischer Abbau der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3	165
12.3.2	INTERAKTIONSTUDIEN VON INTEGRIN-B1/B3 MIT DER LIM2/3-TANDEM-DOMÄNE VON PAXILLIN	168
12.3.2.1	Bindungsstudie der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 mit der LIM3-Domäne von Paxillin	168
12.3.2.2	Bindungsstudie der verkürzten zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin	169
12.3.2.3	Bindungsstudie der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 1 mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin	171

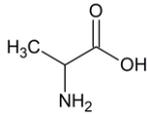
Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
Cbh9A	Cellobiohydrolase 9A
CBM	<i>Carbohydrate-binding module</i>
CSP	<i>Chemical shift perturbation</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GPC	Gelpermeationschromatographie
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RNA	Ribonuklease
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>
PNIPAm	Poly-N-Isopropylacrylamid
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULP1	<i>Ubiquitin-like-specific Protease I</i>
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible</i>

Aminosäurenverzeichnis

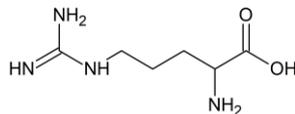
Alanin

Ala, A



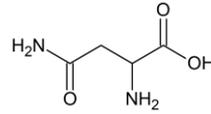
Arginin

Arg, R



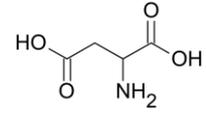
Asparagin

Asn, N



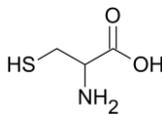
Asparaginsäure

Asp, D



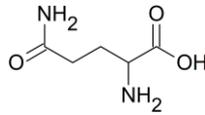
Cystein

Cys, C



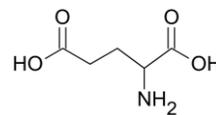
Glutamin

Gln, Q



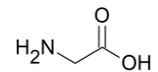
Glutaminsäure

Glu, E



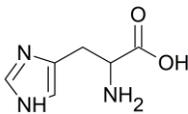
Glycin

Gly, G



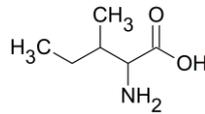
Histidin

His, H



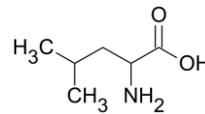
Isoleucin

Ile, I



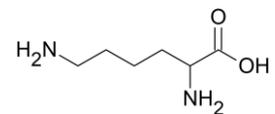
Leucin

Leu, L



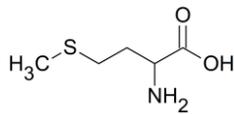
Lysin

Lys, K



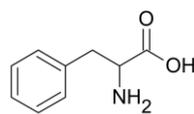
Methionin

Met, M



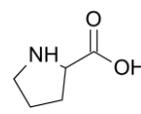
Phenylalanin

Phe, F



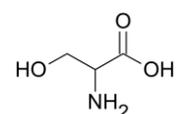
Prolin

Pro, P



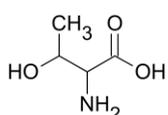
Serin

Ser, S



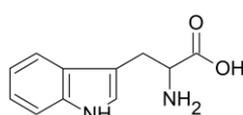
Threonin

Thr, T



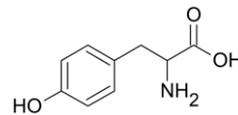
Tryptophan

Trp, W



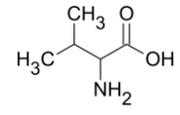
Tyrosin

Tyr, Y



Valin

Val, V



1 Methoden

1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) zur Amplifikation von Nukleinsäuren durch Mullis *et al.* kann als wissenschaftlicher Durchbruch in der Biotechnologie betrachtet werden [1]. Die Anwendungsgebiete reichen von der forensischen Genetik (z.B. individuelle Identifikation durch DNA-Proben von Blut, Speichel, Haaren o.ä. [2]) bis hin zu medizinischen Anwendungen wie der Erkennung von Gendefekten oder infektiösen Erkrankungen durch Bakterien oder Viren wie beispielsweise HIV (*human immunodeficiency virus*, [3]). Auch die Modifizierung (Einfügen, Ersetzen oder Löschen von Nukleotiden) von Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) durch ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) ist durch die Entwicklung der PCR effizienter geworden [4].

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden neben der zu amplifizierenden Templat-DNA eine hitzebeständige DNA-Polymerase (als erstes verwendet und weit verbreitet ist die *Taq* Polymerase aus *Thermus aquaticus*), zwei artifiziell konstruierte Primer (Bedingungen für das Primer-Design siehe Kapitel 10.4), eine Nukleotidquelle (Desoxyribonukleosidtriphosphate, dNTPs) sowie eine geeignete Pufferlösung benötigt. Um die Polymerase-Kettenreaktion zu starten, werden die DNA-Doppelstränge zuerst bei hohen Temperaturen denaturiert (ca. 95 °C, bei Subformen der PCR wie der *Hot start PCR* erfolgt erst ein Initiierungsschritt [5]), damit sie als lineare Einzelstränge vorliegen (siehe Schritt 1 in Abbildung 1). Anschließend folgt die Primerhybridisierung (*annealing*), bei der die Temperatur erniedrigt wird (abhängig von Primer-Eigenschaften, um unvollständige bzw. ineffiziente Anlagerung zu vermeiden), damit sich die spezifischen und komplementären Primer an die Templat-DNA anlagern können (siehe Schritt 2 in Abbildung 1). Die erneute Temperatur-erhöhung (i.d.R. 68 – 72 °C) aktiviert die verwendete DNA-Polymerase, welche einen neuen DNA-Strang komplementär zur Templat-DNA in 5`-3`-Richtung mit Hilfe frei verfügbarer dNTPs synthetisiert, was als Elongation bezeichnet wird (siehe Schritt 3 in Abbildung 1). Dieser Zyklus wird 25 bis 35 Mal wiederholt und da die neu synthetisierte DNA auch als Templat dient, ist unter optimalen Bedingungen mit jedem Zyklus eine exponentielle Erhöhung der Konzentration der Ziel-DNA zu beobachten. Die Visualisierung der erhaltenen PCR-

Produkte kann im Anschluss durch Agarose-Gelelektrophorese erfolgen [6, 7]. Die lineare DNA kann anschließend ligiert und in kompetente Zellen transformiert werden.

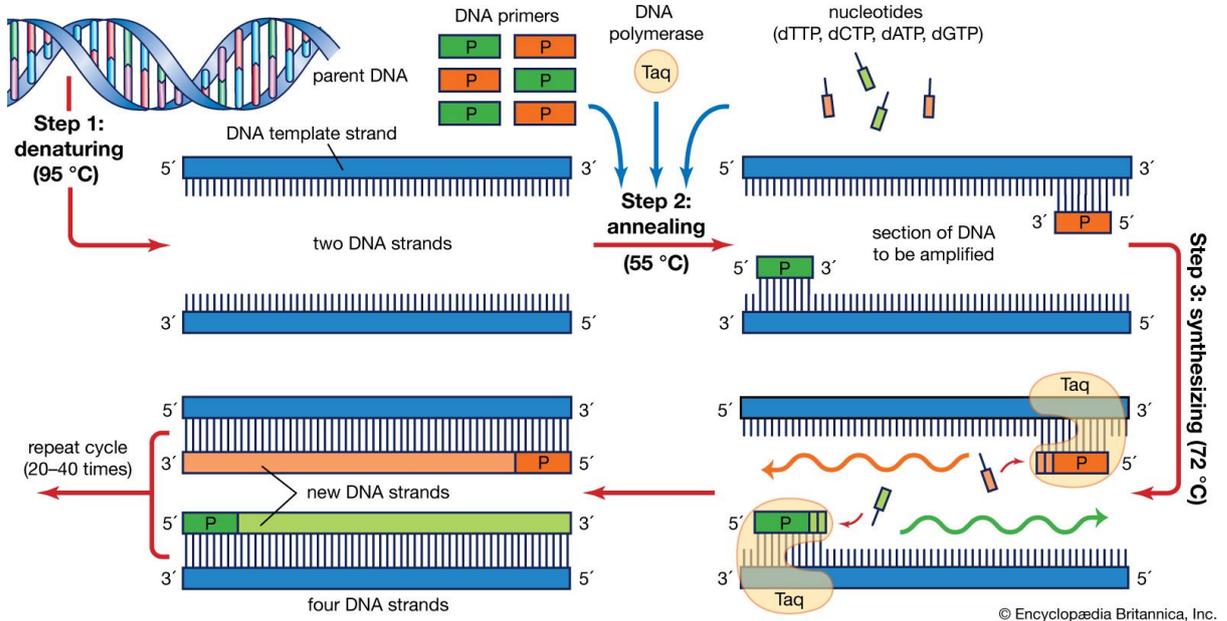


Abbildung 1 | Schema einer Polymerase-Kettenreaktion (Abb. ent. aus [8]).

1.2 Rekombinante Proteinexpression

Die Produktion von Proteinen in hoher Ausbeute ist heutzutage essentiell, sei es für deren biochemische Charakterisierung, deren Verwendung in industriellen Prozessen oder vielen weiteren Bereichen. Die biotechnologische Methode der rekombinanten Proteinexpression revolutionierte die Herstellung von Proteinen, da bakterielle Expressionssysteme sowohl eine hohe Wachstumsrate in kostengünstigen Substraten, eine gut charakterisierte Genetik als auch eine stetig steigende Anzahl an Klonierungsvektoren und Wirtsstämmen besitzen [9, 10]. Das Grundprinzip besteht darin, das *gene of interest* in einen Expressionsvektor zu insertieren, danach den Wirtsorganismus mit diesem zu transformieren und anschließend die Expression zu induzieren. Dabei gibt es jedoch eine Vielzahl an Faktoren zu beachten, die die Proteinausbeute dabei beträchtlich beeinflussen. Beispiele dafür sind ein schlechtes Wachstum des Wirtsorganismus, die Bildung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*), Proteininaktivität oder auch das Ausbleiben der Proteinproduktion [11]. Ein weit verbreiteter, ausführlich studierter und in dieser Arbeit verwendeter Wirtsorganismus für heterologe Proteinproduktion ist das

gramnegative Darmbakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) [12–14]. Dieses besitzt diverse Vorteile wie beispielsweise eine schnelle Wachstumskinetik (Verdopplungsrate bei optimalen Bedingungen sowie glukose- und salzhaltigen Medien beträgt 20 min) [15], die Erreichbarkeit einer hohen Zelldichte [16] als auch eine schnelle und kostengünstige Transformation mit exogener DNA [17]. Diese Aspekte werden weiterhin durch die Vielzahl an verfügbaren Plasmiden, rekombinanten Fusionspartnern und genetisch optimierten Stämmen erweitert, wodurch *E. coli* in vielen Fällen als sehr aussichtsreicher prokaryotischer Wirtsorganismus gilt [14].

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem pET-Expressionssystem (Novagen®, Merck) gearbeitet. Dieses wurde zuerst von Studier *et al.* Ende der 1980er Jahre beschrieben [18–20]. Es gewährleistet sowohl eine hohe Proteinausbeute als auch die Möglichkeit der Isotopenmarkierung, welche für Kernspinresonanzspektroskopie-Studien (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) auf Grund der geringen Häufigkeit von ¹³C- und ¹⁵N-Isotopen unabdingbar ist. *E. coli*-Zellen können für den Einbau der beiden Isotope ¹³C-Glukose und ¹⁵N-Ammoniumchlorid als einzige Quellen für Kohlenstoff und Stickstoff nutzen. Als Expressionsstamm wurde häufig *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Diese Deletionsmutante besitzt, wie auch andere B-Stämme, weder die Lon-Protease, welche für *E. coli* unbekannte Proteine degradiert, noch die OmpT-Protease, welche für den Abbau von extrazellulären Proteinen verantwortlich ist [21, 22]. Weiterhin ist der Stamm durch den DE3-Phagen lysogenisiert, welcher unter Kontrolle des Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)-induzierbaren *lacUV5*-Promoters die T7-RNA-Polymerase kodiert. Dieser *lac*-Promoter beinhaltet verschiedene Punktmutationen, welche einerseits die Abhängigkeit für cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und dessen Rezeptorprotein CAP reduzieren. Andererseits sinkt auch die Affinität zu Glukose, welches eine starke Induktion durch Laktose oder dessen nicht hydrolysierbares Analogon IPTG möglich macht [23]. Die Transkription der T7-RNA-Polymerase hat die Freisetzung von tetramerem LacI vom *lac*-Operon zur Folge, welches die Transkription des Zielgens startet. Dieses Expressionssystem wird auf Grund zahlreicher Vorteile sehr häufig verwendet. Es synthetisiert RNA schneller als die *E. coli* eigene RNA-Polymerase und beendet die Transkription seltener. Weiterhin ist es hochselektiv für die Initiierung der eigenen Promotersequenz im Vergleich zu anderen Sequenzen der *E. coli* DNA und die T7-RNA-Polymerase ist resistent gegen Antibiotika wie beispielsweise Rifampicin, welches die *E. coli* RNA-Polymerase inhibiert [24]. Für spezielle Bedingungen wurden Derivate des BL21(DE3)-Stammes verwendet, wie beispielsweise *E. coli* Tuner(DE3) oder *E. coli* Rosetta(DE3). Während der Tuner-Stamm ein *lacZY*-Deletionsmutant des

BL21-Stammes ist, welcher durch das gleichmäßige Einbringen von IPTG in alle Zellen ein konzentrationsabhängigeres und homogeneres Induktionslevel gewährleistet, dient der Rosetta-Stamm der Expression von eukaryotischen Proteinen, welche sogenannte *rare codons* besitzen (AGG, AGA, AUA, CGG, CUA, CCC, GGA) [11].

Abhängig vom Zielprotein wurden verschiedene Plasmide mit den *E. coli*-Zellen transformiert. Zum einen wurde der pET-28a(+) Vektor verwendet, da er durch ein zusätzliches spezifisches Translationssignal ein für *E. coli* unbekanntes Gen erfolgreich translatieren kann, was bei eukaryotischen Proteinen in prokaryotischen Expressionssystemen unabdingbar ist. Die Transkription erfolgt durch die zuvor beschriebene T7-RNA-Polymerase und als Selektionsmarker dient das Antibiotikum Kanamycin. Weiterhin ist neben dem *lac*-Gen für die IPTG-Induktion auch ein N-terminaler His₆-Tag mit anschließender Thrombin-Schnittstelle für die Reinigung des Proteins kodiert. Zusätzlich besitzt er noch eine f1-Replikationsursprung-Sequenz (*origin of replication*), welche die Replikation von ein- oder doppelsträngiger Plasmid-DNA für Mutagenese- und Sequenzierungsanwendungen ermöglicht. Zum anderen wurde ein pET-24a(+) Vektor verwendet, auf dem neben dem His₆-Tag noch ein *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO)-Tag zur Steigerung der Proteinlöslichkeit kodiert ist. Nach erfolgreicher Transformation der *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid werden diese bis zu einer hohen Dichte wachsen gelassen, um anschließend mit IPTG die Überexpression des gewünschten Proteins zu initiieren.

1.3 Proteinreinigung

Um an einem Protein Strukturaufklärung und Bindungsstudien durchführen zu können, ist es nicht ausreichend, nur eine große Menge davon zu produzieren, sondern es bedarf auch einer hohen Reinheit. Nach der Expression können die Zellen auf mechanische oder nicht-mechanische Weise aufgeschlossen werden. Zu den mechanischen Methoden zählen unter anderem die Verwendung von Kugelmøhlen, Hochdruckhomogenisatoren oder auch von Ultraschall. Nicht-mechanisch können Zellen einerseits mit Hilfe des enzymatischen Verdaus der Zellwand mit anschließendem Aufschluss durch osmotischen Schock, andererseits auch chemisch über die Verwendung von starken chaotropen Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidin oder auch mit Tensiden wie Triton® X-100 aufgeschlossen werden [25]. Bei diesem Prozess werden neben dem Zielprotein auch andere Bestandteile der Zelle wie zum Beispiel DNA, *messenger*-RNA, Organellen oder weitere Proteine freigesetzt. Um das gewünschte Protein zu isolieren, kann es als Fusionsprotein

exprimiert und durch diverse chromatographische Trennverfahren aufgereinigt werden. Fusionsproteine bestehen aus mindestens zwei Domänen, welche von separaten Genen kodiert werden, aber miteinander verbunden sind, sodass sie als ein Polypeptid transkribiert und translatiert werden [26]. Mit der Zeit wurden eine Vielzahl an Fusionspartnern erfolgreich etabliert, welche nicht nur bei der Aufreinigung eine wichtige Rolle spielen, sondern auch *in vivo* diverse Vorteile bringen können [10]. Beispielsweise können sie intrazelluläre Proteolyse verhindern [27], als spezifische Expressionsreporter dienen [28] oder auch die Löslichkeit erhöhen [29]. In vielen Fällen wird als erster Reinigungsschritt eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Dabei wird die Wechselwirkung zwischen einem Liganden und dessen Bindungspartner ausgenutzt, wie beispielsweise die von Glutathion mit der Glutathion-S-Transferase (GST), um das Zielprotein von den restlichen Bestandteilen abzutrennen. Eine auf vielen Plasmiden, ob N- oder C-terminal, kodierte Aminosäuresequenz ist der Polyhistidin-Tag. Dieser ist Voraussetzung für die Reinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) [30]. Dabei bilden die Histidin-Reste mit den Nickel-Ionen der Nickel-Sepharose-Matrix (Nitriloessigsäure-Agarose) einen oktaedrischen Komplex und nur Proteine, welche ebenfalls eine Histidin-reiche Sequenz in definierter Reihenfolge haben, binden ebenfalls. Um das Zielprotein anschließend von der Säule zu eluieren, wird es mit einem Imidazol-Gradienten kompetitiv verdrängt [30]. Für die Strukturaufklärung des nativen Proteins muss der Fusionspartner jedoch wieder, im Idealfall artefaktfrei, entfernt werden. Dies kann sowohl enzymatisch als auch chemisch geschehen. Der enzymatische Verdau wird durch das Erkennen einer bestimmten Schnittstellensequenz durch Proteasen wie Enterokinase, Thrombin, Faktor Xa oder den *tobacco etch virus* (TEV) realisiert [31]. Chemisch kann ein Fusionspartner zum Beispiel durch Bromcyan entfernt werden, was zwar den Vorteil hat, dass das Reagenz wieder leicht zu entfernen und im Vergleich zu kommerziellen Enzymen in der Regel kostengünstiger ist, jedoch unter extremen Bedingungen abläuft und daher nur bei denaturierender Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Einschlusskörperchen empfohlen wird [32].

Neben der Affinitätschromatographie gibt es noch zahlreiche weitere Methoden zur Proteinreinigung. Beispiele dafür sind die hydrophobische Interaktionschromatographie, bei der das Säulenmaterial mit einem hochionischen Puffer equilibriert wird, sodass die hydrophoben Bestandteile des Proteins binden können (auch Umkehrphasenchromatographie möglich) oder auch die Ionenaustauschchromatographie, bei der die Separierung durch die Ladung generiert wird (zu unterteilen in Kationen- und Anionenaustauscher) [33]. Wenn die Moleküle nach ihrem

hydrodynamischen Radius aufgetrennt werden sollen, um sie beispielsweise von Aggregaten zu separieren, ist die Gelpermeationschromatographie (GPC/SEC, *size exclusion chromatography*) eine effektive Reinigungstechnik. Dabei durchlaufen die Moleküle eine Gelmatrix mit Poren definierter Größe, welche durch die verschiedenen hydrodynamischen Volumina unterschiedliche Verweilzeiten in den Poren und dementsprechend auch andere Retentionszeiten besitzen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass keine Interaktion mit dem Säulenmaterial erfolgt [34, 35].

Bei jeder Reinigung ist die Wahl des richtigen Puffers essenziell, da sowohl das Puffersystem als auch der pH-Wert dabei eine wichtige Rolle spielen. Um eine Interaktion des Proteins mit hydrophoben Bereichen anderer Proteine anstelle der Ausbildung einer Hydrathülle und somit der Bildung von Aggregaten zu vermeiden, sollte der gewählte pH-Wert auf der einen Seite weder zu sauer (<4) noch zu basisch (>9) sein und sich auf der anderen Seite möglichst weit von dessen isoelektrischem Punkt befinden. Weiterhin ist die Oberflächenladung des Proteins zu beachten, welche durch den Zusatz von Ionen stabilisiert wird. Es gibt außerdem eine Reihe von optionalen Additiven wie beispielsweise Glycerin zur Proteinstabilisierung oder Dithiothreitol (DTT) beziehungsweise Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) für die Erzeugung einer reduzierenden Umgebung zur Vermeidung von inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken, die den Puffersystemen zugesetzt werden können. Auch Detergenzien zur Solubilisierung wie Triton® X-100 oder der Zusatz von Metallionen wie Calcium-Ionen bei einer entsprechenden Bindestelle im Protein können positive Effekte bei der Proteinreinigung zeigen [36].

1.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wird unter anderem als Analysetechnik zur Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) von Ionen im Hochvakuum beschrieben. Dabei findet diese Methode zahlreiche Anwendungen in der Chemie/Biochemie/Medizin (Bsp.: Identifizierung und Struktur- aufklärung von kleinen Molekülen oder Biomakromolekülen wie Proteinen oder Oligonukleotiden [37–39]), der Physik/Geowissenschaften (Bsp.: Isotopenverhältnis von Gasen und Gesteinen [40, 41]) oder auch der klinischen/forensischen Analytik (Bsp.: Wirkungsmechanismus von Medikamenten oder Drogen auf den Organismus [42, 43]) [44]. Bei dieser Messmethode wird eine Probe direkt oder über eine Online-Kopplung mit chromatographischen Trennverfahren über das Einlasssystem in das Spektrometer eingebracht, wo diese bei Atmosphärendruck oder im Hochvakuum verdampft wird und dabei gasförmige Ionen erzeugt werden. Diese werden

anschließend nach ihrem m/z -Verhältnis im Massenanalysator separiert und der entstandene Ionenstrom wird dann von einem Detektor erfasst (siehe Abbildung 2).

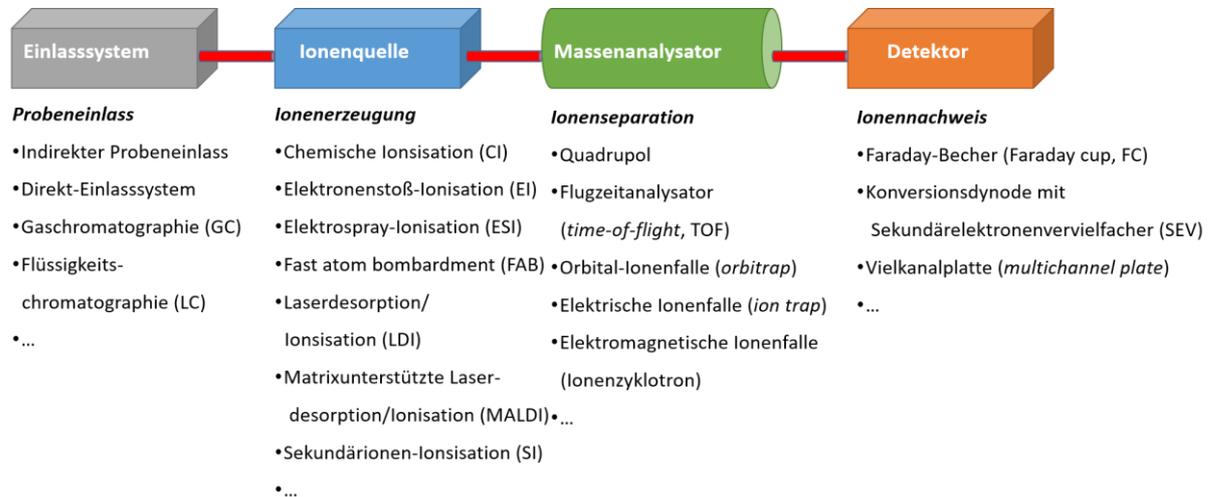


Abbildung 2 | Komponenten eines Massenspektrometers mit einer Auswahl an möglichen Modulen (Abb. ent. und mod. aus [45]).

Während neutrale Teilchen sich im isolierten Grundzustand in der Gasphase frei bewegen, können sie im ionisierten Zustand durch elektrische oder magnetische Felder gezielt beschleunigt und abgelenkt werden. Neben der Elektronenstoßionisation (EI, Beschuss der Neutralteilchen durch Elektronen, $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$) existiert unter anderem auch die sanfte Ionisationstechnik der Elektrospray-Ionisation (ESI). Vorteile bei der ESI-Methode sind sowohl die Kompatibilität mit chromatographischen Trennverfahren, die geringe chemische Spezifität, die Stabilität der erzeugten Ionen als auch die hohe Ionisierungseffizienz [46]. Hierbei wird die gelöste Probe durch eine leitfähige Kapillare in ein elektrisches Feld injiziert, was eine Bildung von Ionen in der Gasphase zur Folge hat.

Die Entstehung dieser Gasphasen-Ionen kann einerseits durch das Modell des geladenen Rückstands (*charged-residue model*, CRM) von Dole *et al.* [47] (ausgebaut von Röttgen *et al.* zur SIDT-Theorie, *single ion in droplet theory* [48]) als auch von dem Ionenemissionsmodell (*ion evaporation model*, IEM) von J. V. Iribane und B. A. Thomson erklärt werden [49, 50]. Die entstandenen einfach sowie mehrfach positiv geladenen Ionen (mögliche Ladungsträger sind beispielsweise H^+ , K^+ , Na^+ oder NH_4^+) bewegen sich in Richtung Kathode, wobei ein Flüssigkeitstonus (Taylor-Konus [51, 52]) entsteht. Dieser wird zu einem filamentartigen Flüssigkeitsstrom und nach einer bestimmten Entfernung zur Kapillare instabil und zu einem

elektrostatisch hoch geladenen Aerosol, welches durch ein spezielles Interface in den im Hochvakuum befindlichen Massenanalysator geleitet wird. Dabei wird oft trockener, geheizter Stickstoff (*curtain gas*) zugeströmt, um Neutralteilchen vom Eindringen abzuhalten und den Desolvatationsprozess zu unterstützen. Oft werden für die Ionenanalyse Hybridgeräte eingesetzt, bei denen mindestens zwei Massenanalytoren gekoppelt sind. Ein Beispiel ist das Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer. Dabei werden die Ionen durch einen „Hilfsquadrupol“ fokussiert und in den ersten Messquadrupol eingebracht, welcher als Massenfilter für die Selektion der Vorläuferionen dient. Es folgt ein weiterer Quadrupol, der als Kollisionszelle zur Generierung der Fragmentationen fungiert, welche durch Kollision der Ionen mit inerten Gasmolekülen/atomen (z.B. Argon, Helium oder Stickstoff) entstehen (*collision induced dissociation*). Anstatt eines weiteren Quadrupols erfolgt die Massenanalyse in einem orthogonal angeordneten Reflektor-TOF-MS (*time of flight*, TOF). Darin werden Ionen zeitlich getrennt, nachdem sie eine definierte feldfreie Driftstrecke mit der gleichen kinetischen Energie passiert haben. Somit lässt sich durch Messung der Flugzeit bei bekannter Flugstrecke und Beschleunigungsspannung das m/z -Verhältnis bestimmen [44, 45].

Vor allem die Analyse einzelner Fragmente macht also die Elektrospray-Ionisation verbunden mit der Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) zu einer wirkungsvollen Methode bei der Untersuchung einer Vielzahl von biologischen Proben. Proteine und Peptide beispielsweise können damit charakterisiert und Prozesse wie posttranslationale Modifikationen oder proteolytischer Abbau untersucht werden [53–55].

1.5 NMR-Spektroskopie

1.5.1 Grundlagen

Die Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) gilt neben der Röntgenkristallstrukturanalyse und der Kryoelektronenmikroskopie als eine der bedeutendsten Methoden in der Strukturaufklärung von Molekülen, wie auch mehrere Nobelpreise für Chemie in diesem Feld belegen (1952 F. Bloch & E. M. Purcell, 1991 R. R. Ernst, 2002 K. Wüthrich [56]). Diese kann für die Charakterisierung sowohl von kleinen Molekülen als auch von Biopolymeren wie beispielsweise Proteinen eingesetzt werden. Neben der Aufklärung der Struktur ist es auch möglich, Moleküldynamiken oder auch Interaktionen mit anderen Molekülen zu bestimmen.

Ausschlaggebend für die Anwendung der Methode sind die magnetischen Eigenschaften der zu untersuchenden Kerne. Aufgrund des inneren Aufbaus der Atomkerne ergibt sich, dass einige Kerne wie zum Beispiel ^1H , ^{13}C oder ^{15}N einen von Null verschiedenen Eigendrehimpuls \vec{P} besitzen. Dieser ist sowohl durch die Kernspinquantenzahl I als auch durch das reduzierte Planck'sche Wirkungsquantum \hbar definiert (siehe Glg. 1) [57, 58].

$$\vec{P} = \sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad \text{Glg. 1}$$

Der Drehimpuls \vec{P} ist direkt proportional zu einer weiteren vektoriellen Größe, dem magnetischen Moment $\vec{\mu}$ (siehe Glg. 2). Als Proportionalitätsfaktor dient hier das für jedes Isotop individuelle gyromagnetische Verhältnis γ . Je größer dieser Faktor, umso höher ist die Empfindlichkeit des jeweiligen Kerns.

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{P} \quad \text{Glg. 2}$$

Wird ein Kern nun einem statischen Magnetfeld B_0 ausgesetzt, orientiert sich der Drehimpuls im Raum so, dass dessen Komponente in z-Richtung ein Vielfaches von \hbar ist, was wiederum durch die Magnetquantenzahl m ($m = 2I + 1$) definiert ist. Kerne wie das Proton oder der ^{13}C -Kern haben eine Kernspinquantenzahl von $I = \frac{1}{2}$, was bedeutet, dass sie die Magnetquantenzahlen $+\frac{1}{2}$ (α -Zustand, parallel zur Feldrichtung) und $-\frac{1}{2}$ (β -Zustand, antiparallel zur Feldrichtung) besitzen. Der Energieunterschied ΔE zwischen den sogenannten Kern-Zeeman-Niveaus ist direkt proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes, was auch als Zeeman-Effekt bezeichnet wird (siehe Glg. 3) [57–59].

$$\Delta E = \gamma\hbar B_0 = \hbar\omega_0 \quad \text{Glg. 3}$$

Die Larmorfrequenz ω_0 ist dabei abhängig von der Kernsorte und der elektronischen Umgebung und liegt abhängig von der Feldstärke des verwendeten Magneten im hohen Megahertz- bis geringem Gigahertz-Bereich. Durch die geringe Energiedifferenz zwischen diesen zwei Zuständen resultiert bei Raumtemperatur eine annähernd gleiche Besetzung N , was durch die Boltzmann-Verteilung dargestellt werden kann (siehe Glg. 4).

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad \text{Glg. 4}$$

Um Übergänge zwischen den unterschiedlichen Energieniveaus zu induzieren, müssen die Kerne mit einer elektromagnetischen Welle mit der Resonanzfrequenz ν_0 bestrahlt werden (siehe Glg. 5). Die Prozesse der Absorption und der Emission können dabei mit gleicher Wahrscheinlichkeit stattfinden, es erfolgt in beiden Fällen eine Spinumkehr.

$$\nu_0 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad \text{Glg. 5}$$

Nachdem der RF-Puls eingestrahlt wurde, ändert sich die Nettomagnetisierung M_0 um einen bestimmten Winkel und die Kerndipole beginnen, um die z-Achse mit der Larmorfrequenz zu präzedieren. Es wird so ein magnetisches Wechselfeld erzeugt, welches wiederum als induzierte Spannung (*free induction decay*, FID) von einem Detektor in x-Richtung detektiert wird. Die Nettomagnetisierung in der transversalen Ebene nimmt exponentiell durch Spin-Spin-Relaxation ab. Nach der Abnahme des FIDs wird anschließend durch Fourier-Transformation die Zeit- in eine Frequenzdomäne umgewandelt und ein NMR-Spektrum erhalten. Durch Variation der Pulsprogramme können neben eindimensionalen auch mehrdimensionale NMR-Spektren aufgenommen werden. Diese haben den Vorteil, dass ein Transfer der Magnetisierung während der Mischsequenzen möglich ist, sodass dies zu Korrelationen zwischen verschiedenen Kernen führen kann. Diese unterschiedlichen Korrelationen können genutzt werden, um beispielsweise die räumliche Struktur aufzuklären oder Resonanzzuordnung durchführen zu können [60].

Um Moleküle charakterisieren zu können, werden mittels NMR-Spektroskopie die Unterschiede der chemischen und magnetischen Umgebung der einzelnen NMR-aktiven Kerne analysiert. Dies resultiert aus einer Abschirmung δ des effektiven Magnetfeldes B_{eff} des beobachteten Kerns durch die äußere Umgebung (siehe Glg. 6). Sie wird in der Regel gegen eine Referenz bekannter Verschiebung gemessen (siehe Glg. 7). Neben der chemischen Verschiebung δ sind auch die Einflüsse anderer Kernspins auf den beobachteten Kernspin über chemische Bindungen (skalare Kopplung) oder durch den Raum (dipolare Kopplung) Indikatoren für die elektronische Umgebung, die 3D-Struktur und die Dynamik [61].

$$B_{\text{eff}} = B_0 - \delta B_0 \quad \text{Glg. 6}$$

$$\delta = \frac{\nu_{\text{Probe}} - \nu_{\text{Referenz}}}{\nu_{\text{Referenz}}} 10^6 \text{ ppm} \quad \text{Glg. 7}$$

1.5.2 Protein-NMR-Spektroskopie

Es bedarf einer möglichst vollständigen Zuordnung der Resonanzen im NMR-Spektrum, um sowohl die Struktur von Biomakromolekülen wie Peptiden und Proteinen aufzuklären, als auch deren Interaktionen mit anderen Molekülen untersuchen zu können. Dies beinhaltet jedoch eine Reihe von Herausforderungen, welche durch verschiedene Lösungsansätze bereits vereinfacht werden konnten.

Die sehr große spektrale Überlappung der Signale im eindimensionalen Spektrum stellt eine Herausforderung dar, die aus der Größe von Proteinen und der dementsprechend hohen Anzahl an Atomen resultiert. Bis auf Eingrenzungen auf charakteristische Bereiche (beispielsweise Methyl-Protonen bei ca. 1 ppm, Amid-Protonen des Rückgrates zwischen 7 und 10 ppm) ist eine exakte Zuordnung der Signale nicht möglich. Zu diesem Zweck werden multidimensionale Spektren aufgenommen. Diese verringern einerseits die Signalüberlagerung und andererseits ermöglichen sie es, dass verschiedene Kerne eines Systems miteinander korreliert werden können. Ein weiteres Problem ist das natürliche Vorkommen der relevanten Kohlenstoff- und Stickstoff-Isotope, welche einen Kernspin von $I = \frac{1}{2}$ besitzen [62, 63]. Im Vergleich zum Proton mit 99,99 % treten das ^{13}C - Isotop und das ^{15}N -Isotop jeweils nur mit einer natürlichen Häufigkeit von 1,1 % bzw. 0,4 % auf. Daher ist eine geringe Empfindlichkeit bei der Messung die Folge, zu der zusätzlich noch in der Regel begrenzte Probenmengen an Protein hinzukommen. Die Empfindlichkeit kann sowohl durch optimierte Probenköpfe (Kryoprobenköpfe) als auch durch die Anreicherung der zu untersuchenden Isotopen mittels Isotopenmarkierung erhöht werden [64].

Ein Standardexperiment zur Untersuchung von ^{15}N -markierten Proteinen ist das ^1H - ^{15}N -HSQC-Experiment (*heteronuclear single quantum coherence*) [65]. Dabei wird die Magnetisierung vom empfindlichen ^1H -Kern via INEPT-Transfer (*insensitive nuclei enhanced by polarization transfer*) durch die skalare ^1J -Kopplung auf den direkt benachbarten ^{15}N -Kern transferiert [66]. Nach einer bestimmten Entwicklungszeit t_1 wird via Retro-INEPT-Schritt die verbleibende Magnetisierung, welche dann mit der chemischen Verschiebung kodiert ist, auf den ^1H -Kern zurück transferiert und detektiert. Dabei ergibt sich ein Signal von allen Stickstoff-gebundenen Protonen. Somit geben alle Aminosäuren, außer Prolin, mindestens ein Signal im Spektrum für das Rückgratproton. Bei einer stickstoffenthaltenden Seitenkette sind auch diese Signale unter bestimmten Umständen sichtbar. Je nach Dispersion der Resonanzen können hieraus Schlüsse auf eine vorhandene Faltung oder Entfaltung des Proteins gezogen werden [62]. Um die entstandenen stickstoffkorrelierten Signale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum den entsprechenden Aminosäuren

zuordnen zu können, sind bei großen Proteinen neben der ^{15}N -Markierung üblicherweise auch die ^{13}C -Markierung und die Aufnahme von dreidimensionalen Spektren Voraussetzungen, da die ^{13}C -chemischen Verschiebungen der C_α - und C_β -Atome eine sequenzielle Zuordnung der Aminosäuren erlauben. Dazu werden verschiedene Korrelationen zwischen $^1\text{H}_{\text{HN}}$, $^{15}\text{N}_{\text{NH}}$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$ und $^{13}\text{C}_{\text{CO}}$ ausgenutzt. Diese Korrelationen können mittels dreidimensionaler Spektren sowohl zur Zuordnung des Rückgrates (unter anderem HNCA, HNCO, HN(CA)CO, HN(CO)CA, HNCACB und HN(CO)CACB [67–72]) als auch zur Zuordnung der Seitenketten (unter anderem HBHA(CO)NH, H(CCCO)NH-TOCSY, C(CCO)NH-TOCSY, H(C)CH-TOCSY und H(C)CH-COSY [72–76]) ausgenutzt werden [62, 63].

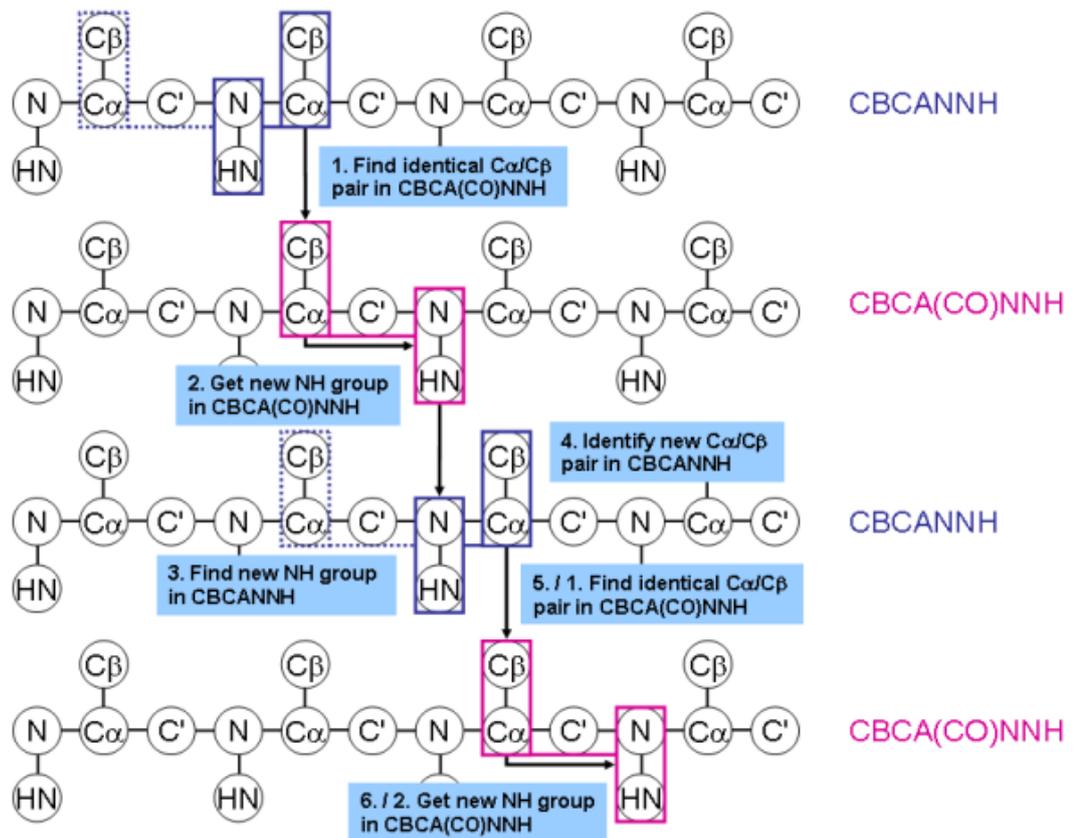


Abbildung 3 | Sequenzielle Zuordnung der Rückgrat-atome durch zwei 3D-NMR-Experimente (Abb. entn. aus [77]).

In Abbildung 3 ist die Sequenzbestimmung sowohl anhand eines CBCA(CO)NH-Spektrums [72], welches pro NH-Korrelation die N-terminal benachbarten C_{α} - und C_{β} -Resonanzen aufzeigt, als auch eines CBCANH-Spektrums abgebildet [71], welches zusätzlich noch die C_{α} - und C_{β} -Resonanzen der beobachteten Aminosäure beinhaltet. Diese Signale können anschließend z.B. mittels der Software Autolink zu einer Serie von aufeinanderfolgenden Aminosäuren, sogenannten Fragmenten, verknüpft werden [78]. Ist diese Zuordnung nicht eindeutig, unvollständig oder sollen neben dem Proteinrückgrat auch noch die Seitenketten zugeordnet werden, bedarf es der Verwendung weiterer 3D-NMR-Experimente, wie in diesem Kapitel schon aufgeführt. Informationen zur Strukturaufklärung wie beispielsweise zu Konformation und Sekundärstrukturelementen können beispielsweise durch die dipolare Interaktion zweier räumlich naher Kerne (nuklearer Overhauser-Effekt, NOE [79]), den Dieder-Winkeln φ und ψ der kovalenten Bindungen des Proteinrückgrates (über die Karplus-Beziehung [80] oder anhand der chemischen Verschiebungen, *secondary chemical shift*) oder der Orientierung der Bindungswinkel durch residuale dipolare Kopplung zweier Kerne (mit Ausrichtungsmedien wie beispielsweise Phagen [81, 82]) bestimmt werden.

1.5.3 Chemical shift perturbation mapping

Die Larmorfrequenz eines Kerns ist, wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, von seiner elektronischen Umgebung abhängig. Ändert sich diese, beispielsweise durch die Interaktion mit einem Liganden, ändert sich auch die mit dem Kernspin verbundene Larmorfrequenz und die dazugehörige chemische Verschiebung des Signals im Spektrum. Eine Änderung der chemischen Verschiebung des Rezeptors zeigt somit eine Interaktion mit einem Liganden oder eine Konformationsänderung an. Sind also die Signale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zugeordnet, kann aus den Verschiebungen der Resonanzen der bekannten Aminosäuren auf die Bindestelle des Liganden geschlossen werden. Diese Methode wird als *chemical shift perturbation mapping* bezeichnet (siehe Abbildung 4 A) [83, 84]. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass der Rezeptor durch die Ligandbindung keine massive Konformationsänderung erfahren darf, da ansonsten auch von der Bindestelle räumlich entfernte Aminosäuren eine Änderung im Spektrum zeigen, was die Interpretation der CSP-Daten erschwert. Prinzipiell können diese Änderungen beobachtet werden, indem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des ^{15}N -markierten Proteins aufgenommen werden, wobei der unmarkierte Ligand schrittweise dazu titriert wird. Das detaillierte Verhalten in CSP-

Experimenten wird von folgenden Faktoren bestimmt: K_d - Dissoziationskonstante, $\Delta\delta$ - chemische Verschiebung und k_{on}/k_{off} - Kinetik (siehe Glg. 8).

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\max} \frac{\{n[P]+[L]+K_d - \sqrt{(n[P]+[L]+K_d)^2 - 4n[P][L]}\}}{2n[P]} \quad \text{Glg. 8}$$

Gleichung definiert für schnellen Austausch mit $\Delta\delta_{\max}$ = chemische Verschiebung bei maximaler Sättigung, [P] = Proteinkonzentration, [L] = Ligandkonzentration und n = Anzahl der äquivalenten Bindungsstellen

Dabei können drei Fälle unterschieden werden. Ist die Geschwindigkeitskonstante k_{off} größer als die Differenz der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$, kann eine graduelle Verschiebung der Resonanzen vom ungebundenen zum gebundenen Zustand beobachtet werden ($k_{off} \gg \Delta\delta$). Dies wird als schneller Austausch bezeichnet. Ist k_{off} jedoch kleiner als $\Delta\delta$, so findet ein langsamer Austausch statt und die Signalintensität des ungebundenen Proteins nimmt ab, während das Signal des gebundenen Proteins an einer anderen Stelle wieder erscheint ($k_{off} \ll \Delta\delta$, siehe Abbildung 4 B). Sind beide Werte annähernd gleich, kommt es zu einer Signalverbreiterung ($k_{off} \approx \Delta\delta$) [84]. Um die Affinität zwischen Rezeptor und Ligand charakterisieren zu können, kann durch die Auftragung der Änderung der chemischen Verschiebung $\Delta\delta$ gegen die Ligandkonzentration [L] die Dissoziationskonstante K_d bestimmt werden (siehe Abbildung 4 C). Die Gleichung 8 ist auf eine beliebige Anzahl n an Bindestellen im Protein anwendbar.

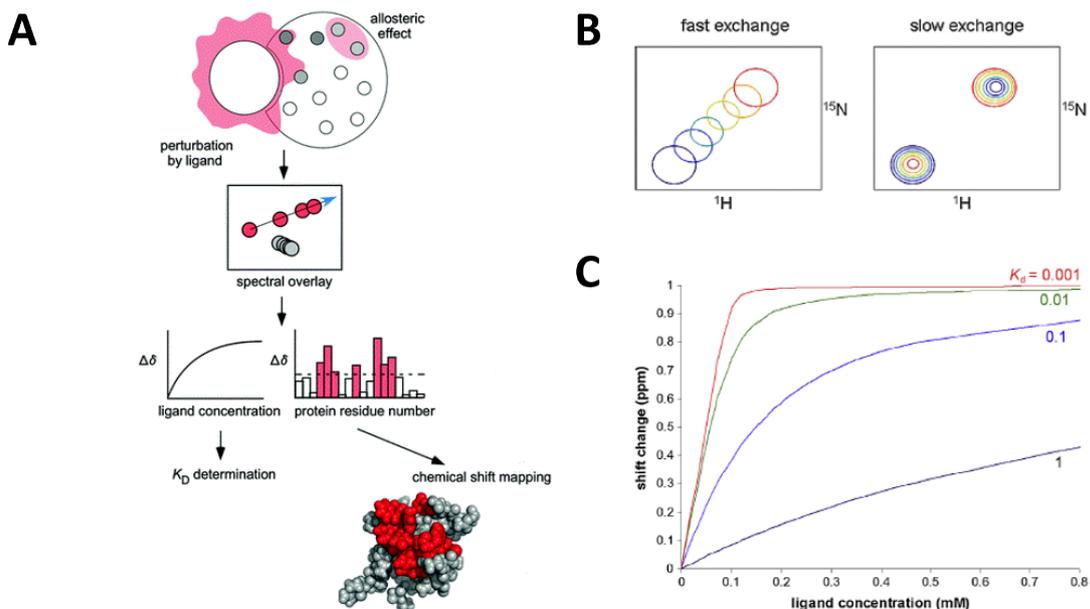


Abbildung 4 | A) Prinzip der *chemical shift perturbation*-Analyse (Abb. ent. aus [85]). B) Abhängigkeit der chem. Verschiebung von der Austauschrate (Abb. entn. aus [84]). C) Berechnete Sättigungskurven für eine einzelne Bindungsstelle bei einer Rezeptorkonzentration von 100 µM (Abb. ent. aus [84]).

Teil I

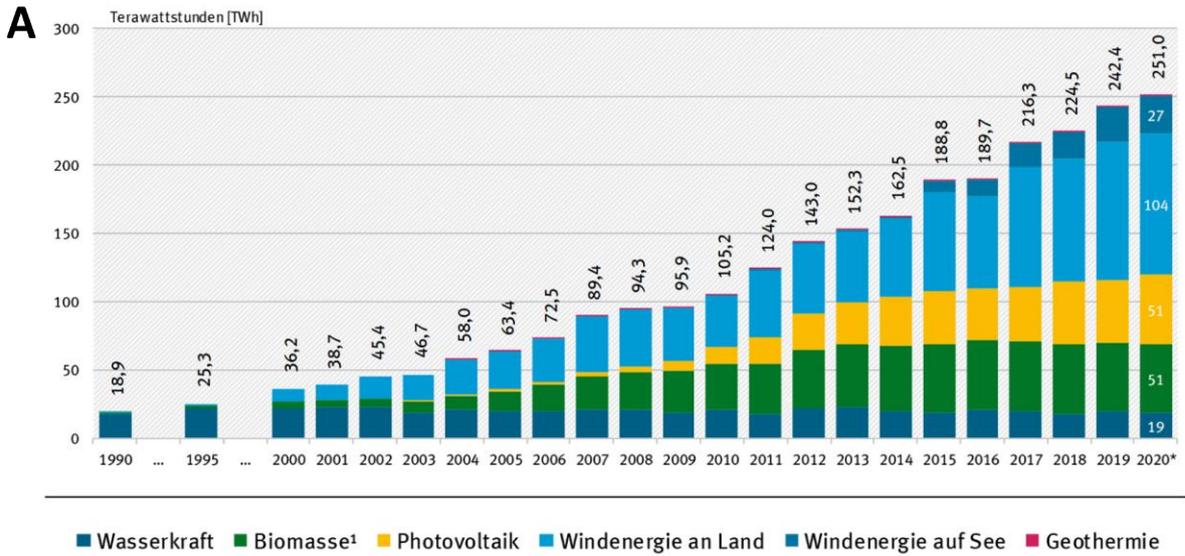
**Molekulare Erkennung von
Cellulose und Cellulose-Fragmenten
durch Cellulose-Bindemodule**

2 Einleitung

2.1 Cellulose – Bedeutung und Verwendung

Nachwachsende Rohstoffe nehmen bei der Verwendung als Energiequelle sowie als Basis für eine breite Produktpalette stetig an Bedeutung zu. Definiert sind diese als Produkte aus land- und forstwirtschaftlicher Erzeugung, die nicht als Futter- oder Nahrungsmittel eingesetzt werden, sondern stofflich oder zur Erzeugung von Kraftstoffen, Strom oder Wärme zum Einsatz kommen [86]. Denn neben der Wasser-, Wind- und Solarenergie ist auch der Anteil an Bioenergie ein wichtiger Faktor bei Stromerzeugung aus erneuerbaren Energien (siehe Abbildung 5 A). Deren Einsatz wird immer essentieller, da beispielsweise fossile Rohstoffe nur begrenzt verfügbar sind, immer kostenintensiver werden sowie negative Auswirkungen auf die Umwelt haben [87].

In diesem Kontext spielt das Polysaccharid mit dem größten Vorkommen weltweit, die Cellulose, eine sehr große Rolle, da es neben vielen weiteren Verwendungen auch in Biokraftstoff umgewandelt werden kann (siehe Abbildung 5 B) [88]. Doch nicht nur im Energiesektor, sondern auch in der Papierproduktion, als Zellglas, als regenerierte Cellulose-Fasern oder als Edukt für chemische Modifizierung wie die Synthese von verschiedenen Cellulose-Estern oder -Ethern kommt sie zum Einsatz. Diese Derivate können beispielsweise für Beschichtungen, optische Filme, Sorptionsmedien oder auch als eigenschaftsbestimmendes Additiv in Baumaterialien, Pharmazeutika oder in der Lebensmittelindustrie verwendet werden [89]. Durch ihre Biokompatibilität und Chiralität bildet Cellulose auch die Grundlage für verschiedenste biotechnologische Anwendungen wie die Immobilisierung von Proteinen oder Antikörpern [90, 91], als Celluloseverbundstoffe mit synthetischen oder Biopolymeren [92] oder auch die Separierung von enantiomeren Molekülen [93]. Diese Vielzahl an Verwendungsmöglichkeiten entsteht durch die Eigenschaften der Cellulose sowohl chiral, abbaubar, hydrophil als auch durch eine hohe Donor-Reaktivität der Hydroxylgruppen chemisch variabel zu sein. Grund für dieses breite Spektrum ist ihr struktureller Aufbau, welcher durch eine definierte hierarchische Ordnung in einer supramolekularen Struktur charakterisiert ist [89].



¹ inkl. feste und flüssige Biomasse, Biogas, Biomethan, Deponie- und Klärgas, Klärschlamm und dem biogenen Anteil des Abfalls
* vorläufige Werte

Quelle: Umweltbundesamt (UBA) auf Basis AGEE-Stat Stand 02/2021

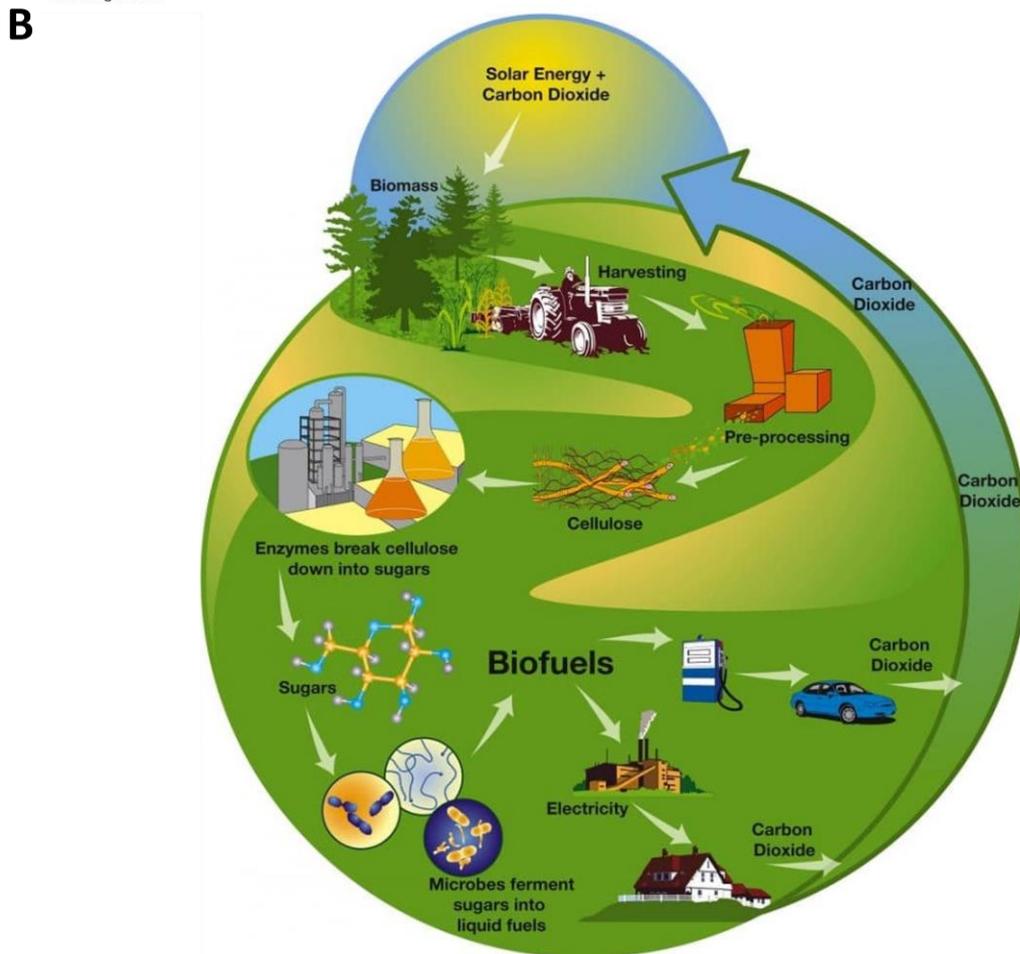


Abbildung 5 | A) Bruttostromerzeugung aus erneuerbaren Energien in Deutschland (Abb. ent. und mod. aus [94]). B) Zyklus über die Verwendung von Cellulose als nachwachsender Rohstoff (Abb. ent. aus [95]).

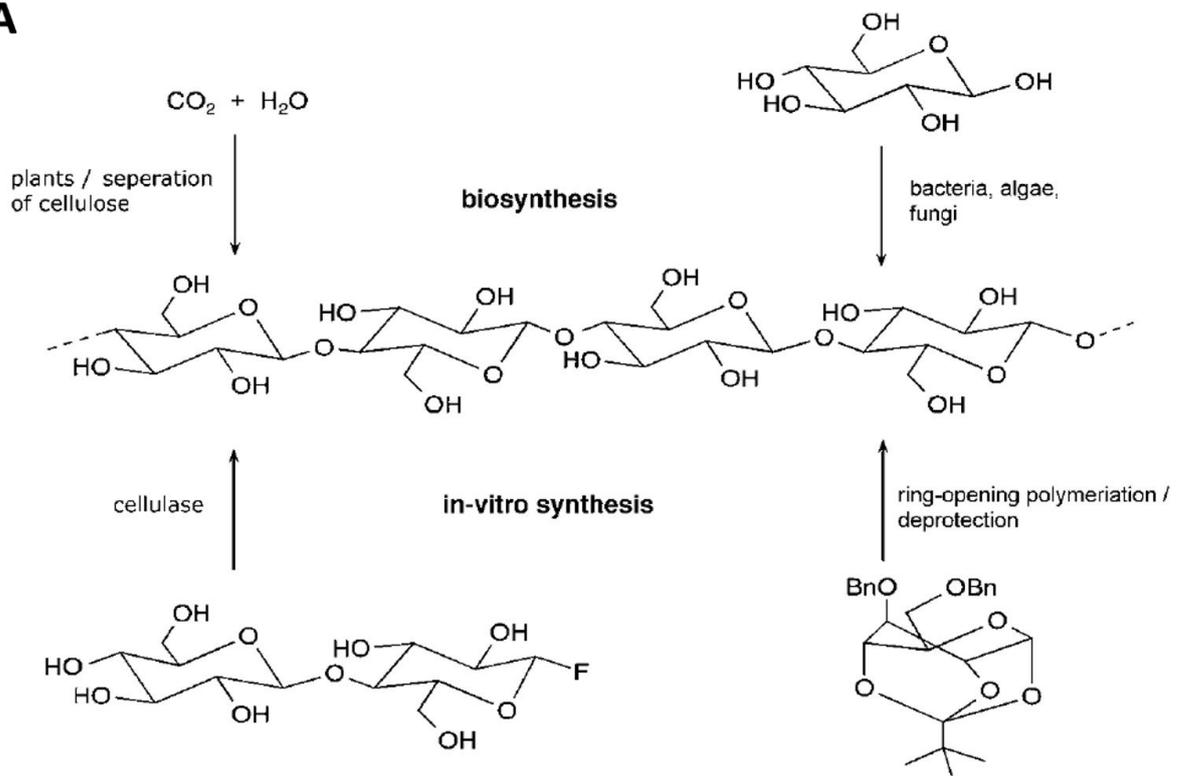
Cellulose, erstmals 1838 vom französischen Chemiker Anselme Payen beschrieben und 1920 von Hermann Staudinger charakterisiert, ist ein lineares Homopolymer und besteht aus β -1,4-glycosidisch gebundener β -D-Glucopyranose [96, 97]. Durch die von der Acetal-Sauerstoffbrücke bevorzugten Bindungswinkel ist jede zweite Anhydroglucose-Einheit um 180° in der Ebene gedreht, weshalb das Disaccharid (Cellobiose) als Wiederholeinheit der Cellulose definiert ist [98]. Weitere Glucose-Polymere sind beispielsweise Stärke aus α -D-Glucose (Amylose: 1,4-verknüpft und nicht verzweigt; Amylopectin: 1,4- und 1,6-verknüpft und verzweigt) oder auch Glycogen (1,4- und 1,6-verknüpft und verzweigt; tierischen Ursprungs). Wie hoch der Polymerisationsgrad von Cellulose ist, hängt von Ursprung und Behandlung des Rohmaterials ab. Während die Länge bei Zellstoff zwischen 300 und 1.700 Wiederholeinheiten beträgt, liegt sie bei Pflanzenfasern zwischen 800 und 10.000. Die Cellulose-Kette besitzt auf der einen Seite eine am C₄-Kohlenstoff freie Hydroxyl-Gruppe, welche als nicht-reduzierendes Ende bezeichnet wird, und auf der anderen Seite eine Aldehyd-Gruppe beziehungsweise ein Halbacetal, der reduzierte Terminus. Die Kette ist somit polarisiert und weitere Monomer-Einheiten können sich an der Hydroxyl-Gruppe anlagern und zur Kettenverlängerung führen [99].

Cellulose ist in Wasser und vielen organischen Lösungsmitteln unlöslich, weshalb spezielle Lösungsmittelgemische wie Dimethylamin / Lithiumchlorid (DMA/LiCl) [100] oder Dimethylsulfoxid / Tetrabutylammoniumfluorid (DMSO/TBAF) [101] für die Charakterisierung und Synthese von Celluloseestern, -ethern, -sulfonaten, Aminocellulosen oder anderen Derivaten in Lösung verwendet werden. Neben der dominierenden Gewinnung von Cellulose aus Pflanzen können auch bestimmte Bakterien (wie *Acetobacter* oder *Acanthamoeba*), Algen (wie *Valonia* oder *Chaetomorpha*) oder Pilze (wie *Ascomycota* oder *Basidiomycota*) dieses Polysaccharid synthetisieren (siehe Abbildung 6 B) [102–104]. Bakterielle Cellulose unterscheidet sich durch einen hohen Polymerisationsgrad (2000 – 8000) und Wasseranteil (bis zu 90 %) und eine hohe Kristallinität (60 – 90 %) von pflanzlicher Cellulose. Sie kann in Laborkulturen durch verschiedene verwendete Substrate, Kultivierungsbedingungen, Additive und Bakterienstämme zu konkreten Modellstrukturen mit definierten Eigenschaften wie molarer Masse, Molmassenverteilung oder supramolekularer Struktur synthetisiert werden [89]. Während die bakterielle Cellulose eine sehr hohe Reinheit aufweist, wird das Polysaccharid in der Pflanzenzellwand (Anteil: 40 – 50 %) von weiteren Komponenten wie Hemicellulose (Anteil: 20 – 40 %) und Lignin (Anteil: 20 – 30 %) umschlossen (siehe Abbildung 6 A) [105]. Durch eine Vielzahl an inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräften bilden sich kristalline und

hochorganisierte Mikrofibrillen aus. Bereiche, in denen Bindungen gebrochen sind und dadurch die Organisation verloren geht, werden als amorph bezeichnet. In der kristallinen Cellulose sind alle Atome in einer fixierten Position zueinander angeordnet und die einzelnen Komponenten der Mikrofibrillen sind sehr dicht gepackt, wodurch ein Eindringen von Enzymen oder kleinen Molekülen verhindert wird. Je größer der Anteil an diesen Strukturen ist, desto höher ist deren Kristallinitätsindex (in der Natur 40 – 95 %) und je schwerer kann der Komplex hydrolysiert werden [106].

Durch sechs mögliche Wasserstoffbrückenbindungs-Donatoren und neun Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptoren in einer Cellobiose-Einheit und unterschiedlichen Ausrichtungen der Pyranose-Ringe und Hydroxymethyl-Gruppen sind die verschiedensten Kristallpackungen möglich [107]. Röntgenkristallstrukturanalyse, Neutronenstreuung und Festkörper-NMR konnten vier kristalline polymorphe Strukturen mit speziellen Untergruppen charakterisieren [108–110]. *Cellulose I* findet sich in der Natur am häufigsten und kommt in Bakterien und Algen als I_{α} -Modifikation und in Pflanzen als I_{β} -Modifikation vor. Während die I_{α} -Form ein triklinisches Gitter durch wirkende van-der-Waals-Kräfte bildet, ist die Triebkraft bei der I_{β} -Form die Scherkraft zwischen den parallelen Cellulose-Ketten [111]. Neben der thermodynamisch weniger stabilen *Cellulose I* existieren auch noch die Subgruppen der *Cellulose II*, *III_I*, *III_{II}*, *IV_I* und *IV_{II}*. *Cellulose II* ist von den aufgeführten die sowohl thermodynamisch stabilste als auch technisch relevanteste Form, da sie durch Behandlung mit Natriumhydroxid-Lösung (Merzerisation) oder Regeneration (Solubilisierung und folgende Rekristallisation) gewonnen werden kann [112]. Die Regeneration von Cellulose, welche beispielsweise für die Herstellung von Fasern, Filmen oder Membranen essenziell ist, wird heutzutage neben der lange genutzten Methode des Viskose-Verfahrens [113] auch durch das CarbaCell-Verfahren (Cellulose-Carbamat-Verfahren) [114] oder den Lyocell-Prozess realisiert [115].

A



B

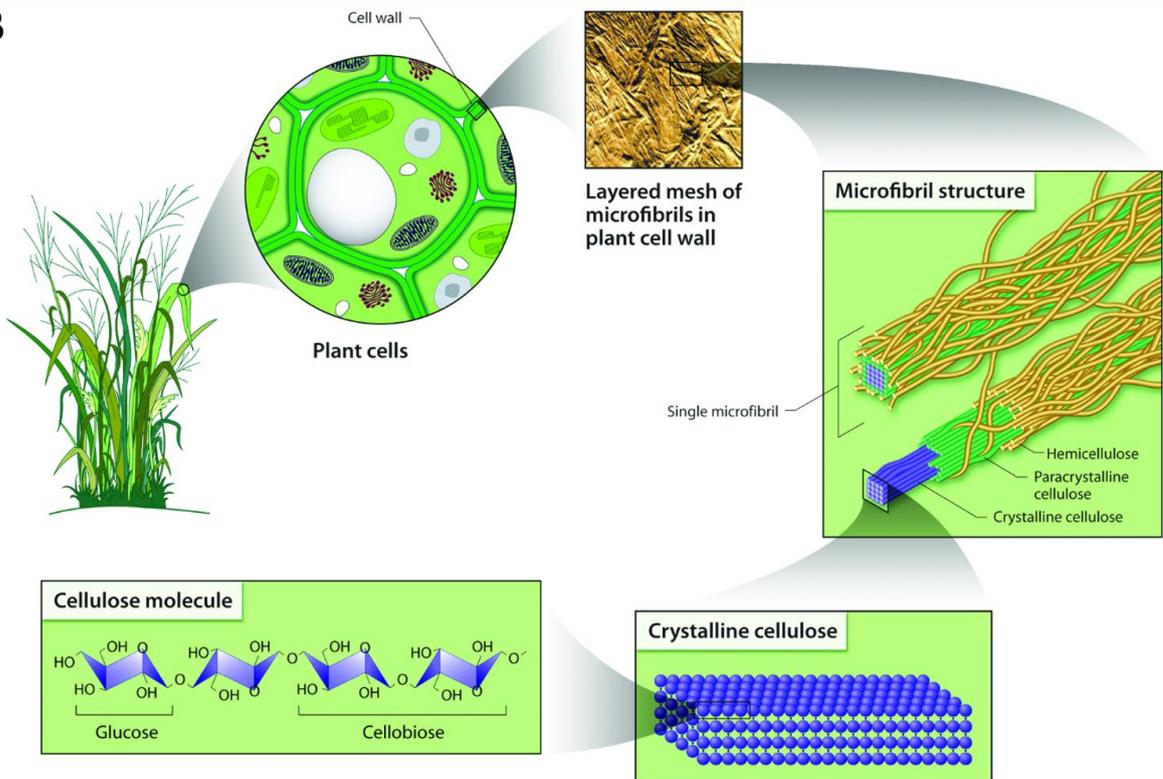


Abbildung 6 | A) Graphische Darstellung verschiedener Cellulose-Synthesewege (Abb. ent. aus [89]). B) Strukturelle Organisation der Pflanzenzellwand (Abb. ent. aus [116]).

2.2 Das Cellulosom – Enzymkomplex mit biotechnologischer Relevanz

Wie in Kapitel 2.1 bereits erwähnt, stellt die Entwicklung von kostengünstigen und erneuerbaren Energiequellen als Alternativen zu fossilen Brennstoffen eine große Herausforderung dar [117]. Viele Voraussetzungen für solch einen neuen Rohstoff erfüllt Cellulose-Ethanol [118, 119]. Während die erste Generation von Bioethanol-Produkten aus den genießbaren Teilen der Pflanzen gewonnen wurde, kann Cellulose-Ethanol aus den Polysacchariden, welche in der Zellwand von Lignocellulose in der Biomasse vorkommen, hergestellt werden [120, 121]. Eine große Hürde bei diesem Prozess ist jedoch die Umwandlung der Cellulose- und Hemicellulose-Komponenten zu fermentierbaren Kohlenhydraten [122]. Dabei erfolgt in der Regel zuerst eine Vorbehandlung, um die Struktur der Biomasse zu modifizieren und die Zugänglichkeit der Polysaccharide zu erhöhen. Anschließend folgt ein Hydrolyse-Schritt zu Glucose-Einheiten (durch Säurebehandlung oder hydrolytische Enzyme), die dann zu Ethanol fermentiert werden können, welcher zum Schluss abdestilliert werden kann [123]. In der Natur existieren eine Vielzahl solcher Zellwand-abbaubarer Enzyme wie Cellulasen, Hemicellulasen oder Pektinasen. Diese werden in Abhängigkeit ihrer Sequenzhomologie und biochemischen Charakterisierung eingeteilt. Es existieren neben den Endoglucanasen und den Exoglucanasen, welche jeweils in der Mitte beziehungsweise am Ende der Cellulose-Kette schneiden, auch die β -Glucosidasen, welche die erhaltenen Cellobiose-Einheiten hydrolysieren [124, 125]. Um diesen komplexen Arbeitsprozess ökonomisch zu optimieren und frei von Limitierungen zu machen, ist die konsolidierte Bioprozesstechnik ein vielversprechender Ansatz. Dabei sollen die Enzymproduktion, die Hydrolyse und die Fermentationsabläufe zu einem Schritt kombiniert werden. Dies soll die Prozesseffizienz erhöhen, die Zugabe von exogenen hydrolytischen Enzymen unnötig machen und die Zucker-Inhibierung der Cellulasen reduzieren [126, 127]. Thermophile zellulolytische Mikroorganismen sind attraktive Kandidaten für diese Verwendung geworden, da sie bei hohen Temperaturen wachsen, somit eine Kontamination verringern und sie die Löslichkeit und Verdaulichkeit der benötigten Substrate erhöhen können [128, 129].

Während heutzutage eine Vielzahl von Mikroorganismen für diese Anwendungen getestet werden, ist *Clostridium thermocellum* (auch *Ruminiclostridium thermocellum*) das mit Abstand am besten charakterisierte Cellulose-abbauende Bakterium in der Natur [130–132]. Das stäbchenförmige, anaerobe und gram-positive Bakterium wurde erstmals 1926 von Viljoen *et al.*

charakterisiert [133]. Seine hohe Substrat-Abbaurrate lässt sich durch einen großen, extrazellulären und supramolekularen Multienzymkomplex erklären, dem Cellulosom (siehe Abbildung 7 A) [134, 135]. Dieser besteht aus mehr als 20 verschiedenen Lignocellulose-abbauenden Enzymen wie Chitinasen oder Esterasen. Der modulare Aufbau dieses Komplexes ist durch zwei verschiedene Interaktionen charakterisiert. Im Zentrum befindet sich ein makromolekulares, nicht-katalytisches Gerüstprotein namens CipA. Dieses besitzt neun interne Typ-I Cohesin-Module, welche mit den Typ-I Dockerin-Modulen des Cellulosoms wechselwirken. Die zweite Interaktion findet zwischen den Typ-II Dockerin-Modulen vom C-Terminus von CipA und den internen Typ-II Cohesin-Modulen der ungebundenen, sekundären S-layer Gerüstproteine LpB, Orf2p und SdbA, welche sich an der Zelloberfläche befinden, statt. Die direkte Bindung des Cellulosoms mit den kristallinen Kohlenhydrat-Substraten erfolgt über ein sogenanntes Kohlenhydrat-bindendes Modul (CBM) [136–139].

Proteomikstudien zeigten, dass die zellulolytische Aktivität des Bakteriums neben der Kohlenstoffquelle auch von der Wachstumsrate reguliert wird und die Änderung von einer dieser Faktoren sich sowohl in der Cellulase-Produktion als auch im zellulosomalen Untereinheiten-Profil widerspiegelt. Sequenzierungen und Annotationen des Genoms von *C. thermocellum* ATCC 27405 zeigten mindestens 79 zellulosomale Gene, von denen ungefähr 70 Typ-I Dockerin-beinhaltende Proteine kodieren, welche potentiell an das Gerüstprotein CipA binden und an zellulosomalen Prozessen teilnehmen könnten [140, 141]. Der vollständige Mechanismus der Umwandlung von Biomasse-Abbauprodukten zu Cellulose-Ethanol ist hingegen noch nicht vollständig aufgeklärt (siehe Abbildung 7 B). Zuerst baut das Cellulosom Lignocellulose zu Cellodextrinen ab, welche durch mindestens fünf *ATP-Binding-Casette* Transporterproteine in die Zelle eingebracht werden. Cellobiose/Cellodextrin-Phosphorylasen phosphorylieren anschließend die Cellobiose/Cellodextrin-Einheiten, damit Glucose-1-Phosphat und Glucose erhalten werden. Diese werden in den Embden-Meyerhof-Pfad eingebracht, wo durch Glykolyse Pyruvat, GTP und ATP entstehen. Nach einer Vielzahl an Phosphorylierungs-Schritten wird Pyruvat schließlich, in Abhängigkeit des katalysierenden Enzyms, durch Lactat-Dehydrogenase zu Lactat oder durch Formiat-Acetyltransferase zu Formiat und Acetyl-Coenzym A metabolisiert. Letzteres kann anschließend zu Acetat und Ethanol metabolisiert werden [142–144].

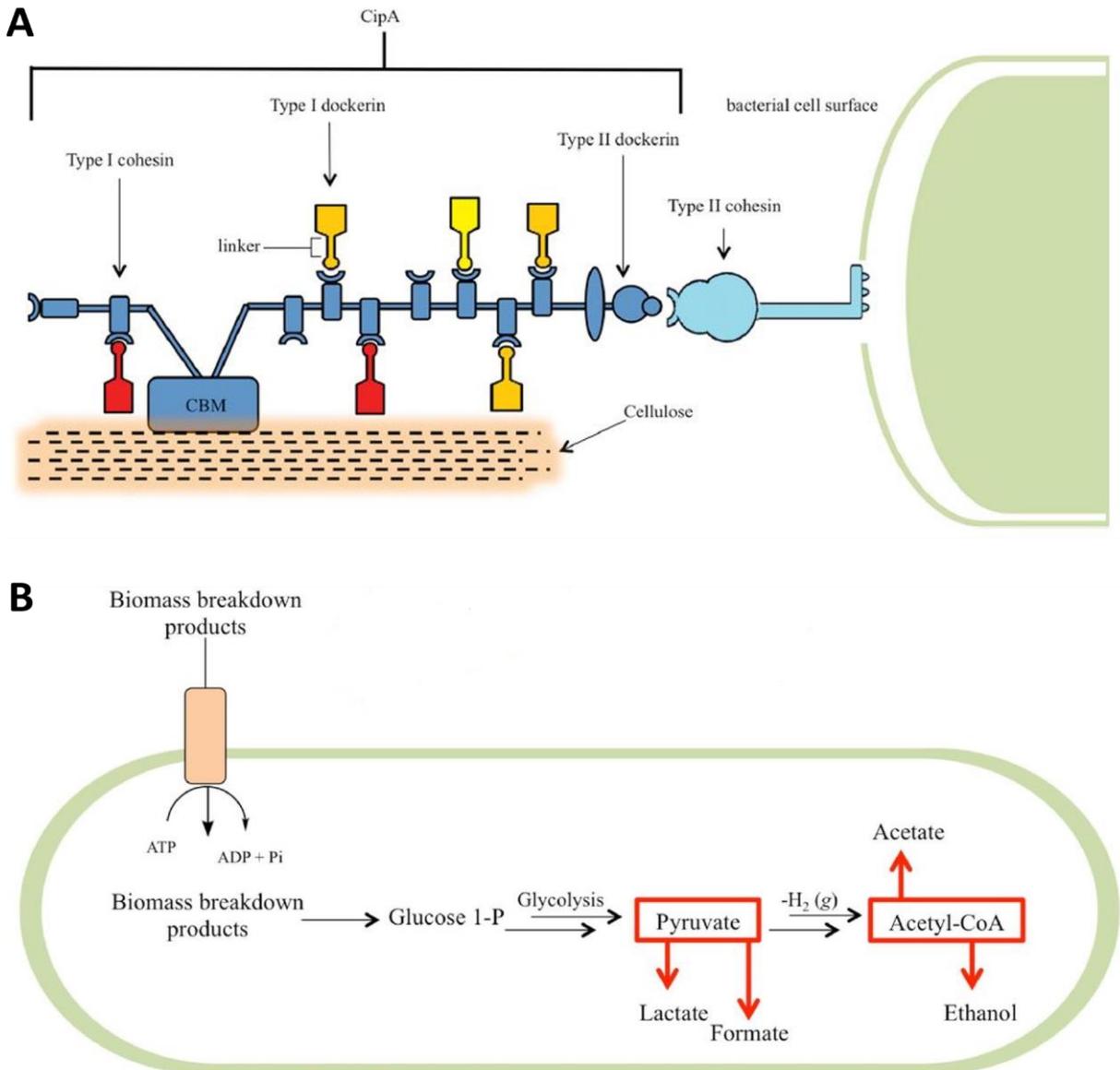


Abbildung 7 | A) Struktur des Cellulosoms aus *C. thermocellum* (Abb. ent. aus [145]). B) Umwandlung der Biomasse-Abbauprodukte (Abb. ent. und modif. aus [145]).

2.3 Kohlenhydrat-bindende Module – Funktionen und Funktionsweisen

Zum Abbau der Bestandteile einer Pflanzenzellwand besitzen Mikroorganismen eine Vielzahl an Polysaccharid-degradierenden Enzymen wie Glucosidasen, Esterasen oder Lyasen, welche wiederum für die Kohlenhydrat-Erkennung nicht-katalytische Domänen wie kohlenhydrat-bindende Module besitzen [146]. Diese Module sind definiert als repräsentative Aminosäuresequenzen, die sich innerhalb eines Kohlenhydrat-aktiven Enzyms mit einer definierten Faltung befinden, das eine Kohlenhydrat-bindende Aktivität zeigt, aber nicht dessen chemische Struktur modifiziert [147]. Entsprechend dem Enzym-Aufbau können CBMs als isolierte Einheiten oder als Tandem-Domänen derselben oder auch anderer Familien vorkommen, was eine Erhöhung der Substrataffinität und weitere kooperative Bindungseffekte zur Folge hat [148]. Seit der ersten Charakterisierung von CBMs als Cellulose-bindende Domänen in den 1980er Jahren sind durch die Diversität an in der Pflanzenzellwand vorhandenen Polysacchariden auch dementsprechend viele verschiedene CBMs entdeckt und charakterisiert worden [149–151]. Diese werden in der Datenbank CAZY (*Carbohydrate Active Enzymes*) gesammelt, in der aktuell 286477 (Stand: 22.11.2021) verschiedene Module in 88 Familien eingeteilt sind [152, 153].

Die dreidimensionale Struktur dieser Module ist trotz geringer Sequenzähnlichkeiten hochkonserviert. Dabei kann beobachtet werden, dass insgesamt sieben verschiedene Faltungsmuster wie β -Kleeblatt, Cystein-Knoten, OB-Faltung oder Hevein-Faltung gebildet werden können, das dominante davon jedoch das β -Kleeblatt ist [154, 155]. Da die Einteilung nach der Faltung keinen Aufschluss über die Funktion der jeweiligen Module gibt, können diese auch auf Basis ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in drei Klassen (Typ-A, Typ-B und Typ-C) unterteilt werden (siehe Abbildung 8 A und Tabelle 1) [154, 156, 157]. Typ-A CBMs sind sogenannte oberflächenbindende Module, welche via einer planaren Bindestelle komplementär an die flache Oberfläche von unlöslicher, hochkristalliner Cellulose und/oder Chitin binden [158]. Dabei finden hydrophobe und entropisch getriebene CH- π -Interaktionen zwischen den aromatischen Aminosäuren des Proteins (hauptsächlich Tryptophan und Tyrosin) und dem Ringsystem der Zucker statt, welche dem System 1.5 - 2.5 kcal/mol Bindungsenergie hinzugeben [159].

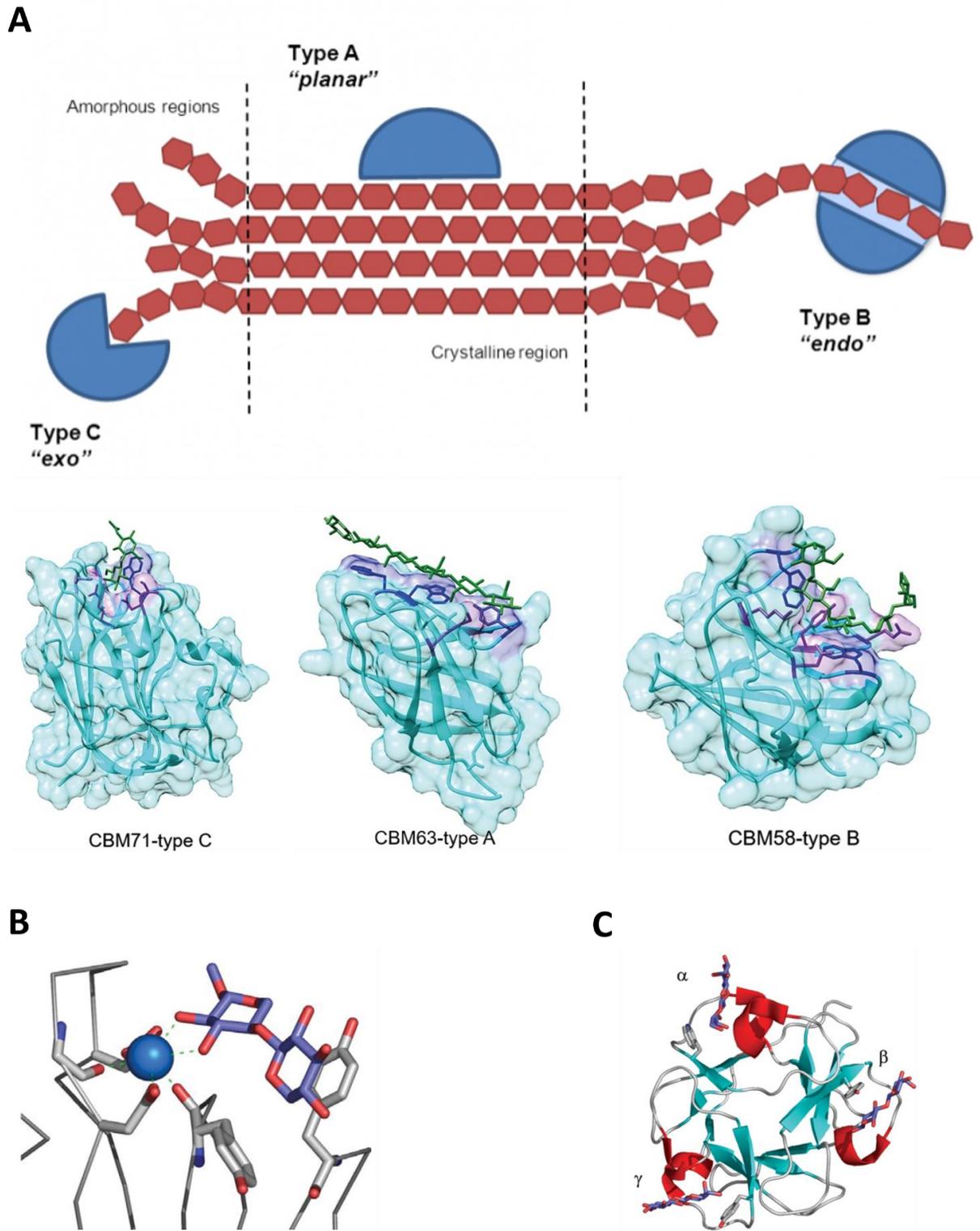


Abbildung 8 | A) Schematische Darstellung der verschiedenen CBM-Typen mit dazugehörigen Bindungsstellen (oben, Abb. ent. aus [160]) und grafische Darstellung der Bindungsmodi anhand von Kristallstrukturen von Protein-Substrat-Komplexen (unten, Abb. entn. und modif. aus [161]). B) Rolle des Calcium-Atoms bei der Xylan-Erkennung eines CBM-Moduls der Familie 36 aus *Pa. polymyxa* Xylanase 43 (Abb. ent. aus [154]). C) Darstellung des Multivalenz-Effektes eines CBM-Moduls der Familie 13 aus *S. lividans* Xylanase 10A bei der Bindung von drei Laktose-Molekülen an drei verschiedenen Bindestellen (Abb. ent. aus [154]).

Im Gegensatz dazu haben Typ-B CBMs, auch als Endo-Typ bezeichnet, eine ausgedehnte Kohlenhydrat-Bindestelle ($> 15 \text{ \AA}$), welche die Form eines Spaltes hat und sich an zwei Positionen in der dreidimensionalen Struktur befinden kann. Zum einen kann sich eine sogenannte variable Schleifenstelle (*variable loop site*, VLS) am Ende der Struktur befinden und zum anderen ist an der gewölbten Seite der Struktur eine konkave Oberfläche (*concave face site*, CFS). Durch mehrere Bindestellen können somit auch größere und verzweigte Polysaccharide gebunden werden [157]. Im Kontrast zu Typ-A CBMs können Typ-B CBMs nicht mit planaren Substraten interagieren, sondern binden an eine Vielzahl von Glycanen wie beispielsweise Xylane, Mannane, Galactane oder Stärke (i.d.R. Polysaccharide mit mehr als vier Monosaccharid-Einheiten) [162–164]. Neben der Interaktion der aromatischen Aminosäuren spielen bei Typ-B CBMs auch direkte Wasserstoffbrückenbindungen eine essentielle Rolle hinsichtlich der Bindung zu Kohlenhydraten [165, 166]. Der Exo-Typ, die Typ-C CBMs, besitzt eine Bindetaschen-Topologie und erkennt wie Lectine kurzkettige Polysaccharide (Mono-, Di- oder Trisaccharide). Diese Module können auch komplexere Polysaccharide erkennen, vorausgesetzt sie können an die von der Oberfläche des Substrates exponierten Kohlenhydrate binden [161]. Die Wechselwirkung durch die Wasserstoffbrückenbindungen sind bei diesem Typ noch wichtiger als bei den Typ-B CBMs [154, 156].

Tabelle 1 | Einteilung der Kohlenhydrat-bindenden Module mit charakteristischen Eigenschaften.

Typ	A	B	C
Strukturmerkmal	Planare, hydrophobe Oberfläche	Spalt bzw. Hohlraum	Bindetasche
Bindungspräferenz	Unlösliche Kohlenhydrate	Glucanketten	Exponierte, kurzkettige Kohlenhydrate
Primäre Wechselwirkung	CH- π -Interaktionen	CH- π -Interaktionen + Wasserstoffbrückenbindungen	Wasserstoffbrückenbindungen
Bindestelle	Linearer, planarer Streifen aromatischer Aminosäuren	Variable Schleifenstelle + konkave Oberfläche	Kleine Bindetasche für Bindung an Glycan-Terminus
Thermodynamik	entropisch	enthalpisch	enthalpisch
Beispiele für Bindungspartner	Kristalline Cellulose, Chitin	Xylane, Mannane, Galactane	Mono-, Di- oder Trisaccharide

Trotz dieser verschiedenen Funktionsklassen sind bei allen CBMs die planaren, gedrehten oder Sandwich-gefalteten aromatischen Aminosäuren eine Haupttriebkraft für die Kohlenhydratbindung. Diese bilden eine hydrophobe Plattform für die Bindung an die planaren Oberflächen der Polysaccharide. Diverse Mutationsstudien haben gezeigt, dass die Deletion von

konservierten aromatischen Resten eine deutliche Verringerung bis hin zur Inaktivierung der Kohlenhydratbindung zur Folge hat [162, 167–169]. Aber auch die polaren Aminosäuren spielen bei der Interaktion eine entscheidende Rolle, da sie mit den Hydroxyl-Gruppen der amphiphilen Polysaccharide diverse Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, weshalb auch deren Orientierung und Verteilung in der Bindestelle Indikatoren für die Substrataffinität, vor allem bei Typ-B und Typ-C CBMs, sind [165, 166, 170, 171]. Diese gesamten strukturellen Charakteristika führen dazu, dass CBMs verschiedene Rollen im Enzymkomplex erfüllen. Sie erkennen die Polysaccharide, binden somit das Enzym an das Substrat (*targeting effect*) und erhöhen die Konzentration an Enzym in der Nähe des Substrats, was zu einem schnelleren und effizienterem Abbau dessen führt (*proximity effect*) [172]. Sie können die Oberfläche von dicht gepackten Polysacchariden wie Cellulosefasern oder Stärkekörnern aufbrechen, machen es so zugänglicher für die katalytischen Module (*disruptive effect*) und können Enzyme an die Oberfläche von bakteriellen Zellwandkomponenten anbringen, während sie gleichzeitig ihre katalytische Aktivität auf externe Kohlenhydratsubstrate anwenden (*adhesion*) [173–175]. Da CBMs in der Regel sehr schwach an Kohlenhydrate binden (Affinität im mikromolaren bis millimolaren Bereich), können in einigen Enzymen, vor allem Glycosidasen, sogenannte Multivalenzeffekte beobachtet werden [154]. Um die Interaktion mit den Substraten zu verstärken, besitzen einige CBMs mehr als eine Bindestelle für die entsprechenden Liganden (siehe Abbildung 8 C) [176, 177]. Ein weitverbreiteter Effekt tritt bei vielen Enzymen auf, welche nicht nur ein, sondern mehrere CBM-Module besitzen. Diese sind entweder tandemmäßig oder am N- und C-Terminus angelagert und binden somit entweder verschiedene Regionen eines Liganden oder verschiedene Liganden innerhalb eines komplexen Polysaccharid-Netzwerkes [162].

Diese Eigenschaften machen CBMs zu einem nützlichen Werkzeug in der Biotechnologie, wo sie zur Verstärkung von bioverarbeitenden Enzymen bei der industriellen Zellstoffentwicklung und Biokraftstoffproduktion eingesetzt werden [174, 178, 179], als Affinitätstags für Cellulose-basierte Reinigung verwendet werden [180] oder auch Enzym- oder Zellimmobilisierung auf Kohlenhydratoberflächen erlauben [181, 182]. Auch biomedizinische Anwendungen wie die Entwicklung eines Cellulose/Stärke-gebundenen Proteins (*cellulose/starch cross bridging protein*, CSCP) für abbaubaren Acryl-Knochenzement [183], schaltbare wirkstoffabgebende Hydrogele [184] oder auch die Produktion von Biomaterialien für den Ersatz von kardiovaskulären Systemen werden durch die genetische Modifikation und Verwendung von CBMs möglich, was deren breites Anwendungsspektrum belegt [185].

2.4 CBM3b aus der Cellobiohydrolase 9A aus *Clostridium thermocellum*

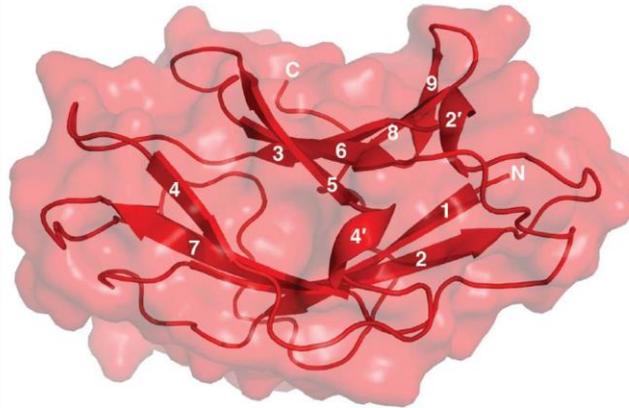
Das Cellulosom aus dem anaeroben, thermophilen Bakterium *C. thermocellum* besitzt über 25 verschiedenen Proteine, von denen die meisten hydrolytische Enzyme sind, welche die Hydrolyse von Polysacchariden aus der Pflanzenzellwand ermöglichen. Eines dieser multimodularen Enzyme ist die Cellobiohydrolase 9A (Cbh9A). Diese besteht aus einem Immunoglobulin-ähnlichen Modul (*Ig like*), einer Glycosidase der Familie 9, einer X1₁- und einer X1₂-Domäne, einem Dockerin-Modul und zwei CBM-Modulen (Familie 3b als Typ-A und Familie 4 als Typ-B) [186]. Diese Tandemanordnung der beiden CBMs ist ungewöhnlich, da sie verschiedene Substratklassen binden. Während Familie 3 CBMs kristalline Cellulose binden, erkennen die Module der Familie 4 amorphe Cellulose, Cellooligopentaose oder verschieden verknüpfte β -Glucane [187, 188]. Das CBM-Modul der Familie 3b aus der Cellobiohydrolase 9A zeigt jedoch strukturelle Abweichungen im Vergleich zu anderen CBMs in seiner hochkonservierten Cellulose-bindenden Oberfläche, welche einen „linearen aromatischen Streifen“ darstellt, und in einer verkürzten Schleifen-Länge im Vergleich zu CBM3-Modulen aus CipA und Cel9V [189]. Da in der Literatur widersprüchliche Aussagen über die Bindung dieses Moduls an kristalline Cellulose getroffen wurden, haben Yaniv *et al.* sowohl den Wildtyp (WT, PDB: 2YLK) als auch eine Punktmutante (N126W, PDB: 3ZQX) von Cbh9A CBM3b kristallisiert. Durch diese Mutation besitzt das Protein eine artifiziell erzeugte Cellulose-Bindung durch das Einfügen eines Tryptophan-Restes und somit gleichzeitiger Verlängerung der planaren, aromatischen Oberfläche (siehe Abbildung 9 A und B) [190–192].

Die Proteine bilden ein neunsträngiges antiparalleles β -Sandwich und besitzen strukturelle Charakteristika wie eine Calcium-Bindestelle und eine flache Tasche mit noch weitgehend ungeklärter Funktion (*shallow groove region*). Calcium-Bindestellen können in vielen CBMs gefunden werden und sind sowohl direkt an der Liganden-Erkennung beteiligt (siehe Abbildung 8 B, [193]) beziehungsweise beeinflussen die Quartärstruktur, indem sie zur Dimerisierung des Moduls beitragen und somit die Bindung der Module an multivalente Polysaccharide verstärken [194]. Während in der Kristallstruktur der Punktmutante ein Calcium-Ion in der Bindestelle lokalisiert werden konnte, zeigte die dreidimensionale Struktur des Wildtyps keinen Peak in der anormalen Fourier-Karte. Das Calcium-Ion ist oktaedrisch durch sieben Sauerstoffatome (Rückgrat-Sauerstoffatome von Thr-65 und Asp-130 und Seitenketten-Sauerstoffatome von Thr-65, Glu-67, Asn-133 und Asp-134) und ein Wassermolekül koordiniert.

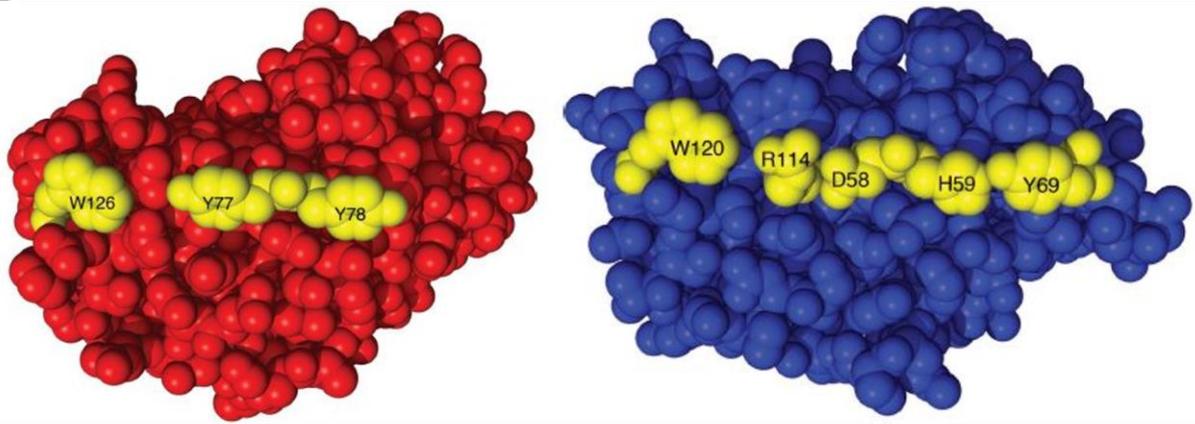
Da Calcium-bindende Reste sich in Regionen befinden, welche zwei Schleifen verbinden, lässt sich auf eine strukturell stabilisierende Rolle des Calcium-Ions schließen, auch wenn das Vorhandensein des Ions in nur einer der beiden Kristallstrukturen dem widersprechen würde [192]. Dies ist jedoch mit Vorsicht zu schlussfolgern, da die Abwesenheit des Calcium-Ions seine Ursachen in der individuellen Proteinpräparation oder den Kristallisationsbedingungen haben kann. Ein weiteres topografisches und in CBMs der Familie 3 konserviertes Charakteristikum ist die *shallow groove region*, welche sowohl mehrere aromatische (Tyr-63, Tyr-98, Tyr-135 und Tyr-153), aliphatische (Leu-158, Pro-163 und Pro-164) als auch polare (Arg-61, Gln-90 und Thr-151) Aminosäuren besitzt [136, 158]. Die exakte Funktion dieser im Vergleich zu *C. thermocellum* CipA CBM3a und *C. thermocellum* Cel9V CBM3b verkürzten und somit nicht so tiefen Tasche ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird eine Involvierung in der Bindung mit intermodularen Linkern wie Prolin-Threonin-Linkersegmenten postuliert, welche einen Anteil bei der strukturellen Organisation dieser multimodularen Proteine besitzen [195].

Wie in Kapitel 2.3 bereits erläutert, spielen vor allem aromatische und polare Aminosäuren bei der Kohlenhydrat-Bindung entscheidende Rollen. Während beispielsweise CBM3a aus *C. thermocellum* eine Bindefläche von fünf Resten mit einer Gesamtlänge von 31.8 Å besitzt, sind in *C. thermocellum* Cbh9A CBM3b nur die aromatischen Reste Tyr-77 und Tyr-78 mit einer Länge von 15.8 Å in einer planaren Anordnung, um als mögliche Kohlenhydrat-Bindeoberfläche zur Verfügung zu stehen (siehe Abbildung 9 B). Daher wurde auf Grundlage der Kristallstrukturen und Sequenz-Abgleiche bekannter, cellulosebindender Module nach einer Aminosäure gesucht, welche in äquivalenter Position den linearen, aromatischen Streifen verlängern würde (PDB: 1NBC, 1G43 und 2WNX, siehe Abbildung 9 C). Ortsspezifische Mutagenesestudien am Protein *C. thermocellum* CipA CBM3a haben den Tryptophanrest Trp-118 identifizieren können, welcher in *C. thermocellum* CBM3b Cbh9A dem Asparaginrest Asn-126 entsprechen und die Bindetasche auf 25.4 Å verlängern würde [191].

A



B



C

		β1	β2	α2'	β3	β4	
C. thermocellum	CbhA CBM3b	DVKVQYLCENTQTSTQEIKGKFNIVNTGNRDYSLKDIVLRYFTKHEHNSQLQFICYTPI	81				
C. cellulolyticum	CipC CBM3a	VVSVQFNNSSPASSNSIYARFKVTNTSGSPINLADLKLRYNYTQADKPLTFLGDHAGY	60				
C. thermocellum	CipA CBM3a	NLKVEFYNSNPSTNTSINPQFKVTNTGSSAIDLKSLTLEYNYTVDGQKDTFFWCDHAAI	60				
C. thermocellum	Cel9V CBM3b'	SISVSYKCGVKDGTKNTRIRATINIKNTGTTPVNLSDIKVRYFTSNGNEQNNFVCDYAAF	60				
		α4'	β5	β6	β7		
C. thermocellum	CbhA CBM3b	GSGN-----LIPSPFGSGDEHYLLEFKD--VKLPAGGQTGEIQFVIRYAD	125				
C. cellulolyticum	CipC CBM3a	MSGS-NYIDATSKVTGSPKAVPAVTNADHYLVALNSDAGSLPAGGSI-EIQTRFARND	118				
C. thermocellum	CipA CBM3a	IGSNGSYNGITSNVKGTFVKMSSSTNNADTYLISFTG--GTLEPGAHV-QIQGRFAKND	117				
C. thermocellum	Cel9V CBM3b'	G-----TDKVKGIVKKIENSVPGADTYCHISFTEDAGRLAPGGST-GTIP-FRIEG	109				
			β8	β9			
C. thermocellum	CbhA CBM3b	NSFHQSNDSFDPTIK-AFQDYGKVTLLKNGELVWGTFFGG	166				
C. cellulolyticum	CipC CBM3a	WSNFDQSNDSYTAAG--SYMDWQKIAPVGGTAYGSTPDG	158				
C. thermocellum	CipA CBM3a	WSNYTQSNDSFKSAS--QFVEWDQVTAALNGVLVWGKEPFG	157				
C. thermocellum	Cel9V CBM3b'	AAEYDQTDQSYNSEMSDDFGDNTKIAPAIKDKLKYGVFV-	150				

Abbildung 9 | A) Cartoondarstellung mit strukturellen Elementen der Kristallstruktur von Cbh9A CBM3b aus *C. thermocellum*. B) Postulierte Cellulose-Bindestelle (gelb) in der Punktmutante von Cbh9A CBM3b aus *C. thermocellum* (rot) und von CipA CBM3b aus *C. thermocellum* (blau). C) Sequenz-Abgleich verschiedener CBM-Module mit gekennzeichneten Strukturelementen (β -Stränge), Cellulose-Bindestellen (gelb), Calciumbindenden Aminosäuren (grün), shallow groove region bildende Aminosäuren (rot), Aminosäuren welche die Schleife zwischen β 5- und β 6-Strang bilden (cyan) und die Punktmutation N126W (grau). Alle Abb. ent. und modif. aus [192].

Eine durch die Mutation hervorgerufene Orientierungsänderung von Tyr-77 und Tyr-78 bringt die aromatischen Ringe in eine Ebene mit denen des Tryptophans Trp-126 und erzeugt so die planare Bindeoberfläche für die Erkennung von Polysacchariden. Die dadurch erzeugte Bindung an kristalline Cellulose konnte von Yaniv *et al.* durch Cellulose-Bindeassays bestätigt werden, was somit eine artifiziell erzeugte Cellulose-Bindung eines von Natur aus nicht an kristalline Cellulose bindenden Proteins durch eine Punktmutation darstellt [192]. Die Funktion dieses CBMs in der Cellobiohydrolase 9A, das nicht die erwartete Affinität zu Cellulose aufweist, ist weiterhin rätselhaft. Möglich wären hier potentielle Multivalenz-Effekte mit dem im Enzym vorkommenden CBM4-Modul oder auch eine Modifizierung der zugehörigen katalytischen Glycosidase, wie es bei einem ebenfalls nicht-bindenden CBM3b-Modul in CipA aus *C. thermocellum* vorkommt [196].

Weiterhin diene Cbh9A CBM3b^{N126W} als ein Modellprotein, um in Kooperation mit Prof. Amir Goldbourn (Tel Aviv Universität, Israel) vergleichende Resonanzzuordnungs- und Bindungsstudien sowohl mit Lösungs- als auch mit Festkörper-NMR-Spektroskopie darzustellen. Während die Festkörper-NMR-Spektroskopie den Vorteil bietet, das Protein im Komplex mit kristalliner Cellulose zu untersuchen, stellt sich jedoch hierbei die Resonanzzuordnung als herausfordernd dar. Die Kombination beider Methoden bietet daher den Vorteil, das Verhalten von Cbh9A CBM3b^{N126W} sowohl mit kurzen Cellulose-Fragmenten in Lösung als auch mit parakristalliner beziehungsweise kristalliner Cellulose im Komplex zu untersuchen und Rückschlüsse zu verschiedenen Bindungsmodi zu ziehen, um diese besser verstehen zu können.

3 Zielsetzung

Nachwachsende Rohstoffe wie beispielsweise die Cellulose gewinnen bei der Erzeugung von Biokraftstoff als alternative Energiequelle immer mehr an Bedeutung. Eine große Herausforderung bei der Gewinnung von fermentierbaren Kohlenhydraten aus den Pflanzenzellwänden der Biomasse stellt die Umwandlung der Cellulose dar. Einen vielversprechenden Ansatz bietet hier das anaerobe, gram-positive Bakterium *C. thermocellum*, welches durch einen großen, extrazellulären Multienzymkomplex, das Cellulosom, Cellulose binden und effizient abbauen kann. Die Erkennung der Polysaccharide erfolgt hierbei durch sogenannte Kohlenhydrat-bindende Module. Im Cellulosom von *C. thermocellum* befindet sich neben einem CBM4-Modul auch ein CBM3b-Modul, welches als nicht kristalline Cellulose-bindender Wildtyp und kristalline Cellulose-bindende Punktmutante von Yaniv *et al.* kristallisiert und charakterisiert wurde.

In dieser Arbeit sollte eine tiefere Charakterisierung dieser beiden Proteine durch NMR-Spektroskopie erfolgen, um detaillierte Informationen über das Cellulose-Bindevverhalten und strukturelle Elemente wie der Calcium-Bindestelle zu erlangen. Dazu sollten der Wildtyp und die N126W-Mutante von Cbh9A CBM3b aus *C. thermocellum* isotonenmarkiert exprimiert, aufgereinigt und mittels multidimensionaler heteronuklearer NMR-Spektroskopie untersucht werden. NMR-Titrations sollten die Cellulose-Bindeeigenschaft der N126W-Mutante in Lösung mit verschiedenen Cellulose-Fragmenten charakterisieren und die Bestimmung der jeweiligen Bindungskonstanten als Indikator für die Affinität ermöglichen.

Weiterhin sollte die N126W-Mutante als Modellsystem für die Synthese von Protein-Polymer-Konjugaten dienen, da es in großen Mengen und monomerer Form exprimierbar und gleichzeitig langzeitstabil ist. Diese Konjugate können die Stabilität von Proteinen erhöhen, pH- und Temperaturoptima von Enzymen beeinflussen oder reaktive und funktionale Materialien synthetisieren. Cbh9A CBM3b besitzt eine definierte Anzahl an exponierten Lysinen, an denen via *grafting from* und *grafting to* Methodik verschieden lange Poly(*N*-isopropylacrylamid)-Einheiten (PNIPAm) angebracht werden können. NMR-Spektroskopie sollte in diesem Zusammenhang die Effizienz dieser beiden Methoden charakterisieren, um zukünftige Reaktionsbedingungen für Konjugat-Synthesen zu optimieren.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Expression und Reinigung

Die CBM-Konstrukte Cbh9A CBM3b^{WT} und Cbh9A CBM3b^{N126W} konnten erfolgreich in *E. coli* Tuner(DE3)-Zellen mit einem N-terminalen His₆-Tag nach dem Protokoll von Jindou *et al.* exprimiert und aufgereinigt werden (siehe Kapitel 10.7.1, Kapitel 10.8 und Abbildung 10 A) [191]. Der His₆-Tag diente dabei zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie, um andere Proteine und weitere Fragmente, welche sich nach dem Zellaufschluss im löslichen Teil des Lysates befanden, vom Zielprotein zu separieren. Das Protein konnte bei einem Elutionspufferanteil von 25 % (entspricht 125 mM Imidazol) eluiert werden und lag nach dem ersten Reinigungsschritt schon mit großer Reinheit vor, wie Abbildung 10 B und C zeigen.

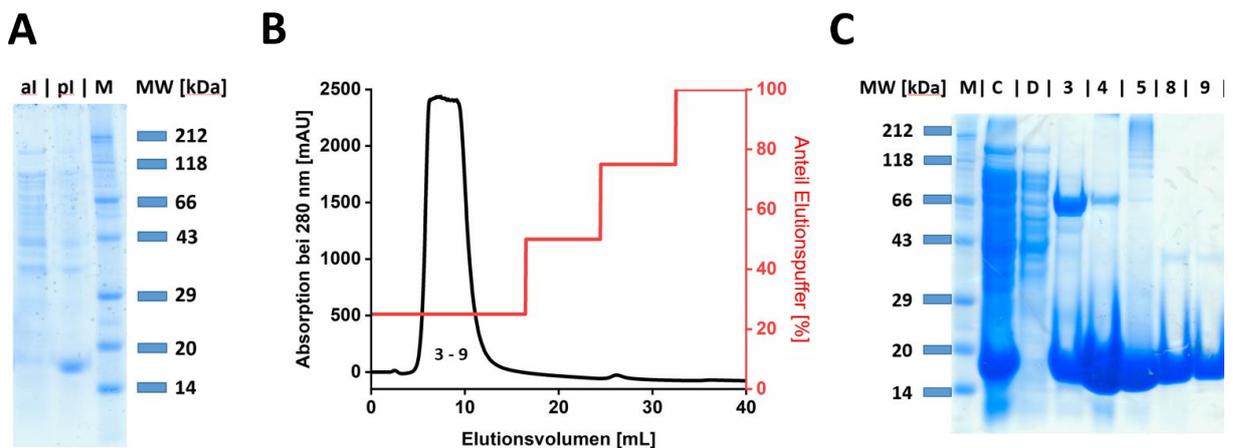


Abbildung 10 | A) SDS-PAGE-Gel vor (*ante induction*, al) und nach der IPTG-Induktion (*post induction*, pl). **B)** UV/Vis-Chromatogramm der ersten Ni²⁺-Affinitätschromatographie (schwarz) mit dazugehöriger Konzentration an Elutionspuffer (rot). **C)** SDS-PAGE-Gel der ersten Ni²⁺-Affinitätschromatographie mit Größenmarker (M), aufgetragenem Zelllysate (C), Durchlauf (D) und proteinenthaltenen Fraktionen (3 – 9).

Um die native Form der CBM3b-Konstrukte unter annähernd physiologischen Bedingungen vermessen zu können, musste der His₆-Tag nach erfolgter Reinigung möglichst vollständig abgespalten werden. Dazu ist auf dem Vektor zwischen dem His₆-Tag und dem Zielprotein eine spezifische Schnittstelle für die Serinprotease Thrombin kodiert. Dieses Enzym erkennt eine Lys-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Sequenz und spaltet die Peptidbindung zwischen Arginin und Glycin [197]. Aufgrund sekundärer Proteaseaktivitäten musste Thrombin nach erfolgter His₆-Tag-Abspaltung

mit einem Proteaseinhibitor wie 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF) inaktiviert werden. Die Separation des Zielproteins von His₆-Tag, ungeschnittenem Protein und Thrombin erfolgte mittels eines zweiten Schrittes der Affinitätschromatographie, bei welcher diese Komponenten mit einem Elutionspufferanteil von 50 % (entspricht 250 mM Imidazol) von der Säule eluiert werden konnten (siehe Abbildung 41 im Anhang). Um reines Cbh9A CBM3b zu erhalten und mögliche Oligomere von der monomeren Form zu trennen, wurde als letzter Schritt eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Diese zeigte neben einem geringen Anteil an höheren Aggregationsformen im Ausschlussvolumen der Säule (Fraktionen 5 – 9) einen symmetrischen Monomerpeak, welcher keine Anzeichen für etwaige Oligomere oder Degradationsprodukte aufwies, was das SDS-PAGE-Gel bestätigen konnte (siehe Abbildung 11). Beide Proteine, Cbh9A CBM3b^{WT} sowie Cbh9A CBM3b^{N126W}, zeigten während der Expression und der Reinigung ein nahezu identisches Verhalten, daher sind im Folgenden nur die Ergebnisse der Punktmutante aufgezeigt.

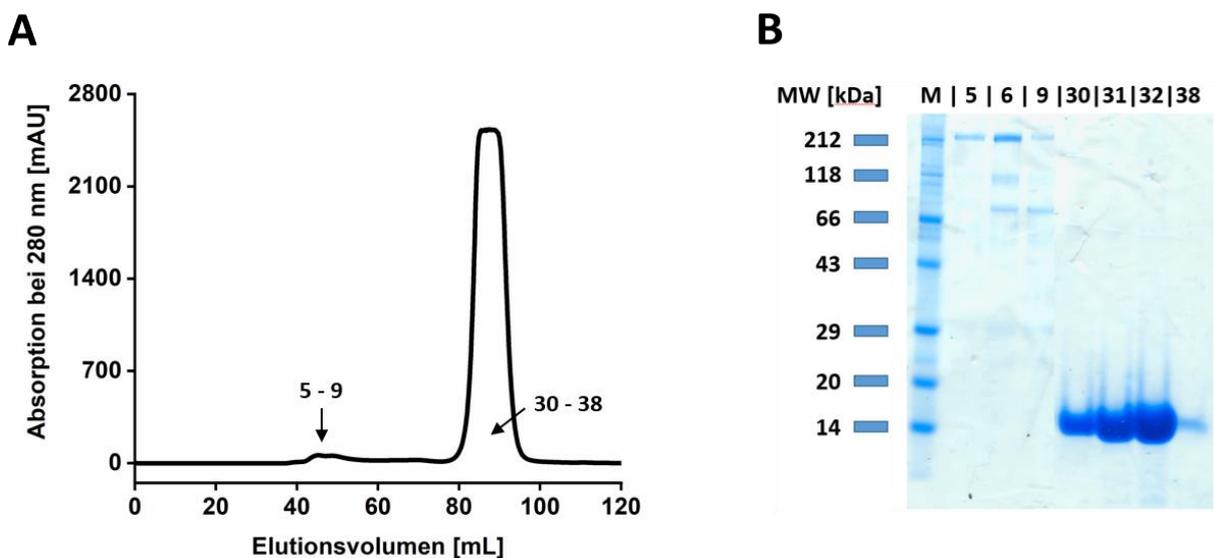
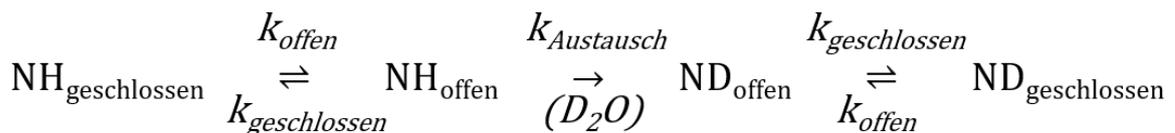


Abbildung 11 | A) UV/Vis-Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie von Cbh9A CBM3b^{N126W}. B) SDS-PAGE-Gel der Gelpermeationschromatographie mit Größenmarker (M) und proteinenthaltenden Fraktionen des Ausschlussvolumens (5 – 9) und der monomeren Form (30 – 38).

4.2 H-D-Austausch

Ein Spezialfall der Isotopsubstitution ist der Austausch von Wasserstoff gegen sein um ein Neutron schwereres Isotop Deuterium. Austauschbare Wasserstoffatome sind sowohl im Rückgrat (-NH) als auch in der Seitenkette (-NH, -NH₂, -OH, -SH) von allen Proteinen und Nucleinsäuren verteilt und im stetigen Austausch mit den Wasserstoffatomen des Lösungsmittels. Nach dem Linderstrøm-Lang-Modell benötigt ein Austausch bei in Wasserstoffbrückenbindungen involvierten Amidprotonen eine Fluktuation zwischen offenem und geschlossenem Zustand, welcher geschützte Amidprotonen in einen austauschbaren Zustand für die Reaktion mit dem Lösungsmittel bringt (k = Geschwindigkeitskonstanten für Übergänge in offenen oder geschlossenen Zustand bzw. für die Austauschrate eines Amidprotons in Anwesenheit von D₂O, siehe Abbildung 12 A) [198, 199].

A



B

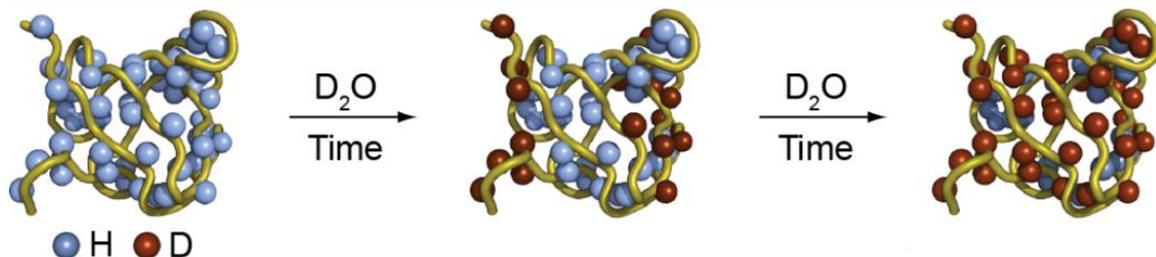


Abbildung 12 | A) Linderstrøm-Lang-Modell für die Austauschrate eines Amidprotons mit einem Deuteriumatom [198, 199]. B) H/D-Austausch-Schema an einer fiktiven Proteinstruktur (Abb. ent. und modif. aus [200]).

Da dieser Austausch eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, sollte ein Überschuss an Deuterium im Vergleich zu austauschbaren Protonen vorhanden sein. Der H/D-Austausch hängt von einer Reihe von Faktoren ab wie z.B. elektrostatischen Effekten, Wasserstoffbrückenbindungen, Temperatur, pH-Wert oder Lösungsmittelzugänglichkeit der Reste, weshalb der zeitlich versetzte Austausch in verschiedenen strukturellen Regionen des Proteins als Indikator für Konformations-, Dynamik- und Protein-Protein-Interaktion-Untersuchungen genutzt wird (siehe Abbildung 12 B) [201].

Während in hochdynamischen, unstrukturierten *random coil* Regionen der Austausch im Bereich von Millisekunden bis Sekunden abläuft, werden Austauschraten, welche um viele Größenordnungen geringer sein können, in Bereichen mit einer definierten Sekundärstruktur beobachtet. Analytisch kann diese Methode mittels der Neutronenkristallographie [202], H/D-Austausch-Massenspektrometrie [203] oder NMR-Spektroskopie [204] untersucht werden. Da Deuterium einen Kernspin von $I = 1$ besitzt, kann es in allen Experimenten, in welcher ein ^1H -Kern detektiert wird, nicht beobachtet werden. Daher wurde von Dr. Ruslan Nediakov und M. Sc. Robert Creutzmacher ein Referenzspektrum von einer 1.8 mM ^{13}C - und ^{15}N -markierten Probe von Cbh9A CBM3b^{WT} aufgenommen und anschließend in einen D₂O-haltigen Phosphatpuffer umgepuffert. Anschließend wurden in regelmäßigen Abständen ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren aufgenommen, in denen die Anzahl der sichtbaren Signale kontinuierlich abgenommen hat (siehe Abbildung 13 A). Da bei diesem Experiment jedes Rückgrat-Amidproton (außer von Prolin, da diese Aminosäure keines besitzt) sowie eine gewisse Anzahl an Seitenketten-Amidprotonen (wie z.B. Asparagin-, Glutamin- oder Tryptophan-Seitenketten) sichtbar sind, können über H/D-Austauschexperimente strukturelle Charakteristika und Stabilitäten identifiziert werden. Der Austausch erfolgte bei einem pH-Wert von 6.5, bei dem sich viele Proteine in ihrem nativen Zustand befinden. Soll die Reaktion verlangsamt oder gar abgebrochen werden, kann dies in einem sauren Milieu (pH 2-3) geschehen, da die Austauschrate sich dort an ihrem Minimum befindet. Es können somit auch Säuren oder Basen diese Reaktion katalysieren, da der Protonentransfer von den Donor- und Akzeptoreigenschaften der polaren funktionellen Gruppen abhängt [205].

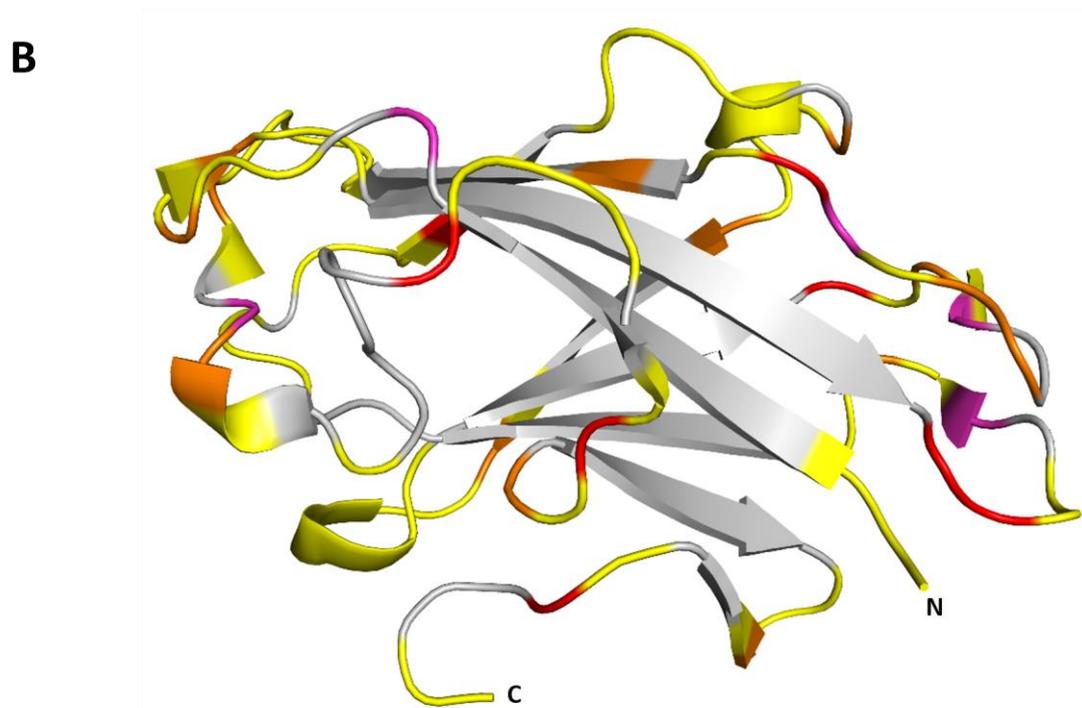
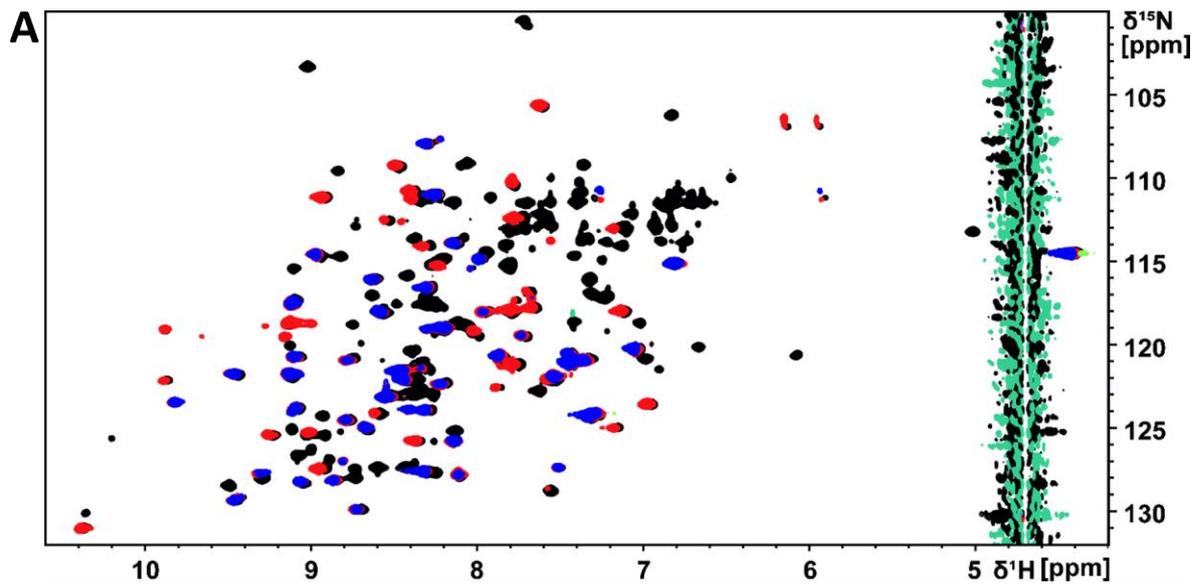


Abbildung 13 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM3b^{WT} an Tag 1 (schwarz), nach 5 Tagen (rot) und nach 27 Tagen in D₂O-Puffer (blau). B) 3D-Struktur von Cbh9A CBM3b^{WT} (PDB: 2YLK) als Bändermodell mit markierten Aminosäuren, welche nach 5 Tagen (gelb), 8 Tagen (orange), 16 Tagen (magenta) und 27 Tagen (rot) oder noch gar nicht ausgetauscht waren (grau).

Für die effektive Nutzung dieses „Protein-Fingerabdruck-Spektrums“ bedarf es der Resonanzzuordnung aller Signale, um die einzelnen Hauptketten- und Seitenkettenamide korrekt zuzuordnen und daraus Rückschlüsse ziehen zu können. Diese Zuordnung wurde in vorherigen Arbeiten schon in der Arbeitsgruppe „Analytische Chemie“ von Prof. Heiko M. Möller von Dr. Ruslan Nediakov, M. Sc. Robert Creutzmacher und M. Sc. Stefan Schön an der Universität Potsdam durchgeführt. In den überlagerten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren aus Abbildung 13 A ist ersichtlich, dass vor allem zuerst die Seitenketten-Amiprotone der neun vorhandenen Asparagin- und 11 Glutamin-Reste ausgetauscht werden (δ ^1H : im Bereich von 7 ppm, δ ^{15}N : 110 – 115 ppm), da diese sehr leicht zugänglich sind. Weiterhin zeigt Abbildung 13 B den Plot des chemischen Austauschs nach definierten Zeitspannen auf die 3D-Struktur. Während an der Oberfläche des Proteins in den unstrukturierten Regionen nach fünf bzw. acht Tagen ein nahezu vollständiger Isotopenaustausch des Proteinrückgrates stattgefunden hat, ist das in der CBM3-Familie verbreitete β -Sandwich mit seinen neun β -Schleifen auch nach 27 Tagen in D_2O weiterhin protoniert. Dies spricht für eine sehr rigide Struktur, in der wahrscheinlich keine Protein-Substrat-Interaktion in diesem Bereich stattfinden wird. Diese Erkenntnis konnte für spätere Wechselwirkungs- oder Mutationsstudien an diesem Protein genutzt werden.

Weitere Eigenschaften wie thermodynamische Parameter, welche das Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Konformation im nativen Zustand beschreiben, oder die kinetische Charakterisierung der Proteinfaltung, können aus Amidproton-spezifischen Austauschraten extrahiert werden [206]. Auch Echtzeit-NMR-Messungen in Kombination mit durch pH-Wert- oder Temperaturänderung langsameren Austauschreaktionen können sowohl für Sekundär- und Tertiärstruktur-Charakterisierungen als auch für die Identifikation von Amidendienen, welche an starken Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Die stetige Optimierung der Messstrategien und die Verwendung von schnellen Mischgerätschaften zum Puls-löschenden H/D-Austausch erlaubt heutzutage Messungen von Austauschraten im Millisekunden- bis Sekundenbereich [207].

4.3 Untersuchung der Cellulose-Bindeeigenschaft

In vorangegangenen Studien zum Protein Cbh9A CBM3b^{WT} und dessen Punktmutante Cbh9A CBM3b^{N126W} konnten Yaniv *et al.* mittels Cellulose-Bindeassays die Erkennung von mikrokristalliner Cellulose (Avicel®) durch die Punktmutante aufzeigen [192].

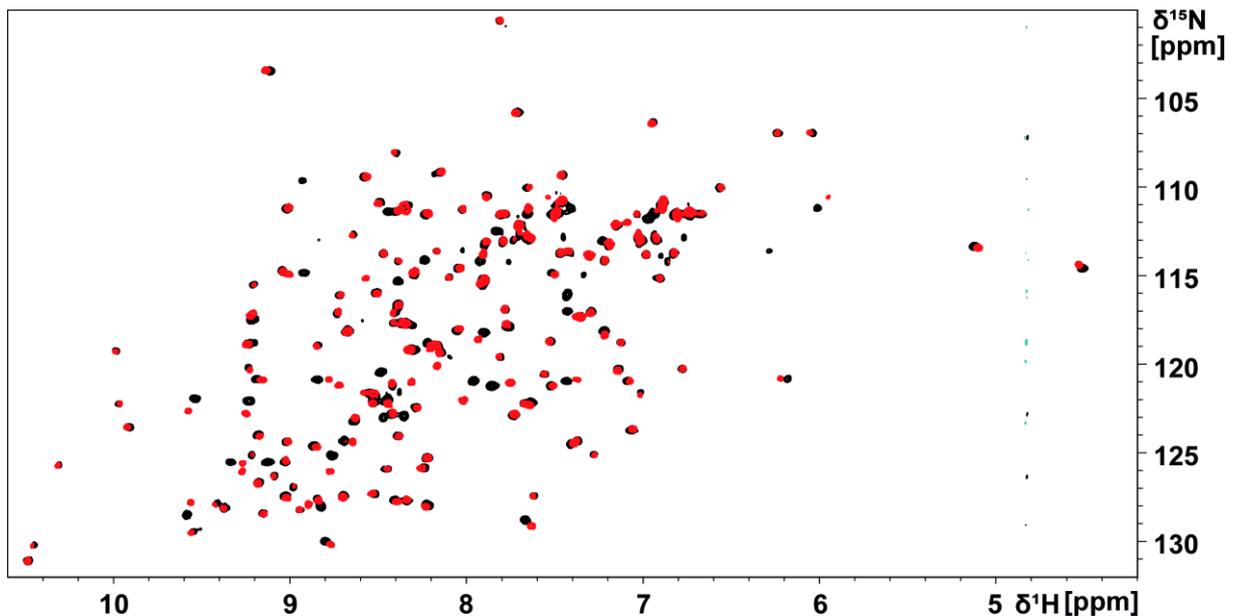


Abbildung 14 | Überlagerung der ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren von Cbh9A CBM^{WT} vor (schwarz) und nach Zugabe von 30 mM Cellobiose (rot).

Avicel® besteht zu ca. 60 % aus kristalliner Cellulose und zu ca. 40 % aus amorphen Regionen, weshalb Typ-A CBMs eine höhere Bindungskapazität im Vergleich zu Typ-B CBMs zeigen und dieses Substrat deshalb unter anderem zur Differenzierung dieser beiden Klassen verwendet wird [208–210]. Um das Verhalten von Cbh9A CBM3b^{WT} und Cbh9A CBM3b^{N126W} mit löslichen Cellulose-Fragmenten zu untersuchen, wurden diese in isotopenmarkierter Form exprimiert, aufgereinigt und mittels Lösungs-NMR vermessen. Dazu wurde ein ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum aufgenommen und schrittweise eine Cellobiose-Lösung hinzugegeben. Cello-Oligosaccharide verlieren mit steigendem Polymerisationsgrad an Löslichkeit, daher besitzen kommerziell erhältliche Cellulose-Fragmente heutzutage nur bis zu acht Wiederholeinheiten von β -1,4-glycosidisch verlinkter β -D-Glucopyranose. In Abbildung 14 ist die Überlagerung des Referenzspektrums von Cbh9A CBM3b^{WT} mit dem ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum mit der höchsten Konzentration an Cellobiose dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass eine Vielzahl an Resonanzen verschoben ist, die Faltung des Proteins jedoch erhalten bleibt. Da diese Verschiebungen bei sehr

hohen Ligand-Konzentrationen weiterhin zu beobachten waren (bis 30 mM) und keine Sättigung erreicht werden konnte, ist es möglich, dass die Veränderungen im Spektrum nicht nur durch spezifische, sondern auch durch unspezifische Wechselwirkungen verursacht wurden. Im weiteren Teil dieser Diskussion wird unter anderem noch auf Bindungsstudien mit Cellohexaose eingegangen, bei denen nur wenige spezifische Verschiebungen beobachtbar und lokal auf das Protein übertragbar waren. Die starken Veränderungen im Spektrum mit der Cellobiose deuten auf eine Vielzahl an möglichen ursächlichen Effekten hin, beispielsweise ein drastischer pH-Effekt oder auch eine Calcium-Komplexierung, welche in Kapitel 4.4 näher erläutert wird. Daher und aufgrund der schon erwähnten Löslichkeitsbegrenzungen wurde diese Interaktion nicht weitergehend untersucht.

Klassische Typ-A CBMs binden kristalline Cellulose via unpolare Interaktionen, welche die Freisetzung von geordneten Wassermolekülen aus dem Protein und dem Liganden zur Folge haben. Dadurch ist dieser Prozess entropisch begünstigt, wie beispielsweise isotherme Titrationskalorimetrie-Studien von CBMs der Familien 2 und 3 mit diversen Oligosacchariden wie Xyloglucan zeigten [211]. Xyloglucan aber ist ein löslicher Ligand, welcher Typ-B und Typ-C CBMs favorisiert. Diese Interaktionen sind enthalpisch getrieben, während auch der Verlust der thermodynamischen Freiheitsgrade durch die Konformationsrestriktion der gebundenen Liganden die Entropie beeinflusst.

Daher stellt sich die Frage, ob die klassische Funktionsweise der Typ-A CBMs überdacht und erweitert werden muss, auch wenn die Affinität zu kristalliner Cellulose trotzdem deutlich höher ist (~50-100fach, [211]). Georgelis *et al.* zeigten in dem Zusammenhang, dass CBMs aus zwei verschiedenen Typ-A Familien lösliches Xyloglucan binden können [164]. Kurze, lösliche Oligosaccharide werden bevorzugt von Typ-B und Typ-C CBMs gebunden, wie beispielsweise das zweite CBM (CBM4) in der Cellobiohydrolase 9A aus *C. thermocellum* eines ist. Die Kristallstruktur von CBM4 konnte im Komplex mit Cellobiose von Alahuhta *et al.* aufgeklärt werden [212]. Dort befindet sich die Cellobiose in einer Art Bindungsspalte, wo sie durch CH- π -Wechselwirkungen von einem Tyrosin- und einem Tryptophan-Rest und einer Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen fixiert wird. Diese Voraussetzungen sind bei der planaren Bindungsstelle von Cbh9A CBM^{WT} und Cbh9A CBM^{N126W} nicht gegeben. Weiterhin besitzt das Disaccharid eine Länge von 10.35 Å [213] und der aromatische Streifen mit Tyr-77 und Tyr-78 im Protein eine Länge von 15.8 Å [192], was bedeuten würde, dass keine Überbrückung dieser aromatischen Systeme durch die Pyranose-

Ringe des Disaccharids aus sterischen Gründen möglich ist. Mit 22,5 Å [214] bzw. 30,8 Å sind hingegen sowohl die Cellotetraose als auch die Cellohexaose in der Lage dazu.

Die Titration von Cbh9A CBM3b^{WT} mit Cellotetraose zeigte punktuelle chemische Verschiebungen im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum, welche jedoch global im Protein verteilt sind, so dass keine konkrete Bindetasche identifiziert werden konnte (siehe Abbildung 44 im Anhang). Die Titrations mit der Cellohexaose hingegen zeigten stärkere *chemical shift perturbations* (CSPs), wie in Abbildung 15 A verdeutlicht. Der Plot auf die Aminosäuresequenz zeigt zwei konzentrierte Regionen, an welchen eine Umgebungsänderung der jeweiligen Aminosäuren stattfindet (siehe Abbildung 15 B). Indem die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Aminosäuren mit den höchsten CSPs gegen die Cellohexaose-Konzentration aufgetragen und mit Hilfe eines *one site binding* Modells gefittet wurden, ergibt sich die Dissoziationskonstante $K_d = 5728 \pm 775 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 15 C). Die schwachen Affinitäten im millimolaren Bereich sind für CBM-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen nicht ungewöhnlich, da diese in vielen Fällen auch reversibler Natur sind beziehungsweise sein müssen [154].

In Abbildung 16 werden die Aminosäuren mit den stärksten Verschiebungen im Spektrum auf der 3D-Struktur von Cbh9A CBM3b^{WT} gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass die Regionen um Tyr-77, Tyr-78 und Asn-126 trotz des Fehlens einer dritten aromatischen Aminosäure die Bindetasche/Bindungsfläche bildet. Neben deren CH- π -Wechselwirkungen mit den Glucopyranoseringen wird die Interaktion vermutlich durch eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Resten des vierten (wie z.B. Ile-75, Cys-76 oder Thr-79) und siebten β -Stranges (wie z.B. Glu-116, Gln-118, Val-120 oder Arg-122), welche sich parallel bzw. in der Nähe zu den Tyrosin-Resten befinden, stabilisiert. Durch diese Bindung kann es auch im gesamten Protein zu leichten Konformationsänderungen kommen. Diese Änderungen betreffen ebenfalls Aminosäurereste, die nicht unmittelbar an der Ligandenbindung beteiligt sind. Es können sogenannte *long range* Effekte beobachtet werden [215].

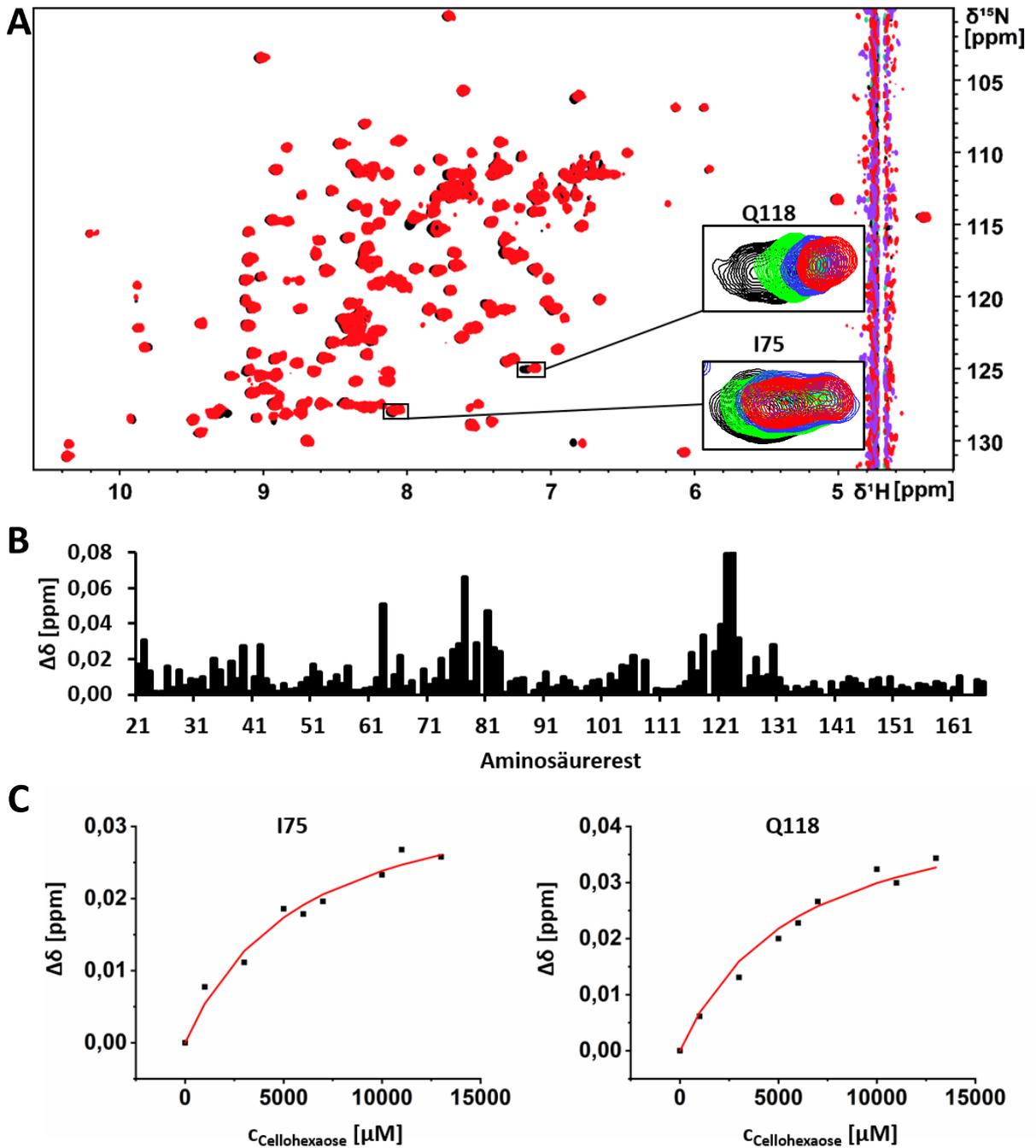


Abbildung 15 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM3b^{WT} vor (schwarz) und nach Zugabe von 3 mM (grün), 7 mM (blau) und 14.5 mM Cellohexaose (rot). B) CSPs in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. C) Titrationskurve von ausgewählten Aminosäureresten mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8.

Die Ergebnisse zeigen, dass Cbh9A CBM3b^{WT} trotz seiner Einstufung als Typ-A CBM auch lösliche Polysaccharide erkennen kann, wenn auch mit einer schwächeren Affinität. Dies steht im Konsens mit anderen Typ-A CBMs wie Vertretern der Familie 2 [216], 3 [211] oder 64 [216]. CBM_E1, das „Gründungsprotein“ der CBM-Familie 81, konnte im Komplex mit Cellopentaose kristallisiert werden (PDB: 5KLE) und wird durch seine enthalpisch begünstigte Bindung zu Kohlenhydraten den Typ-B CBMs zugeordnet, obwohl es strukturelle Charakteristika von Typ-A CBMs wie eine planare Bindungsstelle zeigt [217]. Diese Bindestelle beinhaltet wie bei Cbh9A CBM3b^{WT} jedoch auch nur zwei an den CH- π -Interaktionen beteiligte aromatische Aminosäuren. Es ist also offensichtlich, dass Typ-A CBMs nicht nur im klassischen Sinn an kristalline Cellulose binden, sondern auch an lösliche Fragmente. Dies impliziert, dass die Erkennungsfunktion dieser Typ-A CBMs wahrscheinlich noch komplexer als bisher gedacht ist, indem sie die Enzyme erst an die parakristallinen Bereiche der Cellulose aus exponierten Glucanen binden lassen und sobald die kristalline Cellulose frei zugänglich ist, das Enzym diese dann hydrolysieren kann [211, 217].

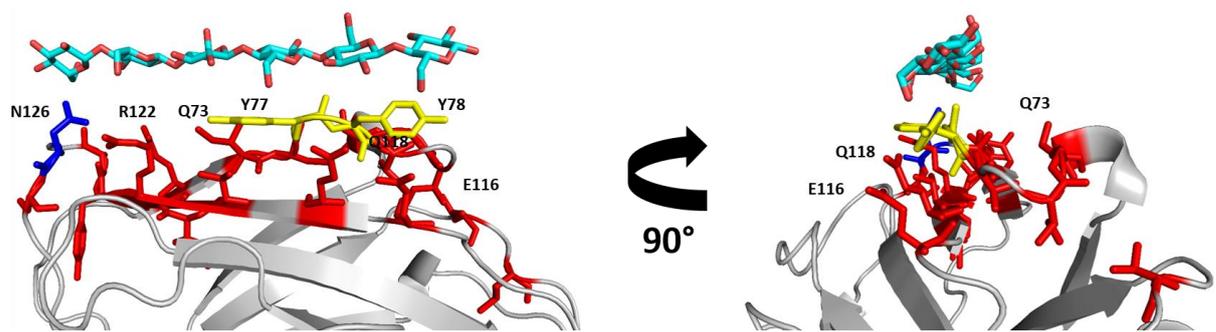


Abbildung 16 | 3D-Struktur von Cbh9A CBM3b^{WT} (PDB: 2YLK) als Bändermodell im Komplex mit Cellohexaose (Kohlenstoffatome: cyan, Sauerstoffatome: rot) mit markierten Aminosäuren, welche der Mutationsposition N126W (blau) und vermuteten Cellulose-Bindestelle Tyr-77 und Tyr-78 (gelb) entsprechen und welche die stärksten chemischen Verschiebungen erfahren (rot).

Die vorangegangenen Studien wurden mit der Punktmutante Cbh9A CBM3b^{N126W} wiederholt, um mögliche Änderungen in deren Bindevverhalten zu löslichen Oligosacchariden durch die Verlängerung der aromatischen Bindestelle zu charakterisieren. Dabei wurde das Protein nicht nur ¹⁵N-, sondern auch ILV-markiert (¹³C-Markierung der Methylgruppen von Isoleucin, Leucin und Valin), um erweiterte Strukturinformationen zu erhalten. Die selektive Markierung der Methylgruppen kann einerseits strukturelevante NOEs mit hoher Sensitivität und Auflösung wiedergeben (wie weitreichende Amid-Methyl- und Methyl-Methyl-NOEs bis zu 8 Å) und

andererseits befinden sich diese Aminosäuren oft im hydrophoben Kern oder an hydrophoben Oberflächen von globulären Proteinen, an denen kleine Moleküle binden können [218–220].

Wie auch schon bei Cbh9A CBM3b^{WT} waren bei der Titration von Cbh9A CBM3b^{N126W} mit Cellobiose starke CSPs bis in den hohen millimolaren Bereich im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum zu beobachten (siehe Abbildung 42 im Anhang). Hingegen im ¹H-¹³C-HMQC zeigen die Resonanzen der ILV-Methylgruppen bis 5 mM Cellobiose keine Veränderungen (siehe Abbildung 43 im Anhang). Die hohe Bindungsaffinität lässt sich möglicherweise durch die Länge als auch die gedrehte Konformation des Liganden erklären. Dagegen zeigt die Titration von Cbh9A CBM3b^{N126W} mit Cellotetraose vor allem im Bereich der beiden Reste Tyr-77 und Tyr-78 diverse Signalverschiebungen im ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum (siehe Abbildung 45 im Anhang). Unter Hinzunahme der Aminosäuren mit den stärksten Verschiebungen im Spektrum errechnete sich eine Dissoziationskonstante von $K_d = 53618 \pm 19246 \mu\text{M}$, welche für eine deutlich schwächere Affinität der Punktmutante im Vergleich zum Wildtyp zu Cellotetraose steht. Des Weiteren stellt dieser K_d -Wert nur eine Abschätzung dar, weil der Verlauf der berechneten Fittingkurve nahezu linear verläuft und somit noch kein Plateau im Sättigungsbereich erreicht werden konnte, was als Indikator für einen noch höheren K_d -Wert und somit für eine schwächere Bindung steht. Ein anderes Ergebnis zeigte sich bei der Titration von Cbh9A CBM3b^{N126W} mit der längeren Cellohexaose. Bei dieser Titration ergab sich eine Dissoziationskonstante von $K_d = 11646 \pm 867 \mu\text{M}$, welche um den Faktor fünf kleiner ist und damit die höhere Affinität der Punktmutante zu Cellohexaose im Vergleich zu Cellotetraose aufzeigt (siehe Abbildung 17 A und C).

In der Kristallstruktur von Cbh9A CBM3b^{N126W} ist erkennbar, dass die Punktmutation neben der Verlängerung der Bindestelle auf 25.4 Å auch Orientierungsänderungen einzelner Aminosäuren erzeugt [192]. Dabei rotiert beispielsweise die C_β-C_γ-Bindung von Tyr-77 um 122° im Uhrzeigersinn, sodass der aromatische Ring mit den aromatischen Systemen von Tyr-78 und Tyr-78 in einer Ebene und ohne topografische Hindernisse steht. Weiterhin befindet sich durch die Mutation unter anderem auch Arg-122 in einer Achse mit der aromatischen Bindestelle und stabilisiert die Bindung durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, wie schon in CipA CBM3a aus *C. thermocellum* beobachtet werden konnte (PDB: 1NBC) [158]. Der Plot der CSPs auf die Sequenz zeigt, dass dieselben Bereiche wie in der Wildtyp-Titration eine Änderung ihrer chemischen Verschiebung bei der Titration mit Cellohexaose erfahren (siehe Abbildung 17 B).

Um weitere involvierte Seitenketten zu identifizieren, wurden zusätzlich ^1H - ^{13}C -HMQC-Spektren aufgenommen (siehe Abbildung 17 D). Bei einer Vielzahl dieser Reste in der Nähe der vermuteten Bindestelle wie Ile-75, Ile-81, Val-106, Leu-108, Ile-117 und Ile-121 findet zwar eine Änderung der chemischen Verschiebung im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum statt, jedoch nicht im ^1H - ^{13}C -HMQC-Spektrum, was vermutlich auf die relative Orientierung der Seitenketten weg von der Bindestelle zurückzuführen ist. Die Methylgruppen-Signale von Val-120 zeigten jedoch Veränderungen, da diese sich in unmittelbarer Nähe der aromatischen Aminosäuren befinden und somit an der Bindung beteiligt sind bzw. durch diese beeinflusst werden. Jedoch ist dies nur bei der Titration mit Cellohexaose und nicht mit Cellotetraose der Fall, da diese Seitenkette wahrscheinlich durch den aromatischen Rest von Tyr-78 abgeschirmt wird. Weiterhin ist es möglich, dass zur Realisierung der Bindung eine Konformationsänderung von Cellohexaose stattfindet. Dabei könnte, ähnlich wie im Fall von Cello-Oligosacchariden und β -Glucanen im Komplex mit Typ-B CBMs, sich der Ligand anstatt der dreifach gedrehten helikalen Struktur zu einer zweifachen Schraubachse formen, in der die Glucose-Moleküle im 180° -Winkel zueinander ausgerichtet sind. Die Bildung der nicht favorisierten Konformation des Liganden würde dadurch einen Verlust der Entropie zur Folge haben [211].

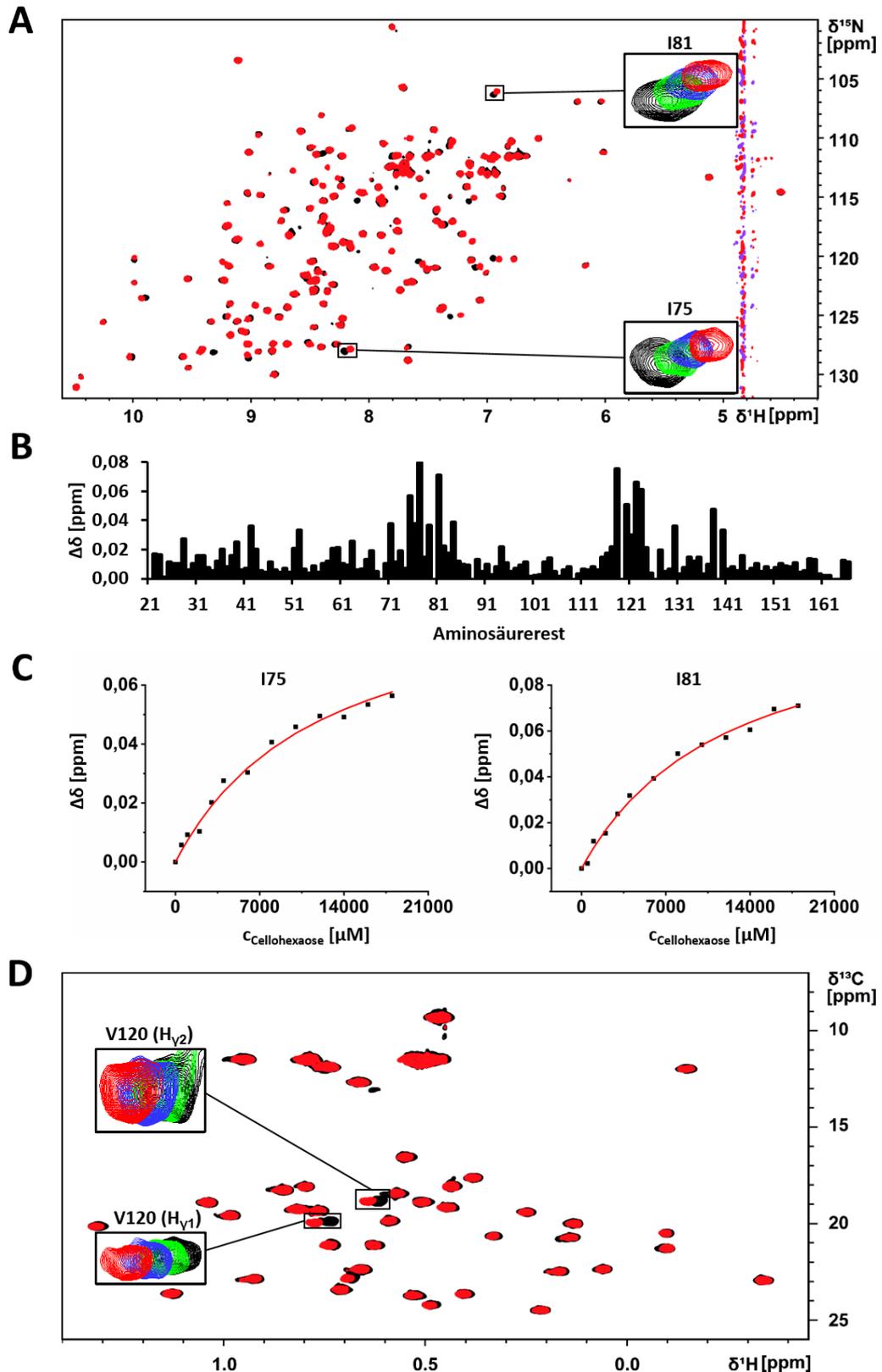


Abbildung 17 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM3b^{N126W} vor (schwarz) und nach Zugabe von 3 mM (grün), 8 mM (blau) und 18 mM Cellohexaose (rot). B) CSPs in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. C) Titrationen von ausgewählten Aminosäureresten mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8. D) Überlagerung der ^1H - ^{13}C -HMQC-Spektren von Cbh9A CBM3b^{N126W} vor (schwarz) und nach Zugabe von 1 mM (grün), 3 mM (blau) und 5 mM Cellohexaose (rot).

Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten weiterführende Experimente wie beispielsweise isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), welche die thermodynamischen Parameter bestimmen können, durchgeführt werden. Die Ergebnisse der Titrationsen von den beiden Cbh9A CBM3b Konstrukten mit löslichen Cellulose-Fragmenten zeigen also, dass sowohl die Cellotetraose als auch die Cellohexaose von beiden Proteinen gebunden werden können und die Erkennung am linearen, aromatischen Bindungsstreifen erfolgt (siehe Abbildung 16 und Abbildung 18). Die Affinität wird sowohl durch die steigende Anzahl an Wiederholeinheiten als auch die Substitution des polaren Asn-126 zum aromatischen Trp-126 beeinflusst. Das Cbh9A CBM3b^{N126W} jedoch nicht signifikant stärker an die löslichen Cellulose-Fragmente bindet als der Wildtyp, gleichzeitig aber im Gegensatz zum Wildtyp die kristalline Cellulose in Assays bindet, ist überraschend. Eine mögliche Erklärung ist die Flexibilität der kurzen Cellulose-Fragmente gegenüber der starr gepackten kristallinen Cellulose, die keine Konformationsänderung vollziehen kann. Daher ist die N126W-Mutation als Verlängerung der planaren Bindestelle dort essenzieller als in Lösung.

Um die Bindung mittels NMR noch detaillierter zu charakterisieren, können weitere Techniken wie *Saturation-Transfer Difference NMR (STD-NMR)*, *Two-Dimensional Transferred Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (trNOESY)* oder *cross saturation* Experimente eingesetzt werden, weitere selektive Markierungsstrategien durchgeführt (z.B. Methionin-Markierung) oder andere Punktmutationen (z.B. Y77A, Y78A oder R122A) erzeugt werden.

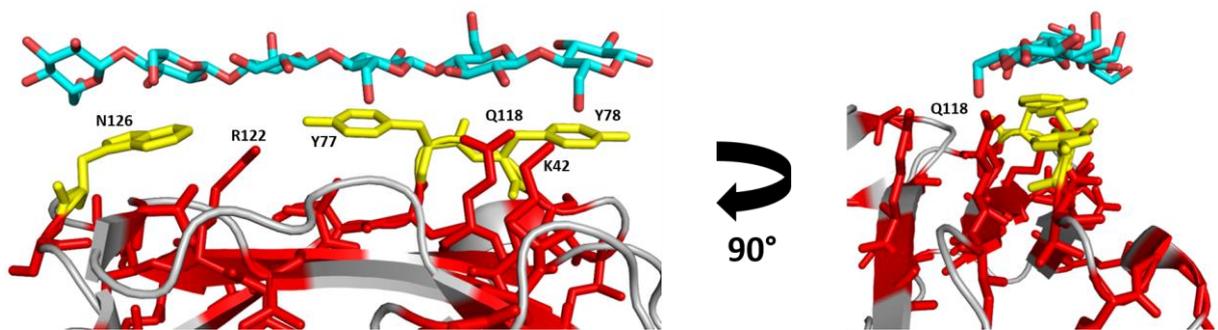


Abbildung 18 | 3D-Struktur von Cbh9A CBM3b^{N126W} (PDB: 3ZQX) als Bändermodell im Komplex mit Cellohexaose (Kohlenstoffatome: cyan, Sauerstoffatome: rot) mit markierten Aminosäuren, welche der vermuteten Cellulose-Bindestelle Tyr-77, Tyr-78 und Trp-126 entsprechen (gelb) und welche die stärksten chemischen Verschiebungen erfahren (rot).

4.4 Untersuchung der Calcium-Bindestelle

Viele CBMs sind Metalloproteine und beinhalten beispielsweise Calcium- oder Nickel-Ionen, welche entweder direkt an der Ligandenbindung beteiligt sind wie in CBMs der Familien 36 [193] und 60 [221] oder indirekt beteiligt sind, indem sie bindende Reste stabilisieren wie in *SdCBM6* [222]. Sie können ebenfalls die Quartärstruktur durch Dimerisierung beeinflussen wie in *CtCBM62* [194]. Wie schon in Kapitel 2.3 erläutert, besitzt *Cbh9A CBM3b* eine Lösungsmittelzugängliche Calcium-Bindestelle, welche laut Fourier-Karte jedoch nur bei der Punktmutante mit einem oktaedrisch koordinierten Calcium-Ion besetzt ist [192]. Titrationsen mit Calciumchlorid und dem sechszähligen Chelatkomplexbildner Ethylendiamintetraacetat (EDTA) sollten zur Existenz bzw. Besetzung dieser möglichen Bindestelle in Lösung Erkenntnisse liefern. Dafür wurden zunächst eine äquimolare Menge und anschließend ein Überschuss an Calciumchlorid zu beiden Proteinen zugegeben und die unter diesen Bedingungen erhaltenen Spektren mit dem Referenzspektrum verglichen (siehe Abbildung 46 und Abbildung 47 im Anhang). Es zeigte sich eine nahezu identische Verteilung der einzelnen Resonanzen, was auf eine schon bestehende Besetzung der Calcium-Bindestelle hindeutet. Diese resultiert wahrscheinlich aus der notwendigen Zugabe an Calciumchlorid während der Expression (im M9-Medium, siehe Kapitel 10.3) und während des Zellaufschlusses (im Lysepuffer, siehe Kapitel 10.8.2).

Ob das Calcium-Ion eine strukturstabilisierende Funktion im *Cbh9A CBM3b* besitzt, sollte durch dessen Entfernung mittels EDTA ermittelt werden. Nach der Zugabe zeigten beide Spektren Veränderungen im Bereich der Calcium-Bindestelle auf (siehe Abbildung 19 und Abbildung 48 im Anhang). Da die koordinierenden Reste in zwei Schleifen lokalisiert sind (Thr-65 und Glu-67 verbinden die β -Stränge 3 und 4 und Asp-130, Asn-133 und Asp-134 verbinden die β -Stränge 7 und 8, siehe Abbildung 9 A), ist eine mögliche Stabilisierung der Struktur dadurch denkbar. Der Verlust des Calcium-Ions erzeugte sowohl teilweise starke CSPs, bei der Punktmutante stärker als beim Wildtyp, als auch das Ausbleiben von Signalen im Spektrum. Diese konzentrierten sich neben einzelnen *longe range* Effekten hauptsächlich auf den Bereich in der Nähe der Calcium-Bindestelle, wie der Plot auf die 3D-Struktur in Abbildung 19 C zeigt. Besonders betroffen sind hierbei die β -Stränge 2, 4, 6 und 7, in denen sich teilweise auch die Calcium-bindenden Reste befinden, die beide β -Schleifen verbinden. Trotz dieser strukturellen Änderungen sind alle Signale weiterhin dispergiert, was gegen eine Destabilisierung und partielle Denaturierung der Proteine spricht (diese würde sich unter anderem durch eine Kumulation der Signale bei einer ^1H -chemischen Verschiebung um 8 ppm zeigen).

Eine mögliche Reversibilität dieses Effektes sollte eine erneute Zugabe an Calciumchlorid nach der Behandlung mit EDTA zeigen (siehe Abbildung 19 A und Abbildung 48 im Anhang). Da die erhaltenen Spektren identisch mit den Referenzspektren waren, konnte gezeigt werden, dass die Bindestelle erneut mit einem Calcium-Ion besetzt werden kann und das Protein nicht irreversibel entfaltet wird.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine besetzte Calcium-Bindestelle in beiden Proteinen vorhanden ist, welche durch den Verlust des Ions eine Änderung der Konformation erfährt. Diese ist allerdings nicht essenziell für die globale Faltung des Proteins, wie es beispielsweise in ScaA CBM3b aus *Bacteroides cellulosolvens* beobachtet werden konnte [223].

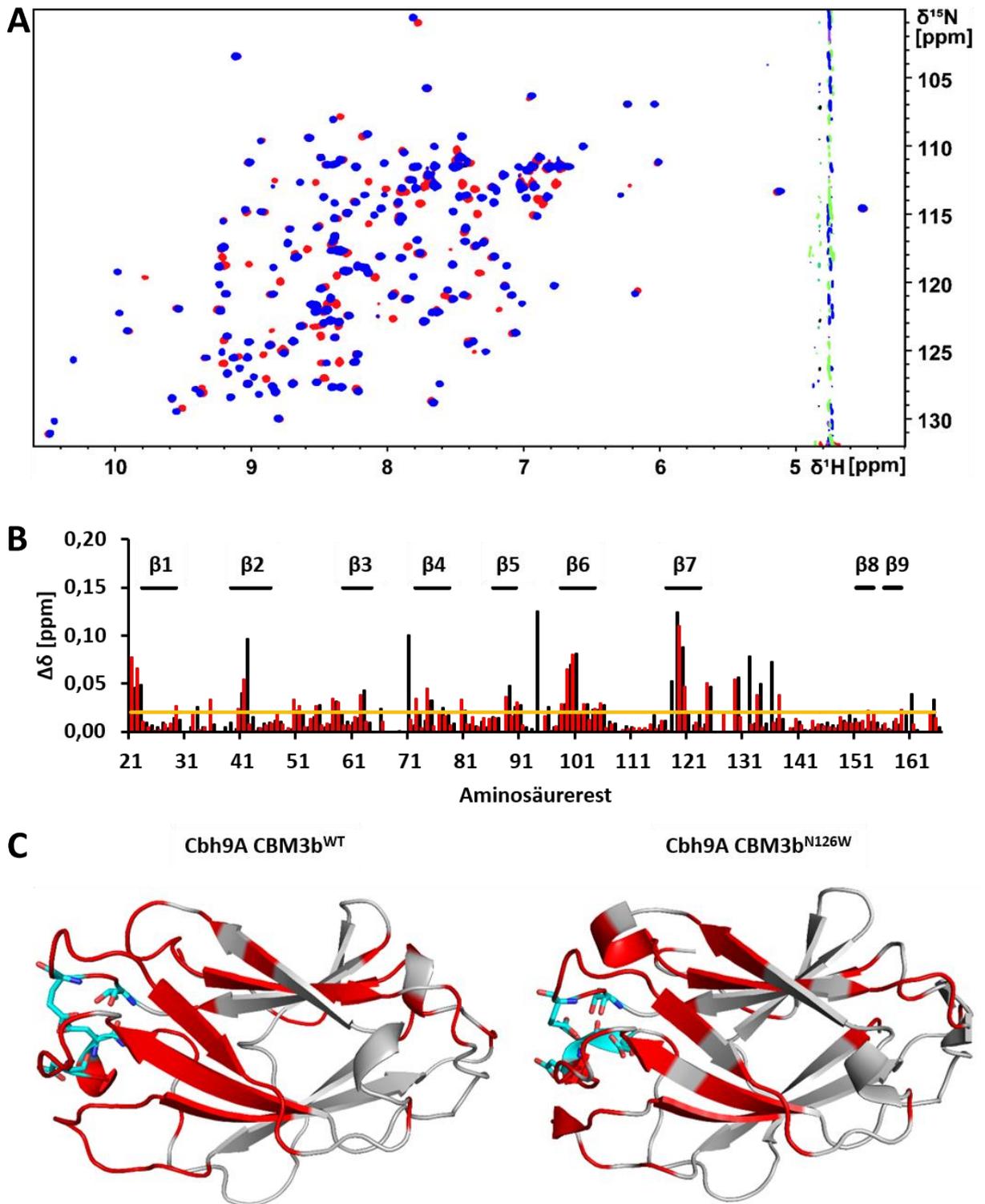


Abbildung 19 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM3b^{WT} vor (schwarz) und nach Zugabe von 250 μM EDTA (rot) und anschließend 5 mM Calciumchlorid (blau). B) CSPs von Cbh9A CBM3b^{WT} (schwarz) und Cbh9A CBM3b^{N126W} (rot) in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. Orange Linie zeigt $\Delta\delta = 0.02$ ppm. C) 3D-Bändermodell von Cbh9A CBM3b^{WT} (links, PDB: 2YLK) und Cbh9A CBM3b^{N126W} (rechts, PDB: 3ZQX) mit Calcium-koordinierenden Resten (cyan) und Aminosäuren mit den stärksten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta > 0.02$ ppm, rot).

Weiterhin sollte auch ein möglicher Einfluss dieser besetzten Bindestelle auf das Cellulose-Bindevverhalten von Cbh9A CBM3b^{N126W} untersucht werden. Die Frage, ob diese wie bei vielen Lectinen oder beispielsweise PpCBM36 aus *Paenibacillus polymyxa* die Bindestelle in die korrekte Konformation bringt oder direkt das Polysaccharid mit koordiniert (siehe Abbildung 8 B), sollte durch eine Entfernung des Calcium-Ions mit anschließender Cellohexaose-Titration weiterführend untersucht werden [154, 193]. Sowohl das ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum als auch der Plot der chemischen Verschiebungen auf die Aminosäuresequenz (siehe Abbildung 20) bestätigten auch beim Calcium-freien Protein eine Affinität zur löslichen Cellohexaose. Diese liegt im Absolutwert mit $K_d = 8767 \pm 1769 \mu\text{M}$ unter der Dissoziationskonstante des Calcium-besetzten Cbh9A CBM3b^{N126W} mit $K_d = 11646 \pm 867 \mu\text{M}$. Der Standardfehler ist jedoch höher, sodass von einer ähnlichen Affinität zum Oligosaccharid ausgegangen werden kann. Die etwas höhere Affinität kann durch die Konformationsänderung des Proteins, welche durch die Calcium-Entfernung neben der Calcium-Bindestelle auch im Cellulose-Bindungsbereich stattgefunden hat, erklärt werden. Dabei hat sich vermutlich die Ausrichtung einiger Aminosäuren nahe den β -Schleifen 4 (z.B. Gln-71) und 7 (z.B. Phe-119 und Val-120) verändert und somit eine für die Cellohexaose mehr favorisierende Konformation gebildet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl der Wildtyp als auch die Punktmutante N126W von Cbh9A CBM3b nach der Expression und Aufreinigung über eine mit Calcium besetzte Bindestelle verfügen, welche durch einen Komplexbildner wie EDTA unter Erhalt der globalen Faltung entfernt werden kann. Anschließend ist eine erneute Besetzung dieser Bindestelle mit Calcium möglich, wodurch die Reversibilität bestätigt werden konnte. Das Calcium-freie Protein bindet ebenso wie der Wildtyp und die Punktmutante lösliche Cellohexaose im niedrigen millimolaren Bereich, welche durch punktuelle Konformationsänderungen sogar eine geringfügig höhere Affinität als die Punktmutante besitzt. Eine Calcium-abhängige Bindung zu Cello-Oligosacchariden wie in Lectinen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

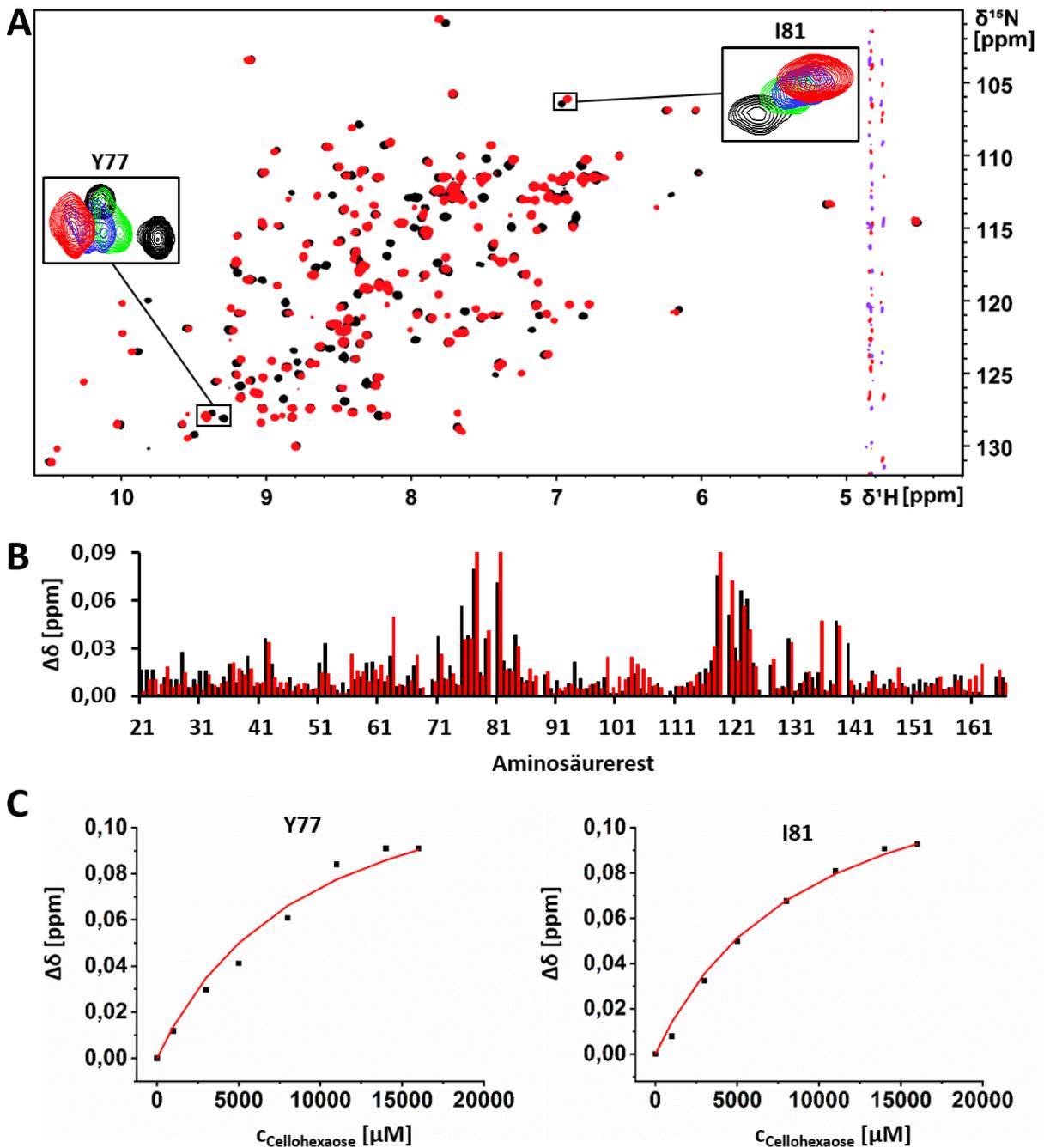


Abbildung 20 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM3b^{N126W} mit EDTA vor (schwarz) und nach Zugabe von 5 mM (grün), 8 mM (blau) und 16 mM Cellohexaose (rot). B) CSPs der Cellohexaose-Titrationen in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste ohne (schwarz) und mit EDTA (rot). C) Titrationskurve von ausgewählten Aminosäureresten mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8.

4.5 Cbh9A CBM3b^{N126W} als Modell für Protein-Polymer-Konjugate

Protein-Polymer-Konjugate, beginnend in den 1970er Jahren mit den ersten BSA-PEG-Konjugaten (BSA: Bovines Serumalbumin, PEG: Polyethylenglycol), sind attraktive Biomaterialien, welche die Proteinstabilität erhöhen oder physikochemische Eigenschaften wie pH-Wert oder Temperaturoptima von Enzymen beeinflussen können [224–226]. Diese funktionalen Materialien finden in der Biomedizin, der Therapeutik, der Biosensorik in elektronischen Geräten und als hauchdünne Membranen breite Anwendung [227–230]. Die Synthesewege zu diesen Konjugaten erfolgen größtenteils über Radikalpolymerisationen mit reversibler Deaktivierung (RDRP) [231], welche unter anderem radikalische Atom-Transfer Polymerisation (*grafting from*, ATRP) [232], reversiblen Addition-Fragmentierungs-Kettentransfer (*grafting to*, RAFT) [233] und Stickstoffgesteuerte Polymerisation (NMP) beinhalten [234]. Die Vorteile reichen von der Kompatibilität für verschiedene funktionelle Gruppen bis hin zur Möglichkeit der Kettenverlängerung nach deren Anbringung an das Protein. Dennoch sind sowohl die Bestimmung des Polymerisationsgrades als auch die Polymerisationsbedingungen für den Erhalt der Proteinstruktur und Funktion weiterhin Gegenstand aktueller Forschung [235]. Während die Anbringung von PEG (PEGylierung) vor allem bei therapeutischen Anwendung weit verbreitet ist [236, 237], ist die Konjugation von Polymeren, welche durch externe Einflüsse stimulierbar sind, eine große Herausforderung [238]. Poly-*N*-Isopropylacrylamid (PNIPAm) ist ein thermoresponsives Polymer, welches eine kritische Lösungstemperatur von 32 °C in Wasser besitzt, was zu einer Konformationsänderung von einer linearen Polymerkette hin zu einem kollabierten Polymerknäuel führt [239, 240]. Dieses schaltbare Polymer sollte sowohl mittels der *grafting from* Methode als auch der *grafting to* Methode unter verschiedenen Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Kettenlänge, Initiatoranzahl) an die zehn vorhandenen Lysine von Cbh9A CBM3b^{N126W} angebracht und mittels Lösungs-NMR auf Stabilität des Proteins und Effizienz der Konjugation untersucht werden.

4.5.1 Konjugation mittels der *grafting from* Methode

Bei der *grafting from* Methode wird ein Initiator oder Kettentransferreagenz, in diesem Fall ein NHS-Ester (NHS-BiBa), an die ϵ -Amino-Gruppe der vorhandenen Lysine angebracht, und das Polymer (PNIPAm) kann anschließend an diesem Makroinitiator (CBM-MI) wachsen (siehe Abbildung 21 A und Kapitel 10.9.1 und 10.9.2 im Anhang) [241, 242]. Es wurde versucht, an alle frei zugänglichen Lysine einen Initiator anzubringen, weshalb dieser im 25fachen Überschuss dazu gegeben wurde. Das dazugehörige Spektrum ist in Abbildung 21 B zu sehen. Nach der Synthese mit dem Initiator bleibt das Protein größtenteils in seiner nativen Form gefaltet, wenngleich auch eine Vielzahl an Resonanzen teilweise starke CSPs zeigen und für jeden angebrachten Initiator ein neues Amidproton-Signal dazukommt. Ein möglicher Indikator für eine erfolgreiche Synthese wäre das zusätzliche Hinzukommen eines unter diesen Bedingungen sichtbaren Seitenketten-Amidprotons der Lysine, was durch die Synthese aus der Amino-Gruppe entsteht. Die Seitenketten-Amino-Signale der Lysine sind generell unter diesen Reaktionsbedingungen nicht sichtbar, da ein schneller Protonenaustausch stattfindet. Um auch Seitenketten-Amino-Resonanzen von Lysinen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum identifizieren zu können, muss bei niedrigen pH-Werten und bei niedriger Temperatur gemessen werden. Dies würde aufgrund verlängerter molekularer *rotational correlation time* (das Protein taumelt langsamer und ist somit träger) zu einer reduzierten Empfindlichkeit führen [243]. Aus diesen Gründen ist aus diesem Spektrum nicht ersichtlich, an welchen Lysinresten eine Modifikation stattgefunden hat.

Bei der anschließenden Polymerisation wurden Kettenlängen von 10, 20 und 100 Wiederholeinheiten erzielt. Die erfolgreiche Konjugation wurde anhand der für Protein-Polymer-Konjugate typischen schmierigen Bande im SDS-PAGE-Gel bestätigt (siehe Abbildung 21 C). Wurde PNIPAm mit 100 Wiederholeinheiten an Cbh9A CBM3b^{N126W} angebracht, so sind beinahe alle Signale im Spektrum verschwunden, was auf die Größe der PNIPAm-Kette zurückzuführen ist (siehe Abbildung 21 D). Das Polymer besitzt mit 11,3 kDa ca. 68 % des Molekulargewichts von Cbh9A CBM3b^{N126W} (16,6 kDa), was zu einer Trägheit des Moleküls in Lösung führt. Die sichtbare Signalgruppe bei der ^1H -chemischen Verschiebung von 7.7 ppm und ^{15}N -chemischen Verschiebung von 100 ppm lässt sich auf das Polymer zurückführen, wie das Referenzspektrum von PNIPAm zeigt (siehe Abbildung 49 im Anhang). Um ein besser aufgelöstes Spektrum zu erhalten, wurden die Ketten daher auf 10 bzw. 20 Wiederholeinheiten begrenzt.

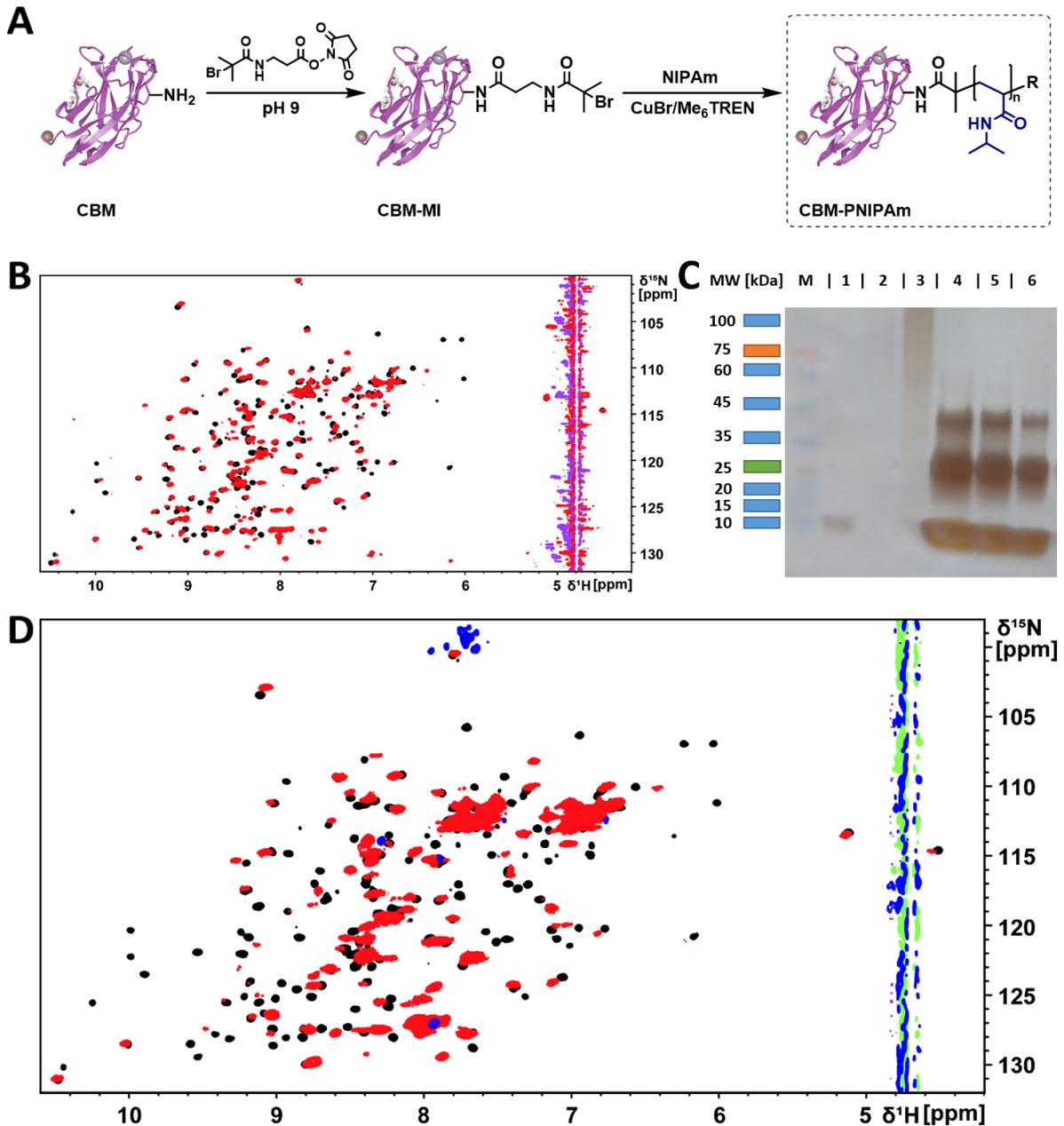


Abbildung 21 | A) Syntheseroute für Cbh9A CBM3b-PNIPAm-Konjugate via *grafting from* Methode, erstellt von Frau M.Sc. Maria Mathieu-Gaedke (Fraunhofer IAP, Golm). B) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM3b $^{\text{N126W}}$ vor (schwarz) und nach der Synthese mit dem Initiator NHS-BiBa (rot). C) SDS-PAGE-Gel mit Größenmarker (M) vom Cbh9A CBM3b $^{\text{N126W}}$ -Makroinitiator (1) und den Cbh9A CBM3b $^{\text{N126W}}$ -PNIPAm-Konjugaten via *grafting from* (2 + 3, 10 Wiederholeinheiten PNIPAm) und *grafting to* (5 – 7, 100 Wiederholeinheiten PNIPAm), erstellt von Frau M.Sc. Maria Mathieu-Gaedke (Fraunhofer IAP, Golm). D) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM3b $^{\text{N126W}}$ vor (schwarz) und nach Konjugation mit 20 Wiederholeinheiten PNIPAm (rot) und 100 Wiederholeinheiten PNIPAm (blau) via *grafting from*.

Die Qualität und Anzahl der identifizierbaren Signale wurden dadurch deutlich erhöht, wie in Abbildung 21 D zu erkennen ist. Jedoch fehlen weiterhin eine Vielzahl an Signalen und das Spektrum weist eine Reihe von kumulierten Resonanzlagen auf, welche auf Aggregation, das Vorhandensein von Kupfer aus der Synthese in der Probe (Kupfer ist diamagnetisch und führt daher zu extremer Signalverbreitung) oder eine partielle Entfaltung des Proteins hindeuten. Als vorsichtiger Indikator für den Grad einer möglichen Denaturierung kann die Anzahl noch vorhandener Signale gesehen werden. Die Auszählung dieser Kreuzsignale ergab, dass noch 65 % aller möglichen Resonanzen vorhanden sind. Jedoch ist dieser Effekt nicht nur auf eine partielle Denaturierung des Proteins zurückzuführen.

Wie die vorangegangenen Ergebnisse zeigen, ist die *grafting from* Methode prinzipiell für die Konjugation von PNIPAm an Cbh9A CBM3b^{N126W} als Modellprotein geeignet, jedoch kann mittels Lösung-NMR keine eindeutige Aussage über die Effizienz und Lokalisation der modifizierten Lysin-Reste getätigt werden. Die Aufnahme von ¹⁵N-TOCSY-HSQC-Spektren mit deutlich längerer Messzeit zur Identifikation der entstandenen Amide ist eine interessante Möglichkeit, jedoch wird die Auswertung der Spektren durch eine Qualitätsabnahme aufgrund von steigender Molekülgröße der Konjugate erschwert. Als weiterer Ansatz könnte die Alaninscan-Methode dienen, bei der ein oder mehrere Lysin-Reste mittels *site-directed mutagenesis* zu Alanin mutiert werden und somit die Entstehung bestimmter Konjugate forciert und analysiert werden können, um stabile Konjugate und dispergierte NMR-Spektren zu erhalten [244].

4.5.2 Konjugation mittels der *grafting to* Methode

Die *grafting to* Methode zeichnet sich durch die separate Synthese des Polymers mit anschließender Konjugation an das Protein aus (siehe Abbildung 22 A). Die Vorteile hierbei bestehen einerseits aus der unkomplizierten Charakterisierung sowohl des Proteins als auch des Polymers vor der Konjugation und andererseits darin, dass die Polymerisationsbedingungen nicht die Proteininstabilität beeinflussen [241, 245].

Nach erfolgreicher thermischer Polymerisation mit Azobis(isobutyronitril) (AIBN), bei der die Kettenlänge zwischen 10 und 100 Wiederholeinheiten variiert wurde, konnte das mit Pentafluorophenyl (PFP) modifizierte PNIPAm an die terminalen Amin-Gruppen der exponierten Lysine konjugiert werden (bei einem 50fachen Polymer-Überschuss). Bei dieser Reaktion wurden pH-Werte von 7.4, 8.2 und 9.0 getestet, um die Konjugationseffizienz zu beeinflussen. Da die Nucleophilie mit steigendem pH-Wert zunimmt, ändert sich auch die Reaktivität der Lysin-

Aminogruppen. Mit der Wahl eines basischen pH-Wertes sollten damit im Idealfall mehr Lysine modifiziert werden können als bei einem neutralen pH-Wert, weil dort nur am N-Terminus eine Modifizierung stattfinden sollte. Denn während der pKs-Wert der α -Aminogruppe für Lysin 8,95 ist, befindet sich hingegen der pKs-Wert der ϵ -Aminogruppe bei 10,53 [246] und der des N-Terminus bei 7,64 [247]. Daher sind speziell die ϵ -Aminogruppen der exponierten Lysine bei einem basischen pH-Wert die bevorzugte Konjugationsposition. Jedoch bestätigte sich diese Vermutung nicht und die ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren sahen für alle bei der Synthese gewählten pH-Werte identisch aus (siehe Abbildung 50 im Anhang).

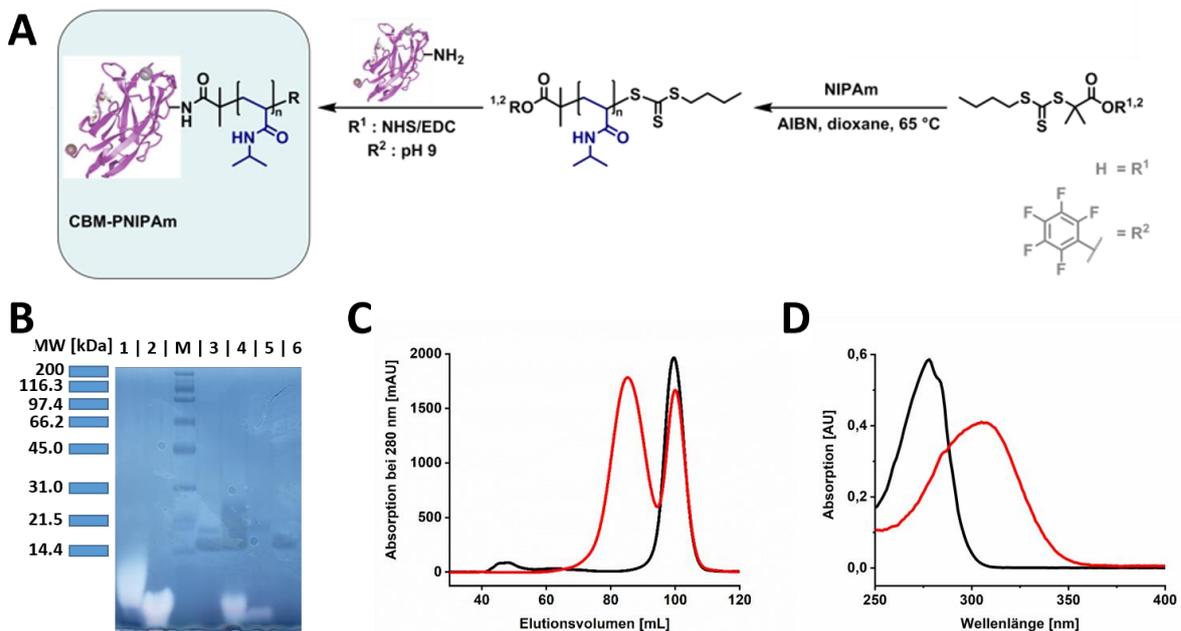


Abbildung 22 | A) Syntheseroute für CBM-PNIPAm-Konjugate via *grafting to* Methode, erstellt von Frau M.Sc. Maria Mathieu-Gaedke (Fraunhofer IAP, Gollm). B) SDS-PAGE-Gel mit Größenmarker (M) von PNIPAm mit 10 (2) bzw. 100 Wiederholeinheiten (1), Cbh9A CBM3b^{N126W} als Referenz (3), CBM-PNIPAm-Konjugat vor (4) und nach der Gelpermeationschromatographie (5-6). C) UV/Vis-Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie von Cbh9A CBM3b^{N126W} (schwarz) und dem CBM-PNIPAm-Konjugat nach der Synthese via *grafting to* (rot). D) Konzentrationsbestimmung via UV/Vis-Spektroskopie von Cbh9A CBM3b^{N126W} (schwarz) und CBM-PNIPAm-Konjugat nach der Synthese via *grafting to* (rot).

Als weiterer Aufreinigungsschritt nach erfolgter Konjugation wurde erneut eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt, um modifiziertes von unmodifiziertem Protein separieren zu können. Wie sowohl das Elutionschromatogramm als auch das SDS-PAGE-Gel zeigen, konnte das unmodifizierte Protein erfolgreich vom Konjugat getrennt werden, damit im Anschluss kein Gemisch mehr für die Messungen vorliegt (siehe Abbildung 22 B und C). Jedoch gestaltete sich die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Synthese via *grafting to* als

schwierig. Denn bei dieser Methode findet ein reversibler degenerativer Kettentransfer durch die Anwesenheit einer Thiocarbonylthio-Verbindung statt, welche die Polymerisation kontrolliert [248, 249]. Das für die Synthese verwendete Kettentransferreagenz mit dieser funktionellen Gruppe zeigt im UV/Vis-Spektrum einen erlaubten π - π^* -Übergang bei ungefähr 308 nm und einen verbotenen n - π^* -Übergang bei ungefähr 441 nm [250]. Durch die Absorption im sichtbaren Bereich lässt sich die gelbe Farbe des Reagenzes erklären. Diese bathochrome Verschiebung in den energieärmeren, längerwelligen Bereich lässt keine Konzentrationsbestimmung nach Lambert-Beer bei der für aromatische Aminosäuren typischen Absorption bei 280 nm zu (siehe Abbildung 22 D). Alternative Methoden zur spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung des Protein-Polymer-Konjugates sind beispielsweise kolorimetrische Methoden wie der Bradford-, der Lowry- oder der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay, welche in dieser Arbeit jedoch nicht verwendet wurden [251].

Nach der Konjugation von PNIPAm an Cbh9A CBM3b^{N126W} via der *grafting to* Methode zeigte das ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum ein weiterhin gefaltetes Protein, in dem punktuelle Veränderungen zu beobachten waren (siehe Abbildung 23 A). Diese zeigten sich vor allem in der Nähe der vorhandenen Lysine, wie das 3D-Bändermodell in Abbildung 23 B visualisiert. Alle zehn Lysine von Cbh9A CBM3b^{N126W} sind an der Oberfläche exponiert. Dies bedeutet zum einen, dass keine Seitenkette in der β -Sandwich-Struktur lokalisiert ist und eine mögliche Modifikation entweder nicht stattfinden oder die Struktur durch Polymer-Konjugation destabilisieren kann. Zum anderen, dass sie an der Oberfläche für die Anbringung mit PNIPAm leicht zugänglich sind, was eine hohe Konjugationseffizienz zur Folge haben sollte. Von dem Plot der chemischen Verschiebungen auf die 3D-Struktur lässt sich jedoch nicht eindeutig ableiten, an welchen Lysinen eine Modifikation stattgefunden hat. Aufgrund der begrenzten Länge des Polymers und der Kumulation von betroffenen Aminosäureresten in bestimmten Bereichen des Proteins sind beispielsweise Lys-40, Lys-42, Lys-66, Lys-149 und Lys-154 potenzielle modifizierte Reste. Für die Validierung dieser These wurde ein dreidimensionales ¹⁵N-TOCSY-HSQC-Spektrum aufgenommen. Darin sind zu jedem Rückgrat-Amid-Signal die zugehörigen Seitenketten-Protonen identifizierbar [252]. Da nach der Modifizierung an der terminalen ϵ -Amino-Gruppe der Lysine ein Proton weniger vorhanden ist, sollte somit durch geringeren chemischen Austausch das noch vorhandene Amidproton unter diesen Messbedingungen sichtbar werden. Wie jedoch in Kapitel 4.5.1 bereits erläutert, sind die ϵ -Amino-Signale von Lysinen nur unter speziellen Bedingungen mittels NMR-Spektroskopie sichtbar, die neu entstandenen Amid-Signale sollten es jedoch bei den untersuchten Bedingungen

sein. Weiterhin konnte, wie bereits beschrieben, keine Proteinkonzentration bestimmt und Probenhomogenität vorausgesetzt werden, da bei der Konjugation ein Gemisch aus verschiedenen substituierten Proteinen entstanden ist, welche nicht trivial voneinander separiert werden konnten. Daher ist es möglich, dass eine nicht optimale T_2 -Zeit gewählt wurde, was wiederum durch die transversale Relaxation zu einer schlechten Auflösung führen kann. Aus diesen Gründen konnten im ^{15}N -TOCSY-HSQC-Spektrum des Konjugats keine neuen Seitenketten-Amidsignale der Lysine identifiziert werden.

Die Modifikation via *grafting to* Methode zeigt jedoch dahingehend eine erfolgreiche Konjugation von PNIPAm an Cbh9A CBM3b^{N126W} ohne eine gleichzeitige Destabilisierung der Proteinstruktur. Während die Anzahl der Konjugationsstellen durch eine pH-Wert-Variation bei der Synthese nicht beeinflusst werden konnte, war jedoch trotzdem eine Abschätzung der modifizierten Reste bei dieser Konjugationsmethode möglich.

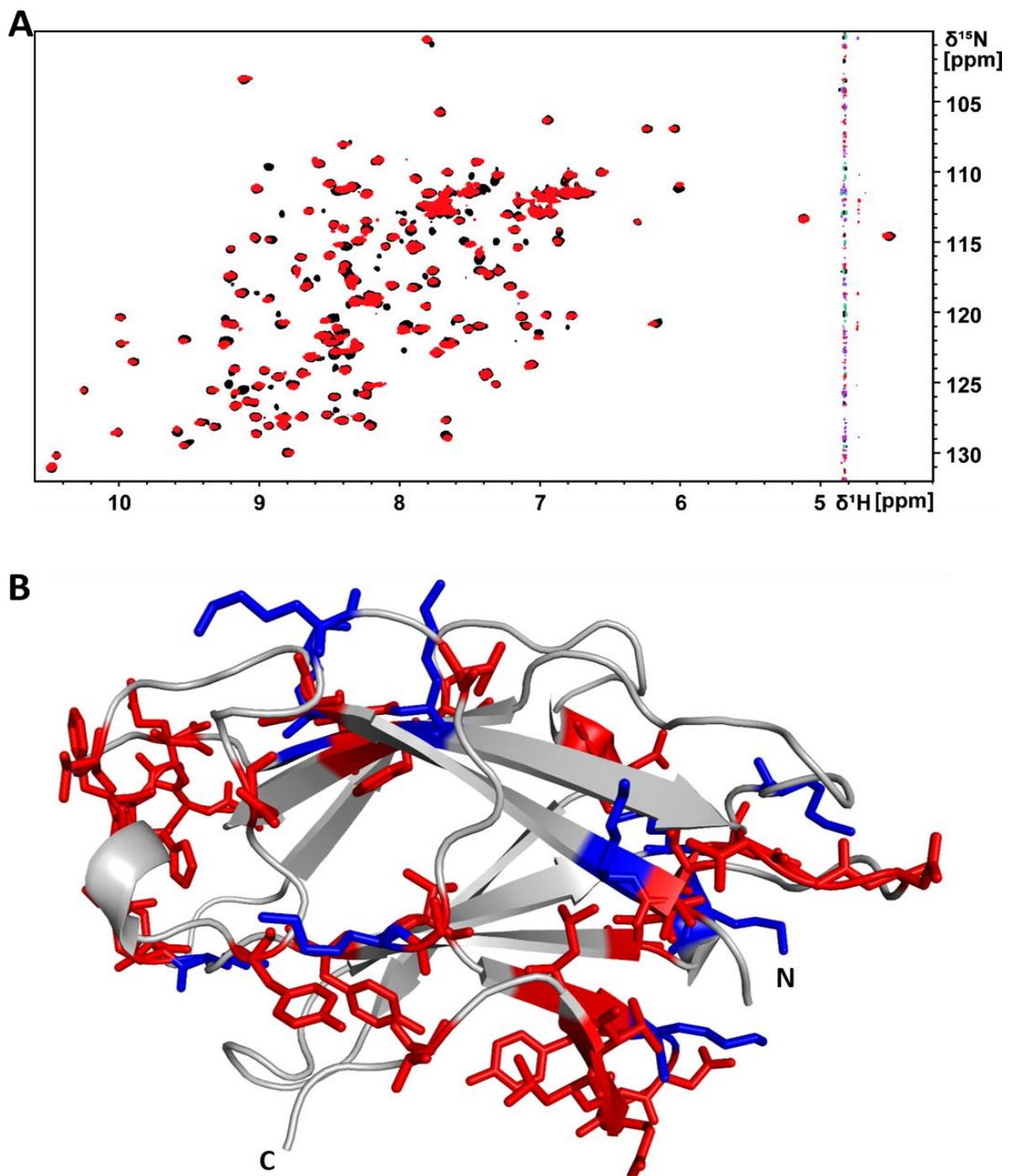


Abbildung 23 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM3b^{N126W} vor (schwarz) und nach Konjugation mit 10 Wiederholeinheiten PNIPAm via *grafting to* (rot). B) 3D-Bändermodell von Cbh9A CBM3b^{N126W} (PDB: 3ZQX) mit markierten Lysin-Resten (blau) und Aminosäuren mit den stärksten chemischen Verschiebungen (rot).

5 Zusammenfassung - Teil I

Kohlenhydrat-bindende Module spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung von diversen Oligo- und Polysacchariden. Die Bindung derer an die degradierenden Enzyme wie beispielsweise Glycosidasen und Lyasen machen es den Mikroorganismen möglich, die Bestandteile von Pflanzenzellwänden wie Cellulose- und Hemicellulose-Komponenten aus der Biomasse in fermentierbare Kohlenhydrate umzuwandeln und somit daraus technisch sowie biotechnologisch relevante Produkte wie Cellulose-basierten Ethanol zu generieren.

In dieser Arbeit sollte der Wildtyp und die N126W-Mutante des Proteins CBM3b aus der Cellobiohydrolase 9A, welche ein Teil des Cellulosoms im thermophilen Bakterium *C. thermocellum* ist, auf dessen Bindeeigenschaft zu löslichen Cellulose-Fragmenten hin untersucht werden. Dazu konnten beide Proteine mittels rekombinanter Proteinexpression in *E. coli*-Zellen exprimiert und durch Affinitäts- und Gelpermeationsschromatographie aufgereinigt werden, wobei sehr hohe Ausbeuten in Monomerform generiert wurden (> 30 mg/L). Zeitlich observierte H/D-Austauschexperimente sollten Aufschlüsse über strukturelle Charakteristika des Proteins wie Sekundärstrukturelemente und mögliche Zugänglichkeit für potenzielle Liganden geben. Dabei zeigte sich, dass zuerst exponierte Seitenketten-Amidprotonen der Asparagin- und Glutamin-Reste und anschließend die Rückgrat-Amidprotonen der Bereiche ohne reguläre Sekundärstruktur an der Oberfläche ausgetauscht wurden. Im Gegensatz dazu blieben auch nach 27 Tagen in D₂O-haltigem Phosphatpuffer die neun β -Schleifen des in CBM3-Familien hochkonservierten β -Sandwiches protoniert. Dieses Strukturelement würde Substrat-Wechselwirkungen in diesem Bereich erschweren, was als Grundlage für weitere Interaktionsstudien dienen und durch die Bestimmung von Amidprotonen-spezifischen Austauschraten noch tiefergehend verifiziert werden kann.

Während die Interaktion von Cbh9A CBM3b mit (teilweise) kristalliner Cellulose wie Avicel® bereits untersucht wurde, sollten im Rahmen dieser Arbeit Studien über das Verhalten des Proteins und der N126W-Mutante mit löslichen Oligosacchariden wie Cellobiose, Cellotetraose und Cellohexaose durchgeführt werden. Mittels Lösungs-NMR konnten Wechselwirkungen mit allen drei kurzkettigen Kohlenhydraten nachgewiesen werden. Mit steigender Kettenlänge sind sowohl durch CH- π -Wechselwirkungen als auch Wasserstoffbrückenbindungen in Bereichen der aromatischen Aminosäuren Tyr-77 und Tyr-78 sowie der Punktmutationsposition N126W Interaktionen beobachtbar und Affinitäten im niedrigen millimolaren Bereich kalkulierbar

gewesen. Während die Punktmutation des Modellproteins erst eine Bindung an kristalline Cellulose bzw. möglicherweise an deren parakristalline Bereiche ermöglicht, ist die Affinität des Wildtyps durch eine veränderte Konformation zu den löslichen Liganden höher. Daher könnte die Funktion von Cbh9A CBM3b, ähnlich wie die von CBM_E1 aus der Familie 81, die Bindung an exponierte Glucane an der Cellulose-Oberfläche sein, worauf folgend die kristalline Cellulose dann enzymatisch hydrolysiert werden kann.

Neben den exponierten aromatischen Aminosäuren ist ein in vielen CBMs vorkommendes Charakteristikum die vorhandene Calcium-Bindestelle, welche bei Cbh9A CBM3b^{WT} und Cbh9A CBM3b^{N126W} nach der Expression und Reinigung besetzt war. NMR-Titrations bewiesen eine trotz Entfernung des Calcium-Ions bestehende globale Faltung der Proteine und die gleichzeitige Reversibilität dieses Effektes durch erneute Calcium-Zugabe. Obwohl dieses Ion ein strukturstabilisierendes Merkmal für das β -Sandwich darstellt, ist es nicht signifikant an der Bindung zu Oligosacchariden beteiligt, wie Interaktionsstudien mit Cellohexaose gezeigt haben.

Aufgrund seiner hohen Ausbeuten bei der Expression und Reinheit sowie Langzeitstabilität sollte Cbh9A CBM3b^{N126W} als Modellprotein für die Konjugation von dem thermoresponsiven Polymer PNIPAm an die Protein-Lysin-Seitenketten verwendet werden, da Protein-Polymer-Konjugate verschiedenste Eigenschaften kombinieren und beispielsweise in der Biomedizin oder Biosensorik eingesetzt werden. Im Zuge dieser Arbeit konnten in Kooperation mit dem Fraunhofer IAP erfolgreich verschieden lange Ketten des Polymers sowohl mittels *grafting from* als auch *grafting to* an Cbh9A CBM3b^{N126W} angebracht und mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden, wobei der pH-Wert bei der Konjugation wider Erwarten keinen signifikanten Einfluss hatte. Während bei der *grafting to* Methode durch eine hohe Konjugationseffizienz viele Lysine mit dem Polymer modifiziert wurden und daher das Protein destabilisierten bzw. teilweise denaturierten, erzielte die *grafting to* Variante definiertere Konjugate, bei denen die globale Faltung des Proteins intakt geblieben ist. Aufgrund der Nähe vieler exponierter Lysine und des hohen Molekulargewichts der Konjugate konnte auch trotz Aufnahmen dreidimensionaler Spektren keine genaue Lokalisation der exakten Modifikationsstellen erfolgen. Die gewonnenen Erkenntnisse über Synthesebedingungen und Proteinstabilität während und nach der Konjugation mit PNIPAm lassen sich auf andere Proteine transferieren und ebnen den Weg, um thermoresponsive und somit schaltbare Polymere für biotechnologische Anwendungen zugänglich zu machen.

Teil II

**Interaktionsstudien zwischen den
zytoplasmatischen Domänen von
Integrin- β 1/ β 3 und dem
fokalen Adhäsionsprotein Paxillin**

6 Einleitung

6.1 Zellmigration – ein essenzieller Prozess

Die Migration von Zellen ist ein fundamentaler biologischer Vorgang, welcher sowohl in Einzellern (zum Beispiel Amöben) wie auch in komplexen multizellulären Organismen (zum Beispiel Säugetieren) beobachtbar ist [253]. Während sich die Hauptfunktionen in einfachen Organismen auf Nahrungssuche und Paarung beschränken, wird mit steigender Komplexität beispielsweise die Gewebeorganisation, die Homöostase oder die Organogenese durch Zellmigration vermittelt [254, 255]. Neben weiteren physiologischen Prozessen wie der Gastrulation, der embryonalen Morphogenese oder der Entwicklung des Nervensystems kann eine Dysregulation zu pathologischen Ereignissen wie Entzündungserkrankungen oder der Krebsmetastasierung beitragen [256–258]. Dazu kommt es, wenn sich die Tumorzellen vom Primärtumor aus über das Kreislauf- und Lymphsystem verbreiten und schließlich Basalmembranen und Endothelwände durchdringen, um sich in entfernten Organen anzusiedeln. Die daraus resultierende Zerstörung der Organe ist die Hauptursache für die krebisbedingte Morbidität und Mortalität [259]. Zellen können dabei sowohl individuell als auch kollektiv migrieren. Die einzelne Zellbewegung wird ohne Zell-Zell-Interaktion mit benachbarten Zellen durch die Zytoskelett-Aktivität realisiert, wie es beispielsweise bei der mesenchymalen oder amöbenartigen Bewegung von Krebszellen oder der Bewegung von Leukozyten während der Immunantwort zu beobachten ist. Wohingegen bei der kollektiven Zellbewegung die sowohl chemischen als auch mechanistischen Interaktionen der Zellen untereinander die Fortbewegungsmechanismen erweitern, indem sie als kohäsive Zellgruppe auftreten. Sie können unter anderem die Gewebestruktur intakt halten, die parazelluläre Permeabilität des Gewebes regulieren, große Gradienten von löslichen Faktoren erzeugen und immobile Zelltypen mobilisieren [260, 261].

Die Zellmigration selbst kann als zyklischer Prozess beschrieben werden, der mit der Polarisation der Zelle beginnt (siehe Abbildung 24 A und B). Dabei spielt die Rho-Familie der GTPasen eine entscheidende Rolle.

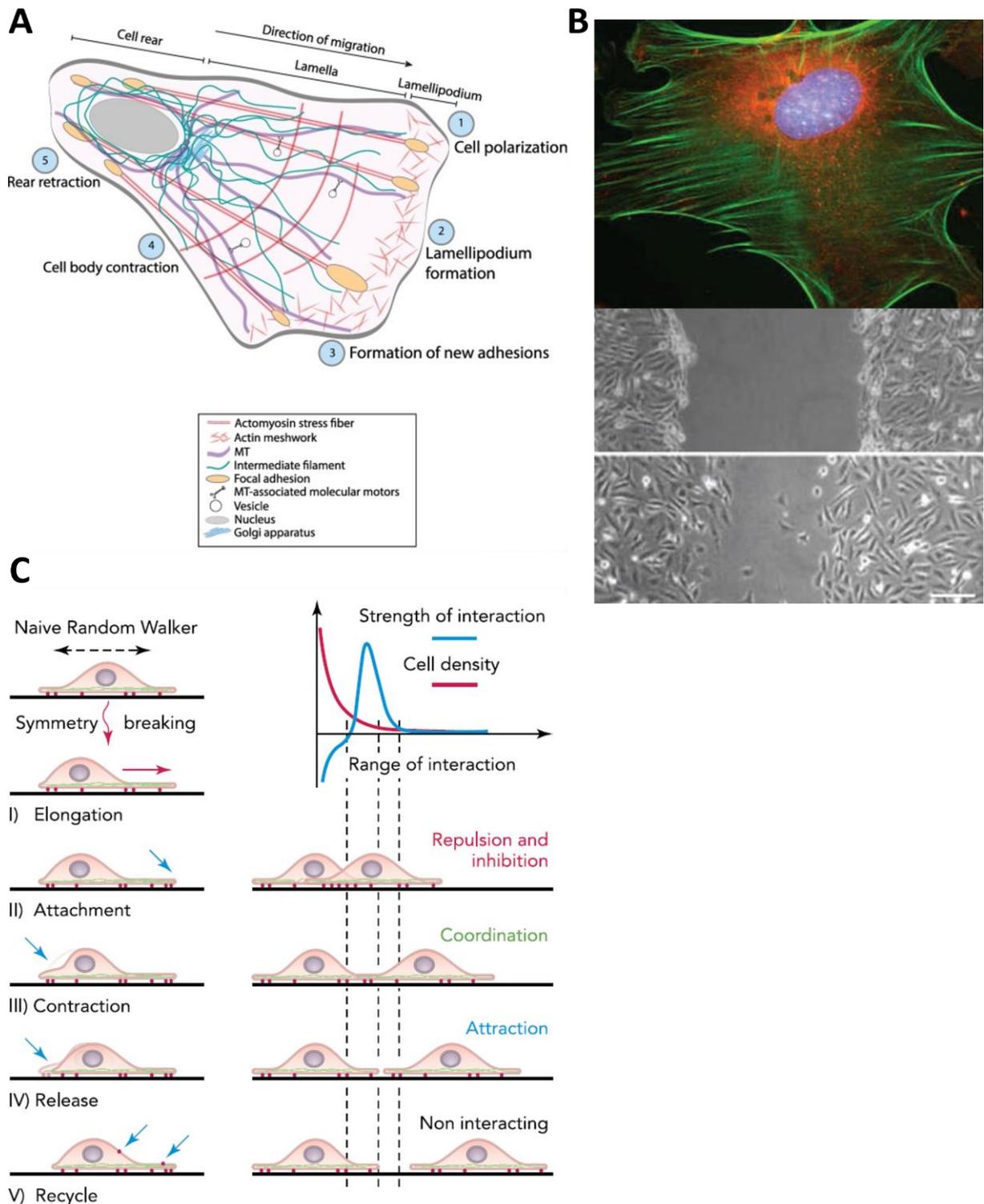


Abbildung 24 | A) Darstellung der Zellmigration mit Bezug auf die beteiligten Regulatoren (Abb. ent. aus [262]). B) Verschiedene Arten der Zellmigration. Oben: Eine stationäre Ausbreitung einer C3H10T1/2 Fibroblaste (angefärbt für DNA in blau, für Mitochondrien in rot und für F-Aktin in grün). Rechts: Prinzip eines 2D-Zellmigration-Assays am Beispiel von Fibroblasten. Mitte: Manuell erzeugter Kratzer einer Wunde auf einer Zellmonoschicht. Unten: Zellmigration nach 15 Stunden, welche unter anderem mit einem Zeitraffermikroskop aufgenommen werden kann (Abb. ent. und mod. aus [260]). C) Mechanismus der Zellmigration einer einzelnen Zelle (links) und Vicsek-Modell zur Darstellung der Stärke der Interaktion in Abhängigkeit von der Dichte und der Distanz zweier Zellen (Abb. ent. aus [263]).

Dazu gehören unter anderem Rac und Cdc42, welche an der Vorderseite der Zelle aktiv sind und unter anderem für die dortige Lokalisation von Mikrotubuli verantwortlich sind, welche wiederum für den Stofftransport zuständig sind [264, 265]. Rho hingegen ist als weiterer Regulator an den Seiten und der Rückseite der Zelle lokalisiert. Die so polarisierte Zelle beginnt an ihrer Vorderseite aktinbasierte Zellfortsätze wie Lamellipodien (dendritische Netzwerke) oder Filopodien (parallele Bündel) auszubilden. Während Lamellipodien durch schon an Filamenten existierende Arp 2/3-Komplex-Proteine gebildet werden, welche dann die Komplexierung neuer Filamente initiieren, werden Filopodien durch einen sogenannten *Treadmilling*-Mechanismus erzeugt. Dabei werden Aktinmonomere an einem Ende addiert, während sie am anderen Ende wieder abgebaut werden, was unter anderem durch die Proteine Ena/Vasp, Fascin oder ADF/Cofilin reguliert wird [266]. Um das Aktin-Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix (ECM) zu verbinden, bilden sich sogenannte fokale Adhäsionen aus [267–269]. Diese dienen einerseits als Traktionsstellen, durch welche die Zelle Zugkräfte erzeugen und so anschließend migrieren kann. Dabei wird eine Kontraktion zwischen den Aktinfilamenten und Myosinbündeln erzeugt. Andererseits sind diese Multiproteinkomplexe auch eine Art Mechanosensoren, welche Informationen über die physikochemischen Eigenschaften der Matrix in das Zellinnere weiterleiten [270]. Die Bildung und Funktionen dieser fokalen Adhäsionen werden im nachfolgenden Absatz (siehe Kapitel 6.2) detaillierter beleuchtet. Die gebildeten adhäsiven Kontakte werden nach einiger Zeit sowohl an der Zellvorder-, vor allem aber an der Zellrückseite abgebaut. Dies wird zum einen durch Kinasen wie FAK (*focal adhesion kinase*) oder Src und Phosphatasen wie Calcineurin realisiert. Zum anderen werden bestimmte Proteine wie z.B. Talin durch Proteasen wie Calpain hydrolisiert. Ein wichtiger Modulator bei dem Retraktionsprozess ist die intrazelluläre Calcium-Konzentration, da diese bei der Regulation von Calpain und Calcineurin eine wichtige Rolle spielt [271].

Um den Prozess der Zellmigration verfolgen und charakterisieren zu können, wurden mittlerweile eine Vielzahl an multidimensionalen Assays entwickelt, welche die verschiedenen Phänotypen und Merkmale der Zellmotilität- und migration abdecken können. Neben den zweidimensionalen Wundheilungsassays wie Kultureinsatz-Assay oder Scratch-Assay (siehe Abbildung 24 C) oder der Einzelzellverfolgung mittels Live-Cell-Imaging gibt es unter anderem noch dreidimensionale Spreading- oder Transwellassays wie dem Boyden-Chamber-Assay [261, 272–274].

6.2 Fokale Adhäsionen – Multiproteinkomplexe, die verbinden

Die Zell-ECM-Adhäsion ist ein zentraler biologischer Prozess, bei dem die Zelle mit ihrer Umgebung interagiert und dabei ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften beeinflusst. Diese wurden erstmals als dichte Plaques zwischen der ventralen Oberfläche der Zelle und einem Substrat in den Fibroblasten von Hühnerherzen mittels Elektronenmikroskopie identifiziert [275]. Fokale Adhäsionen sind größtenteils am Ende von kontraktile Aktinbündeln (sog. Stressfasern) lokalisiert, sind mehrere Mikrometer groß und haben eine Lebensdauer von mehreren Minuten bis hin zu einigen Stunden [260]. Die in diesem Zusammenhang häufig erwähnten fokalen Komplexe hingegen sind kleinere Adhäsionen an den Protrusionen ($< 0.25 \mu\text{m}^2$, Lebensdauer oft kürzer als fünf Minuten [276]), welche Integrin, Paxillin, Talin und einige Aktinfilamente enthalten. Sie reifen in vielen Fällen nicht aus und werden daher noch während der Retraktion des Lamellipodiums degradiert [277–279]. Die fokalen Adhäsionen selbst sind große Multiproteinkomplexe, welche aus ECM-Komponenten (Bsp.: Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Kollagene), Transmembranproteinen (wichtigste Klasse: Integrine), Strukturproteinen (zur Stabilisierung als auch Gerüstproteine) und Signalproteinen zusammengesetzt sind [280].

Wie in Abbildung 25 A dargestellt, sind heutzutage weit über 100 zelluläre Komponenten mit mehreren tausend Interaktionen untereinander bekannt, welche in fokalen Adhäsionen von Mammalia eine Rolle spielen und als Adhäsom bezeichnet werden [281–283]. Die Bildung dieser dynamischen Netzwerke unterliegt einem Kreislauf, der sich über die Initiierung, die Bündelung, das Wachstum, die Reifung und den finalen Abbau dieser Komplexe definiert. Die Assemblierung der Integrin-vermittelten Zell-Adhäsion wird zum Beispiel durch die Stimulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren initiiert, welche die Phosphotyrosin-bindende Domäne von Talin an die zytoplasmatische Domäne von der β -Untereinheit von Integrin binden lassen und diese so aktivieren. In der Folge kann Integrin diverse Signalproteine wie FAK oder α -Aktinin rekrutieren, und die zuerst naszierenden Komplexe wachsen anschließend zu reifen Adhäsionen, welche eine durch Rho und ROCK Aktin-basierte Spannung benötigen [284, 285].

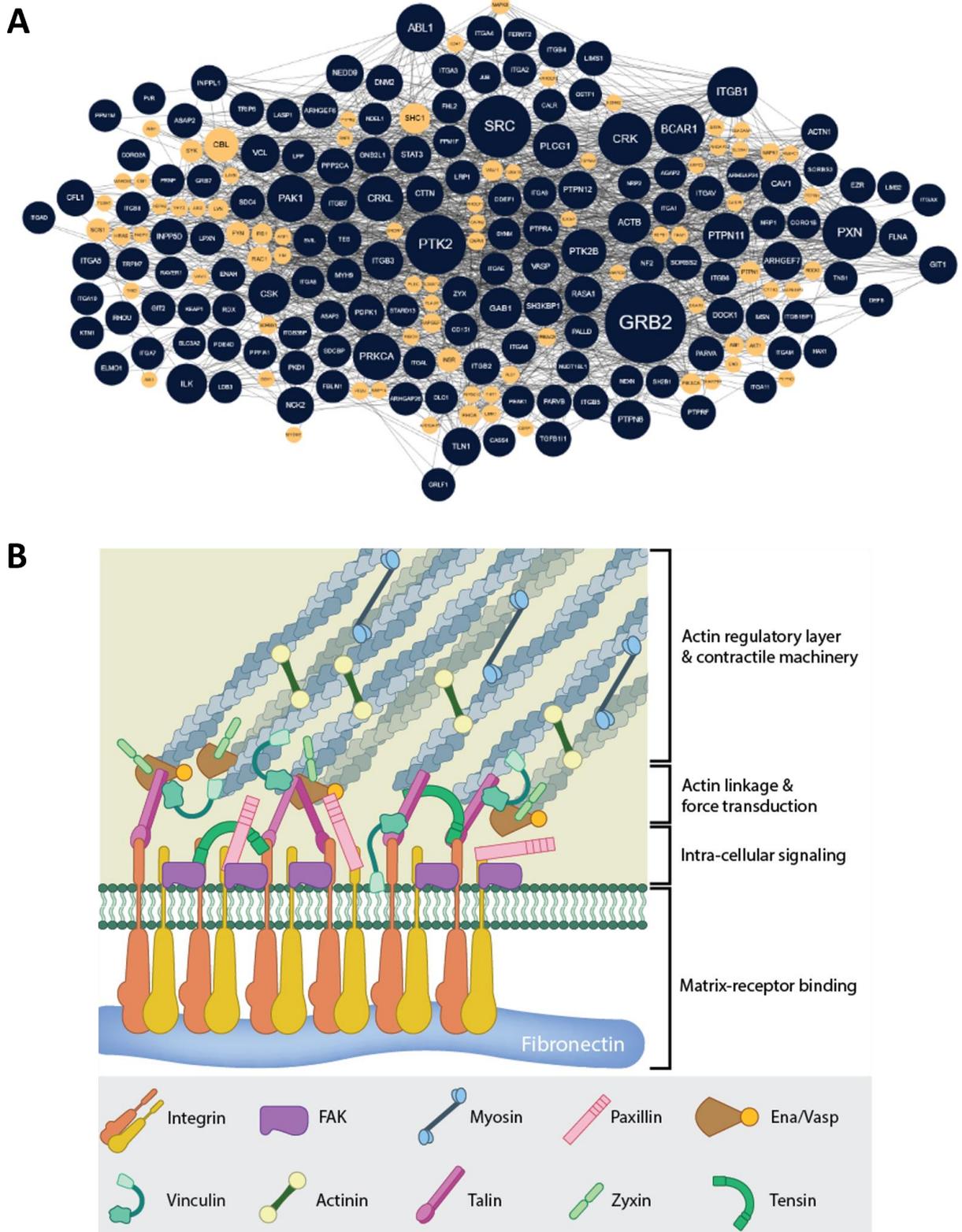


Abbildung 25 | A) Darstellung des Adhäsoms mit intrinsischen Proteinen (blau), assoziierten Proteinen (orange) und den dargestellten Interaktionen untereinander (Abb. ent. aus [276, 281, 283]). B) Darstellung der Organisation von zentralen Komponenten der fokalen Adhäsionen mit dazugehörigen Funktionen (Abb. ent. aus [286]).

Sie können so die Protrusion an den Zellkanten vorantreiben und dienen gleichzeitig als Ankerpunkte, welche die Membrankontraktion unterdrücken und die Zellmigration fördern. In stationären Zellen dienen sie dem Erhalt der Zellmorphologie. Der Abbau hingegen ist nicht eindeutig aufgeklärt und beinhaltet wahrscheinlich mehrere verschiedene Mechanismen, beispielsweise die Freisetzung der Adhäsionen durch die Degradation der ECM, den Adhäsionsumsatz, welcher durch das Zytoskelett vermittelt wird, und der kinasen- und proteaseninduzierte Abbau [287, 288].

Vier zentrale Prozesse dieser mechanosensitiven Komponenten sind in Abbildung 25 B dargestellt: I) Matrix-Rezeptor-Bindung, II) Erzeugen einer intrazelluläre Signalkaskade, III) Verknüpfung mit dem Zytoskelett mit einhergehender Krafttransduktion und IV) Aktinregulation und Kontraktionsmaschinerie [289, 290].

6.2.1 Integrin – Bindeglied zwischen Innen- und Außenwelt

Integrine sind ubiquitäre Transmembranrezeptoren, welche die Zell-ECM-Interaktion vermitteln und dadurch das Zellwachstum, die Proliferation oder Zytokinaktivierung regulieren können. Durch die dynamische Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett können Integrine bidirektionale Signale über die Plasmamembran weiterleiten und sind somit an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen wie der Gewebereparatur, den Entzündungsprozessen oder der Angiogenese beteiligt [291–293]. Sie bestehen aus zwei nicht-kovalent assoziierten Typ I-Glykoproteinen, den sogenannten α - und β -Untereinheiten, welche auf Grund der Ligandenaffinität und evolutionären Aspekten in vier Gruppen eingeteilt werden (Leukozyten-bindende, Kollagen-bindende, Arg-Gly-Asp/RGD-bindende und Laminin-bindende Integrine). Diese besitzen große extrazelluläre (700 – 100 Aminosäuren) und kleinere zytoplasmatische Domänen (20 – 50 Aminosäuren, außer Integrin- β 4 [294]), zentral eine Transmembranhelix und bilden in Säugetieren 24 $\alpha\beta$ -Paare, welche die Spezifität zu bestimmten Liganden definieren [292]. Diese heterodimere Struktur befindet sich vornehmlich in einem inaktiven, geschlossenen Zustand, welcher durch verschiedene stimulatorische Liganden sowie bivalente Kationen eine Konformationsänderung hin zu einer offenen und hochaffinen Struktur erfährt (siehe Abbildung 26 A). Diese aktive Struktur, bei der sich die zytoplasmatischen Domänen voneinander trennen, zeigt eine deutlich höhere Ligandenbindungsaffinität, was die Interaktion mit einer Vielzahl von Signaltransduktions- und Zytoskelettmolekülen ermöglicht [295]. Wenn Proteine wie Fibronectin an die extrazelluläre Domäne binden, geht der Rezeptor in einen Intermediärzustand

über, welcher durch Signalkaskaden eine Aktivierung von Kinasen (wie die Src Familie, SFK) und Adaptormolekülen zur Folge hat. Dieser Prozess wird als *outside-in signaling* bezeichnet. Wenn hingegen der Strukturadaptor Talin mittels seiner Phosphotyrosin-bindenden Domäne und der Gerüstadaptor Kindlin mittels seiner FERM3-Domäne an das membrannahe NxxY-Motiv der zytoplasmatischen β -Domäne binden, erzeugt diese Interaktion eine Aktivierung und einen Cluster-Prozess der Integrine, welcher als *inside-out signaling* bezeichnet wird [296, 297]. Durch diese bidirektionalen Signalkaskaden kann Integrin als Ankerprotein essenzielle physiologische Prozesse wie die Zellmigration, die Adhäsion, die Polarität und die Organisation der ECM initiieren [294].

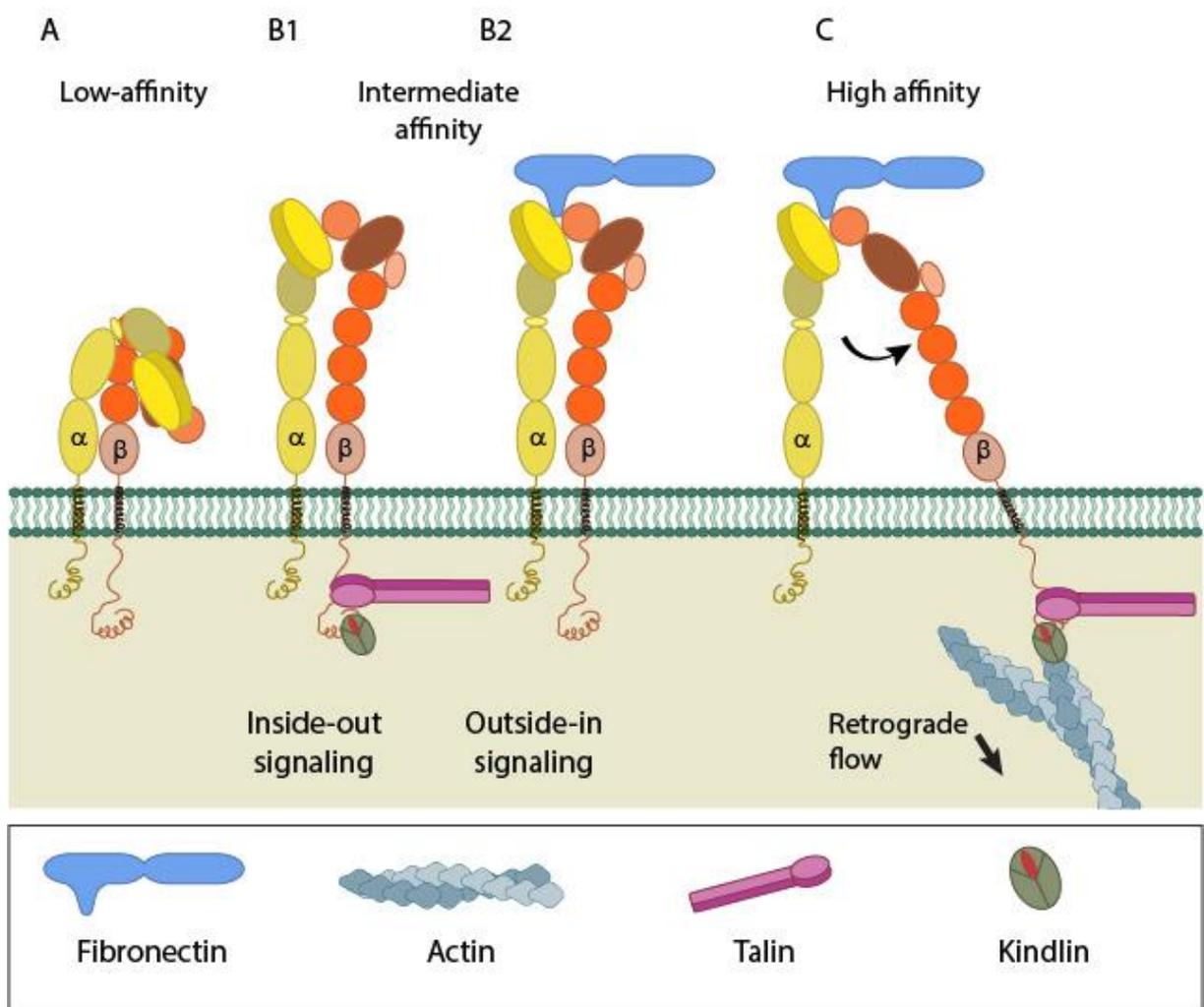


Abbildung 26 | Darstellung des niedrigaffinen (A) und hochaffinen Zustands (C) von Integrin und dessen verschiedene Signalwege *inside-out signaling* (B1) und *outside-in signaling* (B2) im Intermediatzustand (Abb. ent. aus [298]).

6.2.2 Paxillin – Adapterprotein für komplexe Rekrutierungen

Paxillin ist ein Gerüstprotein, das bei der Bildung fokaler Adhäsionen eine zentrale Rolle spielt, indem es durch die Interaktion seiner Multidomänen-Struktur eine Vielzahl an regulatorischen und strukturellen Proteinen rekrutiert (siehe Abbildung 27). Dabei werden zahlreiche Adhäsions- und Wachstumsfaktorsignale transferiert, welche einen entscheidenden Anteil an der Reorganisation des Zytoskeletts und der Beeinflussung der Genexpression haben [299–301]. Paxillin ist nicht nur an der Zellfront an der Organisation der naszierenden fokalen Adhäsionen beteiligt, sondern reguliert auch während der Migration deren Degradation am anderen Ende der Zelle. Das Paxillin-Gen selbst ist in verschiedenen Spezies hochkonserviert (Orthologe von humanem Paxillin konnten in 168 Organismen identifiziert werden [302]) und besitzt durch alternatives Spleißen vier verschiedene Isoformen (Isoform 1/α bis Isoform 4/δ), welche voneinander verschiedene Expressionsmuster aufweisen [301]. Neben Paxillin gehören auch Hic-5 und Leupaxin zur Paxillin-Familie, welche zwar ähnliche Bindungssequenzen für bestimmte Proteine besitzen, sich jedoch in spezifischen Funktionen und deren Verteilung unterscheiden [303].

Wie bereits erwähnt ist Paxillin ein Multidomänenprotein, welches N-terminal fünf repetitive Leucin-Asparagin-Motive (LD-Motive) und eine prolinreiche Domäne besitzt. Während die LD-Motive für die Rekrutierung von Signal- und Strukturproteinen wie Crk, Vinculin oder FAK essentiell sind, dient die prolinreiche Sequenz der Verankerung von Proteinen, die SH3-Domänen enthalten [304, 305]. Am C-Terminus sind vier cystein- und histidinreiche Tandem-Doppelzinkfinger-Motive, sogenannte LIM-Domänen (erstmal in den Homöodomän-Proteinen Lin-11, Isl-1 und Mec-3 identifiziert [306]), lokalisiert. Diese fungieren als Anker an der Plasmamembran und sind für eine Reihe von Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich, beispielsweise mit Tubulin [307], Zyxin [308] oder PTP-PEST (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 12*, [309]). Dabei dient vorrangig die LIM3-Domäne in Kooperation mit der LIM2-Domäne als Regulator für die Lokalisation an fokale Adhäsionen, welche in einem sehr frühen Stadium der Assemblierung stattfindet.

Neben diversen Bindungsmotiven wird Paxillin außerdem als Reaktion auf Zelladhäsion und Exposition gegenüber Wachstumsfaktoren an verschiedenen Positionen phosphoryliert. Während die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten die Bindung von SH2-Domänen enthaltenden Proteinen wie Crk oder RAS GAP und somit die Signalübertragung und Ausrichtung von Paxillin in fokalen Adhäsionen ermöglicht, sorgt die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten unter anderem für eine allosterisch bedingte Konformationsänderung [299, 301]. Diese Phosphorylierungen von Paxillin durch FAK spielt unter anderem bei der embryonalen Entwicklung (die spezifische Deletion der Gene in Mäusen führte zu einer defekten mesodermalen Entwicklung und somit zum Tod nach Gastrulation [310]) eine entscheidende Rolle. Weiterhin ist die Phosphorylierung von Paxillin auch bei der Krebsmetastasierung (Hochregulierung der Paxillin-Expression in proliferativem Prostataepithel [311], beim experimentellen nephritischen Syndrom [312] oder metastasierendem Nierenkarzinom beobachtet [313]) ein wichtiger Faktor.

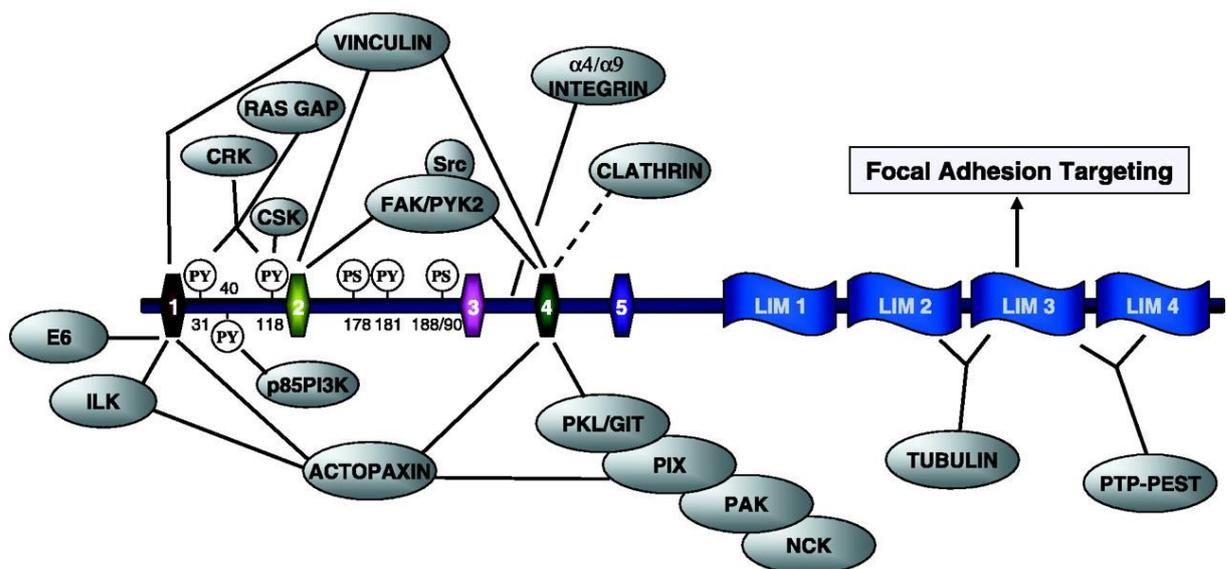


Abbildung 27 | Modulare Darstellung der Paxillin-Domänen mit dazugehörigen Bindungspartner (Abb. ent. und mod. aus [299]).

7 Zielsetzung

Eine Vielzahl an physiologischen Prozessen von der embryonalen Entwicklung und der Gewebeorganisation über die Wundheilung bis hin zu pathologischen Entzündungserkrankungen und der Krebsmetastasierung werden mittels der Zellmigration realisiert. Sowohl die singuläre als auch die kollektive Bewegung von Zellen wird durch die Polarisierung der Zelle initiiert und durch die Bildung von fokalen Adhäsionen vorangetrieben, welche die Kontraktion der Zelle und somit deren Migration auslösen. Diese zuerst als fokale Komplexe auftretenden dynamischen Netzwerke setzen sich aus ECM-Komponenten, Transmembran- und Signalproteinen zusammen, von denen unter anderem Integrin, Paxillin und Talin zu Beginn rekrutiert werden. Der heterodimere Transmembranrezeptor Integrin vermittelt durch seine großen extrazellulären und kleineren zytoplasmatischen Domänen bidirektionale Signalkaskaden und verbindet das Aktin-Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix. Damit Integrine in diesen hochaffinen Zustand übergehen können, werden sie durch eine Reihe von Signal- und Gerüstproteinen aktiviert, unter anderem durch das Multidomänenprotein Paxillin.

Dabei konnte in vorangegangenen Studien bereits nachgewiesen werden, dass eine direkte Interaktion zwischen den LIM2/3-Domänen von Paxillin und dem C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 stattfindet. Ein Ziel dieser Arbeit war die tiefergehende NMR-spektroskopische Charakterisierung dieser Bindestelle mit Hilfe eines verkürzten Integrin-Konstrukts sowie der Verwendung der singulären LIM3-Domäne von Paxillin. Dies sollte Erkenntnisse zur Aufklärung des gebundenen Komplexes dieser beiden Proteine beitragen. Weiterhin sollte in diesem Zusammenhang vergleichend die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne des Kollagen-Rezeptors Integrin- β 1 mit Paxillins LIM-Domänen studiert werden, um Rückschlüsse auf mögliche ähnliche Bindungsmotive ziehen zu können. Dabei wurden auch Ergebnisse aus biochemischen Assays unserer Kooperationspartner um Prof. C. R. Hauck hinzugezogen. Um die bedeutende Rolle von Paxillin bei der Bildung der frühen fokalen Komplexe im Zusammenhang mit der Integrin-Aktivierung zu beleuchten, sollten mittels Polymerase-Kettenreaktion Mutanten generiert, bei welchen die charakterisierte Bindungsstelle für Integrine deaktiviert ist und die Wichtigkeit ihrer flexiblen Loops in Hinblick auf die Proteinstabilität dargestellt werden sollten. Diese Ergebnisse sollten einen Beitrag zu einem besseren Verständnis in dem komplexen Bindungsgebilde der Integrinaktivierung leisten.

8 Ergebnisse und Diskussion

8.1 Expression- und Reinigungsstrategien

8.1.1 Paxillin-Konstrukte

Die LIM3- und die LIM2/3-Domänen von humanem Paxillin konnten erfolgreich als His₆-SUMO-Fusionsproteine, kodiert auf einem pET-24a-Vektor, in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und anschließend mittels zweier Affinitäts- und einer Gelpermeationschromatographie aufgereinigt werden (siehe Kapitel 10.7.2 und 10.8). Die etablierten Protokolle dazu finden sich in [314–316]. Für weitergehende Interaktionsstudien wurden neben den natürlich vorkommenden Proteinen auch Modifizierungen der LIM2/3-Domänen von humanem Paxillin verwendet. Das Plasmid der Paxillin-Mutante Paxillin LIM2/3 GAGNG, bei der der Sequenzabschnitt **FVNGSFF** (UniProtKb-Position 475-481 der α -Isoform) zu **GAGNG** molekularbiologisch modifiziert wurde, wurde von M.Sc. Timo Baade in der Arbeitsgruppe Zellbiologie von Prof. C. R. Hauck an der Universität Konstanz erstellt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Mittels der PCR-Methode können in einer einzelnen Reaktion bis zu 100 Basenpaare eines Plasmids verändert oder neu eingefügt werden. Beim Entfernen von einzelnen Basenpaaren gibt es hingegen keine Limitierung [317, 318]. Dies konnte erfolgreich bei der Erstellung der Paxillin-Mutante Paxillin LIM2/3 SGS~~G~~SGS durchgeführt werden. Dabei wurde das Originalplasmid von humanem Paxillin LIM2/3 benutzt und unter Verwendung von zwei selbst gestalteten Primern mittels Q5 Hot Start Polymerase dieselbe Erkennungsstelle (**FVNGSFF**, UniProtKb-Position 475-481 der α -Isoform) zur Zielsequenz **SGSGSGS** modifiziert (siehe Kapitel 10.4). Dies erfolgte in zwei PCR-Reaktionen, da die Sanger-Sequenzierungsergebnisse nach der ersten Reaktion das Fehlen einer Nukleinbase (Adenin) aufzeigten, welche jedoch nachträglich mit Hilfe der zweiten Reaktion erfolgreich eingefügt werden konnte. Somit konnten beide Paxillin-Mutanten in *E. coli* Tuner(DE3) Zellen exprimiert und analog zum Paxillin-Wildtyp durch Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie aufgereinigt werden (siehe Abbildung 28 und Abbildung 51 im Anhang). Da für beide Paxillin-Mutanten die Expression und Reinigung identisch verlief, sind hier nur die Ergebnisse von Paxillin LIM2/3 GAGNG aufgezeigt. Auch diese Konstrukte beinhalteten sowohl einen His₆-Tag zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie als auch einen SUMO-Tag. Er dient

sowohl zur Förderung der Bildung einer korrekten Sekundärstruktur als auch zur Erhöhung der Löslichkeit und lässt sich bei Bedarf artefaktfrei durch die ULP1-Protease abspalten [319, 320].

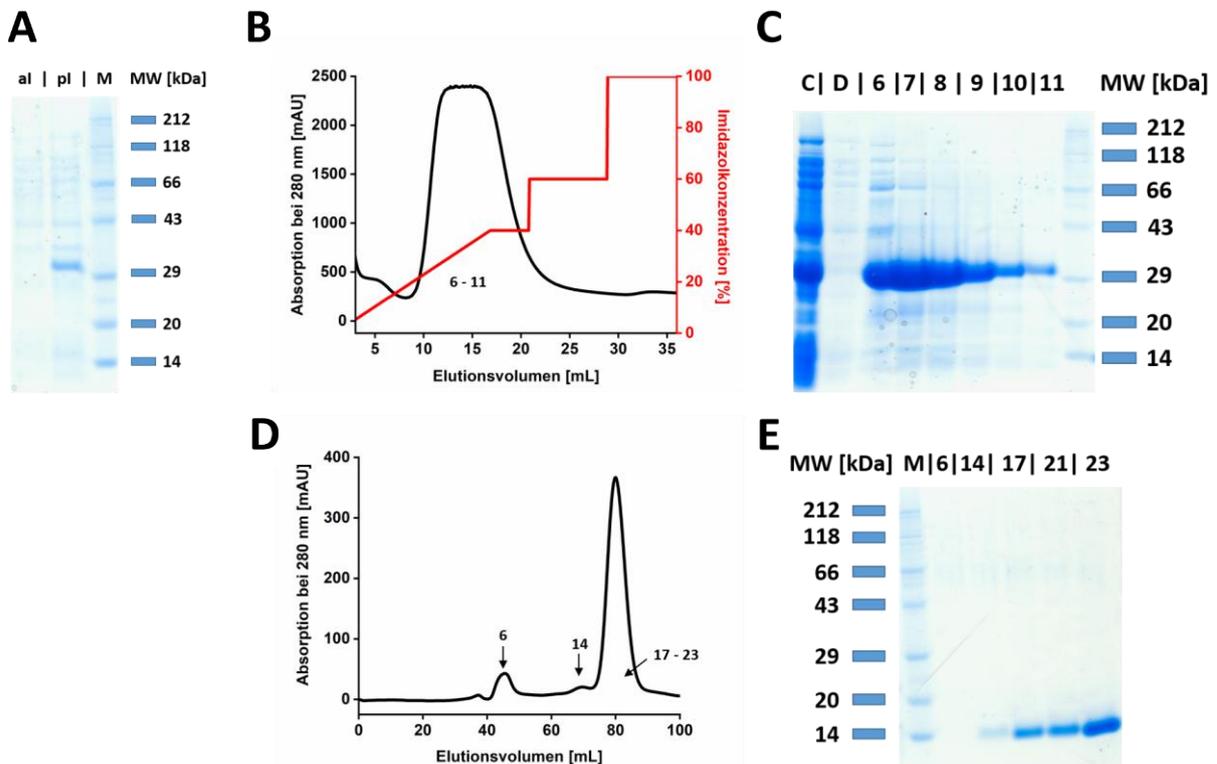


Abbildung 28 | A) SDS-PAGE-Gel vor (al) und nach der IPTG-Induktion von Paxillin LIM2/3 GAGNG (pl). B) UV/Vis-Chromatogramm der ersten Ni²⁺-Affinitätschromatographie (schwarz) mit dazugehöriger Konzentration an Elutionspuffer (rot). C) SDS-PAGE-Gel der ersten Ni²⁺-Affinitätschromatographie mit Größenmarker (M), aufgetragenem Zelllysate (C), Durchlauf (D) und proteinenthaltenen Fraktionen (6 – 11). D) UV/Vis-Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie. E) SDS-PAGE-Gel der Gelpermeationschromatographie mit Größenmarker (M) und proteinenthaltenen Fraktionen des Ausschlussvolumens (6), einer aggregierten (14) und der monomeren Form (17 – 23).

8.1.2 Integrin-Konstrukte

Die Plasmide für die Konstrukte der zytoplasmatischen Domänen von humanem Integrin-β1, Integrin-β3 und Integrin-β3ΔRGT wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe „Zellbiologie“ von Prof. C. R. Hauck aus der Universität Konstanz zur Verfügung gestellt.

Um die Bedeutung des C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne von Integrin-β3 für die Bindung an Paxillins LIM2/3-Domänen zu charakterisieren, wurde dieser um die drei terminalen Aminosäuren Arg-786, Gly-787 und Thr-788 mittels PCR-Deletion verkürzt. Anschließend konnten die Konstrukte in *E. coli* BL21(DE3) (Integrin-β3ΔRGT und Integrin-β1) bzw. Tuner(DE3) Zellen (Integrin-β3) exprimiert und analog zu den Paxillin-Konstrukten als His₆-SUMO-

Fusionsproteine aufgereinigt werden (siehe Kapitel 8.1.1). Ausnahmen waren das Fehlen des Reduktionsmittels DTT und der Verzicht auf die Zugabe von Zinksulfat in den Reinigungspuffern, da die Integrin-Konstrukte einerseits keine Cysteine zur Ausbildung von möglichen Disulfidbrücken besitzen und andererseits im Gegensatz zu den Zinkfinger-LIM-Domänen von Paxillin keine Metallionen zur Strukturstabilisierung benötigen. Die Ergebnisse der Expression und Aufreinigung des bisher noch nicht zuvor verwendeten Integrin- $\beta 3\Delta RGT$ -Konstrukts sind in Abbildung 29 gezeigt. Diese sind analog zur Expression und Reinigung der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- $\beta 1$, weshalb dessen Expression und Reinigung hier nicht weiter aufgeführt sind.

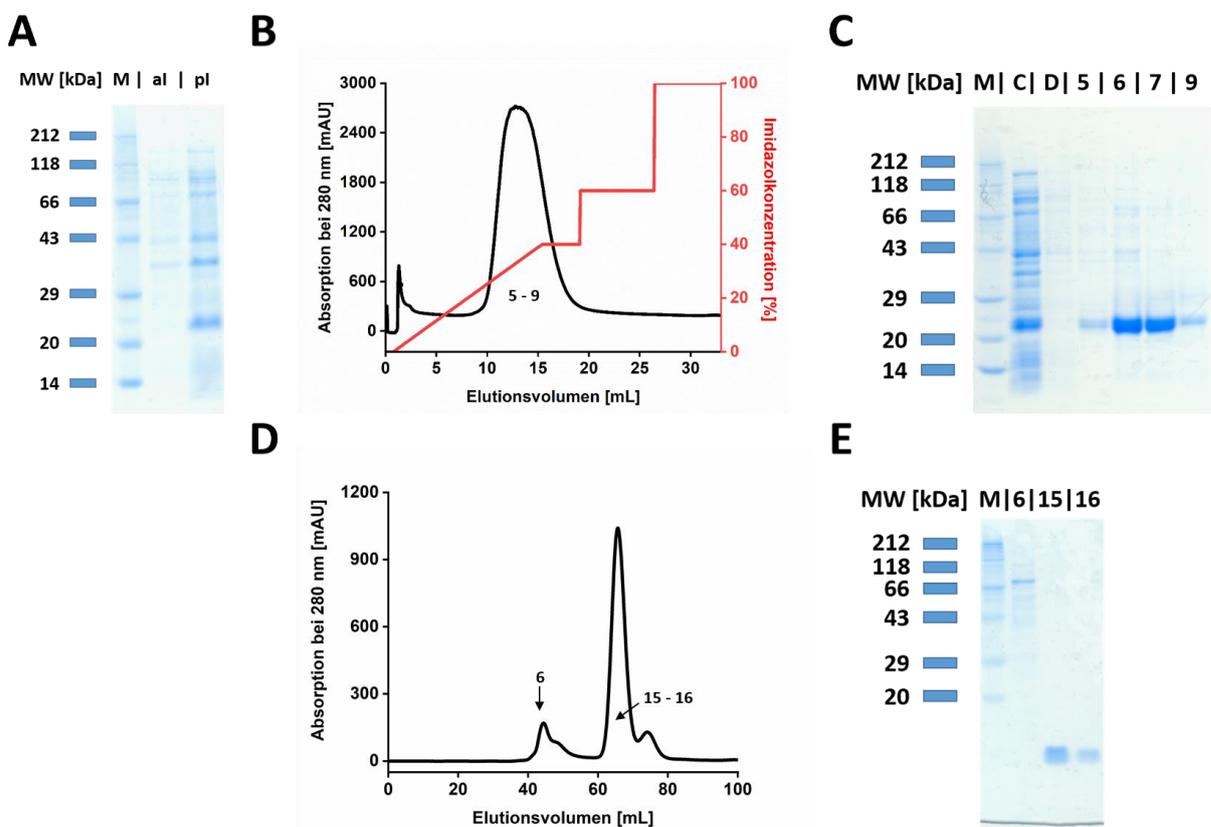


Abbildung 29 | A) SDS-PAGE-Gel vor (al) und nach (pl) der IPTG-Induktion von Integrin- $\beta 3\Delta RGT$. B) UV/Vis-Chromatogramm der ersten Ni^{2+} -Affinitätschromatographie (schwarz) mit dazugehöriger Konzentration an Elutionspuffer (rot). C) SDS-PAGE-Gel der ersten Ni^{2+} -Affinitätschromatographie mit Größenmarker (M), aufgetragenem Zellysate (C), Durchlauf (D) und proteinenthaltene Fraktionen (5 – 9). D) UV/Vis-Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie. E) SDS-PAGE-Gel der Gelpermeationschromatographie mit Größenmarker (M) und proteinenthaltene Fraktionen des Ausschlussvolumens (6) und der monomeren Form (15 – 16).

8.1.3 Proteolytischer Abbau der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3

Ein Vorteil der NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkung ist, dass sich das Biopolymer dabei in seinem nativen Zustand befindet. Jedoch können sowohl bei der Expression als auch der Reinigung diverse Prozesse wie Aggregation, Misfaltung oder Degradation diesen Zustand entscheidend verändern [321, 322]. Die Degradation eines Proteins kann durch eine Vielzahl an multifunktionalen Enzymen namens Proteasen erfolgen, welche entweder durch ihre Lokalisation der aktiven Bindestelle in Endo- oder Exopeptidasen oder durch zentrale Aminosäuren in deren Bindestelle in Asparagin-, Cystein-, Serin- oder Metalloproteasen eingeteilt werden [323]. Diese können Peptidbindungen hydrolisieren und spielen eine wichtige Rolle in diversen physiologischen Prozessen wie dem Proteinabbau [324–326], der Tumordinvasion und Metastasenbildung [327, 328] oder als diagnostische Biomarker [329, 330].

Nach der erstmaligen Reinigung eines Proteins ist es sinnvoll, mittels analytischer Methoden die Intaktheit dessen auf mögliche (unter anderem posttranslationale) Modifikationen oder Degradationsprodukte zu überprüfen. Die Massenspektrometrie, insbesondere die Elektrosprayionisation (ESI-MS) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS), hat sich hierbei als Methode der Wahl etabliert [331–335]. Diese Analyse wurde auch nach der Gelpermeationschromatographie der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 durchgeführt. Der Peak war verbreitert, nicht exakt symmetrisch und deutete eine Schulter ab einem Elutionsvolumen von ca. 73 mL an, was auf das Vorhandensein von kleineren Spezies hindeutete (siehe Abbildung 30 A). Das ESI-MS-Spektrum der Probe zeigte sowohl Ionen bei m/z : [766]⁷⁺, welche dem Volllängenpeptid zugeordnet werden konnten, als auch weitere Fragmentationen bei m/z : [707]⁴⁺, [705]⁵⁺, [738]⁵⁺, [743]⁶⁺ und [721]⁷⁺ (siehe Abbildung 30 B und Tabelle 15 im Anhang, [336]). Zur Identifikation der verschiedenen Spezies wurden Tandem-MS/MS-Messungen durchgeführt, bei denen die Fragmentierung des Molekülions mittels kollisionsinduzierter Dissoziation erfolgte (CID-MS/MS) und diese Daten anschließend mit verschiedenen Hydrolyseprodukten korreliert wurden (siehe Kapitel 10.11.2). Wie in Abbildung 30 C zu erkennen ist, wird die zytoplasmatische Domäne von Integrin- β 3 hauptsächlich C-terminal an aromatischen Aminosäuren wie Phe-756, Trp-765, Tyr-773, Phe-780 und Tyr-785 proteolytisch gespalten [336].

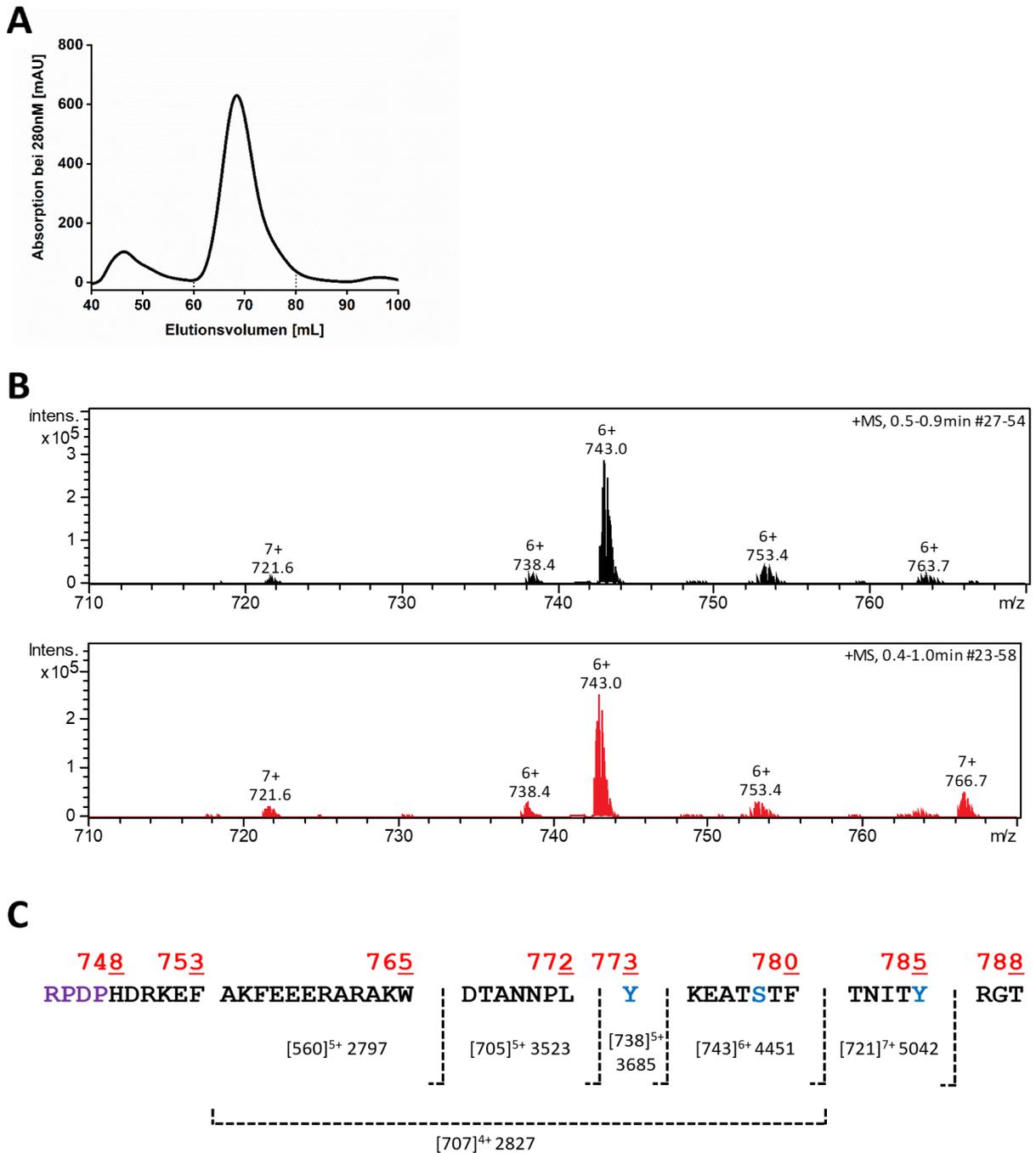


Abbildung 30 | A) UV/Vis-Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie von Integrin- β 3 nach Behandlung mit Roche cOmplete™ Proteaseinhibitoren. B) ESI-MS-Spektren von Integrin- β 3 nach der Behandlung mit SIGMAFAST™ Proteaseinhibitor Cocktail (schwarz) und Roche cOmplete™ Proteaseinhibitoren (rot). C) Degradationsprodukte mit korrespondierenden Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen, Klonierungsartefakten (violett) und mit AEBSF modifizierten Resten (blau).

Dies indizierte eine Spaltung durch eine Chymotrypsin-ähnliche Protease, da diese bevorzugt nach den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin spalten [337, 338]. Chymotrypsin selbst ist eine Endopeptidase, die aufgrund ihrer katalytischen Triade im aktiven Zentrum aus Asparaginsäure, Histidin und Serin der Gruppe der Serinproteasen zugeordnet wird [339]. Solche Proteasen werden unter anderem beim Zellaufschluss freigesetzt und können bei unzureichender Inhibition zum Proteinabbau führen. Diese Form der Degradation konnte bereits bei anderen Integrinen wie Integrin- β 4 beobachtet werden [340]. Um solch eine Proteinmodifikation zu vermeiden, können diverse Proteaseinhibitoren entweder einzeln oder als Kombination während der Zellyse beziehungsweise der Reinigung dazugegeben werden [341, 342]. Dies können zum einen Proteine oder Peptide [343] aber auch kleine Moleküle sein [344], welche über verschiedenste Mechanismen diese Enzyme inhibieren können [345–347]. Bei dem Zellaufschluss von Integrin- β 3 wurde dem Lysepuffer bisher standardmäßig der SIGMAFAST™ Proteaseinhibitor Cocktail (EDTA-frei, Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:10 (v/v) zugesetzt. Auf Grund der beobachteten Proteolyse des Peptids wurde mit Roche cComplete™ Proteaseinhibitoren (EDTA-frei, Sigma-Aldrich) eine weitere kommerziell erhältliche Kombination aus verschiedenen Proteaseinhibitoren getestet. Während jedoch beim bisher verwendeten Inhibitorenmix SIGMAFAST™ die Zusammensetzung bekannt ist (2 mM AEBSF, 0.2 μ M Aprotinin, 130 μ M Bestatin, 14 μ M E-64, 1 μ M Leupeptin, 10 μ M Pepstatin-A und 1 μ M Phosphoramidon [348]), wird beim letzteren nur auf ein breites Spektrum von Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren verwiesen [349]. Doch auch die Verwendung einer Tablette Roche cComplete™ Proteaseinhibitoren im Lysepuffer zeigte keine Inhibition des Degradationsprozesses. Es konnten in den gemessenen ESI-MS-Spektren dieselben Fragmente wie bei der Verwendung des SIGMAFAST™ Proteaseinhibitor Cocktails beobachtet werden (siehe Abbildung 30 B und Abbildung 52 im Anhang, [336]).

Weiterführend sollte der zeitliche Verlauf dieses proteolytischen Abbaus untersucht werden. Daher erfolgte die Probennahme erstmals nach der ersten Affinitätschromatographie, anschließend wie bereits beschrieben nach der Gelpermeationschromatographie und final nach einer Woche Lagerung bei 4 °C. Es zeigte sich, dass die Degradation bereits direkt nach dem ersten Aufreinigungsschritt detektierbar war (siehe Abbildung 31 A und Abbildung 52 im Anhang). Neben dem Volllängen-Fusionskonstrukt His₆-SUMO-Integrin- β 3 bei m/z: [762]²³⁺ zeigten sich weiterhin Abbaufragmente bei m/z: [778]²²⁺ und [786]²¹⁺. Diese indizierten eine zeitnahe proteolytische Spaltung direkt nach dem Zellaufschluss. Nach dem ULP1-Verdau und weiteren

chromatographischen Trennverfahren zeigten ESI-MS-Messungen nach einer Woche Lagerung der Proben bei 4 °C keine neuen Abbauprodukte mehr (siehe Abbildung 54 im Anhang, [336]). Sowohl die erfolgreiche Separation durch diverse Chromatographieschritte als auch die temporär limitierte Aktivität der Proteasen sind dafür wahrscheinliche Ursachen.

Um die Degradation von Integrin- β 3 durch Serinproteasen zu verhindern bzw. zu minimieren, bestand die Möglichkeit, neben der Zugabe kommerziell erhältlicher Proteaseinhibitorenmischungen auch separat spezifische Inhibitoren zum Lysepuffer hinzuzugeben. Daher wurde zusätzlich das Hydrochlorid von AEBSF als irreversibler Serinproteasenhemmer verwendet, welcher eine gute Wasserlöslichkeit und eine geringere Toxizität als beispielsweise Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) besitzt [341, 350]. Dessen dreifache Zugabe von jeweils 2 mM während des Zellaufschlusses zeigte sowohl in den UV/Vis-Chromatogrammen der Gelpermeationschromatographie als auch in den ESI-MS-Spektren deutliche Veränderung zu den bisherigen Ergebnissen. Das Protein eluierte bei einem geringeren Retentionsvolumen, was für eine höhere Molekülmasse spricht, und dessen Schulter ist in diesem Beispiel deutlicher separierter vom Hauptpeak (siehe Abbildung 31 C). Dies bestätigten die ESI-MS-Spektren, da fast ausschließlich nur das Volllängenpeptid mit m/z : [766]⁷⁺ und keine Hydrolyseprodukte identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 31 D und Abbildung 53 im Anhang). Jedoch konnte neben dem intakten Peptid eine weitere Spezies mit m/z : [792]⁷⁺, dem eine molekulare Masse von 5543.01 Da zugeordnet werden konnte, beobachtet werden. Diese 183 Da an Massenanstieg lassen sich durch eine kovalente Anlagerung von AEBSF an das Peptid erklären [336]. AEBSF gehört zu der Klasse der Sulfonsäurehalogenide, konkreter zu den Sulfonsäurefluoriden und kann neben der irreversiblen Inhibierung von freiwerdenden Serinproteasen auch eine Reihe von Aminosäuren des Integrins wie Asparaginsäure, Serin oder Tyrosin modifizieren (siehe Abbildung 31 B) [351, 352]. Solche Modifikationen können diverse Folgen für die Struktur und Funktion eines Proteins haben und sollten daher möglichst nicht auftreten bzw. minimiert werden [353]. Mittels ESI-MSMS-Experimenten konnten anhand der b- und γ -Ionenserien charakteristische Fragmente für diverse AEBSF-Addukte identifiziert werden.

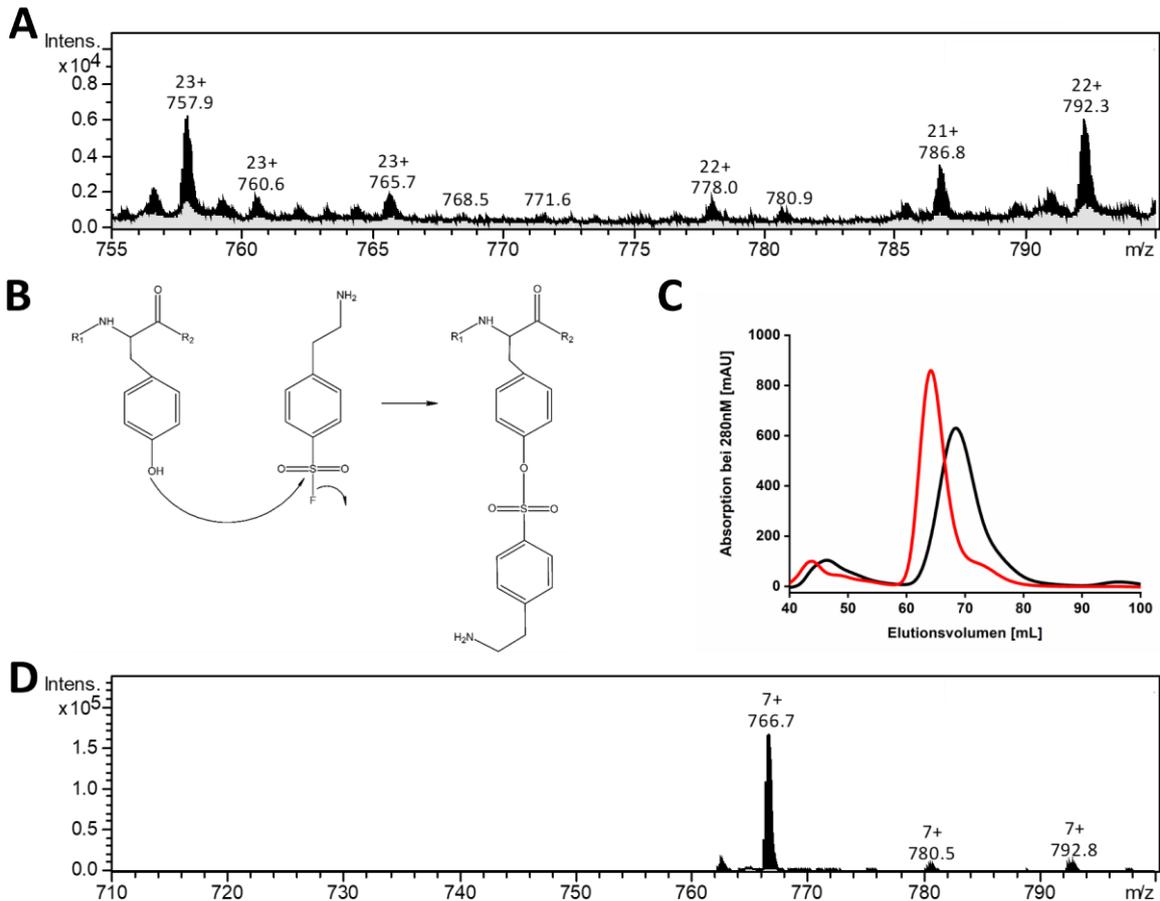


Abbildung 31 | A) ESI-MS-Spektrum von Integrin-β3 nach der ersten Ni²⁺-Affinitätschromatographie. **B)** Mechanismus der kovalenten Anbindung von AEBSF an einen beispielhaften Tyrosinrest. **C)** UV/Vis-Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie vor (schwarz) und nach zusätzlicher Zugabe von AEBSF (rot). **D)** ESI-MS-Spektrum von Integrin-β3 nach der Zugabe von AEBSF.

Die γ-Ionen, welche durch Spaltung der Peptidbindung am C-Terminus mit gleichzeitiger Ladungserhaltung entstehen, zeigten bei einer Massenverschiebung von 183 Da die Aminosäuren Tyr-773, Ser-778 und Tyr-785 als modifizierte Reste auf (exemplarisch für Tyr-785 in Abbildung 32 A gezeigt). Da sich dies bei diversen Folgeexperimenten wie Strukturaufklärungs- und Interaktionsstudien nachteilig auswirken kann, musste ein ideales Verhältnis von verringerter Zugabe an AEBSF bei gleichzeitiger Inhibierung der Serinproteasen gefunden werden. Daher wurde nachfolgend anstatt dreimal 2 mM nur noch einmal 2 mM AEBSF während des Zellaufschlusses hinzugegeben. Dies hatte zur Folge, dass im ESI-MS-Spektrum weiterhin nur noch der Peak für das Volllängenpeptid mit m/z: [766]⁷⁺ und keine Hydrolyseprodukte mehr identifiziert werden konnten.

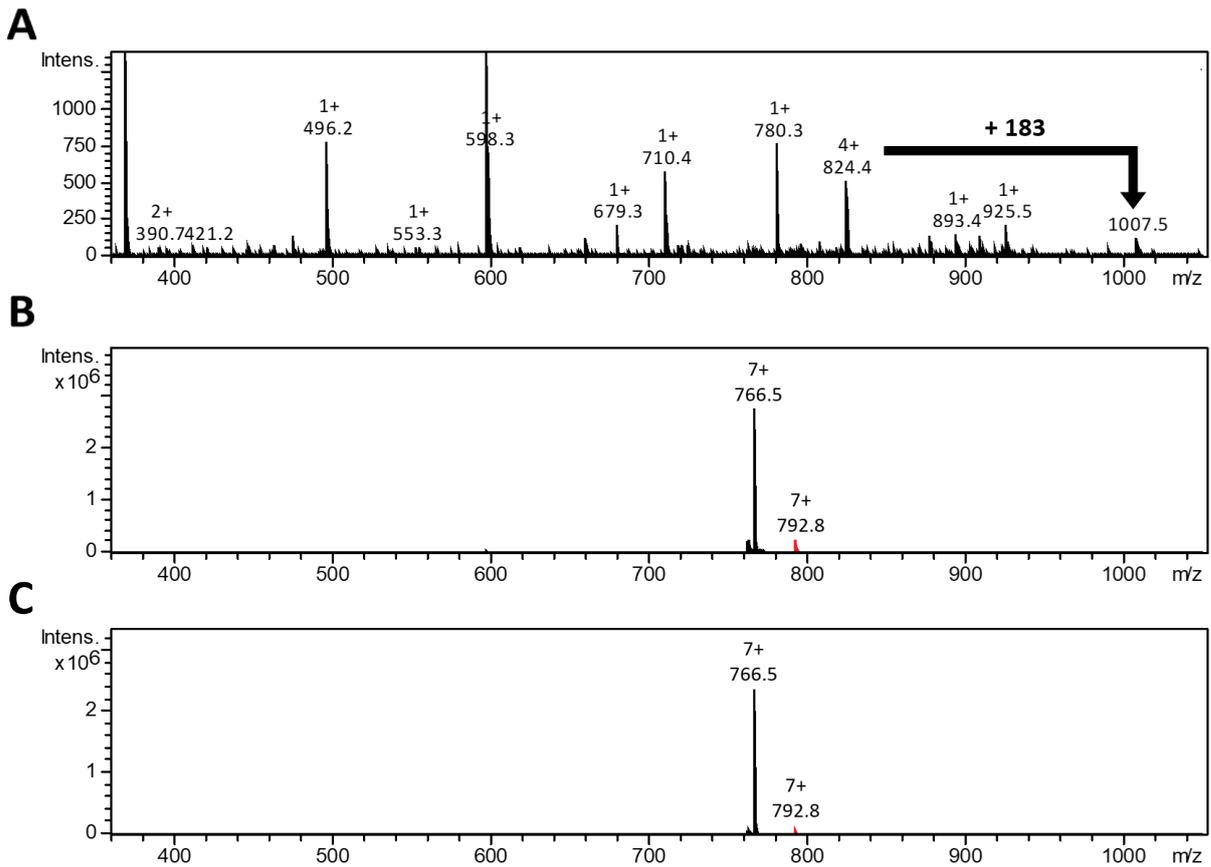


Abbildung 32 | A) ESI-MS/MS-Spektrum des C-terminalen Bereichs von Integrin- β 3 (Phe-780 – Thr-788). B) Überlagerte ESI-MS-Spektren nach LC-Separation von unmodifiziertem (schwarz) und modifiziertem Peptid nach Zugabe von dreimal 2 mM AEBSF (rot). C) Überlagerte ESI-MS-Spektren nach LC-Separation von unmodifiziertem (schwarz) und modifiziertem Peptid nach Zugabe von einmal 2 mM AEBSF (rot).

Für beide Reinigungsprotokolle wurden im Anschluss LC-MS-Messungen durchgeführt, um das Verhältnis von unmodifiziertem Peptid zu AEBSF-Addukt zu bestimmen. In Abbildung 32 B und C ist zu erkennen, dass bei der dreifachen Zugabe des Serinproteasehemmers das Verhältnis von intaktem zu modifiziertem Peptid 100:10 beträgt, während es bei der einmaligen Zugabe um den Faktor zehn geringer ist, nämlich 100:1 (LC-Chromatogramme in Abbildung 55 im Anhang, [336]).

Somit konnten durch die chromatographische und massenspektrometrische Analyse der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 das Vorhandensein aktiver Serinproteasen nach dem Zellaufschluss bestätigt und dadurch resultierende Hydrolyseprodukte identifiziert werden. Es wurden zwei kommerziell erhältliche Proteaseinhibitorenmischungen auf deren serinproteasehemmende Wirkung untersucht und mit dem zusätzlichen Inhibitor AEBSF ergänzt, um so ein effektives Reinigungsprotokoll mit nur minimal entstehendem Peptidaddukt zu erhalten.

8.2 Interaktionsstudien von Integrin- β 1/ β 3 mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin

8.2.1 Bindungsstudie der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 mit der LIM3-Domäne von Paxillin

Bei der Integrin-vermittelten Zellmigration spielt das Adapterprotein Paxillin eine essenzielle Rolle, indem es durch seinen multimodularen Aufbau eine Vielzahl von Proteinen bindet und an der zentralen Signalübermittlung beteiligt ist [299, 300]. Dessen frühe Rekrutierung durch seine LIM-Domänen an naszierenden fokalen Adhäsionen konnte bereits durch Transfektion des Wildtyps und diversen Deletionsmutanten in CHO.K1 Fibroblasten nachgewiesen werden [354, 355]. Auch die Generierung von Paxillin-defizienten Fibroblasten und deren Transfektion mit den isolierten LD-Motiven (LD1-5) und LIM-Domänen (LIM1-4) zeigte nur eine Lokalisation der LIM-Domänen an die fokalen Adhäsionen [316]. Weiterhin konnten unter anderem zellbiologische Experimente [356], fluoreszenzspektroskopische Assays wie der sogenannte OPTIC-Assay (*Opa protein triggered intracellular clustering* [316]) oder auch *in vitro* NMR-spektroskopische Interaktionsstudien die direkte Interaktion der Paxillin-LIM-Domänen (*OPTIC*: LIM1-4, *in vitro*: LIM2/3) mit der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 aufzeigen [315]. Da nach aktuellem Stand noch keine Strukturbestimmung der LIM-Domänen im Komplex mit Integrin- β 3 möglich war, stellen detaillierte NMR-spektroskopische Bindungsstudien wertvolle Informationen zu dessen Aufklärung zur Verfügung. Die Interaktion der LIM2/3-Domänen mit Integrin- β 3 konnte bereits tiefgehend analysiert werden [315], daher wurde sich in dieser Arbeit auf die singuläre LIM3-Domäne fokussiert, die für die Rekrutierung von Paxillin an fokale Adhäsionen essenziell ist [354]. Weiterhin sollten so unspezifische als auch spezifische Wechselwirkungen mit der LIM2-Domäne ausgeschlossen werden.

Dazu wurden sowohl die Paxillin LIM3-Domäne als auch die zytoplasmatische Domäne von Integrin- β 3 unmarkiert sowie ^{15}N -isotopenmarkiert exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren beider Proteine aufgenommen und der jeweils unmarkierte Interaktionspartner dazu titriert (siehe Abbildung 33 A und Abbildung 56 im Anhang). Dabei zeigte sich nach Analyse der chemischen Verschiebungen der Resonanzsignale, dass ausschließlich der C-Terminus, speziell der Aminosäurebereich Thr-781 bis Thr-788, an die LIM3-Domäne bindet (siehe Abbildung 33 B).

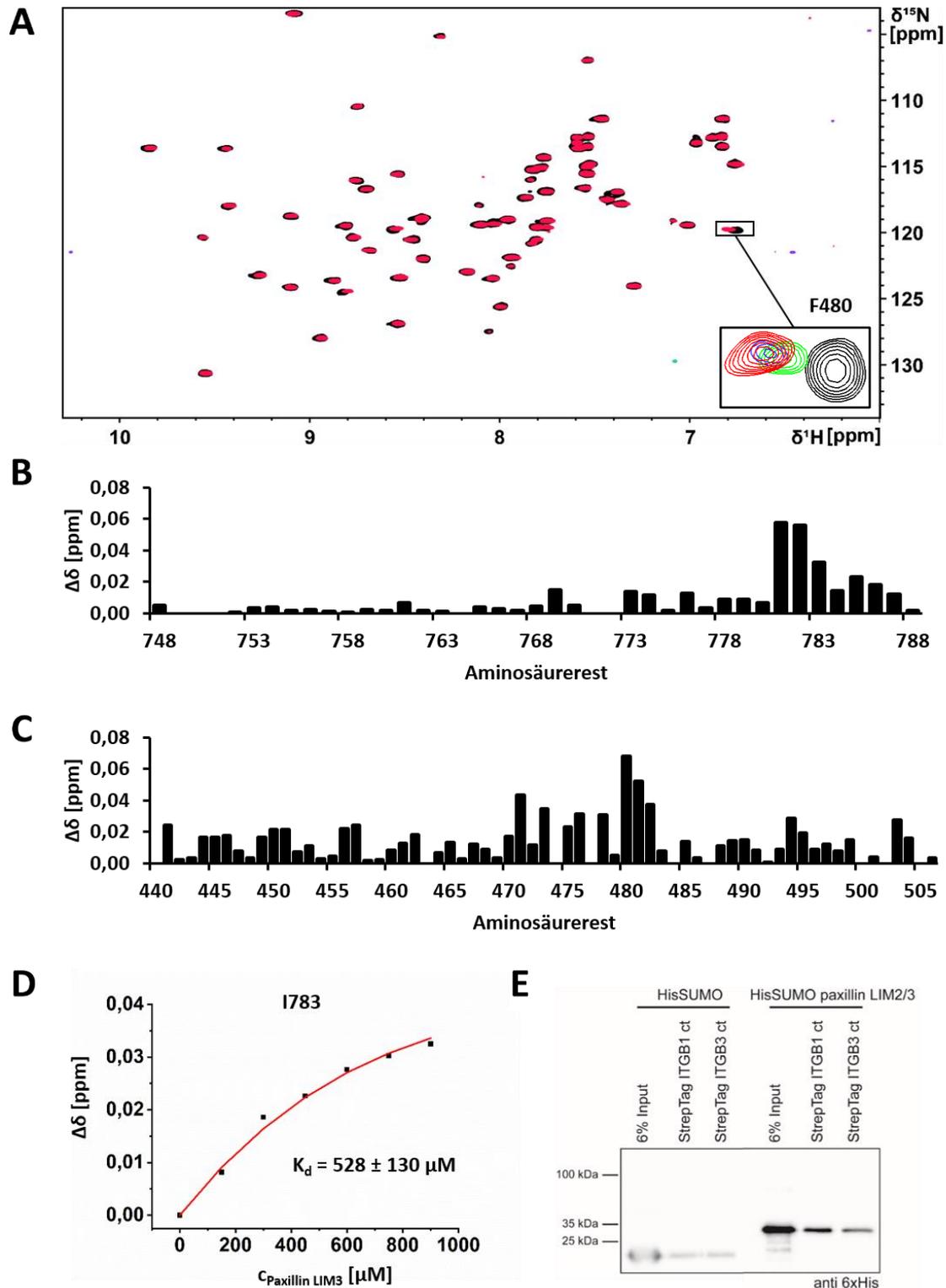


Abbildung 33 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Paxillin LIM3 vor (schwarz) und nach Zugabe von $230\ \mu\text{M}$ (grün), $345\ \mu\text{M}$ (blau) und $750\ \mu\text{M}$ Integrin- $\beta 3$ (rot). B) CSPs von Integrin- $\beta 3$ nach der Paxillin LIM3-Titration in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. C) CSPs von Paxillin LIM3 nach der Integrin- $\beta 3$ -Titration in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. D) Titrationskurve von ausgewähltem Aminosäurerest von Integrin- $\beta 3$ mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8. E) Pulldown-Assay von His $_6$ -SUMO-Paxillin LIM2/3 mit zytoplasmatischen Domänen von Strep-Integrin- $\beta 1/\beta 3$, erstellt von M.Sc. Timo Baade (Universität Konstanz).

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Titrations mit der LIM2/3-Tandem-Domäne, woraus sich schließen lässt, dass die LIM2-Domäne keine Erweiterung des Bindungsmotivs von Integrin- β 3 zur Folge hat. Die zytoplasmatische Domäne von Integrin- β 3 spielt eine zentrale Rolle beim Mechanismus des *inside-out signaling*. Dabei interagiert der membrannahe Teil mit diversen intrazellulären Proteinen wie dem Zytoskelett-Protein Myosin, dem Calcium-bindenden Protein CIB oder den Phosphotyrosin-bindenden Proteinen SHC und GRB2 [357]. Die Aktivierung von Integrin erfolgt hingegen primär über spezifische Wechselwirkungen mit den Proteinen Talin und Kindlin [358, 359]. Dabei spielen die zwei NxxY (Asn-770 bis Tyr-773 und Asn-782 bis Tyr-785)-, das TST (Thr-777 bis Tyr-779)- und das RGT (Arg-786 bis Thr-788)-Motiv wichtige Rollen, welche später noch tiefergehender beleuchtet werden. Zusätzlich werden die Aminosäuren Tyr-773, Thr-777 und Tyr-785 durch Proteinkinasen phosphoryliert, was wiederum einen kritischen Schritt für den *outside-in signaling* Prozess darstellt [360]. Diese vielfältigen Eigenschaften und Bindungsmuster in dem kurzen Peptidabschnitt zeigen, dass vor allem der C-Terminus von Integrin- β 3 komplexe Funktionen simultan erfüllt und die Bindung zu Paxillins LIM-Domäne nur eine davon darstellt.

Die inverse Titration zeigte hingegen das Bindungsmotiv Cys-471 bis Phe-481 im zentralen Bereich der LIM3-Domäne (siehe Abbildung 33 C). Da eine durch NMR-spektroskopische Daten wie Proton-Proton-Distanzen aus NOESY-Spektren (unter anderem ^{15}N -NOESY-HSQC-, $^{13}\text{C}_{\text{ali}}$ -NOESY-HSQC- und $^{13}\text{C}_{\text{aro}}$ -NOESY-HSQC-Spektren) basierte berechnete dreidimensionale Struktur der LIM2/3-Tandem-Domäne aus vorangegangenen Arbeiten in dieser Arbeitsgruppe existiert, konnten diese chemischen Verschiebung auf die Struktur übertragen werden. Dabei zeigte sich, dass die Bindung von Integrin- β 3 an einen flexiblen Loop der LIM3-Domäne stattfindet (Struktur des Loops siehe Abbildung 37 C). Während sich die Dissoziationskonstante für die Bindung der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 an die LIM2/3-Tandem-Domäne mit $K_d = 394 \pm 65 \mu\text{M}$ im schwachen mikromolaren Bereich befindet, ergibt sich aus der Titration mit der LIM3-Domäne eine Affinität von $K_d = 528 \pm 130 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 33 D). Dies deutet auf eine ähnliche Bindung hin, die trotz des Fehlens der LIM2-Domäne detektiert werden kann. Denn diese hat auch Interaktionen mit Integrin- β 3 gezeigt, wenngleich auch nicht solch ausgeprägte [315]. Da sich beide Dissoziationskonstanten jedoch im ähnlichen Affinitätsbereich befinden, kann davon ausgegangen werden, dass im Vergleich zur LIM2-Domäne die LIM3-Domäne eine deutlich signifikantere Rolle bei der Bindung zu Integrin- β 3 spielt. Diese vergleichsweise schwachen Affinitäten können mit diversen Bindungspartnern der zytoplasmatischen Integrin-Domänen

beobachtet werden, beispielsweise mit den FERM-Domänen von Talin [361] oder der ζ -Isoform vom Protein 14-3-3 [362].

Mittels einer zellbiologischen Methode namens Pulldown-Assay können Interaktionen zwischen aufgereinigten rekombinanten Proteinen *in vitro* nachgewiesen werden [363]. Hierbei wurden die zytoplasmatischen Domänen von Integrin- β 1 und Integrin- β 3 an einen Twin-Strep-Tag[®] fusioniert, welche dann mit hoher Selektivität an Strep-Tactin[®] binden konnten und an Beads gekoppelt wurden. Diese Lösung wurde dann zum möglicherweise interagierenden Partner dazugegeben, zentrifugiert, mehrfach gewaschen und durch einen Überschuss an Biotin eluiert. Der Überstand kann dann mittels SDS-PAGE analysiert werden. In Abbildung 33 E liegt der Fokus vor allem auf der Interaktion zwischen den LIM2/3-Domänen von Paxillin und den zytoplasmatischen Domänen von Integrin- β 1 und Integrin- β 3. Die Diskussion dazu wird im Kapitel 8.2.3 geführt.

8.2.2 Bindungsstudie der verkürzten zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin

Der C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 hat sich sowohl in Kapitel 8.2.1 als auch in vorangegangenen Studien als kritisch für die Bindung zu Paxillins LIM-Domänen erwiesen [315]. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion der acht C-terminalen Aminosäuren Thr-781 bis Thr-788 die Interaktion mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin nahezu vollständig unterbindet [316]. Neben der Interaktion mit Paxillin interagiert die zytoplasmatische Domäne weiterhin noch über die membranernahe NxxY-Bindestelle (Asn-770 bis Tyr-773) mit Talin und über die membranferne NxxY-Bindestelle (Asn-782 bis Tyr-785) und das TST-Motiv (Thr-777 bis Tyr-779) mit Kindlin. Während Talin eine Änderung der transmembranen Integrin-Konformation induziert und somit die Bindungsaffinität zu ECM-Liganden erhöht, agiert Kindlin „nur“ als Promoter und Co-Aktivator, welcher jedoch die Integrin-Aktivierung nicht allein auslösen kann [364–366]. Studien, die ein rekonstituiertes Integrin-Aktivierungs- und Adhäsionsmodell in transfizierten CHO-Zellen mit verschiedenen Deletionsmutanten verwendet haben, zeigten außerdem, dass das C-terminale RGT-Motiv (Arg-786 bis Thr-788) eine wichtige Rolle beim *outside-in signaling* spielt [357]. Daher sollte in dieser Arbeit eine dieser Deletionsmutanten von Integrin- β 3 untersucht werden, bei der anstatt der letzten acht Aminosäuren nur die letzten drei Aminosäuren Arg-786 bis Thr-788 mittels PCR-Reaktion entfernt wurden.

Wie im Vergleich der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des Volllängen-Peptids mit der Deletionsmutante gesehen werden kann, sind sowohl die Resonanzen der drei fehlenden Aminosäuren Arg-786, Gly-787 und Thr-788 erwartungsgemäß verschwunden als auch eine Positionsänderung der Kreuzsignale der benachbarten Aminosäuren (beispielsweise Asn-782, Ile-783 und Thr-784) zu beobachten gewesen (siehe Abbildung 34 A). Auffallend ist auch die Verschiebung des Rückgrat-Amidprotonsignals der Aminosäure Tyr-785, welches nach der Deletion die neue C-terminale Aminosäure ist und daher durch die entstandene Carboxyl-Gruppe und maximale Flexibilität eine charakteristische Änderung seiner chemischen Verschiebung erfährt und sich durch eine hohe Intensität auszeichnet [62]. Neben der Plasmidsequenzierung kann somit auch das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum die erfolgreiche Mutation des Peptids bestätigen.

Um die veränderten Bindungsmotive und Affinitäten der neuen Mutante zu der singulären LIM3-Domäne und der LIM2/3-Tandem-Domäne zu bestimmen, wurden erneut NMR-Titrations mit isotope markierten Proteinen durchgeführt (siehe Abbildung 57 und Abbildung 58 im Anhang). Dabei zeigte sich im Vergleich zu der Titration mit dem Volllängenpeptid (siehe Kapitel 8.2.1) eine deutlich verminderte Bindungsaffinität von Integrin- $\beta 3\Delta\text{RGT}$ mit $K_d = 1923 \pm 637 \mu\text{M}$ für die Interaktion mit der LIM3-Domäne und $K_d = 1987 \pm 4049 \mu\text{M}$ für die Interaktion mit der Paxillin LIM2/3-Domäne (siehe Abbildung 34 D und E). Diese sich im millimolaren Bereich befindenden Dissoziationskonstanten zeigen somit eine deutliche Abschwächung der Bindung mit einer mindestens vier- bis fünffach schwächeren Affinität. Die verhältnismäßig großen Standardabweichungen ergaben sich aus dem beinahe linearen Anstieg der Fittingkurven, da eine Sättigung der Bindungsstelle trotz hoher Zugabe an Ligand nicht zu erreichen war. Eine höhere Aufkonzentration der Ligandlösung war durch die zunehmende Wahrscheinlichkeit von Proteinaggregation und daraus folgender Präzipitation nicht möglich gewesen. Außerdem hätte eine weitere Zugabe an Ligandlösung mögliche unspezifische Wechselwirkungen zur Folge haben können, welche bereits auch bei dieser Konzentration nicht ausgeschlossen werden können. Dies zeigte sich auch in der Darstellung der CSPs auf die Aminosäuresequenzen. Während bei der Titration mit dem Volllängenpeptid eindeutige Bindungsmotive an beiden Proteinen eindeutig identifizierbar sind (siehe Abbildung 33 B und C), verteilen sich bei diesen Interaktionsexperimenten die chemischen Verschiebungen fast global über beide Proteine. In Abbildung 34 B zeigten nur die Aminosäuren Asn-782 und Ile-783 signifikante, wenn auch deutlich geringere, CSPs. Diese gehören zum membrandistalen NxxY-Motiv, welches für das *inside-out* wie auch für das *outside-in signaling* essenziell ist. Diese Doppelfunktion des NxxY-Motivs zeigten sowohl vWF-

induzierte Integrin-Aktivierungsexperimente mit dem Glykoprotein Fibrinogen [357] als auch Tyrosin-Punktmutationsstudien, bei denen geringe bzw. keine Zelladhäsion und Zellausbreitung mehr beobachtet werden konnte [367].

Das Volllängenpeptid interagiert in den Bindungsstudien hingegen mit seinen letzten acht Aminosäuren (Thr-781 bis Thr-788), was einem deutlich ausgeprägteren Bindungsmotiv entspricht. Ein ähnliches Bild zeigt sich in Abbildung 34 C. Während der flexible Loop im Bereich Cys-471 bis Phe-481 der Tandem-Paxillin LIM2/3-Domäne eindeutig die dominante Bindetasche für Integrin- β 3 darstellt (siehe Abbildung 33 C), zeigt sich bei der Titration mit Integrin- β 3 Δ RGT eine sehr breite Verteilung der Änderungen der chemischen Verschiebungen über die ganze Aminosäuresequenz. Einzig die beiden aromatischen Aminosäuren Phe-480 und Phe-481 des Loops zeigen weiterhin eine vergleichsweise etwas stärkere CSPs. Diese besitzen auch eine wichtige strukturelevante Funktion, wie Punktmutationsstudien in unserer Gruppe aktuell gezeigt haben.

Die Titrations mit der Deletionsmutante Integrin- β 3 Δ RGT konnten aufzeigen, dass schon eine Verkürzung des Peptids um nur drei anstatt wie bisher acht Aminosäuren zu einer drastischen Reduktion der Bindung zur singulären LIM3-, aber auch zur LIM2/3-Tandem-Domäne führt. Jedoch sind trotz der abgeschwächten Affinität die stärksten Verschiebungen an den bereits bekannten Bindungsmotiven zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass sich durch die Deletion kein neuer Bindungsmodus ausbildet und die Interaktion nicht komplett unterbunden wird. Su *et al.* konnten außerdem mithilfe eines ELISA-Assays (*enzyme-linked immunosorbent assay*) zeigen, dass das RGT-Motiv direkt an die SH3-Domäne der Tyrosinkinase Src bindet [368]. Diese ist ein wichtiger Modulator der humanen Thrombozytenfunktion, durch die eben das *outside-in signaling* vermittelt wird. Während so gezeigt werden konnte, dass dieser Signaltransfer vom C-terminalen Peptid abhängig ist, konnten Pulldown-Assays mit Talins Kopf-Domäne beweisen, dass keine Interaktion mit den drei Aminosäuren stattfindet und somit auch kein Beitrag zum anderen Signalweg, dem *inside-out signaling*, leistet. Diese Erkenntnisse über das RGT-Peptid bilden die Grundlage für die Entwicklung und das Design von neuartigen Thrombozytenaggregationshemmern, deren Wirkung schon in diversen Studien mit transgenen Mäusen *in vivo* durch photochemische Denudation, Kollagen/Epinephedrin-Injektion [369], Eisenchlorid-Zugabe [370] oder Laser-Bestrahlung [371] gezeigt werden konnten [368].

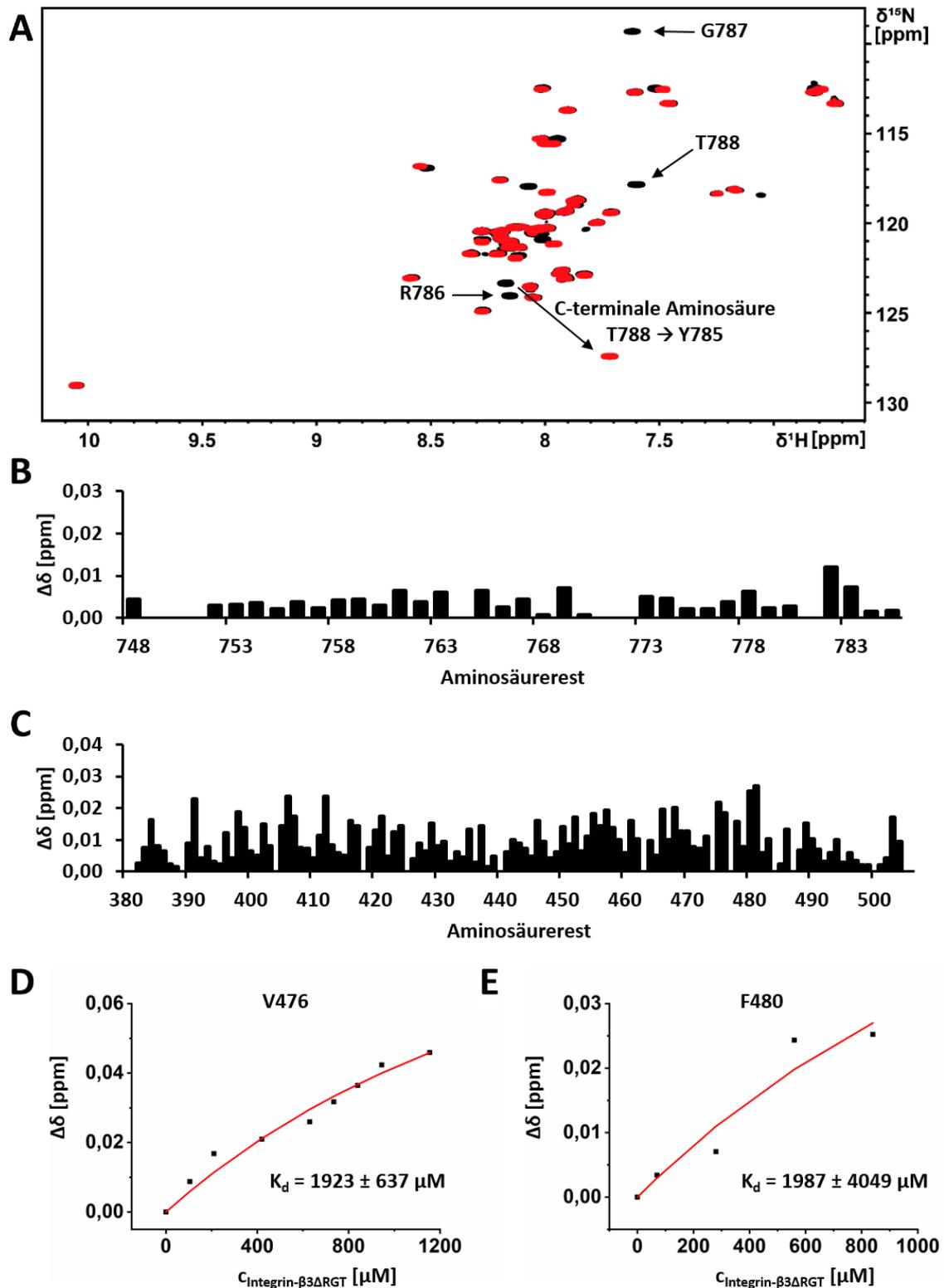


Abbildung 34 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Integrin- $\beta 3$ (schwarz) und Integrin- $\beta 3\Delta\text{RGT}$ (rot). B) CSPs von Integrin- $\beta 3\Delta\text{RGT}$ nach der Paxillin LIM3-Titration in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. C) CSPs von Paxillin LIM2/3 nach der Integrin- $\beta 3\Delta\text{RGT}$ -Titration in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. D) Titrationskurve von ausgewähltem Aminosäurerest von Paxillin LIM3 mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8. E) Titrationskurve von ausgewähltem Aminosäurerest von Paxillin LIM2/3 mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8.

8.2.3 Bindungsstudie der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 1 mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin

Die bisherigen Studien fokussierten sich auf den RGD-Rezeptor Integrin- β 3 und seine Interaktion mit der LIM2/3-Domäne von Paxillin. Diese Subfamilie erkennt das Tripeptid RGD in Molekülen wie Fibronectin und Vitronectin in Wirbeltieren oder Tigrin in *Drosophila melanogaster* [292]. In Abbildung 33 E lässt sich aus dem Pulldown-Assay vermuten, dass Paxillin LIM2/3 eine stärkere Bindung zur zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 1 als zu Integrin- β 3 zeigt. Während zwischen beiden Proteinen (Transmembran- und zytoplasmatische Domäne) zwar eine hohe Sequenzhomologie festgestellt werden kann, sind diverse biophysikalische Eigenschaften mit variierenden kombinierten α -Untereinheiten deutlich verschieden voneinander, was vor allem Folgen für deren Aktivierungsmechanismus hat. Dazu zählen unter anderem sehr differenzierte Affinitäten zu bestimmten α -Untereinheiten wie α 1, α 2 und α 5 oder auch zu Talins F3-Domäne (K_d für Talin/Integrin- β 3 um Faktor fünf geringer als bei Talin/Integrin- β 1) und signifikante Unterschiede in der transmembranen Sekundärstruktur (unter bizellulären Bedingungen) [372]. Aber auch Abweichungen vom kanonischen Aktivierungsmodell offener/geschlossener Zustand sind ein theoretischer Interpretationsansatz, bei dem sich beispielsweise Integrin- α 1 β 1 permanent im aktivierten Zustand befindet und daher andere Mechanismen die Signalisierung modulieren.

Das Ergebnis des *in vitro* Assays sollte mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Protein-Peptid-Interaktion untermauert werden, da zwar die Bindungen bereits in einer Reihe von *in vitro* Assays gezeigt werden, jedoch nicht die exakten Bindungsmotive oder die Affinitäten der Partner zueinander bestimmt werden konnten [356, 373]. Nachdem beide ^{15}N -markierten Proteine bei den Titrations mit deren unmarkierten Partnern Resonanzverschiebungen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zeigten, wurden diese darauffolgend tiefergehend untersucht (siehe Abbildung 35 A und Abbildung 59 im Anhang). Der Plot auf die Sequenz von Integrin- β 1 zeigte ein Bindungsmotiv im C-terminalen Bereich, jedoch nicht direkt am C-Terminus wie es bei Integrin- β 3 der Fall ist. Die Bindestelle erstreckt sich von Tyr-783 bis Thr-789 (siehe Abbildung 35 B). Die größten Verschiebungen erfahren hierbei Lys-784 und Thr-788. Während sich das charakteristische TTV-Motiv primär mit zwei Aminosäuren an der Bindung beteiligt, zeigt das NITY-Motiv keine ausgeprägten Änderungen der chemischen Verschiebungen. Dies ist insofern interessant, da sich die Bindestelle für Kindlin dort befindet und entweder eine Konkurrenzsituation entsteht oder beide Proteine kooperativ mit Integrin einen möglichen

ternären Komplex ausbilden. Dabei ist zu beachten, dass die Rolle von Paxillin im Falle der Bindung an Integrin- β 3 noch wichtiger ist, da es in der Zelle vermutlich unabhängig von Kindlin bindet, während bei der Bindung an Integrin- β 1 Kindlin ein Hauptaktivator ist [374]. Biochemische Bindungsstudien zeigten bereits die indirekte Interaktion von Paxillin mit sowohl Integrin- β 1 als auch Integrin- β 3 via Kindlin-1 und Kindlin-2 [375, 376].

Bei den Bindungsstudien ist auf der Paxillin-Seite ein nahezu gleiches Bindeverhalten wie zu Integrin- β 3 zu beobachten (siehe Abbildung 35 B). Die LIM2-Domäne zeigt erneut kleinere Bindungsmotive um Val-395 und His-422, während sich die primäre Bindetasche in der LIM3-Domäne um den flexiblen Loop von Thr-473 bis Phe-481 erstreckt. Damit docken beide Peptide an demselben charakteristischen Strukturmotiv von Paxillin an, woraus sich dessen Bedeutung für die Ligandbildung wie beispielsweise auch an Tubulin ableiten lässt [307]. Der Pulldown-Assay deutete aufgrund des Intensitätsunterschiedes beider SDS-PAGE-Banden eine höhere Affinität von Integrin- β 1 als Integrin- β 3 zu Paxillin LIM2/3 an. Dies konnten Analysen der CSPs bestätigen. Die Titration mit isotopenmarkiertem Integrin- β 1 ergab eine Dissoziationskonstante von $K_d = 42 \pm 28 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 35 D), welche im Gegensatz zu der Dissoziationskonstante von Integrin- β 3 mit $K_d = 394 \pm 65 \mu\text{M}$ eine um das zehnfache erhöhte Affinität zeigt. Auch die Affinität bei der inversen Titration befindet sich mit $K_d = 12 \pm 13 \mu\text{M}$ im niedrigen, mikromolaren Bereich und bestätigt die stärkere Bindung zur LIM2/3-Tandem-Domäne (siehe Abbildung 35 E). Die erhöhte Standardabweichung kann durch zu hohe Titrationsschritte erklärt werden, da der erste Titrationsschritt bei der Zugabe von Integrin- β 1 bei $50 \mu\text{M}$ lag und somit schon über dem errechneten K_d -Wert. Eine Minimierung dieser Abweichung könnte durch eine Wiederholung der NMR-Titration mit deutlich kleineren Titrationsschritten erzielt werden. Da sich die Bestimmung von niedrig mikromolaren Dissoziationskonstanten an der unteren Grenze der mittels Lösungs-NMR zu bestimmenden Affinitäten befindet, könnte diese Bindung auch durch weitere Methoden wie der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) [377] oder der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) charakterisiert werden [378].

Somit konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne des Kollagen-Rezeptors Integrin- β 1 mit einer bis zu zehnfach höheren Affinität an den flexiblen Loop der LIM3-Domäne von Paxillin bindet und dabei ein anderes Bindungsmotiv als Integrin- β 3 aufzeigt. Dieser Trend zeigt sich auch für Kindlin-2 in zellbasierten OPTIC-Experimenten unserer Kooperationspartner [379]. Daher wären sowohl Kindlin-2- als auch Paxillin-Mutanten (beschrieben in Kapitel 8.3) interessante Kandidaten, um den Bindungsmodus zu Integrins zytoplasmatischen Domänen

tieferegehend zu untersuchen und sowohl Aufschlüsse über komplexe Bindungsmodi als auch über Rekrutierungsmechanismen an naszierenden Adhäsionen, welche von der motorischen Aktivität von Myosin II abhängen, aufzuzeigen [380].

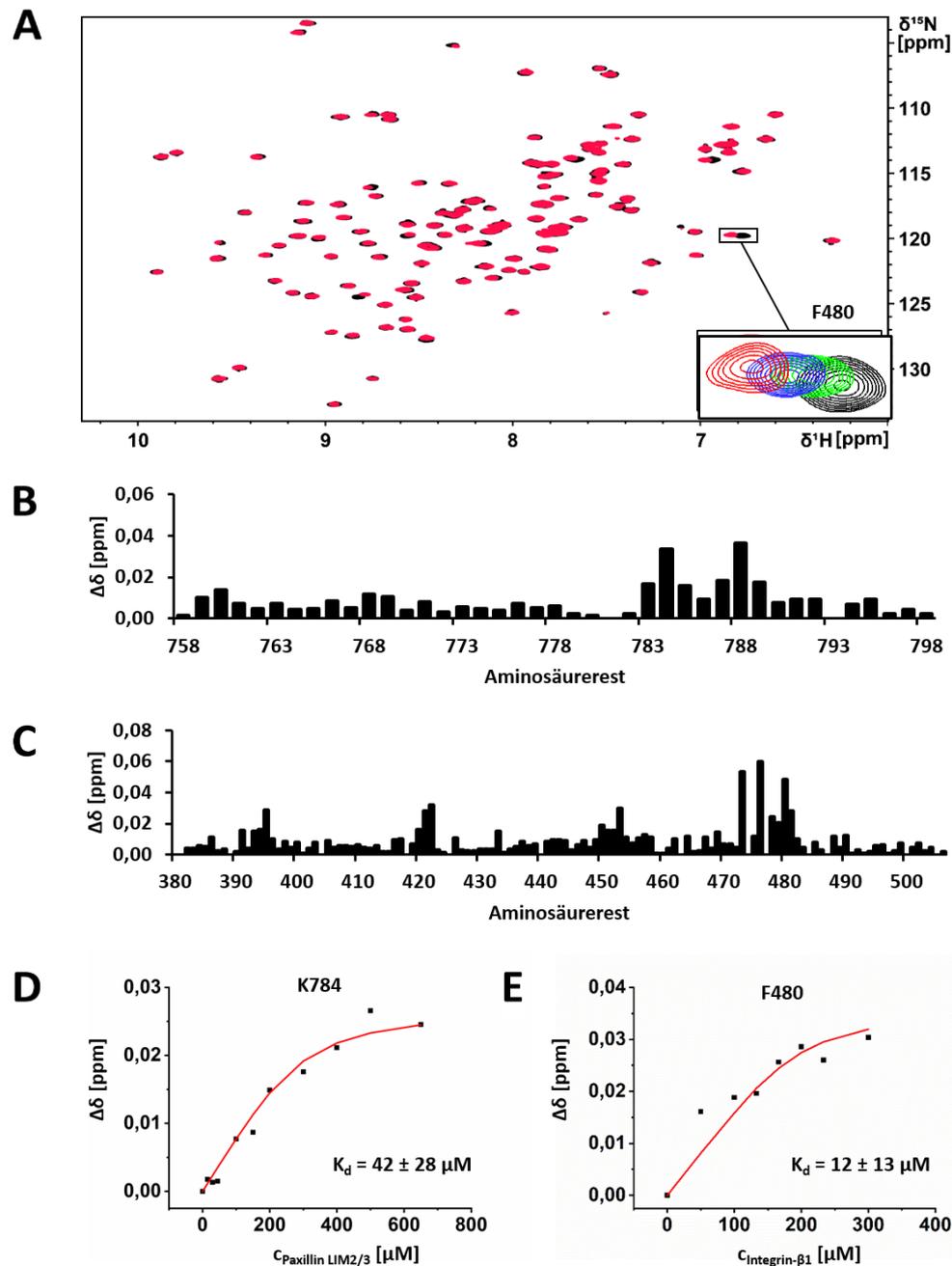


Abbildung 35 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Paxillin LIM2/3 vor (schwarz) und nach Zugabe von 166 μM (grün), 300 μM (blau) und 500 μM Integrin- β 1 (rot). B) CSPs von Integrin- β 1 nach der Paxillin LIM2/3-Titration in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. C) CSPs von Paxillin LIM2/3 nach der Integrin- β 1-Titration in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. D) Titrationskurve von ausgewähltem Aminosäurerest von Integrin- β 1 mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8. E) Titrationskurve von ausgewähltem Aminosäurerest von Paxillin LIM2/3 mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8.

8.3 Stabilitätsstudien von Paxillin-Mutanten

Um die Bildung multimodularer Proteinkomplexe bei der Aktivierung von Integrin und der folgenden intra- und interzellulären Signalübertragung besser zu verstehen, ist neben der Identifizierung der Bindestellen der einzelnen Proteine auch deren Bindungsmodus zueinander von entscheidender Bedeutung. Dabei kann die Erzeugung von Mutationen, seien es Punktmutationen oder auch die Deletion oder Substitution ganzer Fragmente, einen hilfreichen Beitrag leisten. Dazu können diese mittels PCR-Reaktion biotechnologisch modifiziert und hergestellt werden, um anschließend die mögliche Interaktion mit den verschiedenen Liganden untersuchen zu können.

Dieser Ansatz wurde in der Arbeit für das Adapterprotein Paxillin verfolgt. Dazu wurde der Sequenzabschnitt Phe-475 bis Phe-481 der LIM3-Domäne in der Arbeitsgruppe Zellbiologie von Prof. C. R. Hauck an der Universität Konstanz zu der verkürzten Sequenz Gly-Ala-Gly-Asn-Gly mutiert (siehe Abbildung 36 A). Diese Sequenz entspricht dem Hauptbindemotiv für die Interaktion mit den zytoplasmatischen Domänen von Integrin- β 3 (siehe Kapitel 8.2.1) und von Integrin- β 1 (siehe Kapitel 8.2.3). Ziel dieser Proteinmodifikation war es, unter Erhalt der nativen Konformation die Affinität zu Integrin zu unterbinden und anschließend festzustellen, ob eine Interaktion mit weiteren fokalen Adhäsionsproteinen wie Kindlin-2 detektierbar ist. Die Untersuchung dieser Mutante mittels Pulldown-Assay erfolgt zuerst in der Arbeitsgruppe Zellbiologie von Prof. C. R. Hauck an der Universität Konstanz (siehe Abbildung 36 B). Darin ist zu erkennen, dass die Wildtyp-Sequenz erwartungsgemäß stark an Strep-Integrin- β 3 bindet, während die mutierte Sequenz keinerlei Bindung mehr zeigt. Daraus ließ sich, basierend auf diesem Assay, zuerst einmal ableiten, dass die Mutation den gewünschten Effekt erzielt und die Interaktion beider Proteine vollständig unterbunden hat. Weiterhin zeigt der Assay in den beiden äußeren Banden die Interaktion mit den zwei Punktmutanten Paxillin LIM2/3^{N477A} und Paxillin LIM2/3^{S455/479A}. Da gezeigt werden konnte, dass der Paxillin-Wildtyp an der Position Asn-477 in Lösung zu den Isomeren Aspartat und iso-Aspartat deamidiert ($t_{1/2} = 2$ Tage bei 37 °C und pH = 8.0 [315]), wurde eine N477A-Punktmutante erstellt und das Bindeverhalten zu Integrin- β 3 untersucht.

Diese Mutation führte *in vitro* zu einer schwächeren Bindung zu Integrin- β 3 (siehe Abbildung 36 B). Die Bindung wird jedoch nicht vollständig verhindert, was auch OPTIC-Assays mit Paxillin-Knockout-Zellen bestätigten [316]. Die Serin-Mutanten sind dahingehend interessante Kandidaten, da sie bereits von Brown *et al.* als Schlüsselreste für die Paxillin-Lokalisation an fokalen Adhäsionen und die Zelladhäsion an Fibronectin durch deren Phosphorylierung identifiziert werden konnten [355]. Auch hier war nur eine Abschwächung, aber keine komplette Auslöschung der Bindung zu Integrin- β 3s zytoplasmatischer Domäne detektierbar.

Da der Pulldown-Assay keine Kriterien zum Strukturverlust des Proteins aufzeigt, wurde dieses in unserer Arbeitsgruppe mittels rekombinanter Expression hergestellt, aufgereinigt und mit Hilfe von Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) vermessen. Bei dieser Methode wird die ungleiche Absorption von zirkular polarisiertem Licht an chiralen Zentren wie beispielsweise den aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin) ausgenutzt, um im Fern-UV-Bereich (170 – 250 nm) den Gehalt an Sekundärstrukturelementen wie α -Helix oder β -Strang oder im Nah-UV-Bereich (250 – 300 nm) die Charakterisierung der Tertiärstruktur bestimmen zu können [381]. Im CD-Spektrum in Abbildung 36 C zeigt der Wildtyp Merkmale sowohl von α -Helix-Elementen (positiver $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang bei 192 nm und negativer $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang bei 209 nm) als auch von β -Faltblatt-Elementen (positiver $n \rightarrow \pi^*$ Übergang bei 196 nm und negativer $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang bei 218 nm). Dies bestätigt einerseits die von Dr. A. Prestel mittels NMR-Restraints berechnete Struktur der LIM2/3-Tandem-Domäne, in der sich je Einzeldomäne sowohl zwei antiparallele β -Faltblätter als auch eine kurze C-terminale α -Helix befinden [315]. Andererseits gleichen sich diese strukturellen Eigenschaften auch mit anderen LIM-Domänen wie beispielsweise einer des Proteins PINCH, dessen Struktur bereits röntgenkristallographisch bestimmt werden konnte (PDB: 2D8X, [382]).

In Abbildung 36 C ist neben dem CD-Spektrum des Wildtyps auch das der GAGNG-Mutante dargestellt. Dieses zeigt eindeutige Veränderungen der molaren Elliptizität, was auf eine Konformationsänderung im Protein hindeutet. Es lässt sich jedoch vermuten, dass es sich nur um eine partielle Konformationsänderung handelt, da die charakteristischen Minima und Maxima im relevanten Wellenlängenbereich weiterhin erkennbar sind und eine globale, ungeordnete *random coil* Konformation ein positives Signal bei 212 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang) und ein negatives Signal bei 195 nm ($n \rightarrow \pi^*$ Übergang) zeigen würde.

Daraufhin wurde die Mutante isotopenmarkiert und NMR-spektroskopisch vermessen (siehe Abbildung 37 A). Eine globale Denaturierung des Proteins würde sich hier durch eine Signalkumulation der ^1H -chemischen Verschiebungen aller Signale um 8.0 ppm zeigen [383]. Das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zeigte jedoch, dass 31 % der Resonanzen unverändert und 31 % nur kleine Änderungen der chemischen Verschiebungen erfahren haben. Doch auch starke Verschiebungen (13 %) und das Ausbleiben von ganzen Resonanzlagen (25 %) sind zu beobachten. Der Plot auf die Sequenz liefert eine strukturell sinnvolle Antwort auf diese Signallage im Proteinspektrum (siehe Abbildung 37 B). Dabei ist zu erkennen, dass die von der Mutationsposition weit entfernte LIM2-Domäne keine beziehungsweise nur minimale Änderungen ihrer chemischen Umgebung erfährt (Ser-380 bis Ala-439). Hingegen sind bei Resten, die sich in der Nähe der Mutationsstellen der LIM3-Domäne befinden, starke Verschiebungen und sogar das Verschwinden von Resonanzen zu beobachten (siehe Abbildung 37 C). Daraus lässt sich schließen, dass der flexible Loop einen wichtigen Anteil an der korrekten Faltung von Paxillins LIM3-Domäne hat und eine Mutation desselbigen zur partiellen Entfaltung des Proteins führt. Dies wiederum liefert auch eine Erklärung für das Ergebnis des Pulldown-Assays, da Paxillins Bindetasche für die Bindung mit Strep-Integrin- $\beta 3$ nicht mehr in der korrekten Konformation vorlag. Bei der ersten Mutation wurden zum einen sieben Aminosäurereste zu fünf gekürzt, was mit einer deutlich erhöhten Spannung der Konformation einhergegangen ist, die möglicherweise schon allein zur Instabilität des Loops geführt hat. Zum anderen wurde die Sequenz vor allem durch das Fehlen der drei Phenylalanin-Reste deutlich hydrophiler (GRAVY-Index [384] für Sequenzstellen FVNGSFF/GAGNG/SGSGSGS beträgt 1.129/−0,580/−0.629 [385]). Diese Beobachtungen legen eine strukturstabilisierende hydrophobe Interaktion der aromatischen Seitenketten mit ihrer Umgebung nahe.

Um eine korrekte LIM3-Domänen-Faltung zu erhalten, wurde eine neue Paxillin-Mutante hergestellt, welche einen sieben Aminosäure langen Glycin-Serin-Linker besitzt (siehe Abbildung 36 A). Bei diesen alternierenden Sequenzen werden oft kleine Aminosäuren wie Glycin verwendet, um die Flexibilität zu erhalten, und polare Reste wie Serin, welche durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen die Stabilität in wässrigen Lösungen aufrechterhalten und somit unerwünschte Wechselwirkungen zwischen Linker und Protein minimieren [386, 387]. Wie jedoch sowohl im CD-Spektrum (siehe Abbildung 36 C) als auch im NMR-Spektrum (siehe Abbildung 37 A) zu sehen ist, hatte die Mutation denselben Einfluss auf die Struktur wie die GAGNG-Mutante. Die Sekundärstrukturelemente ändern sich und das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zeigt fast die identische CSPs sowie auch das Verschwinden einiger Signale. Daraus lässt sich schließen, dass auch die Mutation in einen gleich langen Glycin-Serin-Linker die partielle Denaturierung der LIM3-Domäne von Paxillin zur Folge hat. Aktuelle Punktmutationsstudien (Alanin-Scanning) in der Arbeitsgruppe haben ergeben, dass vor allem die drei Phenylalanin-Reste Phe-475, Phe-480 und Phe-481 mit ihren aromatischen Seitenketten einen wichtigen Beitrag zur stabilen Formation des Loops leisten, während die Struktur bei den Mutationen von Val-476, Asn-477, Gly-478 und Ser-479 größtenteils erhalten blieb [374]. Eine FAAAAFF-Mutante ist daher ein interessanter Kandidat für das Unterbinden der Interaktion mit Integrin- β 3 bei gleichzeitigem Strukturverlust.

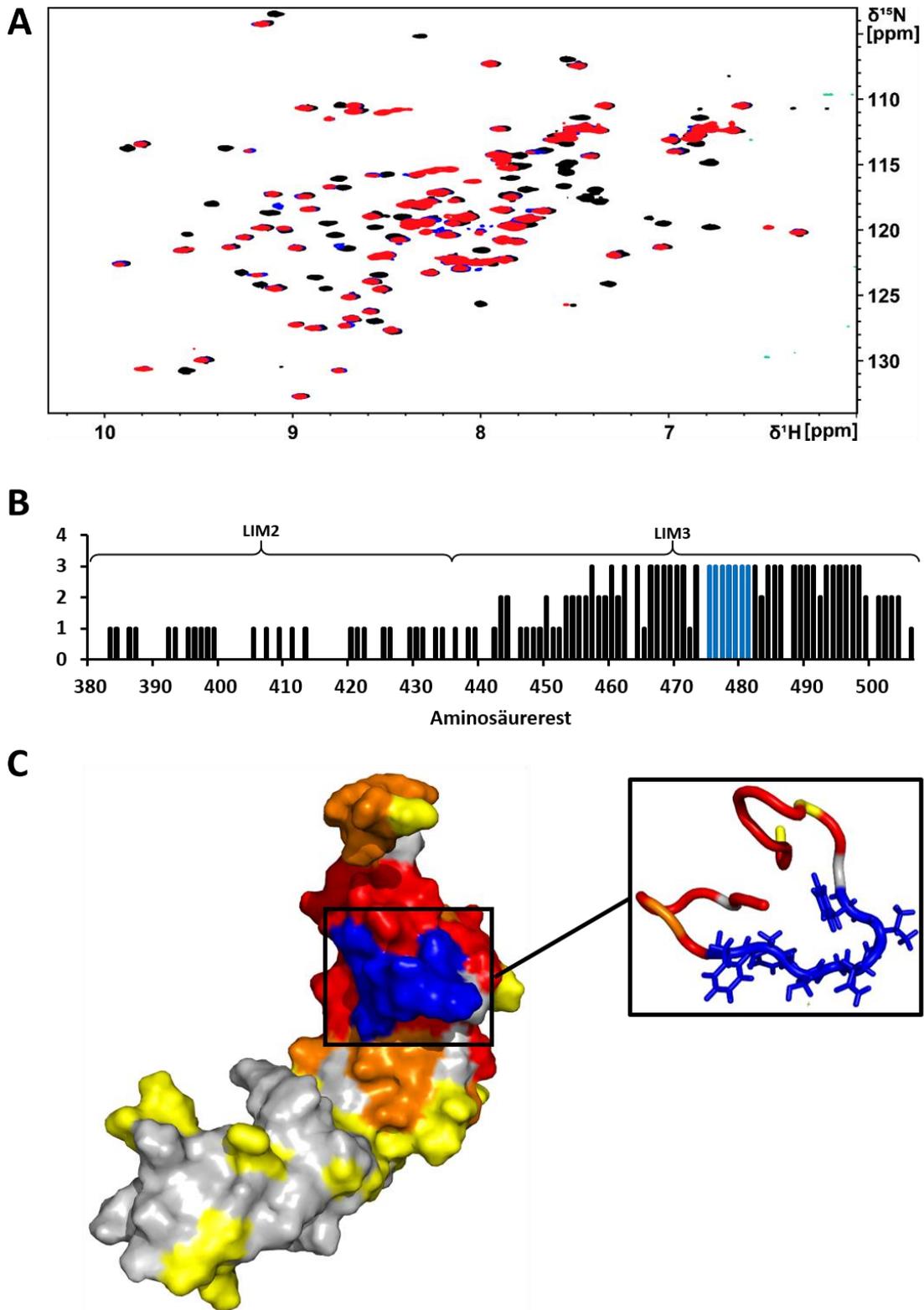


Abbildung 37 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Paxillin LIM2/3 (schwarz), Paxillin LIM2/3 GAGNG (blau) und Paxillin LIM2/3 SGSGSGS (rot). B) CSPs der Paxillin LIM2/3-Mutanten in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste mit geringen (1) und starken chemischen Verschiebungen (2), nicht mehr sichtbaren Resonanzen (3) und markiertem flexiblen Loop (blau). C) Berechnetes 3D-Bändermodell von Paxillin LIM2/3 mit markierten Aminosäuren mit geringen (gelb) und starken chemischen Verschiebungen (orange), verschwunden Resonanzen (rot) und dem flexiblen Loop der LIM3-Domäne (blau).

9 Zusammenfassung – Teil II

Homöostase, Gewebeorganisation, embryonale Morphogenese und Krebsmetastasierung - diese und noch viele weitere physiologische Prozesse werden durch den Prozess der Zellmigration vermittelt. Für die Migration muss die Zelle unter anderem kontrahieren können, weshalb sich zwischen der extrazellulären Matrix und dem Aktin-Zytoskelett adhäsive Kontakte namens fokale Adhäsionen ausbilden. Schlüsselproteine bei deren Bildung und bidirektionalen Signalübertragung sind die Transmembranproteine aus der Gruppe der Integrine und das Adapterprotein Paxillin. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion dieser fokalen Adhäsionsproteine tiefergehender analysiert werden, um vorrangig einen Beitrag zur Aufklärung der 3D-Struktur des Komplexes zu leisten und die Bedeutung einzelner Strukturelemente aufzuzeigen.

Dazu wurden verschiedene Konstrukte der Proteine zunächst mit Hilfe etablierter Protokolle exprimiert und mittels Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie aufgereinigt. Durch massenspektrometrische Analysen des Integrin- β 3-Peptids konnte eine Serinproteasen-induzierte Degradation während der Zelllyse festgestellt werden. Zur Inhibierung dieses Abbaus wurden verschiedene Zugaben des Serinprotease-Hemmers AEBSF getestet, was bei zu hoher Konzentration neben der erfolgreichen Inhibierung auch eine kovalente Modifikation des Zielpeptids zu Folge hatte, wie ESI-MSMS-Analysen zeigten. Final konnte neben der Bestimmung der Modifikationspositionen auch eine optimale Konzentration des spezifischen Inhibitors gefunden werden, bei der erfolgreiche Proteaseinhibition und minimale AEBSF-Addukt-Bildung einen Kompromiss darstellen. Dieses optimierte Protokoll ist essenziell, um zukünftig mit der intakten zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 Struktur- und Interaktionsstudien durchführen zu können.

Da die Interaktion von Integrin und Paxillin ein wichtiger Bestandteil bei der Ausbildung von fokalen Adhäsionen ist und die vollständige Aufklärung des Bindungsmodus aktuell noch erforscht wird, wurde zuerst die Bindung von Paxillins LIM3-Domäne mit Integrin- β 3 NMR-spektroskopisch untersucht. Dabei zeigten sich der flexible Loop von Paxillin (Cys-471 bis Phe-481) und der C-Terminus von Integrin (Thr-781 bis Thr-788) als charakteristische Bindungsstellen, welche auch schon bei der Interaktion mit der LIM2/3-Tandem-Domäne zu beobachten waren. Auffällig war eine ähnliche Affinität im mikromolaren Bereich, welche durch Multivalenzeffekte mit anderen Proteinen bei der Bildung fokaler Adhäsionen und Aktivierung von Integrin erklärt werden kann. Da die zytoplasmatische Domäne von Integrin nicht nur mit Paxillin, sondern auch mit anderen

Adhäsionsproteinen wie Kindlin oder Talin über weitere C-terminale Bindungsstellen wie den zwei NxxY-Motiven und dem TST/TTV-Motiv interagiert, um etwa beispielsweise in den aktiven, offenen Konformationszustand zu gelangen und dadurch Signalkaskaden zu ermöglichen, wurde ein um drei Aminosäuren verkürztes Konstrukt des Peptids untersucht. Dabei war eine fast vollständige Auslöschung der Bindung zu Paxillins LIM2/3-Tandem-Domäne mit Affinitäten im millimolaren Bereich zu beobachten. Daraus ließ sich schließen, dass schon das C-terminale Arg-Gly-Thr-Motiv essenziell für die Bindung zu Paxillin ist. Die gleichzeitige Interaktion dieser Sequenz mit der SH3-Domäne von Src deutet darauf hin, dass auch hier ein komplexer Bindungsmodus vorliegt, der das *outside-in signaling* direkt beeinflusst. Da Pulldown-Assays eine höhere Affinität zum Kollagen-Rezeptor Integrin- β 1 gezeigt haben, wurde auch diese Interaktion NMR-spektroskopisch auf Bindungsmuster und Affinität zu Paxillin untersucht. Während nachgewiesen werden konnte, dass dieses Peptid mit einer fast zehnfach höheren Affinität mit Paxillins flexiblem Loop interagiert, konnte bei Integrin- β 1 ein anderes Bindungsmotiv (Tyr-783 bis Thr-789), welches nicht am C-Terminus liegt, identifiziert werden.

Final wurden zwei Paxillin-Mutanten biotechnologisch mit dem Ziel hergestellt, bei gleichbleibender Stabilität keine Interaktion mehr mit Integrin- β 3 zu zeigen, um Kenntnisse über einen möglichen kooperativen Bindungsmodus mit Kindlin-2 zu liefern. Jedoch bestätigten sowohl CD- als auch NMR-Spektroskopie, dass diese Mutationen (FVNGSFF \rightarrow GAGNG/SGSGSGS) die Sekundär- und Tertiärstruktur der LIM3-Domäne destabilisierten und das Fehlen des flexiblen Loops eine partielle Denaturierung des Proteins zur Folge hatte. Aktuelle Forschungsergebnisse in unserer Arbeitsgruppe zeigten primär die drei aromatischen Aminosäuren (Phe-475, Phe-480 und Phe-481) als strukturelevant, weshalb eine FAAAAFF-Mutante hergestellt wurde, die bisher vielversprechende Ergebnisse in NMR-Bindungsstudien zeigt.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nur ein optimiertes Reinigungsprotokoll für zukünftige Studien mit der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 erstellt werden, sondern es konnten auch über Deletionsstudien auf präzise Weise Reste der Integrin-Paxillin-Bindung identifiziert werden. Weiterhin erfolgten vergleichende Bindungsstudien mit dem verwandten Integrin- β 1-Peptid, welche interessanterweise ein anderes bevorzugtes Bindungsmotiv zeigten. Die Ergebnisse erweitern also die aktuellen Kenntnisse über die Bindungsmodi zwischen diesen Proteinen, was Aufschlüsse über deren Interaktionen untereinander und Erklärungen für das gleichzeitige Binden an weitere fokale Adhäsionsproteine wie Kindlin oder Talin darstellt.

10 Experimentalteil

10.1 Geräteliste

Tabelle 2 | Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Verwendung	Gerät	Software & Spezifikation	Firma
PCR	Biometra TAdvanced	-	analytikjena
Transformation	Thermomixer C	1,5 mL Aufsatz	Eppendorf
Inkubation	Universalwärmeschrank	Modell 100 - 800	Memmert
Kultivierung	Ecotron	-	Infors HT
Kultivierung	Multitron Pro	-	Infors HT
Zentrifugation	Heraeus Multifuge 1L-R	<i>Rotor:</i> Sorvall Ch. 7595	Thermo Scientific
Zentrifugation	Avanti J-30I	<i>Rotor:</i> JLA 9.1000	Beckman Coulter
Ultra-zentrifugation	Avanti J-30I	<i>Rotor:</i> JA 30.50	Beckman Coulter
SDS-PAGE	PowerPac HC	-	Bio-Rad
Zellaufschluss	Emulsiflex C3	-	Avestin
HPLC	Agilent 1260 System	<i>Säule:</i> RP-C ₁₈ Poroshell 120	Agilent
FPLC	Äkta Purifier	UNICORN 5.31, HisTrap HP 5 HiLoad 16/600 Superdex 30&75	GE Healthcare

10 - Experimentalteil

Verwendung	Gerät	Software / Spezifikation	Firma
UV/Vis-Spektroskopie	Cary 50 Photometer	WinUV	Varian
CD-Spektroskopie	J-815	-	Jasco
Massen-spektrometrie	ESI-Q-TOF maXis	DataAnalysis 4.2, Biotools	Bruker
NMR-Spektroskopie	Avance NEO 500 MHz Avance III 600 MHz	TopSpin 2.1, 3.6 und 4.0 5 mm BBI mit Z-Gradient, 5 mm TXI-H/C/N mit Z-Gradient, 5 mm TCI-H/C/N CryoProbe Prodigy	Bruker

10.2 Chemikalienliste

Tabelle 3 | Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Bestellnummer	Firma
1,4-Dithiothreitol	≥99 %	A1101.0025	VWR
100x BME Vitamine	k.A.	B6891	Sigma-Aldrich
10X Ligase-Puffer	≥98 %	B0202S	New England Biolabs
¹⁵N-Ammoniumchlorid	≥99 %	299251	Sigma-Aldrich
¹⁵N-Celton	98 %	CGM-1030P-N-PK	Cambridge Isotope Laboratories
2-Oxo-3-¹³C-Methyl- butansäurehydrat-4-¹³C	98 %	CLM-6821	Cambridge Isotope Laboratories
2-Oxobutansäurehydrat-4-¹³C	98 %	CLM-6820	Cambridge Isotope Laboratories
4-(2-Aminoethyl)benzol- sulfonylfluorid	≥98 %	2931	Carl Roth
Acetonitril	HPLC-Reinheit	83639.320	VWR
Acrylamid	≥98 %	7871.2	Carl Roth
Adenosintriphosphat	≥98 %	HN35	Carl Roth
Agar	Biologische Reinheit	A0949	AppliChem
Ammoniumperoxodisulfat	≥98 %	9592	Carl Roth
Ammoniumsulfat	≥99.5 %	3746	Carl Roth
Broad Range Standardmarker	k.A.	1610317	Bio-Rad
Bromphenolblau	k.A.	151350050	Acros Organics
Calciumchlorid-Dihydrat	≥99 %	31307	Riedel-de Haen
Cellobiose	≥99 %	22150	Fluka
Cellohexaose	≥95 %	O-CHE	Megazyme
Cellotetraose	≥90 %	O-CTE	Megazyme
Coomassie Brilliant Blau	k.A.	9598	Carl Roth
Deuteriumoxid	99 %	D216L	Eurisotop

Chemikalie	Reinheit	Bestellnummer	Firma
Dimethylsulfoxid	99.5 %	A994	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	≥98 %	T876	Carl-Roth
DNaseI	k.A.	DN25	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat	≥99 %	8043	Carl Roth
Glucose-Monohydrat	≥99.5 %	6780	Carl Roth
Glycerol, 86 %	≥98 %	4043	Carl Roth
Harnstoff	≥99.5 %	X999	Carl Roth
Hefeextrakt	Biologische Reinheit	2904	Carl Roth
Imidazol	≥99 %	X998	Carl Roth
Kaliumchlorid	≥99.5 %	6781	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	≥99 %	30407	Riedel-de Haen
Kanamycin	≥88 %	T832	Carl Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	99 %	197530010	Acros Organics
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	≥99 %	T888	Carl Roth
Methanol	≥99 %	8388	Carl Roth
Methansäure	HPLC-Reinheit	9676	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin	99 %	2367.3	Carl Roth
N,N-Methylenbisacrylamid	≥98 %	7867	Carl Roth
Natriumchlorid	≥99.5 %	3957.1	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	≥99 %	T879	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	≥99 %	CN30	Carl Roth
Natriumhydroxid	≥99 %	6771	Carl Roth
Natriumtrimethylsilyl- propansulfonat	97%	178837	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Biologische Reinheit	9079	Carl Roth
Polyethylenglycol	Biologische Reinheit	81253	Sigma-Aldrich

Chemikalie	Reinheit	Bestellnummer	Firma
Polynukleotidkinase	k.A.	M0201S	New England Biolabs
Q5 Hot Start Polymerase	k.A.	M0493S	New England Biolabs
Roche cOmplete™	k.A.	04693132001	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitoren, EDTA-frei			
Roti-Mark Standard	k.A.	X879	Carl Roth
SIGMAFAST™	k.A.	S8830	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitoren, EDTA-frei			
T4 Ligase	≥98 %	M0202S	New England Biolabs
Tricin	≥99 %	6977	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	≥99 %	AE15	Carl Roth
Trypton	Biologische Reinheit	8952.2	Carl Roth
Tween® 20	k.A.	9127	Carl Roth
Zinksulfat-Monohydrat	≥99 %	96495	Sigma-Aldrich

10.3 Verwendete Nährmedien

- LB-Medium [388]:** 5 g/L Hefeextrakt
10 g/L NaCl
10 g/L Trypton
Sterilisation bei 121 °C
Antibiotikum (steril filtriert)
10 mM Glucose (steril filtriert)
- LB-Agarplatten:** siehe LB-Medium
15 g/L Agar
Sterilisation bei 121 °C
Antibiotikum (steril filtriert)
10 mM Glucose (steril filtriert)
- M9-Minimalmedium:** 1 g/L NaCl
3 g/L KH₂PO₄
6 g/L Na₂HPO₄
1 g/L ¹⁵NH₄Cl
mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt
Sterilisation bei 121 °C
Antibiotikum (steril filtriert)
20 mM Glucose (steril filtriert)
2 mM MgCl₂ (steril filtriert)
0.1 mM CaCl₂ (steril filtriert)
10 mL/L 100x BME-Vitamine
100 mg/L ¹⁵N-Celtone
Zugabe 1 Stunde vor Induktion bei ILV-Markierung:
60 mg/L 2-Oxobutansäurehydrat-4-¹³C
100 mg/L 2-Oxo-3-¹³C-Methyl-butansäurehydrat-4-¹³C

Bei den Paxillin-Konstrukten wurden allen Medien zusätzlich 0.1 mM ZnSO₄ zugesetzt.

10.4 Ortsspezifische Mutagenese

Für die Erstellung der Paxillin LIM2/3 SGGSGS Mutante wurde die Methode der ortsspezifischen Mutagenese angewendet. Dazu wurden zuerst die Vorwärts- und Rückwärtsprimer kreiert, sodass sie bestimmte Voraussetzungen erfüllen (siehe Tabelle 4). Sie sollten zwischen 25 und 45 Nukleotide lang sein, es sollten nicht mehr als drei aufeinanderfolgende Guanin- oder Cytosinbasen am 3'-Ende auftreten, die Schmelztemperatur T_m der komplementären Bereiche sollte zwischen 50 und 72 °C (Kontrolle durch NEB Tm Calculator [389]) und der Guanin/Cytosin-Gehalt zwischen 40 und 60 % liegen.

Tabelle 4 | Verwendete Primer für Mutagenese von Paxillin LIM2/3 WT zu Paxillin LIM2/3 SGGSGS. Unterstrichene Nukleotide sind neu in die Sequenz eingefügt. Hybridisierungstemperatur bei allen verwendeten Primern war 72 °C.

Primer für die Mutagenese von Paxillin LIM2/3 WT zu Paxillin LIM2/3 SGGSGS	
Vorwärtsprimer	<u>ttcaggtag</u> CGAGCACGACGGGCAGCC
Rückwärtsprimer	<u>ccgctaccgct</u> TGGCGTGAAGCATTCCCGGCAC
Primer für das Einfügen der fehlenden Basen Adenin	
Vorwärtsprimer	<u>a</u> GCGGTAGCGGTTCAGGTAGCGAG
Rückwärtsprimer	TGGCGTGAAGCATTCCCGGCAC

Tabelle 5 | Protokoll der Primer-Phosphorylierung

Reagenz	V [μ L]
Autoklaviertes Wasser	18.5
10x T4 PNK Puffer	2.5
100 μM Vorwärtsprimer	0.5
100 μM Rückwärtsprimer	0.5
10 mM ATP	2.5
T4 PNK	0.5
Schritt 1: 30 min bei 37 °C	
Schritt 2: 20 min bei 65 °C	
Biometra TAdvanced (analytik jena)	

Weiterhin wurden die Primer auf mögliche Dimerisationsprodukte und auf weitere Bindungsstellen in der Templat-DNA überprüft (Kontrolle durch IDT Oligo DNA Analyzer [390] und ExPASy DNA Align Tool [391]). Die Primer wurden bei der Firma *Merck* bestellt und mussten vor der PCR-Reaktion zuerst phosphoryliert werden (siehe Tabelle 5). Als nächstes erfolgte die Amplifizierung mittels der Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, welche durch die Fusion mit einer Prozessivität-verstärkenden Sso7d-DNA-Bindedomäne neben einer sehr geringen Fehlerrate auch eine hohe und akkurate Replikationsrate besitzt. Als Templat-DNA wurde das Paxillin LIM2/3-Plasmid verwendet. Die Elongationszeiten waren abhängig von der verwendeten DNA-Länge. Die verwendeten Reagenzien sowie das PCR-Protokoll sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6 | Protokoll der Polymerase-Kettenreaktion

Reagenz	V [μ L]
Autoklaviertes Wasser	25.0
5x Q5 Reaktionspuffer	10.0
10 mM dNTPS	1.0
2 μM Primer-Mix	12.5
Templat-DNA (insgesamt ca. 1 ng)	1.0
Q5 Hot Start Polymerase	0.5
Schritt 1: 30 s bei 98 °C	
Schritt 2: 10 s bei 98 °C	
Schritt 3: 20 s bei 72 °C	
Schritt 4: 180 s bei 72 °C	
30 Wiederholungen von Schritt 2 – 4	
Schritt 5: 120 s bei 72 °C	
Biometra TAdvanced (analytik jena)	

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit Hilfe des Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kits (*New England Biolabs*). Die DNA wurde mit 13 μ L Elutionspuffer eluiert und es wurde mit Hilfe einer TrayCell Küvette (Typ 105.800, *Hellma[®]Analytiks*) mittels UV/Vis-Spektroskopie die Konzentration durch Absorption bei 260 nm und die Reinheit durch die Absorptionsverhältnisse von 260/280- und 230/260 nm für spätere Verwendungen bestimmt. Für die anschließende

Ligation der linearen DNA wurden alle Reagenzien (siehe Tabelle 7) zusammengegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 7 | Protokoll der Ligation

Reagenz	V [μ L]
Autoklaviertes Wasser	4.5
10x T4 Ligase Puffer	1.0
25 % PEG	2.0
1 mM ATP	1.0
PCR-Produkt (25 ng)	1.0
T4 Ligase	0.5
10 min bei 25 °C	

10.5 Transformation

Für die Transformation der Plasmide wurden zuerst 50 μ L kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 0.5 – 2 μ L Plasmid hinzugegeben, sanft resuspendiert und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde für 30 s einem Hitzeschock von 42 °C im Thermomixer ausgesetzt. Es folgte für 2 min eine Inkubation auf Eis und danach wurden 500 μ L vorgewärmtes LB-Medium (siehe Kapitel 10.3, kein Antibiotikum) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 60 min bei 37 °C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Lösung wurde auf vorgewärmte Agar-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden separierte Kolonien gepickt und für 5 mL-Vorkulturen verwendet. Aus diesen konnten dann nach einem weiteren Tag Inkubation (siehe Kapitel 10.7.1) Kryokulturen hergestellt werden (920 μ L Vorkultur + 80 μ L DMSO, schockfrieren in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -80 °C) und Plasmide für eine Sequenzierung isoliert werden (siehe Kapitel 10.6).

10.6 Plasmidsequenzierung

Bevor die DNA-Sequenz mittels Sanger-Methode bestimmt werden konnte, musste das Plasmid aus den *E. coli*-Zellen isoliert werden. Dafür wurde eine 5 mL-Vorkultur genutzt und das Protokoll entweder von *Qiagen* mit dem dazugehörigen *QIAprep Spin Miniprep Kit* oder von *New England*

BioLabs[®] mit dem dazugehörigen *Monarch*[®] *Plasmid Miniprep Kit* verwendet. Die Sequenzierung der aufgereinigten Plasmide wurde von der Firma *Eurofins Scientific SE* durchgeführt. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz erfolgte durch Kapillarelektrophorese von fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten an einem ABI 3730XL Gerät. Es wurden die von *Eurofins Scientific SE* angebotenen Standardprimer verwendet.

10.7 Proteinexpression

10.7.1 Cbh9A CBM3b^{WT} und Cbh9A CBM3b^{N126W}

Die Expression der Proteine Cbh9A CBM3b^{WT} und Cbh9A CBM3b^{N126W} erfolgte nach dem Protokoll von Jindou *et al.* [189]. Beide Proteine wurden analog mit einem His₆-Tag exprimiert und gereinigt. *E. coli* Tuner(DE3) Zellen dienten als Host für das Plasmid pET-28a. Einer durch bereits aus vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe „Analytische Chemie“ von Prof. H. M. Möller bestehenden Kryokultur wurde eine Probe entnommen, welche für die Vorkultur genutzt wurde. Die Vorkultur (LB-Medium, 10 mM Glucose und 50 µg/mL Kanamycin) wurde bei 37 °C und 160 rpm über Nacht geschüttelt und anschließend 10 min bei 5.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet mit frischem Medium (LB-Medium oder M9-Medium) resuspendiert und anschließend in die Hauptkultur (LB-Medium oder M9-Medium) überführt. Die Zellen wurden weiterhin bei 37 °C inokuliert, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0.6-0.8 erreicht war. Bei der ILV-Markierung der Proteine wurden bei einem OD₆₀₀-Wert von 0.4 zusätzlich 2-Oxobutansäurehydrat-4-¹³C (Natriumsalz) und 2-Oxo-3-¹³C-Methyl-butansäurehydrat-4-¹³C (Natriumsalz) hinzugegeben [64, 392]. Die Induktion der Expression erfolgte durch IPTG, welches zu einer Zielkonzentration von 1 mM dazugegeben wurde. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei 37 °C und 110 rpm geschüttelt und am nächsten Tag für 15 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde entweder direkt für den darauffolgenden Aufschluss verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

10.7.2 Integrin- und Paxillin-Konstrukte

Die Expressionsabläufe der Integrin- und Paxillin-Konstrukte erfolgten nahezu analog zu dem in Kapitel 10.7.1 beschriebenen Protokoll. Die dazugehörigen Zellstämme, Plasmide und die Expressionsbedingungen für alle Proteine sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8 | Übersicht über alle verwendeten Konstrukte und deren Expressionsbedingungen

Protein	Stamm	Vektor	Tag	C _{IPTG} [mM]	t [h]	T [°C]
Cbh9A CBM3b^{WT}	Tuner(DE3)	pET-28a	His ₆	1.00	16	37
Cbh9A CBM3b^{N126W}	Tuner(DE3)	pET-28a	His ₆	1.00	16	37
Integrin-β1	Tuner(DE3)	pET-24a	His ₆ -SUMO	1.00	16	30
Integrin-β3	BL21(DE3)	pET-24a	His ₆ -SUMO	0.50	5 – 7	30
Integrin-β3ΔRGT	Tuner(DE3)	pET-24a	His ₆ -SUMO	0.50	5 – 7	30
Paxillin LIM3	BL21(DE3)	pET-24a	His ₆ -SUMO	0.50	5 – 7	30
Paxillin LIM2/3	BL21(DE3)	pET-24a	His ₆ -SUMO	0.50	5 – 7	30
Paxillin LIM2/3 GAGNG	Tuner(DE3)	pET-24a	His ₆ -SUMO	0.50	5 – 7	30
Paxillin LIM2/3 SGSGSGS	Tuner(DE3)	pET-24a	His ₆ -SUMO	0.50	5 – 7	30

10.8 Proteinreinigung

10.8.1 SDS-PAGE

Um sowohl den Erfolg der Expression als auch die Qualität der Proteinreinigung kontrollieren zu können, wurden von den entsprechenden Proben jeweils 10 µL entnommen und für eine SDS-PAGE nach U. Laemmli verwendet [393]. In dieser Arbeit wurde mit der Tricin-SDS-PAGE-Methode nach H. Schägger gearbeitet [394]. Die Proben wurden mit 10 µL Ladebuffer (siehe Tabelle 9) vermischt und für 10 min bei 95 °C im Thermomixer denaturiert (Eppendorf). Die Lösungen wurden auf ein 10 %iges Gel (siehe Tabelle 10) aufgetragen und dann 40 min bei 15 W getrennt (Spannung und Stromstärke wurden durch das Gerät reguliert, um die Zielleistung zu erhalten, PowerPac HC, *Bio-Rad*). Dabei war im Inneren der Elektrophoresekammer der Kathodenpuffer, während sich im äußeren Raum der Anodenpuffer befand (siehe Tabelle 9). Als Größenreferenzierung wurden neben den Proben auch 5 µL eines Standards mit

Molekulargewichten bekannter Größe aufgetragen (Broad Range Marker von Roti®-Mark oder Bio-Rad, siehe Abbildung 38). Nach der Elektrophorese wurden die Gele bei zeitnah benötigten Ergebnissen mit der Imidazol-Zink-Methode gefärbt [395]. Dabei wurden sie zunächst in Wasser gegeben, anschließend für 5 - 10 min in einer 0.2 M Imidazol-Lösung geschwenkt und danach in einer 0.3 M Zinkchlorid-Lösung gegen einen schwarzen Hintergrund gefärbt, da die Banden weiß erschienen. Die Gele konnten dann mit 2 %iger Zitronensäure entfärbt und anschließend, bei Bedarf, über Nacht mit kolloidaler Blue Silver Stain-Lösung (20 % v/v Methanol, 10 % v/v Phosphorsäure, 10 % w/v Ammoniumsulfat, 0.12 w/v Coomassie-Brilliant-Blau G-250) gefärbt werden [396]. Die Entfärbung erfolgte mit VE-Wasser.

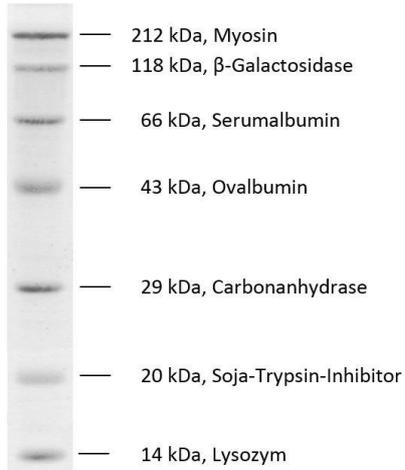
Tabelle 9 | Verwendete Puffer in der Tricin-SDS-PAGE

Chemikalie	Ladepuffer	3x Gelpuffer	Kathodenpuffer	Anodenpuffer
Bromphenolblau (w/v)	0.04 %	-	-	-
DTT (w/v)	2.00 %	-	-	-
EDTA	25 mM	-	-	-
Glycerol (w/v)	20.00 %	-	-	-
SDS (w/v)	4.00 %	4.00 %	1.00 %	-
TRIS	100 mM	300 mM	100 mM	100 mM
Tricin	-	-	100 mM	-
pH	6.80	8.45	8.25	8.90

Tabelle 10 | Zusammensetzung der 10 %igen SDS-PAGE-Gele

Chemikalie	Sammelgel	Trenngel
30 % AB-3 (97 % Acrylamid + 3 % N, N'-Methylenbisacrylamid)	400 µL	2000 µL
3x Gelpuffer	750 µL	1000 µL
60 % Glycerol in H₂O	-	1000 µL
VE-Wasser	2000 µL	1000 µL
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	20 µL	30 µL
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin	2 µL	3 µL

Roti®-Mark Broad Range Marker



Bio-Rad Broad Range Marker

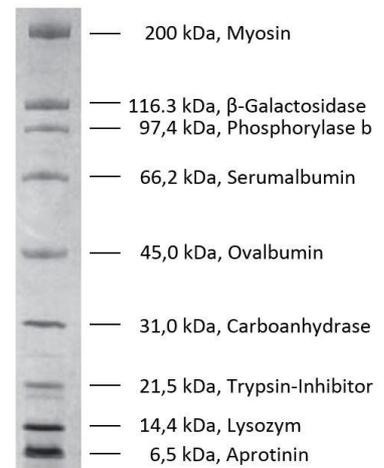


Abbildung 38 | Molekulargewichte der verwendeten Größenmarker für die SDS-PAGE

10.8.2 Zellaufschluss

Um das Zielprotein isolieren zu können, wurden zuerst die gefrorenen Zellpellets auf Eis aufgetaut und anschließend mit Lysepuffer im Verhältnis 1:5 (w/v) resuspendiert (Zusammensetzungen aller Lysepuffer siehe Tabelle 11). Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe des Potter-Elvehjem-Verfahrens [397]. Der Zellaufschluss wurde mit einem Hochdruck-Homogenisator Emulsiflex-C3 (*Avestin*) für drei Minuten bei 1.500 bar durchgeführt. Für die Separation der löslichen von den unlöslichen Zellbestandteilen wurde das Zelllysate bei 100.000 x g und 4 °C für 20 Minuten ultrazentrifugiert (*Beckman Coulter Avanti J-30I* mit JA 30.50 Ti Rotor). Der Überstand wurde mittels eines 0.45 μ M Polyester-Filters mit Glasfaservorfilter (*Chromafil®*) steril filtriert.

Tabelle 11 | Zusammensetzung der Lysepuffer

Chemikalie	CBM-Konstrukte	Integrin-β1	Integrin-β3	Paxillin-Konstrukte
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM
TRIS	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
ZnSO₄	-	-	-	0.1 mM
DTT	-	-	-	2 mM
SIGMAFAST™	1:10 (v/v)	1:10 (v/v)	1:10 (v/v)	1:10 (v/v)
AEBSF	-	-	2 mM	-
DNase I	Spatelspitze	-	-	Spatelspitze
0.5 M MgCl₂	1:100 (v/v)	-	-	1:100 (v/v)
0.1 M CaCl₂	1:100 (v/v)	-	-	1:100 (v/v)
pH	7.5	8.0	8.0	8.0

10.8.3 Chromatographische Reinigung

Für die Proteinreinigung wurde ein Äkta Purifier System von *GE Healthcare* verwendet. Bei allen Reinigungsschritten wurde die UV-Absorption bei 280 nm beobachtet. Die benutzten Puffer für die einzelnen Reinigungen befinden sich in Tabelle 12 bis

Tabelle 14. Für die Kontrolle der Aufreinigungsqualität der einzelnen Reinigungsschritte wurde anschließend eine SDS-PAGE (siehe Kapitel 10.8.1) durchgeführt. Dafür wurden Proben von 10 µL des aufgetragenen Zellysats, des Durchflusses der ersten Affinitätschromatographie sowie allen proteinenthaltenden Fraktionen der Reinigungsschritte entnommen und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mithilfe des Lambert-Beer-Gesetzes errechnet [398]:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Glg. 9}$$

A = Absorption (bestimmt bei 280 nm mit Cary 50 Photometer, *Varian*), ε = Molarer Extinktionskoeffizient (bestimmt unter Zunahme der Aminosäuresequenz mit ExPASy ProtParam tool [385]), c = Konzentration, d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

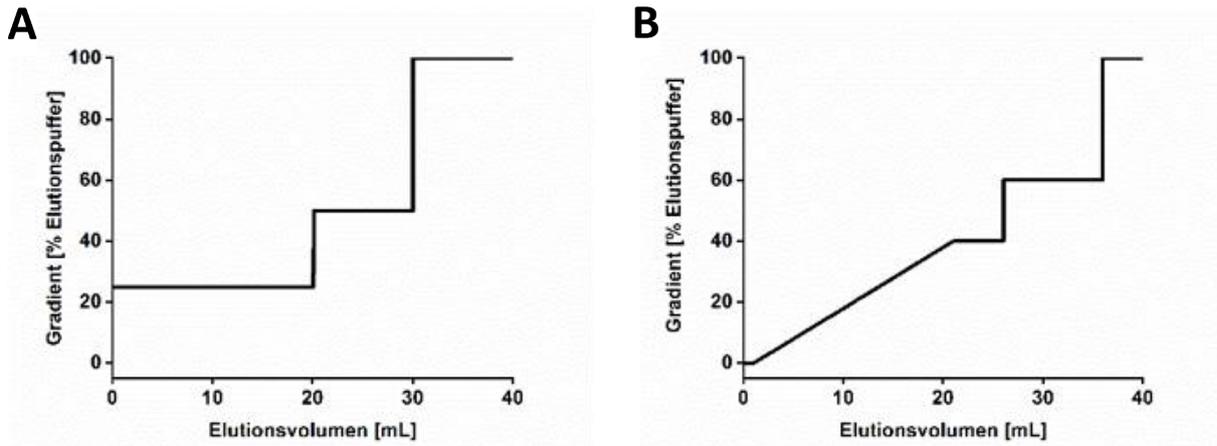


Abbildung 39 | Elutionsgradienten der ersten Affinitätschromatographie der A) CBM-Konstrukte und B) der Integrin- und Paxillin-Konstrukte.

Da alle verwendeten Konstrukte mit einem His₆-Tag versehen waren, wurden die steril filtrierten Zelllysate nach dem Aufschluss mit einer Flussrate von 2 mL/min auf eine mit Laufpuffer equilibrierte HisTrap HP-Säule (*GE Healthcare*) geladen. Die Säule wurde daraufhin so lange mit Laufpuffer gespült, bis ein konstantes UV-Signal erreicht war. Anschließend wurden die CBM-Konstrukte mittels eines Imidazol-Stufengradienten eluiert. Bei den weiteren Konstrukten wurde ein teilweise linearer Imidazol-Gradient verwendet (siehe Abbildung 39).

Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und für den proteolytischen Verdau über Nacht auf das vierfache Volumen mit Laufpuffer verdünnt. Für die Abspaltung des His₆-Tags der CBM-Konstrukte wurde Thrombin (1 mg pro 10 mg Protein) und für alle weiteren Konstrukte mit His₆-SUMO-Tag ULP1 (0,4 mg) und eine Spatelspitze DTT verwendet. Durch eine zweite Affinitätschromatographie konnte das native vom ungeschnittenen Protein sowie den Proteasen und den Fusionspartnern separiert werden. Es erfolgte eine Aufkonzentration der Probe auf 2 bis 3 mL mithilfe einer Amicon-15-Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussgrenze 3 kDa, *Merck*), damit anschließend die Probe mit 1 mL/min auf eine zuvor mit GPC-Puffer equilibrierte HiLoad 16/600 Superdex-Säule (*GE Healthcare*) geladen und gleichzeitig eluiert werden konnte. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden erneut vereint und entweder zur direkten weiteren Verwendung mit einer Amicon-4-Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussgrenze 3 kDa, *Merck*) aufkonzentriert oder bei 4 °C (Kurzzeit) / - 80 °C (Langzeit) gelagert.

Tabelle 12 | Zusammensetzung der Reinigungspuffer für die CBM-Konstrukte

Chemikalie	Laufpuffer	Elutionspuffer	GPC-Puffer
NaCl	300 mM	300 mM	150 mM
TRIS	50 mM	50 mM	-
Na₂HPO₄	-	-	50 mM
Imidazol	-	500 mM	-
pH	7.5	7.5	6.5

Tabelle 13 | Zusammensetzung der Reinigungspuffer für die Integrin-Konstrukte

Chemikalie	Laufpuffer	Elutionspuffer	GPC-Puffer
NaCl	300 mM	300 mM	150 mM
TRIS	50 mM	50 mM	-
Na₂HPO₄	-	-	50 mM
Imidazol	-	500 mM	-
pH	8.0	8.0	7.5

Tabelle 14 | Zusammensetzung der Reinigungspuffer für die Paxillin-Konstrukte

Chemikalie	Laufpuffer	Elutionspuffer	GPC-Puffer
NaCl	300 mM	300 mM	150 mM
TRIS	50 mM	50 mM	-
Na₂HPO₄	-	-	50 mM
ZnSO₄ (nur Paxillin-Konstrukte)	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM
DTT	2 mM	2 mM	2 mM
Imidazol	-	500 mM	-
pH	8.0	8.0	7.5

10.9 Synthese der Protein-Polymer-Konjugate

Alle Synthesen der hier vorgestellten Protein-Polymer-Konjugate wurden von Frau M. Sc. Maria Mathieu-Gaedke in der Arbeitsgruppe „Polymermaterialien und Polymertechnologien“ von Prof. Alexander Böker am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung (Fraunhofer IAP) in Golm durchgeführt.

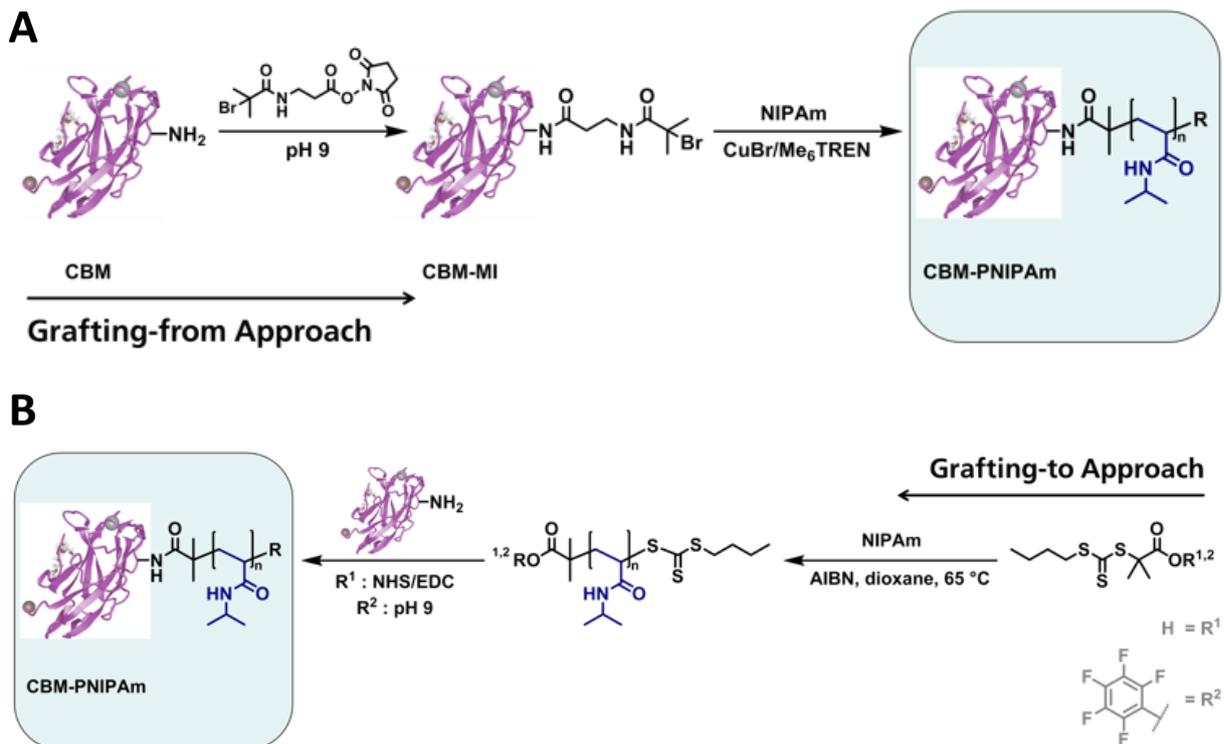


Abbildung 40 | Allgemeines Schema über die verwendeten Synthesen der Protein-Polymer-Konjugate von Frau M. Sc. Maria Mathieu-Gaedke. A) *grafting from* Methode. B) *grafting to* Methode.

10.9.1 Synthese des Makroinitiators (CBM-MI)

N-2-bromo-2-methylpropanoyl- β -alanine *N'*-oxysuccinimide ester (NHS-BiBa) wurde nach der Methode von Murata *et al.* synthetisiert [399]. Aufgereinigtes Cbh9A CBM3b^{N126W} in GPC-Puffer wurde mit 0.1 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer (pH 10.0) auf einen pH-Wert von 9.0 eingestellt. Anschließend wurde NHS-BiBa im 25-fachen Überschuss pro Lysin (10 vorhandene Lysine in Cbh9A CBM3b^{N126W}) zur Proteinlösung gegeben und bei 20 °C für 4 h gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels Dialyse (3.5 kDa Ausschlussgrenze) gegen GPC-Puffer gereinigt.

10.9.2 Synthese der CBM-PNIPAm-Konjugate via *grafting-from*

Eine Lösung von CBM-MI wurde zusammen mit N-Isopropylacrylamid (NIPAm) in einen Schlenk-Kolben gegeben, verschlossen und für 30 min mit Stickstoff gespült. Parallel wurde in einem zweiten Schlenk-Kolben die Prozedur mit Kupferbromid (CuBr) und Tris(2-dimethylaminoethyl)amin (Me₆TREN) in Phosphatpuffer (pH 7.4) durchgeführt. Das Verhältnis der Reaktionspartner Lysin:Monomer:CuBr:Me₆TREN betrug 1:100:7:10 bzw. 1:10:7:10, abhängig von der gewünschten Kettenlänge. Die Polymerisation wurde durch Zugabe der CBM-MI/Monomer-Lösung zur Katalysator/Ligand-Lösung mittels Spritze initiiert und für eine weitere Stunde bei 0 °C rühren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels Dialyse (3.5 kDa Ausschlussgrenze) gegen GPC-Puffer gereinigt.

10.9.3 Synthese der CBM-PNIPAm-Konjugate via *grafting-to*

PFP-funktionalisiertes RAFT-CTA wurde nach der Methode nach Wang *et al.* und Haridharan *et al.* synthetisiert [400, 401]. Die Polymerisation wurde in 1,4-Dioxan mit AIBN als Initiator für 2.5 h bei 70 °C unter inerten Bedingungen durchgeführt. Je nach gewünschter Kettenlänge wurden Verhältnisse von NIPAm:CTA:AIBN von 10:1:0.1 oder 100:1:0.1 verwendet. Nach erfolgreicher Polymerisation wurde das Polymer in kaltem Diethylether präzipitiert und im Vakuum getrocknet. Für die Konjugation an Cbh9A CBM3b^{N126W} wurden das Protein und PFP-PNIPAm in GPC-Puffer mit einem pH-Wert von 7.4, 8.2 oder 9.0 gelöst. Das Verhältnis von Protein:Polymer wurde bei 1:50 gehalten und die Lösung wurde zu einer Zielkonzentration von 0.5 mg/mL verdünnt. Nachdem die Reaktionsmischung über Nacht bei 12 °C rührte, wurde sie zentrifugiert, um festes überschüssiges Polymer abzutrennen und anschließend mittels eines 0.22 µM Polyvinylidenfluorid-Spritzenfilters (PVDF) filtriert. Es erfolgte ein finaler Reinigungsschritt mittels Gelpermeationschromatographie.

10.10 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem J-815 CD-Spektrometer der Firma Jasco aufgenommen. Die Proben wurden mittels einer Amicon-4-Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussgrenze 3 kDa, *Merck*) in einen Puffer mit einer geringeren Salzkonzentration umgepuffert (50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.5). Die Probenkonzentration wurde auf 1 mg/mL eingestellt. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt und es wurden 0.1 mm Küvetten genutzt bei einem gewählten Aufnahmebereich von 180 bis 250 nm.

10.11 Massenspektrometrie

10.11.1 Probenpräparation

Für die ESI-MS- und ESI-MSMS-Messungen wurden die Proben mittels einer ZipTip_{C18}-Pipettenspitze (*Merck*) entsalzt. Dazu wurde die Spitze zuerst mit viermal 10 µL Acetonitril equilibriert und zehnmals mit 10 µL 1 %iger Methansäure gewaschen. Danach wurden 10 µL der Probe (Gesamtvolumen 25 µL) zehnmals immer wieder zur Beladung der C₁₈-Säule aufgezogen, und die Säule wurde erneut zehnmals mit 1 %iger Methansäure gewaschen. Final wurde das Protein mit der Elutionslösung (1 % HCOOH, 50 % CH₃CN in ddH₂O) von der Säule eluiert (zehnmals in 5 µL) und somit auf die fünffache Konzentration gebracht.

10.11.2 ESI-MS/ESI-MSMS

Alle ESI-MS-Spektren wurden mittels eines maXis ESI-Q-TOF Massenspektrometers (*Bruker Daltonics*) mit der positiven Elektrospray-Ionisations-Methode gemessen. Die angelegte Kapillarspannung betrug 4 kV, die Quelltemperatur lag bei 80 °C und die Desolvatationstemperatur bei 180 °C. Das Desolvatationsgas (Stickstoff) wurde bei einer Flussrate von 4 L/min auf 180 °C erhitzt. Als Referenzsubstanz wurde APCI tuning mix (*Agilent*) bei einer Auflösung von 30.000 verwendet. Die Messbedingungen wurden für jede Probe optimiert und anschließend konnten Massenspektren aufgenommen werden. Diese wurden zur Bestimmung der intakten Proteingewichte und idealen *m/z*-Werte für die CID-Fragmentierung (kollisionsinduzierte Dissoziation) genutzt. Nach Auswahl eines spezifischen

Ladungszustandes als Vorläufer-Ion für die Experimente wurden Einstellungen für ein optimales Fragmentationsmuster mit einer hohen Anzahl an MS² Fragment-Ionen gewählt. Das Vorläufer-Ion wurde im CID-Modus mit einer Kollisionsenergie zwischen 10 – 200 eV aktiviert, bis die gewünschte relative Häufigkeit für die Detektion der b- und y-Ionen erreicht war. Die mehrfach geladenen Peptid-Ionen wurden als Vorläufer-Ionen für den entsprechenden Massenbereich gewählt. Die MS/MS-Spektren wurden über 16 Messungen für jeden Kollisionsenergieschritt (0.2 min) gemittelt und drei Mal wiederholt. Die Sequenzen der verschiedenen Peptide (Hydrolyseprodukte, Modifizierungsaddukte) wurden mittels des Sequenz-Editor-Algorithmus der DataAnalysis 4.2 Software (*Bruker*) ausgewertet. Für die Korrelation der MS/MS-Spektren mit den Aminosäure-Sequenzen wurde die Software Biotoools (*Bruker*) genutzt.

10.11.3 HPLC-MS

Für die quantitative Bestimmung von verschiedenen Peptiden in einer Mischung wurde eine Kombination aus Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) an einem Agilent 1260 System (Binäre Pumpe mit Entgaser, Probenwechsler, temperaturkontrollierter Säulenbereich und Multiwellenlängen-Detektor, Software: Hystar, *Agilent*) und Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) an einem maXis ESI-Q-TOF Massenspektrometer (Software: DataAnalysis 4.2, *Bruker Daltonics*) genutzt. 2 µL Probe wurden bei 25 °C mit einer Flussrate von 0.2 µL/min auf eine vorequilibrierte (98 % H₂O, 2 % CH₃CN/0.1 % HCOOH) Umkehrphasen-C₁₈-Säule (Poroshell 120) aufgetragen. Der lineare Gradient startete für 5 min bei 2 % CH₃CN und stieg danach in 17 min auf 100 %. Diese Konzentration wurde für 5 min konstant gehalten, bis sie danach 8 min lang auf 2 % reduziert und schließlich noch für 5 min konstant gehalten wurde. Zwischen den einzelnen Läufen wurde immer ein Blindlauf durchgeführt. Nach der HPLC wurden die Proben mit ESI-MS gemessen. Die Elektrospray-Ionenquelle befand sich im positiven Modus. Die Kapillarspannung betrug 4 kV. Das Desolvatationsgas (Stickstoff) wurde bei einer Flussrate von 8 mL/min auf 180 °C erhitzt.

10.12 NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Experimente wurden an einem Bruker Avance III 600 MHz (Bruker Biospin), ausgestattet mit einem Doppelresonanz-Breitband-Probenkopf mit Z-Gradienten (BBI) oder einem H/C/N-Tripelresonanz-Breitband-Probenkopf mit Z-Gradienten (TXI), oder an einem Bruker Avance NEO 500 MHz, ausgestattet mit einem H/C/N-Tripelresonanz-Kryoprobenkopf Prodigy, durchgeführt. Wenn nicht anders ausgewiesen, wurden alle Spektren bei 25 °C aufgenommen. Für die Aufnahme und Auswertung der Spektren wurde die Software TopSpin (Versionen 2.1, 3.6 oder 4.0, Bruker) und das Programm CARR (Version 1.9.1.5.) genutzt [402]. Die Berechnung der K_d -Werte wurde mit Hilfe der Software OriginPro® 2018b (Version b9.5.5.409, OriginLab®) durchgeführt. Den Proben mit einem Volumen von 550 μ L, welche sich im entsprechenden GPC-Puffer befanden, wurden 5 % D₂O sowie 50 μ M 4,4-Dimethyl-silylpentan-1-sulfonsäure (DSS) als Referenzsubstanz zugesetzt. Die Messungen erfolgten in einem 5 mm NMR-Röhrchen (automatisiertes 1D-Shimming) oder bei sehr geringer Probenkonzentration nach der Aufkonzentration auf 160 μ L in einem 3 mm NMR-Röhrchen (automatisiertes 3D-Shimming) der Firma Deutero. Aufgenommen wurden sowohl eindimensionale ¹H-Spektren (Pulsprogramm: *zgesgp*) als auch zweidimensionale ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren (Pulsprogramm: *hsqcetf3gpsi*) und ¹H-¹³C-HMQC-Spektren (Pulsprogramm: *hmqcetgpsi.2*). Die Anzahl der aufgenommenen Datenpunkte betrug in der ¹H-Dimension 1024 oder 2048 und in der ¹⁵N- bzw ¹³C-Dimension 128 oder 256. Als Aufnahmemodus wurde DQD (*digital quadrature detection*) verwendet und für die Fourier-Transformation erfolgte eine vorwärts lineare Vorhersage komplexer Datenpunkte in der indirekten Dimension. Für die CSP-Experimente wurde zuerst ein ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum der ¹⁵N-markierten Probe als Referenz aufgenommen und anschließend der unmarkierte Partner in definierten Schritten dazu titriert, während nach jedem Titrationsschritt erneut ein Spektrum mit gleichen Messparametern aufgenommen wurde. Für die Untersuchungen an der Calcium-Bindestelle der CBM-Konstrukte wurde den Proben Stammlösungen von EDTA bzw. CaCl₂, gelöst im GPC-Puffer, zugesetzt. Für die Cellulose-Bindestudien wurden kommerziell erhältliche Cellobiose, Cellotetraose und Cellohexaose (*Megazyme*) in GPC-Puffer gelöst verwendet.

11 Literaturverzeichnis

- 1 Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, **230** (4732), 1350–1354.
- 2 Decorte, R. and Cassiman, J.J. (1993) Forensic medicine and the polymerase chain reaction technique. *Journal of medical genetics*, **30** (8), 625–633.
- 3 Kwok, S., Mack, D.H., Mullis, K.B., Poiesz, B., Ehrlich, G., Blair, D., Friedman-Kien, A., Sninsky, J.J. (1987) Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *Journal of Virology*, **61** (5), 1690–1694.
- 4 Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, **239** (4839), 487–491.
- 5 Sharkey, D.J., Scalice, E.R., Christy, K.G., Atwood, S.M., Daiss, J.L. (1994) Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, **12** (5), 506–509.
- 6 Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y.H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE* (62).
- 7 Helling, R.B., Goodman, H.M., Boyer, H.W. (1974) Analysis of Endonuclease R-EcoRI Fragments of DNA from Lambdoid Bacteriophages and Other Viruses by Agarose-Gel Electrophoresis. *Journal of Virology*, **14** (5), 1235–1244.
- 8 Encyclopedia Britannica polymerase chain reaction | Definition & Steps. <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction> (16 November 2021).
- 9 Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, **72** (2), 211–222.
- 10 Stevens, R.C. (2000) Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*, **8** (9), R177-R185.
- 11 Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, **5**, 172.

- 12 Makrides, S.C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, **60** (3), 512–538.
- 13 Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, **10** (5), 411–421.
- 14 Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, **115** (2), 113–128.
- 15 Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, **189** (23), 8746–8749.
- 16 Shiloach, J. and Fass, R. (2005) Growing *E. coli* to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnology advances*, **23** (5), 345–357.
- 17 Pope, B. and Kent, H.M. (1996) High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, **24** (3), 536–537.
- 18 Studier, F. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, **189** (1), 113–130.
- 19 William Studier, F., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990) [6] Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, in *Gene expression technology* (ed D.V. Goeddel), Academic Press, pp. 60–89.
- 20 Dubendorf, J.W. and Studier, F. (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology*, **219** (1), 45–59.
- 21 Grodberg, J. and Dunn, J.J. (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of Bacteriology*, **170** (3), 1245–1253.
- 22 Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual review of genetics*, **30**, 465–506.
- 23 Grossman, T.H., Kawasaki, E.S., Punreddy, S.R., Osburne, M.S. (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*, **209** (1-2), 95–103.
- 24 Tabor, S. (2001) Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. *Current protocols in molecular biology*, **Chapter 16**, Unit16.2.

- 25 Jahanshahi, M. and Najafpour, G. (2007) Advanced Downstream Processing in Biotechnology, in *Biochemical engineering and biotechnology*, 1st edn (ed G.D. Najafpour), Elsevier, Amsterdam, pp. 390–415.
- 26 Riggs, P. (2013) Fusion Protein, in *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Elsevier, pp. 134–135.
- 27 Jacquet, A., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Chaudoir, S., Bollen, A., Biemans, R. (1999) Expression of a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. *Protein expression and purification*, **17** (3), 392–400.
- 28 Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., Terwilliger, T.C. (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, **17** (7), 691–695.
- 29 Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M., Harrison, R.G. (1999) New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, **65** (4), 382–388.
- 30 Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258** (5536), 598–599.
- 31 Jenny, R.J., Mann, K.G., Lundblad, R.L. (2003) A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein expression and purification*, **31** (1), 1–11.
- 32 Hwang, P.M., Pan, J.S., Sykes, B.D. (2014) Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *FEBS letters*, **588** (2), 247–252.
- 33 Asenjo, J.A. and Andrews, B.A. (2009) Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions. *Journal of molecular recognition*, **22** (2), 65–76.
- 34 Lathe, G.H. and Ruthven, C.R. (1955) The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water. *The Biochemical journal*, **60** (4), xxxiv.
- 35 Porath, J. and Flodin, P. (1959) Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, **183** (4676), 1657–1659.
- 36 Ritchie, C. (2012) Protein Purification. *Materials and Methods*, **2**, 134.
- 37 Kinter, M. and Sherman, N.E. (2000) *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- 38 Chapman, J.R. (2000) *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, Humana Press, Totowa, NJ.
- 39 Ashcroft, A.E. (2003) Protein and peptide identification: the rôle of mass spectrometry in proteomics. *Natural product reports*, **20** (2), 202–215.
- 40 Platzner, I.T. (1999) *Modern isotope ratio mass spectrometry*, Wiley, Chichester.

- 41 Becker, J.S. (2007) *Inorganic mass spectrometry: Principles and applications*, John Wiley & Sons, Chichester, England, Hoboken, NJ.
- 42 Ramanathan, R. (2008) *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- 43 Banoub, J.H. and Limbach, P.A. (2019) *Mass Spectrometry of Nucleosides and Nucleic Acids*, CRC PRESS, [S.I.].
- 44 Gross, J.H. (2019) *Massenspektrometrie: Spektroskopiekurs kompakt*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- 45 Lottspeich, F. and Engels, J.W. (eds) (2012) *Bioanalytik*, 3rd edn, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- 46 Wilm, M. (2011) Principles of electrospray ionization. *Molecular & cellular proteomics*, **10** (7), M111.009407.
- 47 Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B. (1968) Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics*, **49** (5), 2240–2249.
- 48 Röllgen, F.W., Bramer-Weger, E., Bütfering, L. (1987) Field Ion Emission from Liquid Solutions: Ion Evaporation against Electrohydrodynamic Disintegration. *Le Journal de Physique Colloques*, **48** (C6), C6-253-C6-256.
- 49 Iribarne, J.V. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, **64** (6), 2287.
- 50 Thomson, B.A. and Iribarne, J.V. (1979) Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics*, **71** (11), 4451–4463.
- 51 Zeleny, J. (1917) Instability of Electrified Liquid Surfaces. *Physical Review*, **10** (1), 1–6.
- 52 Taylor, G.I. (1964) Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London*, **280** (1382), 383–397.
- 53 Carol E. Parker, Viorel Mocanu, Mihaela Mocanu, Nedyalka Dicheva, Maria R. Warren (2010) Mass Spectrometry for Post-Translational Modifications, in *Neuroproteomics* (eds C.E. Parker, V. Mocanu, M. Mocanu, N. Dicheva, M.R. Warren), CRC Press/Taylor & Francis.
- 54 Henzel, W.J., Watanabe, C., Stults, J.T. (2003) Protein identification: The origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **14** (9), 931–942.
- 55 Burlingame, A.L., Boyd, R.K., Gaskell, S.J. (1994) Mass spectrometry. *Analytical chemistry*, **66** (12), 634R-683R.
- 56 All Nobel Prizes. <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes> (17 February 2020).

- 57 Friebolin, H. (2013) *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*, 5th edn, Wiley-VCH-Verl., Weinheim.
- 58 Günther, H. (2013) *NMR spectroscopy: Basic principles, concepts, and applications in chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- 59 Hentschel, K. (1996) Die Entdeckung des Zeeman-Effekts: als Beispiel für das komplexe Wechselspiel von wissenschaftlichen Instrumenten, Experimenten und Theorie. *Physik Journal*, **52** (12), 1232–1235.
- 60 Schmieder, P. (2006) Multidimensional NMR Spectroscopy, in *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 1204–1208.
- 61 Hahn, E.L. and Maxwell, D.E. (1952) Spin Echo Measurements of Nuclear Spin Coupling in Molecules. *Physical Review*, **88** (5), 1070–1084.
- 62 Cavanagh, J. (2007) *Protein NMR spectroscopy: Principles and practice*, 2nd edn, Academic Press, Amsterdam, Boston.
- 63 Bertini, I., McGreevy, K.S., Parigi, G. (2012) *NMR of Biomolecules*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- 64 Tugarinov, V., Kanelis, V., Kay, L.E. (2006) Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nature protocols*, **1** (2), 749–754.
- 65 Bodenhausen, G. and Ruben, D.J. (1980) Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, **69** (1), 185–189.
- 66 Morris, G.A. and Freeman, R. (1979) Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society*, **101** (3), 760–762.
- 67 Kay, L.E., Ikura, M., Tschudin, R., Bax, A. (1990) Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, **89** (3), 496–514.
- 68 Grzesiek, S. and Bax, A. (1992) Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, **96** (2), 432–440.
- 69 Clubb, R.T., Thanabal, V., Wagner, G. (1992) A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ^1HN , ^{15}N , and $^{13}\text{C}'$ chemical shifts in ^{15}N · ^{13}C -labelled proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, **97** (1), 213–217.
- 70 Bax, A. and Ikura, M. (1991) An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and ^{15}N backbone amide resonances with the alpha-carbon of the preceding residue in uniformly $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ enriched proteins. *Journal of biomolecular NMR*, **1** (1), 99–104.

- 71 Grzesiek, S. and Bax, A. (1992) An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, **99** (1), 201–207.
- 72 Grzesiek, S. and Bax, A. (1992) Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *Journal of the American Chemical Society*, **114** (16), 6291–6293.
- 73 Grzesiek, S. and Bax, A. (1993) Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. *Journal of biomolecular NMR*, **3** (2), 185–204.
- 74 Brongniart, A., Guillemin, A., Decaisne, J., van Tieghem, P., Costantin, J., Allorge, P., Blaringhem, L. (1839) *Annales des sciences naturelles: Botanique et biologie végétale*, Masson.
- 75 Montelione, G.T., Lyons, B.A., Emerson, S.D., Tashiro, M. (1992) An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **114** (27), 10974–10975.
- 76 Kay, L.E., Ikura, M., Bax, A. (1990) Proton-proton correlation via carbon-carbon couplings: a three-dimensional NMR approach for the assignment of aliphatic resonances in proteins labeled with carbon-13. *Journal of the American Chemical Society*, **112** (2), 888–889.
- 77 Triple Resonance Backbone Assignment | Protein NMR. <https://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/assignment-theory/triple-resonance-backbone-assignment/> (20 February 2020).
- 78 Masse, J.E. and Keller, R. (2005) AutoLink: automated sequential resonance assignment of biopolymers from NMR data by relative-hypothesis-prioritization-based simulated logic. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)*, **174** (1), 133–151.
- 79 Overhauser, A.W. (1953) Polarization of Nuclei in Metals. *Physical Review*, **92** (2), 411–415.
- 80 Karplus, M. (1963) Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the American Chemical Society*, **85** (18), 2870–2871.
- 81 Saupe, A. and Englert, G. (1963) High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules. *Physical Review Letters*, **11** (10), 462–464.
- 82 Prestegard, J.H., Bougault, C.M., Kishore, A.I. (2004) Residual dipolar couplings in structure determination of biomolecules. *Chemical reviews*, **104** (8), 3519–3540.

- 83 Zuiderweg, E.R.P. (2002) Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **41** (1), 1–7.
- 84 Williamson, M.P. (2013) Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, **73**, 1–16.
- 85 Hiroaki, H. and Kohda, D. (2018) Protein–Ligand Interactions Studied by NMR, in *Experimental approaches of NMR spectroscopy: Methodology and application to life science and materials science* (ed T.N.M.R. Soci), Springer, Singapore, pp. 579–600.
- 86 FNR: Überblick. <https://www.fnr.de/nachwachsende-rohstoffe/nachwachsende-rohstoffe-im-ueberblick/> (11 March 2020).
- 87 Oreskes, N. (2004) Beyond the ivory tower. The scientific consensus on climate change. *Science (New York, N.Y.)*, **306** (5702), 1686.
- 88 Vispute, T.P., Zhang, H., Sanna, A., Xiao, R., Huber, G.W. (2010) Renewable chemical commodity feedstocks from integrated catalytic processing of pyrolysis oils. *Science (New York, N.Y.)*, **330** (6008), 1222–1227.
- 89 Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A. (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **44** (22), 3358–3393.
- 90 Martínez, A.J., Manolache, S., González, V., Young, R.A., Denes, F. (2000) Immobilized biomolecules on plasma functionalized cellophane. I. Covalently attached alpha-chymotrypsin. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, **11** (4), 415–438.
- 91 Löscher, F., Ruckstuhl, T., Seeger, S. (1998) Ultrathin Cellulose-Based Layers for Detection of Single Antigen Molecules. *Advanced Materials*, **10** (13), 1005–1009.
- 92 Amash, A. (2000) Morphology and properties of isotropic and oriented samples of cellulose fibre–polypropylene composites. *Polymer*, **41** (4), 1589–1596.
- 93 Ling, F., Brahmachary, E., Xu, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J. (2003) Polymer-bound cellulose phenylcarbamate derivatives as chiral stationary phases for enantioselective HPLC. *Journal of Separation Science*, **26** (15-16), 1337–1346.
- 94 Umweltbundesamt Erneuerbare Energien in Zahlen. <https://www.umweltbundesamt.de/themen/klima-energie/erneuerbare-energien/erneuerbare-energien-in-zahlen#strom> (24 August 2021).
- 95 DOE Joint Genome Institute: A DOE Office of Science User Facility of Lawrence Berkeley National Laboratory. <https://jgi.doe.gov/> (24 March 2020).

- 96 Payen A. (1838) Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux. *Comptes rendus de l'Académie des sciences* (7), 1052–1056.
- 97 Staudinger, H. (1920) Über Polymerisation. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, **53** (6), 1073–1085.
- 98 Festucci-Buselli, R.A., Otoni, W.C., Joshi, C.P. (2007) Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **19** (1), 1–13.
- 99 Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J., Henrissat, B. (1997) Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94** (17), 9091–9095.
- 100 Dawsey, T.R. and McCormick, C.L. (1990) The Lithium Chloride/Dimethylacetamide Solvent for Cellulose: A Literature Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C*, **30** (3-4), 405–440.
- 101 Ciacco, G.T. (2003) Application of the solvent dimethyl sulfoxide/tetrabutyl-ammonium fluoride trihydrate as reaction medium for the homogeneous acylation of Sisal cellulose. *Cellulose*, **10** (2), 125–132.
- 102 Jonas, R. and Farah, L.F. (1998) Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, **59** (1-3), 101–106.
- 103 Vandamme, E.J., Baets, S. de, Vanbaelen, A., Joris, K., Wulf, P. de (1998) Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polymer Degradation and Stability*, **59** (1-3), 93–99.
- 104 Edwards, I.P., Upchurch, R.A., Zak, D.R. (2008) Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **74** (11), 3481–3489.
- 105 Estela, R. and Luis, J. (2014) Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars, in *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass: Techniques, applications and commercialization* (eds A.K. Chandel and S.S.d. Silva), InTech, Rijeka, Croatia.
- 106 Hildén, L. and Johansson, G. (2004) Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology letters*, **26** (22), 1683–1693.
- 107 Kovalenko, V.I. (2010) Crystalline cellulose: structure and hydrogen bonds. *Russian Chemical Reviews*, **79** (3), 231–241.
- 108 Gardner, K.H. and Blackwell, J. (1974) The structure of native cellulose. *Biopolymers*, **13** (10), 1975–2001.

- 109 Atalla, R.H. and Vanderhart, D.L. (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science (New York, N.Y.)*, **223** (4633), 283–285.
- 110 Finkenstadt, V.L. and Millane, R.P. (1998) Crystal Structure of Valonia Cellulose I β . *Macromolecules*, **31** (22), 7776–7783.
- 111 Wada, M., Heux, L., Sugiyama, J. (2004) Polymorphism of cellulose I family: reinvestigation of cellulose IVI. *Biomacromolecules*, **5** (4), 1385–1391.
- 112 Mittal, A., Katahira, R., Himmel, M.E., Johnson, D.K. (2011) Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnology for biofuels*, **4** (1), 41.
- 113 Götze, K. (ed) (1967) *Chemiefasern nach dem Viskoseverfahren: Erster Band*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l.
- 114 Fink, H.-P., Ebeling, H., Vorweg, W. (2009) Technologien der Cellulose- und Stärkeverarbeitung. *Chemie Ingenieur Technik*, **81** (11), 1757–1766.
- 115 Rosenau, T., Potthast, A., Sixta, H., Kosma, P. (2001) The chemistry of side reactions and byproduct formation in the system NMMO/cellulose (Lyocell process). *Progress in Polymer Science*, **26** (9), 1763–1837.
- 116 Image: Cellulose Structure and Hydrolysis Challenges. <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181> (22 March 2020).
- 117 Goldemberg, J. (2007) Ethanol for a sustainable energy future. *Science (New York, N.Y.)*, **315** (5813), 808–810.
- 118 Sun, Y. and Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, **83** (1), 1–11.
- 119 Hadar, Y. (2013) Sources for Lignocellulosic Raw Materials for the Production of Ethanol, in *Lignocellulose conversion: Enzymatic and microbial tools for bioethanol production* (ed V. Faraco), Springer, Berlin, pp. 21–38.
- 120 Bayer, E.A., Lamed, R., Himmel, M.E. (2007) The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current opinion in biotechnology*, **18** (3), 237–245.
- 121 Mittal, A. and Decker, S.R. (2013) Special issue: Application of biotechnology for biofuels: transforming biomass to biofuels. *3 Biotech*, **3** (5), 341–343.
- 122 Viikari, L., Vehmaanperä, J., Koivula, A. (2012) Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy*, **46**, 13–24.

- 123 Gupta, R.B. and Demirbas, A. (2010) *Gasoline, diesel, and ethanol biofuels from grasses and plants*, Cambridge University Press, Cambridge.
- 124 Himmel, M.E., Xu, Q., Luo, Y., Ding, S.-Y., Lamed, R., Bayer, E.A. (2010) Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels*, **1** (2), 323–341.
- 125 Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G. (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for biofuels*, **5** (1), 45.
- 126 Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M. (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current opinion in biotechnology*, **16** (5), 577–583.
- 127 Olson, D.G., McBride, J.E., Shaw, A.J., Lynd, L.R. (2012) Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current opinion in biotechnology*, **23** (3), 396–405.
- 128 Demain, A.L., Newcomb, M., Wu, J.H.D. (2005) Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and molecular biology reviews*, **69** (1), 124–154.
- 129 Blumer-Schuette, S.E., Brown, S.D., Sander, K.B., Bayer, E.A., Kataeva, I., Zurawski, J.V., Conway, J.M., Adams, M.W.W., Kelly, R.M. (2014) Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS microbiology reviews*, **38** (3), 393–448.
- 130 Johnson, E.A., Sakajoh, M., Halliwell, G., Madia, A., Demain, A.L. (1982) Saccharification of Complex Cellulosic Substrates by the Cellulase System from *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **43** (5), 1125–1132.
- 131 Lu, Y., Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R. (2006) Enzyme-microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103** (44), 16165–16169.
- 132 Koeck, D.E., Koellmeier, T., Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H. (2015) Differences in biomass degradation between newly isolated environmental strains of *Clostridium thermocellum* and heterogeneity in the size of the cellulosomal scaffoldin. *Systematic and applied microbiology*, **38** (6), 424–432.
- 133 Viljoen, J.A., Fred, E.B., Peterson, W.H. (1926) The fermentation of cellulose by thermophilic bacteria. *The Journal of Agricultural Science*, **16** (1), 1–17.
- 134 Bayer, E.A., Lamed, R., White, B.A., Flint, H.J. (2008) From cellulosomes to cellulosomes. *Chemical record (New York, N.Y.)*, **8** (6), 364–377.
- 135 Fontes, C.M.G.A. and Gilbert, H.J. (2010) Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual review of biochemistry*, **79**, 655–681.

- 136 Shimon, L.J.W., Bayer, E.A., Morag, E., Lamed, R., Yaron, S., Shoham, Y., Frolow, F. (1997) A cohesin domain from *Clostridium thermocellum*: the crystal structure provides new insights into cellulosome assembly. *Structure*, **5** (3), 381–390.
- 137 Dror, T.W., Rolider, A., Bayer, E.A., Lamed, R., Shoham, Y. (2003) Regulation of expression of scaffoldin-related genes in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, **185** (17), 5109–5116.
- 138 Gilbert, H.J. (2007) Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure. *Molecular microbiology*, **63** (6), 1568–1576.
- 139 Olson, D.G., Giannone, R.J., Hettich, R.L., Lynd, L.R. (2013) Role of the CipA scaffoldin protein in cellulose solubilization, as determined by targeted gene deletion and complementation in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, **195** (4), 733–739.
- 140 Gold, N.D. and Martin, V.J.J. (2007) Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *Journal of Bacteriology*, **189** (19), 6787–6795.
- 141 Raman, B., Pan, C., Hurst, G.B., Rodriguez, M., McKeown, C.K., Lankford, P.K., Samatova, N.F., Mielenz, J.R. (2009) Impact of pretreated Switchgrass and biomass carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulosome composition: a quantitative proteomic analysis. *PLoS one*, **4** (4), e5271.
- 142 Nataf, Y., Yaron, S., Stahl, F., Lamed, R., Bayer, E.A., Scheper, T.-H., Sonenshein, A.L., Shoham, Y. (2009) Cellodextrin and laminaribiose ABC transporters in *Clostridium thermocellum*. *Journal of Bacteriology*, **191** (1), 203–209.
- 143 Rydzak, T., Levin, D.B., Cicek, N., Sparling, R. (2011) End-product induced metabolic shifts in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *Applied microbiology and biotechnology*, **92** (1), 199–209.
- 144 Zhou, J., Olson, D.G., Argyros, D.A., Deng, Y., van Gulik, W.M., van Dijken, J.P., Lynd, L.R. (2013) Atypical glycolysis in *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **79** (9), 3000–3008.
- 145 Akinosho, H., Yee, K., Close, D., Ragauskas, A. (2014) The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications. *Frontiers in chemistry*, **2**, 66.
- 146 Gilbert, H.J. (2010) The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant physiology*, **153** (2), 444–455.

- 147 Abbott, D.W. and Boraston, A.B. (2012) Quantitative approaches to the analysis of carbohydrate-binding module function. *Methods in enzymology*, **510**, 211–231.
- 148 Guillén, D., Santiago, M., Linares, L., Pérez, R., Morlon, J., Ruiz, B., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R. (2007) Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (12), 3833–3837.
- 149 van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R., Pettersson, G. (1986) Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *FEBS letters*, **204** (2), 223–227.
- 150 Tomme, P., van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T., Claeysens, M. (1988) Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *European journal of biochemistry*, **170** (3), 575–581.
- 151 Gilkes, N.R., Warren, R.A., Miller, R.C., Kilburn, D.G. (1988) Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *The Journal of biological chemistry*, **263** (21), 10401–10407.
- 152 Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic acids research*, **37** (Database issue), D233-8.
- 153 CAZy - Home. <http://www.cazy.org/> (19 March 2020).
- 154 Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J. (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical journal*, **382** (Pt 3), 769–781.
- 155 Hashimoto, H. (2006) Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. *Cellular and molecular life sciences*, **63** (24), 2954–2967.
- 156 Gilbert, H.J., Knox, J.P., Boraston, A.B. (2013) Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Current opinion in structural biology*, **23** (5), 669–677.
- 157 Abbott, D.W. and van Bueren, A.L. (2014) Using structure to inform carbohydrate binding module function. *Current opinion in structural biology*, **28**, 32–40.
- 158 Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., Shoham, Y., Steitz, T.A. (1996) Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *The EMBO Journal*, **15** (21), 5739–5751.

- 159 Meyer, E.A., Castellano, R.K., Diederich, F. (2003) Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **42** (11), 1210–1250.
- 160 Carbohydrate-binding modules. https://www.cazypedia.org/index.php/Carbohydrate-binding_modules#bibkey_Nakamura2008 (22 March 2020).
- 161 Armenta, S., Moreno-Mendieta, S., Sánchez-Cuapio, Z., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R. (2017) Advances in molecular engineering of carbohydrate-binding modules. *Proteins*, **85** (9), 1602–1617.
- 162 Bolam, D.N., Xie, H., White, P., Simpson, P.J., Hancock, S.M., Williamson, M.P., Gilbert, H.J. (2001) Evidence for synergy between family 2b carbohydrate binding modules in *Cellulomonas fimi* xylanase 11A. *Biochemistry*, **40** (8), 2468–2477.
- 163 Boraston, A.B., Healey, M., Klassen, J., Ficko-Blean, E., van Lammerts Bueren, A., Law, V. (2006) A structural and functional analysis of alpha-glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *The Journal of biological chemistry*, **281** (1), 587–598.
- 164 Georgelis, N., Yennawar, N.H., Cosgrove, D.J. (2012) Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109** (37), 14830–14835.
- 165 Pell, G., Williamson, M.P., Walters, C., Du, H., Gilbert, H.J., Bolam, D.N. (2003) Importance of hydrophobic and polar residues in ligand binding in the family 15 carbohydrate-binding module from *Cellvibrio japonicus* Xyn10C. *Biochemistry*, **42** (31), 9316–9323.
- 166 Xie, H., Gilbert, H.J., Charnock, S.J., Davies, G.J., Williamson, M.P., Simpson, P.J., Raghothama, S., Fontes, C.M., Dias, F.M., Ferreira, L.M., Bolam, D.N. (2001) *Clostridium thermocellum* Xyn10B carbohydrate-binding module 22-2: the role of conserved amino acids in ligand binding. *Biochemistry*, **40** (31), 9167–9176.
- 167 Goto, M., Semimaru, T., Furukawa, K., Hayashida, S. (1994) Analysis of the raw starch-binding domain by mutation of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. kawachi expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (11), 3926–3930.
- 168 Bharali, S., Purama, R.K., Majumder, A., Fontes, C.M.G.A., Goyal, A. (2007) Functional characterization and mutation analysis of family 11, Carbohydrate-Binding Module (CtCBM11)

- of cellulosomal bifunctional cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Indian journal of microbiology*, **47** (2), 109–118.
- 169 Cid, M., Pedersen, H.L., Kaneko, S., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Willats, W.G.T., Boraston, A.B. (2010) Recognition of the helical structure of beta-1,4-galactan by a new family of carbohydrate-binding modules. *Journal of Biological Chemistry*, **285** (46), 35999–36009.
- 170 Notenboom, V., Boraston, A.B., Chiu, P., Freelove, A.C., Kilburn, D.G., Rose, D.R. (2001) Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: an X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study. *Journal of Molecular Biology*, **314** (4), 797–806.
- 171 Boraston, A.B., Notenboom, V., Warren, R.J., Kilburn, D.G., Rose, D.R., Davies, G. (2003) Structure and Ligand Binding of Carbohydrate-binding Module CsCBM6-3 Reveals Similarities with Fucose-specific Lectins and “Galactose-binding” Domains. *Journal of Molecular Biology*, **327** (3), 659–669.
- 172 Hervé, C., Rogowski, A., Blake, A.W., Marcus, S.E., Gilbert, H.J., Knox, J.P. (2010) Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107** (34), 15293–15298.
- 173 Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G. (1991) Non-Hydrolytic Disruption of Cellulose Fibres by the Binding Domain of a Bacterial Cellulase. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, **9** (11), 1096–1099.
- 174 Gourlay, K., Arantes, V., Saddler, J.N. (2012) Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for biofuels*, **5** (1), 51.
- 175 Singh, A.K., Pluinage, B., Higgins, M.A., Dalia, A.B., Woodiga, S.A., Flynn, M., Lloyd, A.R., Weiser, J.N., Stubbs, K.A., Boraston, A.B., King, S.J. (2014) Unravelling the multiple functions of the architecturally intricate *Streptococcus pneumoniae* β -galactosidase, BgaA. *PLoS pathogens*, **10** (9), e1004364.
- 176 Boraston, A.B., Tomme, P., Amandoron, E.A., Kilburn, D.G. (2000) A novel mechanism of xylan binding by a lectin-like module from *Streptomyces lividans* xylanase 10A. *The Biochemical journal*, **350 Pt 3** (Pt 3), 933–941.
- 177 Schärpf, M., Connelly, G.P., Lee, G.M., Boraston, A.B., Warren, R.A.J., McIntosh, L.P. (2002) Site-specific characterization of the association of xylooligosaccharides with the CBM13 lectin-

- like xylan binding domain from *Streptomyces lividans* xylanase 10A by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **41** (13), 4255–4263.
- 178 Ravalason, H., Herpoël-Gimbert, I., Record, E., Bertaud, F., Grisel, S., Weert, S. de, van den Hondel, C.A.M.J.J., Asther, M., Petit-Conil, M., Sigoillot, J.-C. (2009) Fusion of a family 1 carbohydrate binding module of *Aspergillus niger* to the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase for efficient softwood kraft pulp biobleaching. *Journal of biotechnology*, **142** (3-4), 220–226.
- 179 Reyes-Ortiz, V., Heins, R.A., Cheng, G., Kim, E.Y., Vernon, B.C., Elandt, R.B., Adams, P.D., Sale, K.L., Hadi, M.Z., Simmons, B.A., Kent, M.S., Tullman-Ercek, D. (2013) Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. *Biotechnology for biofuels*, **6** (1), 93.
- 180 Kavooosi, M., Meijer, J., Kwan, E., Creagh, A.L., Kilburn, D.G., Haynes, C.A. (2004) Inexpensive one-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with the family 9 carbohydrate-binding module of xylanase 10A from *T. maritima*. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **807** (1), 87–94.
- 181 Francisco, J.A., Stathopoulos, C., Warren, R.A., Kilburn, D.G., Georgiou, G. (1993) Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, **11** (4), 491–495.
- 182 Lu, L., Xu, S., Zhao, R., Zhang, D., Li, Z., Li, Y., Xiao, M. (2012) Synthesis of galactooligosaccharides by CBD fusion β -galactosidase immobilized on cellulose. *Bioresource Technology*, **116**, 327–333.
- 183 Espigares, I., Elvira, C., Mano, J.F., Vázquez, B., San Román, J., Reis, R.L. (2002) New partially degradable and bioactive acrylic bone cements based on starch blends and ceramic fillers. *Biomaterials*, **23** (8), 1883–1895.
- 184 Michailova, V., Titeva, S., Kotsilkova, R., Krusteva, E., Minkov, E. (2001) Influence of hydrogel structure on the processes of water penetration and drug release from mixed hydroxypropylmethyl cellulose/thermally pregelatinized waxy maize starch hydrophilic matrices. *International Journal of Pharmaceutics*, **222** (1), 7–17.
- 185 Andrade, F.K., Costa, R., Domingues, L., Soares, R., Gama, M. (2010) Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: Functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide. *Acta biomaterialia*, **6** (10), 4034–4041.

- 186 Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.V., Schwarz, W.H., Bronnenmeier, K., Kellermann, J., Staudenbauer, W.L. (1998) Multidomain structure and cellosomal localization of the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbhA. *Journal of Bacteriology*, **180** (12), 3091–3099.
- 187 Johnson, P.E., Tomme, P., Joshi, M.D., McIntosh, L.P. (1996) Interaction of soluble celooligosaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC 2. NMR and ultraviolet absorption spectroscopy. *Biochemistry*, **35** (44), 13895–13906.
- 188 Tomme, P., Creagh, A.L., Kilburn, D.G., Haynes, C.A. (1996) Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC. 1. Binding specificity and calorimetric analysis. *Biochemistry*, **35** (44), 13885–13894.
- 189 Jindou, S., Petkun, S., Shimon, L., Bayer, E.A., Lamed, R., Frolow, F. (2007) Crystallization and preliminary diffraction studies of CBM3b of cellobiohydrolase 9A from *Clostridium thermocellum*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, **63** (Pt 12), 1044–1047.
- 190 Kataeva, I.A., Seidel, R.D., Shah, A., West, L.T., Li, X.-L., Ljungdahl, L.G. (2002) The fibronectin type 3-like repeat from the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbhA promotes hydrolysis of cellulose by modifying its surface. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (9), 4292–4300.
- 191 Jindou, S., Xu, Q., Kenig, R., Shulman, M., Shoham, Y., Bayer, E.A., Lamed, R. (2006) Novel architecture of family-9 glycoside hydrolases identified in cellosomal enzymes of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Clostridium thermocellum*. *FEMS microbiology letters*, **254** (2), 308–316.
- 192 Yaniv, O., Petkun, S., Shimon, L.J.W., Bayer, E.A., Lamed, R., Frolow, F. (2012) A single mutation reforms the binding activity of an adhesion-deficient family 3 carbohydrate-binding module. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **68** (Pt 7), 819–828.
- 193 Jamal-Talabani, S., Boraston, A.B., Turkenburg, J.P., Tarbouriech, N., Ducros, V.M.-A., Davies, G.J. (2004) Ab initio structure determination and functional characterization of CBM36; a new family of calcium-dependent carbohydrate binding modules. *Structure*, **12** (7), 1177–1187.
- 194 Montanier, C.Y., Correia, M.A.S., Flint, J.E., Zhu, Y., Baslé, A., McKee, L.S., Prates, J.A.M., Polizzi, S.J., Coutinho, P.M., Lewis, R.J., Henrissat, B., Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J. (2011) A novel, noncatalytic carbohydrate-binding module displays specificity for galactose-containing polysaccharides through calcium-mediated oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, **286** (25), 22499–22509.

- 195 Yaniv, O., Frolow, F., Levy-Assraf, M., Lamed, R., Bayer, E.A. (2012) Interactions between family 3 carbohydrate binding modules (CBMs) and cellulosomal linker peptides. *Methods in enzymology*, **510**, 247–259.
- 196 Petkun, S., Jindou, S., Shimon, L.J.W., Rosenheck, S., Bayer, E.A., Lamed, R., Frolow, F. (2010) Structure of a family 3b' carbohydrate-binding module from the Cel9V glycoside hydrolase from *Clostridium thermocellum*: structural diversity and implications for carbohydrate binding. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **66** (Pt 1), 33–43.
- 197 Hefti, M.H., van Vugt-Van der Toorn, C.J., Dixon, R., Vervoort, J. (2001) A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Analytical biochemistry*, **295** (2), 180–185.
- 198 Neuberger, A. (1958) *Symposium on Protein Structure*, Taylor & Francis.
- 199 Hvidt, A. and Nielsen, S.O. (1966) Hydrogen Exchange in Proteins, in *Advances in protein chemistry: Volume 21* (ed C.B. Anfinsen), Academic Press, New York, London, pp. 287–386.
- 200 H/D Exchange. <https://weisgroup.ku.edu/hd-exchange> (25 March 2020).
- 201 Englander, S.W., Sosnick, T.R., Englander, J.J., Mayne, L. (1996) Mechanisms and uses of hydrogen exchange. *Current opinion in structural biology*, **6** (1), 18–23.
- 202 Chatake, T. and Fujiwara, S. (2016) A technique for determining the deuterium/hydrogen contrast map in neutron macromolecular crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, **72** (Pt 1), 71–82.
- 203 Lindner, R., Heintz, U., Winkler, A. (2015) Applications of hydrogen deuterium exchange (HDX) for the characterization of conformational dynamics in light-activated photoreceptors. *Frontiers in molecular biosciences*, **2**, 33.
- 204 Yao, X., Dürr, U.H.N., Gattin, Z., Laukat, Y., Narayanan, R.L., Brückner, A.-K., Meisinger, C., Lange, A., Becker, S., Zweckstetter, M. (2014) NMR-based detection of hydrogen/deuterium exchange in liposome-embedded membrane proteins. *PloS one*, **9** (11), e112374.
- 205 Eigen, M. (1964) Proton Transfer, Acid-Base Catalysis, and Enzymatic Hydrolysis. Part I: Elementary processes. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **3** (1), 1–19.
- 206 Dempsey, C.E. (2001) Hydrogen exchange in peptides and proteins using NMR spectroscopy. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, **39** (2), 135–170.
- 207 Kleckner, I.R. and Foster, M.P. (2011) An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, **1814** (8), 942–968.

- 208 Hall, M., Bansal, P., Lee, J.H., Realff, M.J., Bommarius, A.S. (2010) Cellulose crystallinity--a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *The FEBS journal*, **277** (6), 1571–1582.
- 209 McLean, B.W., Boraston, A.B., Brouwer, D., Sanaie, N., Fyfe, C.A., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., Haynes, C.A. (2002) Carbohydrate-binding modules recognize fine substructures of cellulose. *The Journal of biological chemistry*, **277** (52), 50245–50254.
- 210 Boraston, A.B., Kwan, E., Chiu, P., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G. (2003) Recognition and hydrolysis of noncrystalline cellulose. *The Journal of biological chemistry*, **278** (8), 6120–6127.
- 211 Hernandez-Gomez, M.C., Rydahl, M.G., Rogowski, A., Morland, C., Cartmell, A., Crouch, L., Labourel, A., Fontes, C.M.G.A., Willats, W.G.T., Gilbert, H.J., Knox, J.P. (2015) Recognition of xyloglucan by the crystalline cellulose-binding site of a family 3a carbohydrate-binding module. *FEBS letters*, **589** (18), 2297–2303.
- 212 Alahuhta, M., Xu, Q., Bomble, Y.J., Brunecky, R., Adney, W.S., Ding, S.-Y., Himmel, M.E., Lunin, V.V. (2010) The unique binding mode of cellulosomal CBM4 from *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase A. *Journal of Molecular Biology*, **402** (2), 374–387.
- 213 Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A.B., Ståhl, K. (2005) On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. *Cellulose*, **12** (6), 563–576.
- 214 Gessler, K., Krauss, N., Steiner, T., Betzel, C., Sandmann, C., Saenger, W. (1994) Crystal structure of beta-D-cellobiose hemihydrate with implications for the structure of cellulose II. *Science (New York, N.Y.)*, **266** (5187), 1027–1029.
- 215 Gianni, S., Walma, T., Arcovito, A., Calosci, N., Bellelli, A., Engström, A., Travaglini-Allocatelli, C., Brunori, M., Jemth, P., Vuister, G.W. (2006) Demonstration of long-range interactions in a PDZ domain by NMR, kinetics, and protein engineering. *Structure*, **14** (12), 1801–1809.
- 216 Pires, V.M.R., Pereira, P.M.M., Brás, J.L.A., Correia, M., Cardoso, V., Bule, P., Alves, V.D., Najmudin, S., Venditto, I., Ferreira, L.M.A., Romão, M.J., Carvalho, A.L., Fontes, C.M.G.A., Prazeres, D.M. (2017) Stability and Ligand Promiscuity of Type A Carbohydrate-binding Modules Are Illustrated by the Structure of *Spirochaeta thermophila* StCBM64C. *Journal of Biological Chemistry*, **292** (12), 4847–4860.
- 217 Campos, B.M., Liberato, M.V., Alvarez, T.M., Zanthorlin, L.M., Ematsu, G.C., Barud, H., Polikarpov, I., Ruller, R., Gilbert, H.J., Zeri, A.C.d.M., Squina, F.M. (2016) A Novel Carbohydrate-binding Module from Sugar Cane Soil Metagenome Featuring Unique Structural and Carbohydrate Affinity Properties. *Journal of Biological Chemistry*, **291** (45), 23734–23743.

- 218 Kay, L.E. (2005) NMR studies of protein structure and dynamics. *Journal of magnetic resonance*, **173** (2), 193–207.
- 219 Rosen, M.K., Gardner, K.H., Willis, R.C., Parris, W.E., Pawson, T., Kay, L.E. (1996) Selective methyl group protonation of perdeuterated proteins. *Journal of Molecular Biology*, **263** (5), 627–636.
- 220 Goto, N.K. and Kay, L.E. (2000) New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy. *Current opinion in structural biology*, **10** (5), 585–592.
- 221 Montanier, C., Flint, J.E., Bolam, D.N., Xie, H., Liu, Z., Rogowski, A., Weiner, D.P., Ratnaparkhe, S., Nurizzo, D., Roberts, S.M., Turkenburg, J.P., Davies, G.J., Gilbert, H.J. (2010) Circular permutation provides an evolutionary link between two families of calcium-dependent carbohydrate binding modules. *Journal of Biological Chemistry*, **285** (41), 31742–31754.
- 222 Henshaw, J., Horne-Bitschy, A., van Bueren, A.L., Money, V.A., Bolam, D.N., Czjzek, M., Ekborg, N.A., Weiner, R.M., Hutcheson, S.W., Davies, G.J., Boraston, A.B., Gilbert, H.J. (2006) Family 6 carbohydrate binding modules in beta-agarases display exquisite selectivity for the non-reducing termini of agarose chains. *Journal of Biological Chemistry*, **281** (25), 17099–17107.
- 223 Yaniv, O., Shimon, L.J.W., Bayer, E.A., Lamed, R., Frolov, F. (2011) Scaffoldin-borne family 3b carbohydrate-binding module from the cellulosome of *Bacteroides cellulosolvens*: structural diversity and significance of calcium for carbohydrate binding. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **67** (Pt 6), 506–515.
- 224 Klibanov, A.M. (1983) Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation, in *Advances in applied microbiology* (ed A.I. Laskin), Academic Press, New York, London, pp. 1–28.
- 225 Cummings, C., Murata, H., Koepsel, R., Russell, A.J. (2013) Tailoring enzyme activity and stability using polymer-based protein engineering. *Biomaterials*, **34** (30), 7437–7443.
- 226 Abuchowski, A., van Es, T., Palczuk, N.C., Davis, F.F. (1977) Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *The Journal of biological chemistry*, **252** (11), 3578–3581.
- 227 van Rijn, P. and Böker, A. (2011) Bionanoparticles and hybrid materials: tailored structural properties, self-assembly, materials and developments in the field. *Journal of Materials Chemistry*, **21** (42), 16735.
- 228 Shu, J.Y., Panganiban, B., Xu, T. (2013) Peptide-polymer conjugates: from fundamental science to application. *Annual review of physical chemistry*, **64**, 631–657.

- 229 Fuhrmann, G., Grotzky, A., Lukić, R., Matoori, S., Luciani, P., Yu, H., Zhang, B., Walde, P., Schlüter, A.D., Gauthier, M.A., Leroux, J.-C. (2013) Sustained gastrointestinal activity of dendronized polymer-enzyme conjugates. *Nature chemistry*, **5** (7), 582–589.
- 230 van Rijn, P., Tutus, M., Kathrein, C., Mouglin, N.C., Park, H., Hein, C., Schürings, M.P., Böker, A. (2014) Ultra-Thin Self-Assembled Protein-Polymer Membranes: A New Pore Forming Strategy. *Advanced Functional Materials*, **24** (43), 6762–6770.
- 231 Braunecker, W.A. and Matyjaszewski, K. (2007) Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Progress in Polymer Science*, **32** (1), 93–146.
- 232 Kato, M., Kamigaito, M., Sawamoto, M., Higashimura, T. (1995) Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization. *Macromolecules*, **28** (5), 1721–1723.
- 233 Chiefari, J., Chong, Y.K., Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T.P.T., Mayadunne, R.T.A., Meijs, G.F., Moad, C.L., Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S.H. (1998) Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules*, **31** (16), 5559–5562.
- 234 Georges, M.K., Veregin, R.P.N., Kazmaier, P.M., Hamer, G.K. (1993) Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process. *Macromolecules*, **26** (11), 2987–2988.
- 235 Falatach, R., McGlone, C., Al-Abdul-Wahid, M.S., Averick, S., Page, R.C., Berberich, J.A., Konkolewicz, D. (2015) The best of both worlds: active enzymes by grafting-to followed by grafting-from a protein. *Chemical communications (Cambridge, England)*, **51** (25), 5343–5346.
- 236 Basu, A., Yang, K., Wang, M., Liu, S., Chintala, R., Palm, T., Zhao, H., Peng, P., Wu, D., Zhang, Z., Hua, J., Hsieh, M.-C., Zhou, J., Petti, G., Li, X., Janjua, A., Mendez, M., Liu, J., Longley, C., Zhang, Z., Mehlig, M., Borowski, V., Viswanathan, M., Filpula, D. (2006) Structure-function engineering of interferon-beta-1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation. *Bioconjugate chemistry*, **17** (3), 618–630.
- 237 Pasut, G. and Veronese, F.M. (2012) State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **161** (2), 461–472.

- 238 Kulkarni, S., Schilli, C., Grin, B., Müller, A.H.E., Hoffman, A.S., Stayton, P.S. (2006) Controlling the aggregation of conjugates of streptavidin with smart block copolymers prepared via the RAFT copolymerization technique. *Biomacromolecules*, **7** (10), 2736–2741.
- 239 Schild, H.G. (1992) Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science*, **17** (2), 163–249.
- 240 Okada, Y. and Tanaka, F. (2005) Cooperative Hydration, Chain Collapse, and Flat LCST Behavior in Aqueous Poly(N-isopropylacrylamide) Solutions. *Macromolecules*, **38** (10), 4465–4471.
- 241 Lutz, J.-F. and Börner, H.G. (2008) Modern trends in polymer bioconjugates design. *Progress in Polymer Science*, **33** (1), 1–39.
- 242 Sumerlin, B.S. (2012) Proteins as Initiators of Controlled Radical Polymerization: Grafting-from via ATRP and RAFT. *ACS Macro Letters*, **1** (1), 141–145.
- 243 Esadze, A., Zandarashvili, L., Iwahara, J. (2014) Effective strategy to assign ¹H- ¹⁵N heteronuclear correlation NMR signals from lysine side-chain NH₃⁺ groups of proteins at low temperature. *Journal of biomolecular NMR*, **60** (1), 23–27.
- 244 Koizumi, T., Terada, T., Nakajima, K., Kojima, M., Koshiha, S., Matsumura, Y., Kaneda, K., Asakura, T., Shimizu-Ibuka, A., Abe, K., Misaka, T. (2015) Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor. *Scientific reports*, **5**, 12947.
- 245 Nicolas, J., Mantovani, G., Haddleton, D.M. (2007) Living Radical Polymerization as a Tool for the Synthesis of Polymer-Protein/Peptide Bioconjugates. *Macromolecular Rapid Communications*, **28** (10), 1083–1111.
- 246 Williams, M. (2013) The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. *Drug Development Research*, **74** (5), 339.
- 247 Pahari, S., Sun, L., Alexov, E. (2019) PKAD: a database of experimentally measured pKa values of ionizable groups in proteins. *Database : the journal of biological databases and curation*, **2019**.
- 248 Barner-Kowollik, C. (2008) *Handbook of RAFT polymerization*, Wiley-VCH, Weinheim.
- 249 Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S.H. (2009) Living Radical Polymerization by the RAFT Process - A Second Update. *Australian Journal of Chemistry*, **62** (11), 1402.
- 250 Skrabania, K., Miasnikova, A., Bivigou-Koumba, A.M., Zehm, D., Laschewsky, A. (2011) Examining the UV-vis absorption of RAFT chain transfer agents and their use for polymer analysis. *Polymer Chemistry*, **2** (9), 2074.

- 251 Olson, B.J.S.C. and Markwell, J. (2007) Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in protein science*, **Chapter 3**, Unit 3.4.
- 252 Marion, D., Driscoll, P.C., Kay, L.E., Wingfield, P.T., Bax, A., Gronenborn, A.M., Clore, G.M. (1989) Overcoming the overlap problem in the assignment of ^1H NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear ^1H - ^{15}N Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1 beta. *Biochemistry*, **28** (15), 6150–6156.
- 253 Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., Horwitz, A.R. (2005) Cell migration at a glance. *Journal of cell science*, **118** (Pt 21), 4917–4919.
- 254 Manahan, C.L., Iglesias, P.A., Long, Y., Devreotes, P.N. (2004) Chemoattractant signaling in dictyostelium discoideum. *Annual review of cell and developmental biology*, **20**, 223–253.
- 255 Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, **302** (5651), 1704–1709.
- 256 van Helvert, S., Storm, C., Friedl, P. (2018) Mechanoreciprocity in cell migration. *Nature cell biology*, **20** (1), 8–20.
- 257 Charras, G. and Sahai, E. (2014) Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **15** (12), 813–824.
- 258 Mayor, R. and Etienne-Manneville, S. (2016) The front and rear of collective cell migration. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **17** (2), 97–109.
- 259 Xu, L., Gordon, R., Farmer, R., Pattanayak, A., Binkowski, A., Huang, X., Avram, M., Krishna, S., Voll, E., Pavese, J., Chavez, J., Bruce, J., Mazar, A., Nibbs, A., Anderson, W., Li, L., Jovanovic, B., Pruell, S., Valsecchi, M., Francia, G., Betori, R., Scheidt, K., Bergan, R. (2018) Precision therapeutic targeting of human cancer cell motility. *Nature Communications*, **9** (1), 2454.
- 260 Trepap, X., Chen, Z., Jacobson, K. (2012) Cell migration. *Comprehensive Physiology*, **2** (4), 2369–2392.
- 261 Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D.F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R.M., Macià, A., Panosa, A. (2019) In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Frontiers in cell and developmental biology*, **7**, 107.
- 262 Seetharaman, S. and Etienne-Manneville, S. (2020) Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in cell biology*, **30** (9), 720–735.

- 263 Vedula, S.R.K., Ravasio, A., Lim, C.T., Ladoux, B. (2013) Collective cell migration: a mechanistic perspective. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **28** (6), 370–379.
- 264 Tzima, E., Kiosses, W.B., del Pozo, M.A., Schwartz, M.A. (2003) Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubule organizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress. *Journal of Biological Chemistry*, **278** (33), 31020–31023.
- 265 Horwitz, A.R. and Parsons, J.T. (1999) Cell migration--movin' on. *Science (New York, N.Y.)*, **286** (5442), 1102–1103.
- 266 Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J. (2014) Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews*, **94** (1), 235–263.
- 267 Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., Turner, C. (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annual review of cell biology*, **4**, 487–525.
- 268 Abercrombie, M. and Dunn, G.A. (1975) Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Experimental cell research*, **92** (1), 57–62.
- 269 Lloyd, C. (1980) Hot foot. *Nature*, **288** (5786), 13–14.
- 270 Pascalis, C. de and Etienne-Manneville, S. (2017) Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular biology of the cell*, **28** (14), 1833–1846.
- 271 Franco, S.J., Rodgers, M.A., Perrin, B.J., Han, J., Bennin, D.A., Critchley, D.R., Huttenlocher, A. (2004) Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature cell biology*, **6** (10), 977–983.
- 272 Hulkower, K.I. and Herber, R.L. (2011) Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*, **3** (1), 107–124.
- 273 Vogt, A. (2010) Advances in two-dimensional cell migration assay technologies. *European Pharmaceutical Review*.
- 274 Chen, H.-C. (2005) Boyden chamber assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **294**, 15–22.
- 275 Abercrombie, M., Heaysman, J.E., Pegrum, S.M. (1970) The locomotion of fibroblasts in culture. *Experimental cell research*, **62** (2-3), 389–398.

- 276 Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M. (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **2** (11), 793–805.
- 277 Huttenlocher, A., Palecek, S.P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R.L., Lauffenburger, D.A., Ginsberg, M.H., Horwitz, A.F. (1997) Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *Journal of Biological Chemistry*, **272** (52), 32719–32722.
- 278 Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V., Wang, Y.L. (2001) Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *The Journal of cell biology*, **153** (4), 881–888.
- 279 Galbraith, C.G., Yamada, K.M., Sheetz, M.P. (2002) The relationship between force and focal complex development. *The Journal of cell biology*, **159** (4), 695–705.
- 280 Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., Geiger, B. (2004) Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society transactions*, **32** (Pt3), 416–420.
- 281 The Adhesome: A Focal Adhesion Network. <http://www.adhesome.org/> (20 December 2020).
- 282 Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B. (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature cell biology*, **9** (8), 858–867.
- 283 Winograd-Katz, S.E., Fässler, R., Geiger, B., Legate, K.R. (2014) The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **15** (4), 273–288.
- 284 Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., Seiki, M. (2012) Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *International journal of cell biology*, **2012**, 310616.
- 285 Jiang, G., Giannone, G., Critchley, D.R., Fukumoto, E., Sheetz, M.P. (2003) Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature*, **424** (6946), 334–337.
- 286 MBIInfo Focal Adhesion Organization | MBIInfo. <https://www.mechanobio.info/focal-adhesion-organization/> (21 December 2020).
- 287 Broussard, J.A., Webb, D.J., Kaverina, I. (2008) Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Current opinion in cell biology*, **20** (1), 85–90.
- 288 Huang, C. (2010) Roles of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration. *Cell adhesion & migration*, **4** (1), 10–18.
- 289 Zamir, E. and Geiger, B. (2001) Components of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, **114** (Pt 20), 3577–3579.
- 290 Lo, S.H. (2006) Focal adhesions: what's new inside. *Developmental biology*, **294** (2), 280–291.

- 291 Hynes, R.O. and Zhao, Q. (2000) The evolution of cell adhesion. *The Journal of cell biology*, **150** (2), F89-96.
- 292 Hynes, R.O. (2002) Integrins. *Cell*, **110** (6), 673–687.
- 293 Harburger, D.S. and Calderwood, D.A. (2009) Integrin signalling at a glance. *Journal of cell science*, **122** (Pt 2), 159–163.
- 294 Takada, Y., Ye, X., Simon, S. (2007) The integrins. *Genome biology*, **8** (5), 215.
- 295 Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., Springer, T.A. (2002) Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-In and Inside-Out Signaling. *Cell*, **110** (5), 599–611.
- 296 Morse, E.M., Brahme, N.N., Calderwood, D.A. (2014) Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry*, **53** (5), 810–820.
- 297 Luo, B.-H., Carman, C.V., Springer, T.A. (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual review of immunology*, **25**, 619–647.
- 298 MBInfo How is integrin activated? | MBInfo. <https://www.mechanobio.info/what-is-mechanosignaling/what-is-the-extracellular-matrix-and-the-basal-lamina/what-is-integrin/how-is-integrin-activated/> (22 December 2020).
- 299 Brown, M.C. and Turner, C.E. (2004) Paxillin: adapting to change. *Physiological reviews*, **84** (4), 1315–1339.
- 300 Deakin, N.O. and Turner, C.E. (2008) Paxillin comes of age. *Journal of cell science*, **121** (Pt 15), 2435–2444.
- 301 López-Colomé, A.M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., López, E. (2017) Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *Journal of hematology & oncology*, **10** (1), 50.
- 302 Salgia, R., Li, J.L., Lo, S.H., Brunkhorst, B., Kansas, G.S., Sobhany, E.S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T. (1995) Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *The Journal of biological chemistry*, **270** (10), 5039–5047.
- 303 Chen, P.-W. and Kroog, G.S. (2010) Leupaxin is similar to paxillin in focal adhesion targeting and tyrosine phosphorylation but has distinct roles in cell adhesion and spreading. *Cell adhesion & migration*, **4** (4), 527–540.
- 304 Brown, M.C., Curtis, M.S., Turner, C.E. (1998) Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains. *Nature structural biology*, **5** (8), 677–678.
- 305 Weng, Z., Taylor, J.A., Turner, C.E., Brugge, J.S., Seidel-Dugan, C. (1993) Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry*, **268** (20), 14956–14963.

- 306 Dawid, I.B., Breen, J.J., Toyama, R. (1998) LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends in Genetics*, **14** (4), 156–162.
- 307 Herreros, L., Rodríguez-Fernandez, J.L., Brown, M.C., Alonso-Lebrero, J.L., Cabañas, C., Sánchez-Madrid, F., Longo, N., Turner, C.E., Sánchez-Mateos, P. (2000) Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, **275** (34), 26436–26440.
- 308 Nix, D.A., Fradelizi, J., Bockholt, S., Menichi, B., Louvard, D., Friederich, E., Beckerle, M.C. (2001) Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, **276** (37), 34759–34767.
- 309 Côté, J.F., Turner, C.E., Tremblay, M.L. (1999) Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST. *Journal of Biological Chemistry*, **274** (29), 20550–20560.
- 310 Moik, D., Böttcher, A., Makhina, T., Grashoff, C., Bulus, N., Zent, R., Fässler, R. (2013) Mutations in the paxillin-binding site of integrin-linked kinase (ILK) destabilize the pseudokinase domain and cause embryonic lethality in mice. *Journal of Biological Chemistry*, **288** (26), 18863–18871.
- 311 Tremblay, L., Hauck, W., Aprikian, A.G., Begin, L.R., Chapdelaine, A., Chevalier, S. (1996) Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *International Journal of Cancer*, **68** (2), 164–171.
- 312 Koukouritaki, S.B., Tamizuddin, A., Lianos, E.A. (1998) Enhanced expression of the cytoskeletal-associated protein, paxillin, in experimental nephrotic syndrome. *Journal of investigative medicine*, **46** (6), 284–289.
- 313 Jenq, W., Cooper, D.R., Ramirez, G. (1996) Integrin expression on cell adhesion function and up-regulation of P125FAK and paxillin in metastatic renal carcinoma cells. *Connective tissue research*, **34** (3), 161–174.
- 314 Karge, M. (2017) Interaktion zwischen der Paxillin LIM3-Domäne und Spin-markierten Peptiden aus dem B3-Integrin. Universität Potsdam. Masterarbeit.
- 315 Prestel, A. (2015) Synthese und Anwendung eines photoschaltbaren zellgängigen Peptids & Struktur, Dynamik und Funktion der LIM2/3 Tandem-Domäne des Proteins Paxillin. Universität Konstanz. Dissertation.
- 316 Paone, C. (2016) The role of focal adhesion kinases and adaptor proteins in integrin-dependent signaling. Universität Konstanz. Dissertation.

- 317 Kunkel, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82** (2), 488–492.
- 318 Castorena-Torres, F., Peñuelas-Urquides, K., León, M.B. de (2016) Site-Directed Mutagenesis by Polymerase Chain Reaction, in *Polymerase chain reaction for biomedical applications* (ed A. Samadikuchaksaraei), InTech, Rijeka.
- 319 Malakhov, M.P., Mattern, M.R., Malakhova, O.A., Drinker, M., Weeks, S.D., Butt, T.R. (2004) SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *Journal of structural and functional genomics*, **5** (1-2), 75–86.
- 320 Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P., Mattern, M.R. (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein expression and purification*, **43** (1), 1–9.
- 321 Fink, A.L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding & design*, **3** (1), R9-R23.
- 322 Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*, **426** (6968), 884–890.
- 323 Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, **42** (Database issue), D503-9.
- 324 Neurath, H. and Walsh, K.A. (1976) Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **73** (11), 3825–3832.
- 325 Pepper, M.S., Belin, D., Montesano, R., Orci, L., Vassalli, J.D. (1990) Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *Journal of Cell Biology*, **111** (2), 743–755.
- 326 Darmon, A.J., Nicholson, D.W., Bleackley, R.C. (1995) Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, **377** (6548), 446–448.
- 327 Duffy, M.J., Reilly, D., O'Sullivan, C., O'Higgins, N., Fennelly, J.J., Andreasen, P. (1990) Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer research*, **50** (21), 6827–6829.
- 328 Sidenius, N. and Blasi, F. (2003) The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer metastasis reviews*, **22** (2-3), 205–222.

- 329 Southan, C. (2001) A genomic perspective on human proteases as drug targets. *Drug discovery today*, **6** (13), 681–688.
- 330 Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature reviews. Drug discovery*, **5** (9), 785–799.
- 331 Huang, E.C. and Henion, J.D. (1990) LC/MS and LC/MS/MS determination of protein tryptic digests. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **1** (2), 158–165.
- 332 Larsen, M.R., Trelle, M.B., Thingholm, T.E., Jensen, O.N. (2006) Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques*, **40** (6), 790–798.
- 333 Witze, E.S., Old, W.M., Resing, K.A., Ahn, N.G. (2007) Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods*, **4** (10), 798–806.
- 334 Sala, F., Marangon, E., Bagnati, R., Livi, V., Cereda, R., D'Incalci, M., Zucchetti, M. (2010) Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of the novel proteasome inhibitor CEP-18770 in human plasma and its application in a clinical pharmacokinetic study. *Journal of mass spectrometry*, **45** (11), 1299–1305.
- 335 Clifton, J., Huang, F., Rucevic, M., Cao, L., Hixson, D., Josic, D. (2011) Protease inhibitors as possible pitfalls in proteomic analyses of complex biological samples. *Journal of proteomics*, **74** (7), 935–941.
- 336 Michaelis, M., Starke, I., Ude, J., Prestel, A., Möller, H.M. Manuscript in preparation.
- 337 Matthews, B.W., Sigler, P.B., Henderson, R., Blow, D.M. (1967) Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin. *Nature*, **214** (5089), 652–656.
- 338 Blow, D.M., Birktoft, J.J., Hartley, B.S. (1969) Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*, **221** (5178), 337–340.
- 339 Hedstrom, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews*, **102** (12), 4501–4524.
- 340 Potts, A.J., Croall, D.E., Hemler, M.E. (1994) Proteolytic cleavage of the integrin beta 4 subunit. *Experimental cell research*, **212** (1), 2–9.
- 341 Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, O.D., James, K.E. (2002) Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical reviews*, **102** (12), 4639–4750.
- 342 Ritchie, C. (2013) Protease Inhibitors. *Materials and Methods*, **3**, 169.
- 343 Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M., Oleksy, A. (2005) The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *The EMBO Journal*, **24** (7), 1303–1310.

- 344 Drag, M. and Salvesen, G.S. (2010) Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, **9** (9), 690–701.
- 345 Chabbat, J., Porte, P., Tellier, M., Steinbuch, M. (1993) Aprotinin is a competitive inhibitor of the factor VIIa-tissue factor complex. *Thrombosis research*, **71** (3), 205–215.
- 346 Sperka, T., Pitlik, J., Bagossi, P., Tözsér, J. (2005) Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **15** (12), 3086–3090.
- 347 Kuzmic, P., Cregar, L., Millis, S.Z., Goldman, M. (2006) Mixed-type noncompetitive inhibition of anthrax lethal factor protease by aminoglycosides. *The FEBS journal*, **273** (13), 3054–3062.
- 348 Sigma-Aldrich SIGMAFAST™ Proteasehemmer-Cocktail-Tabletten, EDTA-frei S8830. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s8830?lang=de®ion=DE> (10 November 2020).
- 349 Sigma-Aldrich cOplete™, Mini, EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail 11836170001. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11836170001?lang=de®ion=DE> (10 November 2020).
- 350 Gold, A.M. and Fahrney, D. (1964) Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. II. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl α -Chymotrypsin. *Biochemistry*, **3**, 783–791.
- 351 Bergen, H.R., Klug, M.G., Bolander, M.E., Muddiman, D.C. (2004) Informed use of proteolytic inhibitors in biomarker discovery. *Rapid communications in mass spectrometry*, **18** (9), 1001–1002.
- 352 Narayanan, A. and Jones, L.H. (2015) Sulfonyl fluorides as privileged warheads in chemical biology. *Chemical science*, **6** (5), 2650–2659.
- 353 Schuchard, M.D., Mehig, R.J., Cockrill, S.L., Lipscomb, G.T., Stephan, J.D., Wildsmith, J., Valdes-Camin, R., Kappel, W.K., Rai, A.J., Scott, G.B.I. (2005) Artifactual isoform profile modification following treatment of human plasma or serum with protease inhibitor, monitored by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *BioTechniques*, **39** (2), 239–247.
- 354 Brown, M.C., Perrotta, J.A., Turner, C.E. (1996) Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *Journal of Cell Biology*, **135** (4), 1109–1123.

- 355 Brown, M.C., Perrotta, J.A., Turner, C.E. (1998) Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Molecular biology of the cell*, **9** (7), 1803–1816.
- 356 Schaller, M.D., Otey, C.A., Hildebrand, J.D., Parsons, J.T. (1995) Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *Journal of Cell Biology*, **130** (5), 1181–1187.
- 357 Xi, X., Bodnar, R.J., Li, Z., Lam, S.C.-T., Du, X. (2003) Critical roles for the COOH-terminal NITY and RGT sequences of the integrin beta3 cytoplasmic domain in inside-out and outside-in signaling. *Journal of Cell Biology*, **162** (2), 329–339.
- 358 Calderwood, D.A. (2004) Integrin activation. *Journal of cell science*, **117** (Pt 5), 657–666.
- 359 Moser, M., Legate, K.R., Zent, R., Fässler, R. (2009) The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*, **324** (5929), 895–899.
- 360 Law, D.A., Deguzman, F., Heiser, P., Ministri-Madrid, K., Killeen, N., Phillips, D.R. (1999) Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ signalling and platelet function. *Nature*, **401**, 808–811.
- 361 Moore, D.T., Nygren, P., Jo, H., Boesze-Battaglia, K., Bennett, J.S., DeGrado, W.F. (2012) Affinity of talin-1 for the β3 -integrin cytosolic domain is modulated by its phospholipid bilayer environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109** (3), 793–798.
- 362 Bonet, R., Vakonakis, I., Campbell, I.D. (2013) Characterization of 14-3-3- ζ Interactions with integrin tails. *Journal of Molecular Biology*, **425** (17), 3060–3072.
- 363 Louche, A., Salcedo, S.P., Bigot, S. (2017) Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **1615**, 247–255.
- 364 Bledzka, K., Liu, J., Xu, Z., Perera, H.D., Yadav, S.P., Bialkowska, K., Qin, J., Ma, Y.-Q., Plow, E.F. (2012) Spatial coordination of kindlin-2 with talin head domain in interaction with integrin β cytoplasmic tails. *Journal of Biological Chemistry*, **287** (29), 24585–24594.
- 365 Li, H., Deng, Y., Sun, K., Yang, H., Liu, J., Wang, M., Zhang, Z., Lin, J., Wu, C., Wei, Z., Yu, C. (2017) Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114** (35), 9349–9354.
- 366 Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., Pereda, J.M. de, Ginsberg, M.H., Calderwood, D.A. (2003) Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, **302** (5642), 103–106.

- 367 Ylänné, J., Huuskonen, J., O'Toole, T.E., Ginsberg, M.H., Virtanen, I., Gahmberg, C.G. (1995) Mutation of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. Differential effects on cell spreading, recruitment to adhesion plaques, endocytosis, and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry*, **270** (16), 9550–9557.
- 368 Su, X., Mi, J., Yan, J., Flevaris, P., Lu, Y., Liu, H., Ruan, Z., Wang, X., Kieffer, N., Chen, S., Du, X., Xi, X. (2008) RGT, a synthetic peptide corresponding to the integrin beta 3 cytoplasmic C-terminal sequence, selectively inhibits outside-in signaling in human platelets by disrupting the interaction of integrin alpha IIb beta 3 with Src kinase. *Blood*, **112** (3), 592–602.
- 369 Angelillo-Scherrer, A., Burnier, L., Flores, N., Savi, P., DeMol, M., Schaeffer, P., Herbert, J.-M., Lemke, G., Goff, S.P., Matsushima, G.K., Earp, H.S., Vesin, C., Hoylaerts, M.F., Plaisance, S., Collen, D., Conway, E.M., Wehrle-Haller, B., Carmeliet, P. (2005) Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *Journal of Clinical Investigation*, **115** (2), 237–246.
- 370 Nanda, N., Andre, P., Bao, M., Clauser, K., Deguzman, F., Howie, D., Conley, P.B., Terhorst, C., Phillips, D.R. (2005) Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood*, **106** (9), 3028–3034.
- 371 Arias-Salgado, E.G., Haj, F., Dubois, C., Moran, B., Kasirer-Friede, A., Furie, B.C., Furie, B., Neel, B.G., Shattil, S.J. (2005) PTP-1B is an essential positive regulator of platelet integrin signaling. *Journal of Cell Biology*, **170** (5), 837–845.
- 372 Lu, Z., Mathew, S., Chen, J., Hadziselimovic, A., Palamuttam, R., Hudson, B.G., Fässler, R., Pozzi, A., Sanders, C.R., Zent, R. (2016) Implications of the differing roles of the $\beta 1$ and $\beta 3$ transmembrane and cytoplasmic domains for integrin function. *eLife*, **5**.
- 373 Tanaka, T., Yamaguchi, R., Sabe, H., Sekiguchi, K., Healy, J.M. (1996) Paxillin association in vitro with integrin cytoplasmic domain peptides. *FEBS letters*, **399** (1-2), 53–58.
- 374 Baade, T., Michaelis, M., Klishin, N., Prestel, A., Paone, C., Hauck, C.R., Möller, H.M. Manuscript in preparation.
- 375 Gao, J., Huang, M., Lai, J., Mao, K., Sun, P., Cao, Z., Hu, Y., Zhang, Y., Schulte, M.L., Jin, C., Wang, J., White, G.C., Xu, Z., Ma, Y.-Q. (2017) Kindlin supports platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$ activation by interacting with paxillin. *Journal of cell science*, **130** (21), 3764–3775.
- 376 Theodosiou, M., Widmaier, M., Böttcher, R.T., Rognoni, E., Veelders, M., Bharadwaj, M., Lambacher, A., Austen, K., Müller, D.J., Zent, R., Fässler, R. (2016) Kindlin-2 cooperates with

- talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *eLife*, **5**, e10130.
- 377 Patching, S.G. (2014) Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. *Biochimica et biophysica acta*, **1838** (1 Pt A), 43–55.
- 378 Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., Lin, L.-N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical biochemistry*, **179** (1), 131–137.
- 379 Baade, T., Paone, C., Baldrich, A., Hauck, C.R. (2019) Clustering of integrin β cytoplasmic domains triggers nascent adhesion formation and reveals a protozoan origin of the integrin-talin interaction. *Scientific reports*, **9** (1), 5728.
- 380 Pasapera, A.M., Schneider, I.C., Rericha, E., Schlaepfer, D.D., Waterman, C.M. (2010) Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *Journal of Cell Biology*, **188** (6), 877–890.
- 381 Provencher, S.W. and Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, **20** (1), 33–37.
- 382 Qin, X.R., Hayashi, F., Yokoyama, S. (2006) *Solution structure of the second LIM domain of particularly interesting new Cys-His protein (PINCH)*.
- 383 Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2004) Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chemical reviews*, **104** (8), 3607–3622.
- 384 Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, **157** (1), 105–132.
- 385 Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D., Hochstrasser, D.F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **112**, 531–552.
- 386 Chen, X., Zaro, J.L., Shen, W.-C. (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews*, **65** (10), 1357–1369.
- 387 van Rosmalen, M., Krom, M., Merckx, M. (2017) Tuning the Flexibility of Glycine-Serine Linkers To Allow Rational Design of Multidomain Proteins. *Biochemistry*, **56** (50), 6565–6574.
- 388 Bertani, G. (1951) Studies on lyogenesis: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, **62** (3), 293–300.
- 389 NEB Tm Calculator. <http://tmcalculator.neb.com/#!/main> (11 February 2020).

- 390 LALIGN Server. https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html (11 February 2020).
- 391 Oligo Analyzer. <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> (11 February 2020).
- 392 McShan, A.C., Kaur, K., Chatterjee, S., Knight, K.M., de Guzman, R.N. (2016) NMR identification of the binding surfaces involved in the Salmonella and Shigella Type III secretion tip-translocon protein-protein interactions. *Proteins*, **84** (8), 1097–1107.
- 393 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259), 680–685.
- 394 Schägger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, **1** (1), 16–22.
- 395 Fernandez-Patron, C., Castellanos-Serra, L., Rodriguez, P. (1992) Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: sensitive detection of unmodified proteins. *BioTechniques*, **12** (4), 564–573.
- 396 Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G. (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, **25** (9), 1327–1333.
- 397 Potter, V.R. and Elvehjem, C.A. (1936) A modified method for the study of tissue oxidations. *Journal of Biological Chemistry*, **114** (2), 495–504.
- 398 Beer, A. (1852) Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik und Chemie*, **162** (5), 78–88.
- 399 Murata, H., Cummings, C.S., Koepsel, R.R., Russell, A.J. (2013) Polymer-Based Protein Engineering Can Rationally Tune Enzyme Activity, pH-Dependence, and Stability. *Biomacromolecules*, **14** (6), 1919–1926.
- 400 Wang, X., Shi, Y., Graff, R.W., Cao, X., Gao, H. (2016) Synthesis of Hyperbranched Polymers with High Molecular Weight in the Homopolymerization of Polymerizable Trithiocarbonate Transfer Agent without Thermal Initiator. *Macromolecules*, **49** (17), 6471–6479.
- 401 Vanparijs, N., Maji, S., Louage, B., Voorhaar, L., Laplace, D., Zhang, Q., Shi, Y., Hennink, W.E., Hoogenboom, R., Geest, B.G. de (2015) Polymer-protein conjugation via a ‘grafting to’ approach – a comparative study of the performance of protein-reactive RAFT chain transfer agents. *Polymer Chemistry*, **6** (31), 5602–5614.
- 402 Keller, R. (2004) *The computer aided resonance assignment tutorial*, 1st edn, Cantina Verl., Goldau.

12 Anhang

12.1 Material und Methoden

12.1.1 Proteinsequenzen

His₆-Tag + Thrombin-Schnittstelle

10 20
 MGSSHHHHHH SGLVPRGSH

His₆-SUMO-Tag

10 20 30 40 50 60
 MGHHHHHHGS DSEVNQEAKP EVKPEVKPET HINLKVSDGS SEIFFKIKKT TPLRRLMEAF

70 80 90 100 106
 AKRQ GKEMDS LRFLYDGIRI QADQTPEDLD MEDNDIIEAH REQIGG

Cbh9A CBM3b^{WT} (In der Arbeit verwendete Sequenz in rot entsprechend der in [192])

30 40 50 60 70 80
10 20 30 40 50 60
 MDVKVQYLCE NTQTSTQEI^K GKFNIVNTGN RDYSLKDIVL RYYFTKEHNS QLQFICYYP

90 100 110 120 130 140
70 80 90 100 110 120
 IGSGNLI^{PSF} GSGDEHYL^Q LEFKDVKLPA GGQTGEIQFV IRYADNSFHD QSDYSFDPT

150 160 166
130 140 146
 IKA^{FQ}DYGV TLYKNGELVW GTPPG

Cbh9A CBM3b^{N126W} (In der Arbeit verwendete Sequenz in rot entsprechend der in [192])

30 40 50 60 70 80
10 20 30 40 50 60
MDVKVQYLCE NTQTSTQEI^K GKFNIVNTGN RDYSLKDIVL RYYFTKEHNS QLQFICYYP

90 100 110 120 130 140
70 80 90 100 110 120
IGSGNLI^{PSF} GSGDEHYLQ LEFKDVKLPA GGQTGEIQFV IRYAD^{WSFHD} QSDYSFDPT

150 160 166
130 140 146
IKAFQDYGV TLYKNGELVW GTPPGG

Integrin-β1 (UniProtKb – P05556 in rot, Klonierungsartefakte in violett)

758 763 773 783 793 798
10 20 30 40 45
RDPD^{HDRREF} AKFEKEKMNA KWD^{TGENPIY} KSAVTTVVNP KYEGK

Integrin-β3 (UniProtKb – P05106 in rot, Klonierungsartefakte in violett)

748 753 763 773 783 788
10 20 30 40 45
RDPD^{HDRKEF} AKFEEERARA KWD^{TANNPLY} KEATSTFTNI TYRGT

Integrin-β3ΔRGT (UniProtKb – P05106 in rot, Klonierungsartefakte in violett)

748 753 763 773 783 785
10 20 30 40 42
RDPD^{HDRKEF} AKFEEERARA KWD^{TANNPLY} KEATSTFTNI TY

Paxillin LIM3

(UniProtKb – P49023 α-Isoform in rot, Klonierungsartefakte in violett, Nef-Tag in orange)

449 459 469 479 489 499
10 20 30 40 50 60
PKCGGCARAI LENYISALNT LWHPECFVCR ECFTPFVNGS FFEHDGQPYC EVHYHERRGS

67
PEYFKNG

Paxillin LIM2/3(UniProtKb – P49023 α -Isoform in rot, Klonierungsartefakte in violett, Nef-Tag in orange)

<u>389</u>	<u>399</u>	<u>409</u>	<u>419</u>	<u>429</u>	<u>439</u>
<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
SPRCYYCNGP	ILDKVVTALD	RTWHPEHFFC	AQCGAFFGPE	GFHEKDGKAY	CRKDYFDMFA
<u>449</u>	<u>459</u>	<u>469</u>	<u>479</u>	<u>489</u>	<u>499</u>
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
PKCGGCARAI	LENYISALNT	LWHPECFVCR	ECFTPFVNGS	FFEHDGQPYC	EVHYHERRGS

127
PEYFKNG

Paxillin LIM2/3 GAGNG(UniProtKb – P49023 α -Isoform in rot, Klonierungsartefakte in violett, Nef-Tag in orange, Mutationssequenz in blau)

<u>389</u>	<u>399</u>	<u>409</u>	<u>419</u>	<u>429</u>	<u>439</u>
<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
SPRCYYCNGP	ILDKVVTALD	RTWHPEHFFC	AQCGAFFGPE	GFHEKDGKAY	CRKDYFDMFA
<u>449</u>	<u>459</u>	<u>469</u>	<u>479</u>	<u>489</u>	<u>499</u>
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
PKCGGCARAI	LENYISALNT	LWHPECFVCR	ECFTPGAGNG	EHDGQPYCEV	HYHERRGSPE

125
YFKNG

Paxillin LIM2/3 SSGSGS(UniProtKb – P49023 α -Isoform in rot, Klonierungsartefakte in violett, Nef-Tag in orange, Mutationssequenz in blau)

<u>389</u>	<u>399</u>	<u>409</u>	<u>419</u>	<u>429</u>	<u>439</u>
<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
SPRCYYCNGP	ILDKVVTALD	RTWHPEHFFC	AQCGAFFGPE	GFHEKDGKAY	CRKDYFDMFA
<u>449</u>	<u>459</u>	<u>469</u>	<u>479</u>	<u>489</u>	<u>499</u>
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
PKCGGCARAI	LENYISALNT	LWHPECFVCR	ECFTPSGSGS	GSEHDGQPYC	EVHYHERRGS

127
PEYFKNG

12.2 Ergebnisse und Diskussion

12.2.1 Molekulare Erkennung von Cellulose und Cellulose-Fragmenten durch Cellulose-Bindemodule

12.2.2 Expression & Reinigung der Cbh9A CBM3b-Konstrukte

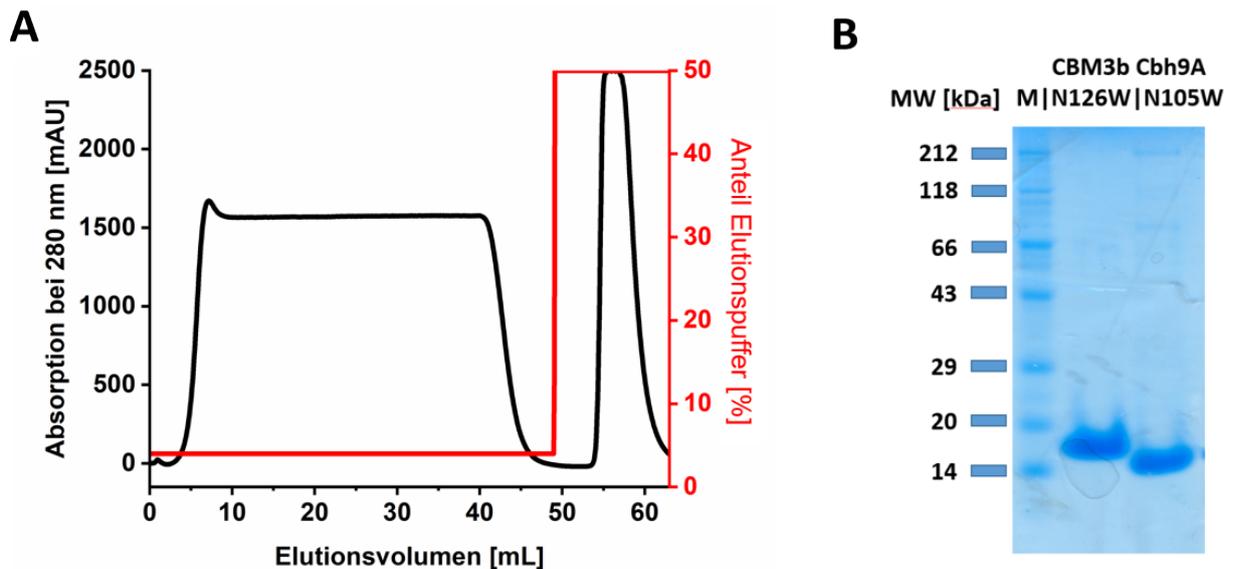


Abbildung 41 | A) Chromatogramm der zweiten Ni^{2+} -Affinitätschromatographie von Cbh9A CBM3b^{N126W} (schwarz) mit dazugehöriger Konzentration an Elutionspuffer (rot). B) SDS-PAGE-Gel vor (18.7 kDa) und nach dem Verdau mit Thrombin (16.6 kDa) mit aufgetragenem Größenmarker (M).

12.2.3 Untersuchung der Cellulose-Bindeeigenschaft der Cbh9A CBM3b Konstrukte

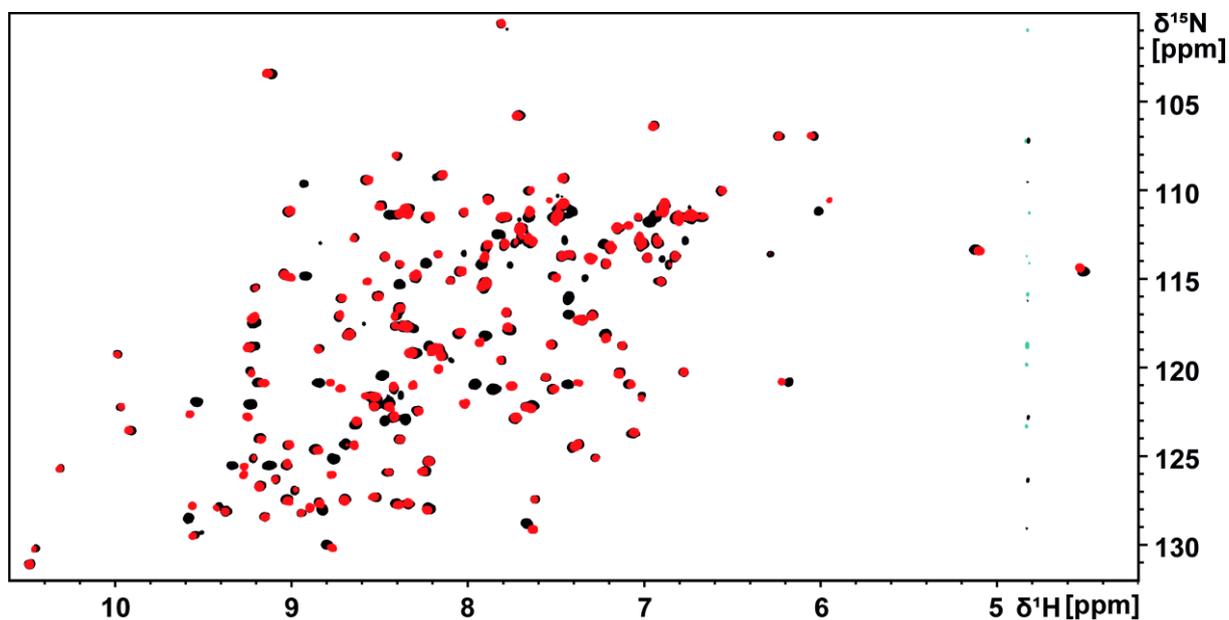


Abbildung 42 | Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM $^{\text{N126W}}$ vor (schwarz) und nach Zugabe von 30 mM Cellobiose (rot).

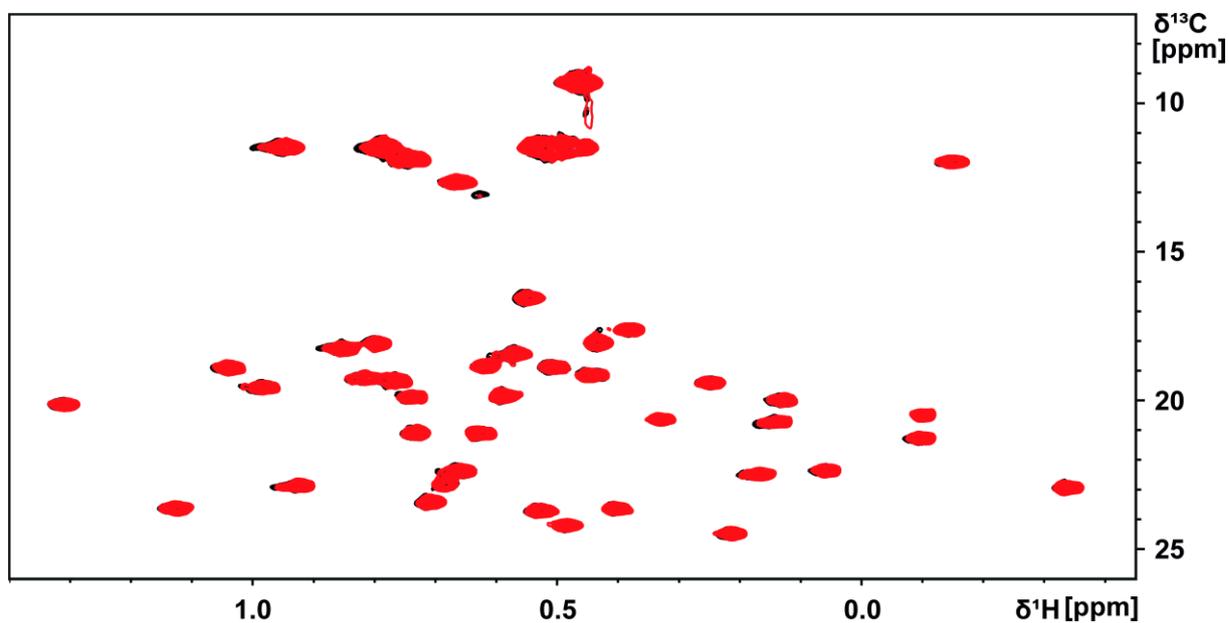


Abbildung 43 | Überlagerung der ^1H - ^{13}C -HMQC-Spektren von Cbh9A CBM $^{\text{N126W}}$ vor (schwarz) und nach Zugabe von 5 mM Cellobiose (rot).

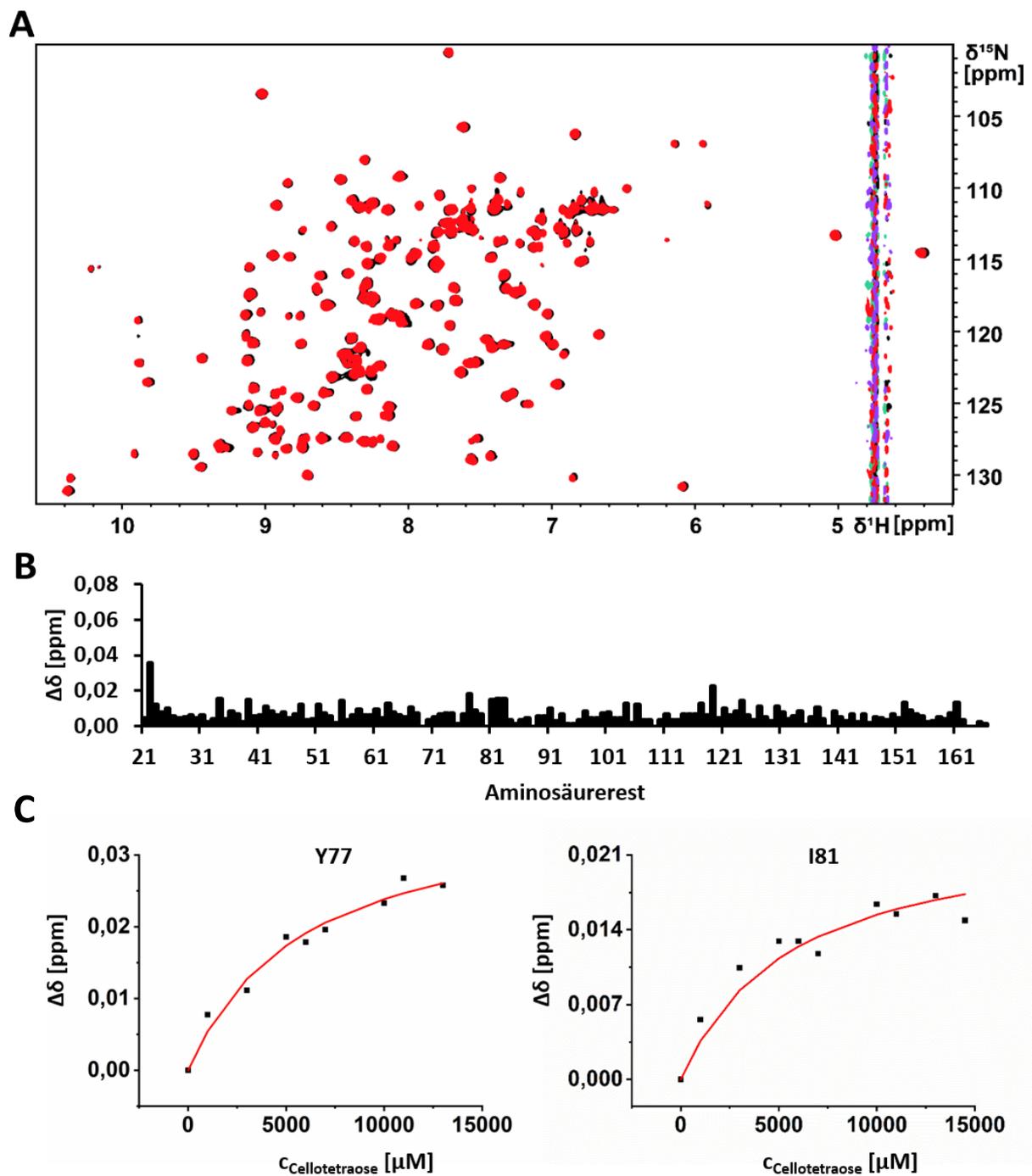


Abbildung 44 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM^{WT} vor (schwarz) und nach Zugabe von 18 mM Cellotetraose (rot). B) CSPs in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. C) Titrationskurve von ausgewählten Aminosäureresten mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8.

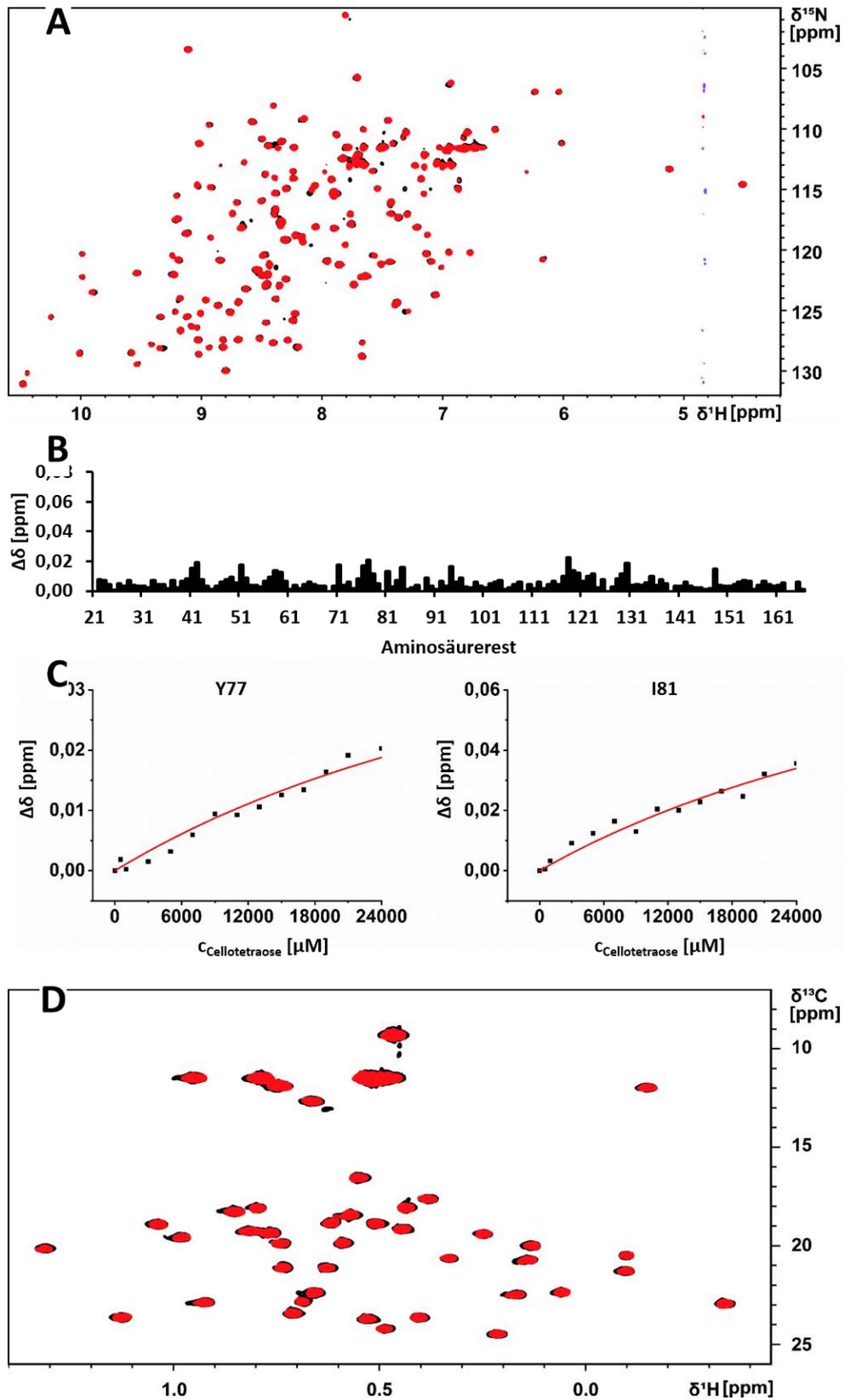


Abbildung 45 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM^{N126W} vor (schwarz) und nach Zugabe von 24 mM Cellotetraose (rot). B) CSPs in Abhängigkeit der jeweiligen Aminosäurereste. C) Titrationskurve von ausgewählten Aminosäureresten mit dazugehöriger Fittingkurve gemäß *one site binding* nach Glg. 8. D) Überlagerung der ^1H - ^{13}C -HMQC-Spektren von Cbh9A CBM^{N126W} vor (schwarz) und nach Zugabe von 5 mM Cellotetraose (rot).

12.2.4 Untersuchung der Calcium-Bindestelle

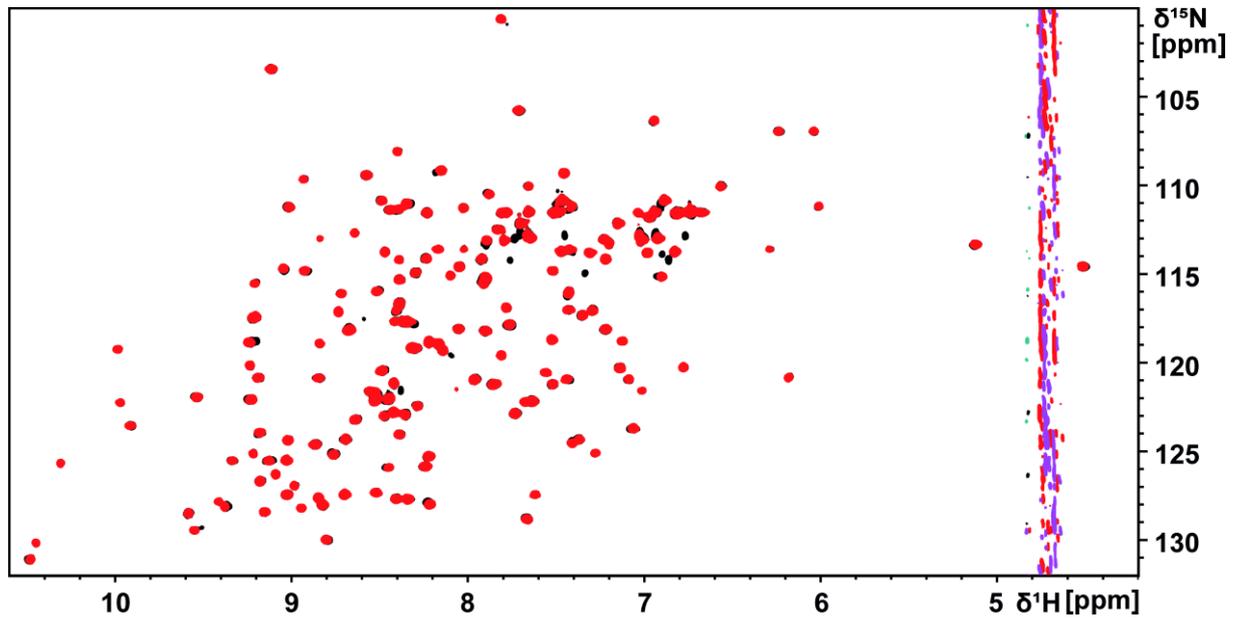


Abbildung 46 | Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM^{WT} vor (schwarz) und nach Zugabe von 5 mM Calciumchlorid (rot).

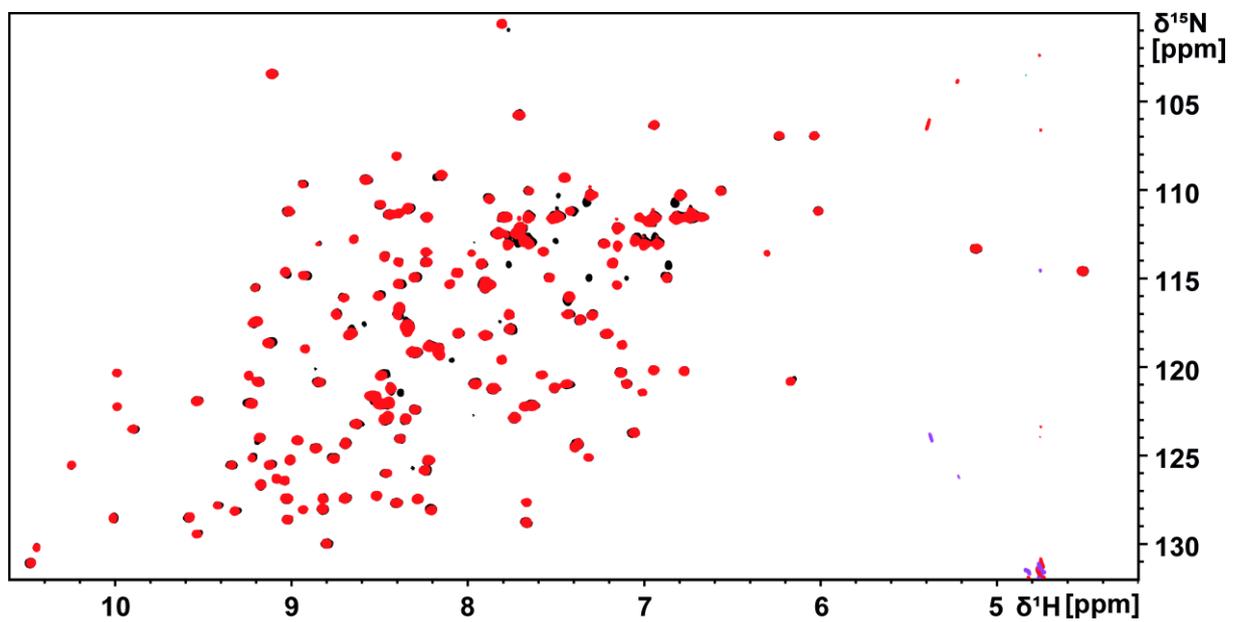


Abbildung 47 | Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM^{N126W} vor (schwarz) und nach Zugabe von 5 mM Calciumchlorid (rot)

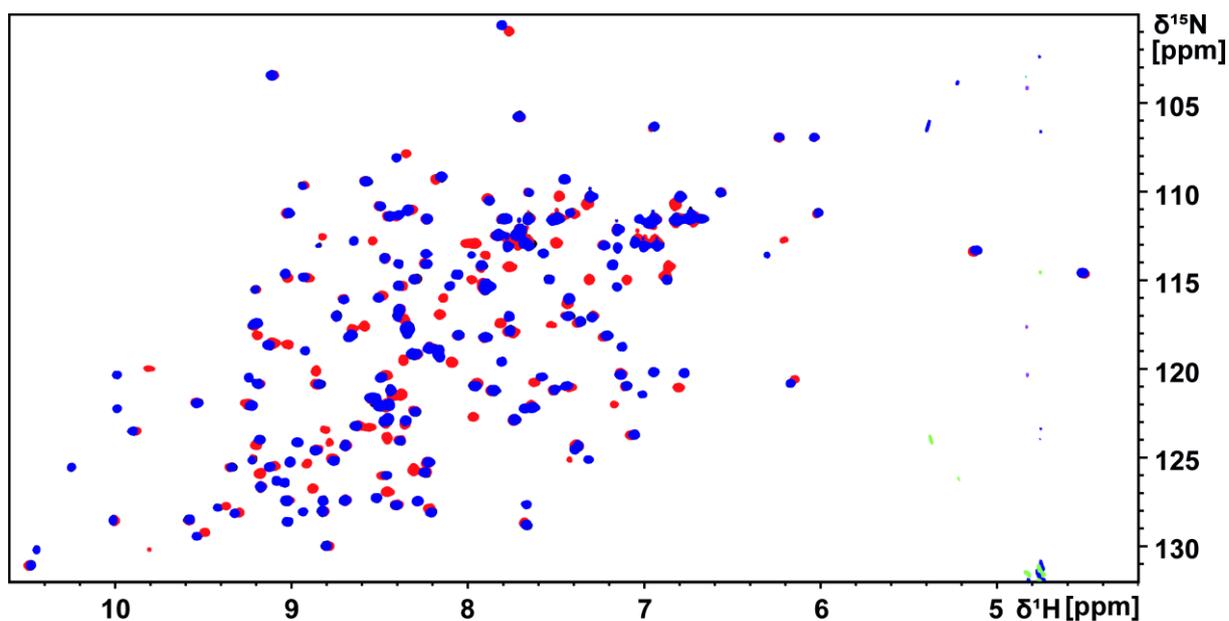


Abbildung 48 | Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM^{N126W} vor (schwarz) und nach Zugabe von 250 μM EDTA (rot) und 5 mM Calciumchlorid (blau).

12.2.5 Cbh9A CBM3b als Modell für Protein-Polymer-Konjugate

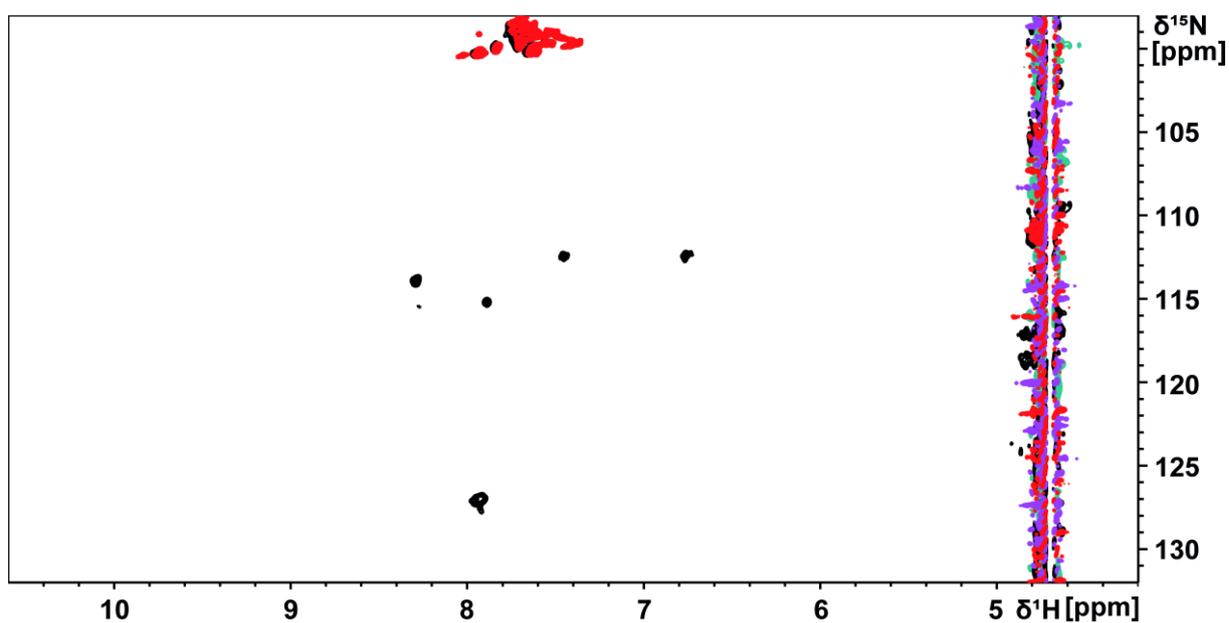


Abbildung 49 | Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM^{N126W} nach Konjugation mit 100 Wiederholeinheiten PNIPAm (schwarz) und von reinem PNIPAm (rot).

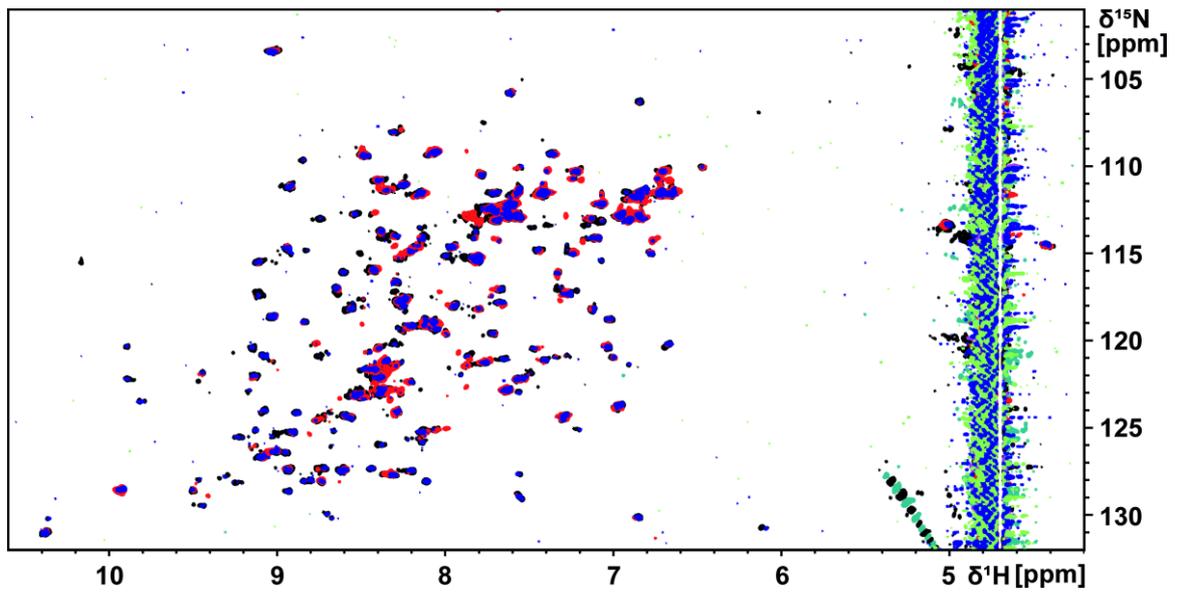


Abbildung 50 | Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Cbh9A CBM^{N126W} nach PNIPAm-Konjugation bei pH-Wert 7.4 (schwarz), 8.2 (rot) und 9.0 (blau).

12.3 Interaktionsstudien zwischen den zytoplasmatischen Domänen von Integrin- $\beta 1/\beta 3$ und dem fokalen Adhäsionsprotein Paxillin

12.3.1 Expression- und Reinigungsstrategien

12.3.1.1 Paxillin-Konstrukte

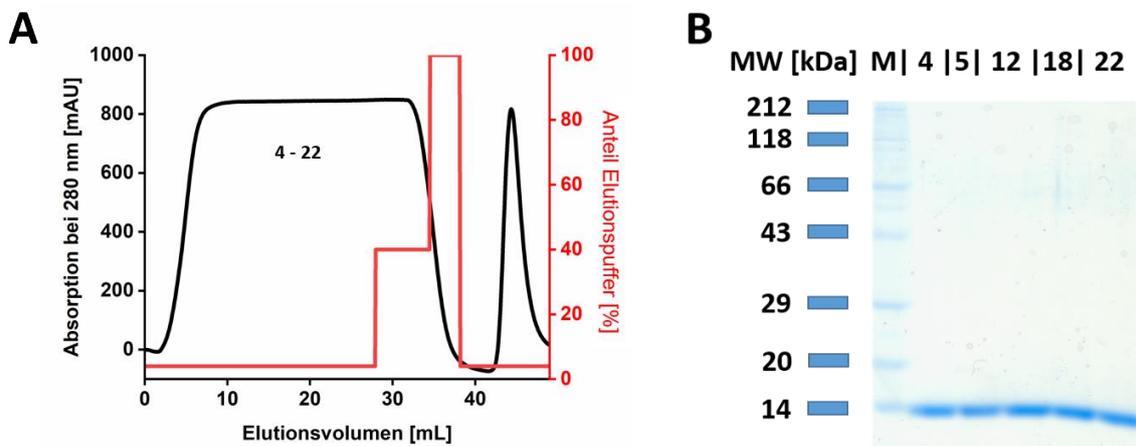


Abbildung 51 | UV/Vis-Chromatogramm der zweiten Ni^{2+} -Affinitätschromatographie (schwarz) mit dazugehöriger Konzentration an Elutionspuffer (rot) von Paxillin LIM2/3 GAGNG. B) SDS-PAGE-Gel der zweiten Ni^{2+} -Affinitätschromatographie mit Größenmarker (M) und proteinenthaltene Fraktionen (4 – 22).

12.3.1.2 Proteolytischer Abbau der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- $\beta 3$

Tabelle 15 | Exakte Massen von Integrin- $\beta 3$, den Degradationprodukten und AEBSF-Addukten

Fragment	Summenformel	Theoretische Masse	Gemessene Masse	Abweichung
5357	$\text{C}_{236}\text{H}_{358}\text{N}_{70}\text{O}_{74}$	$[766.2416]^{7+}$	$[766.2394]^{7+}$	0.4
5042	$\text{C}_{224}\text{H}_{336}\text{N}_{64}\text{O}_{70}$	$[721.3601]^{7+}$	$[721.3581]^{7+}$	0.4
4450	$\text{C}_{197}\text{H}_{296}\text{N}_{58}\text{O}_{61}$	$[742.7046]^{6+}$	$[742.7028]^{6+}$	0.4
3685	$\text{C}_{163}\text{H}_{244}\text{N}_{50}\text{O}_{49}$	$[615.3096]^{6+}$	$[615.3076]^{6+}$	0.5
3523	$\text{C}_{154}\text{H}_{235}\text{N}_{49}\text{O}_{47}$	$[588.1323]^{6+}$	$[588.1306]^{6+}$	0.4
2827	$\text{C}_{123}\text{H}_{187}\text{N}_{35}\text{O}_{42}$	$[566.2787]^{5+}$	$[566.2771]^{5+}$	0.6
2797	$\text{C}_{124}\text{H}_{188}\text{N}_{40}\text{O}_{35}$	$[467.2433]^{6+}$	$[467.2404]^{6+}$	1.0
5540	$\text{C}_{244}\text{H}_{367}\text{N}_{71}\text{O}_{76}\text{S}_1$	$[792.8142]^{7+}$	$[792.8192]^{7+}$	-0.9

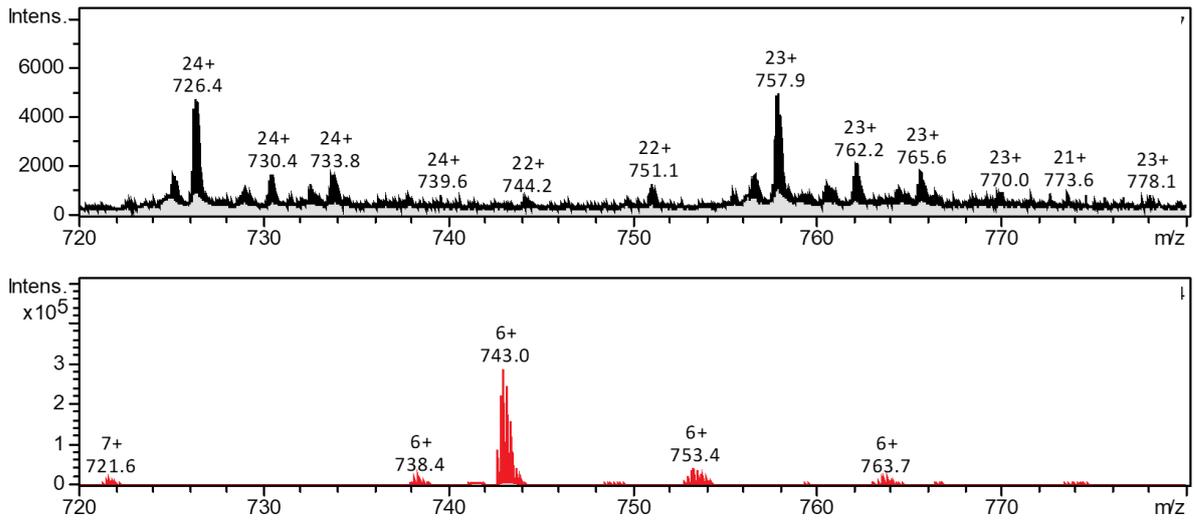


Abbildung 52 | ESI-MS-Spektren von Integrin-β3 nach der Behandlung mit Roche cComplete™ Proteaseinhibitoren nach der ersten Ni²⁺-Affinitätschromatographie (schwarz) und nach der Gelpermeationschromatographie (rot).

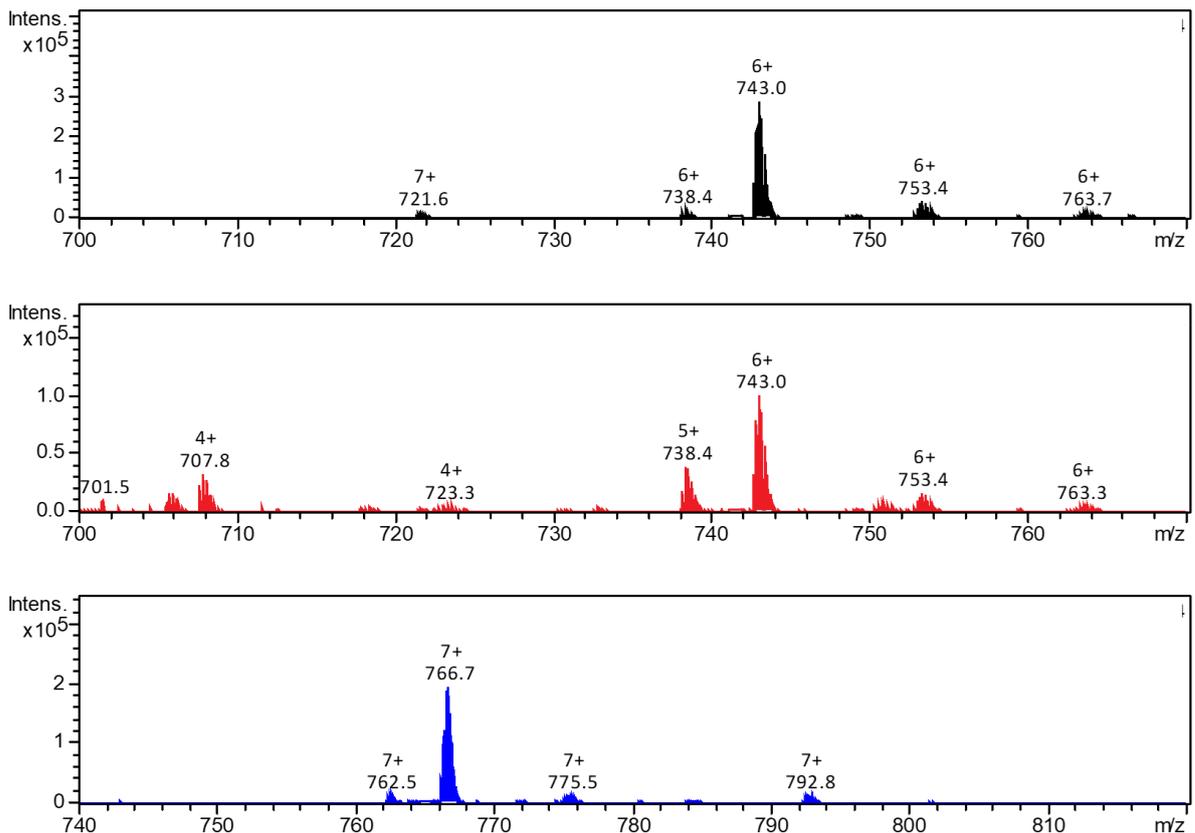


Abbildung 53 | ESI-MS-Spektren von Integrin-β3 nach der Behandlung mit SIGMAFAST™ Proteaseinhibitor Cocktail nach der Gelpermeationschromatographie vom Hauptpeak (schwarz), von der Schulter des Hauptpeaks (rot) und vom Hauptpeak nach der Behandlung während des Zellaufschlusses mit AEBSF (blau).

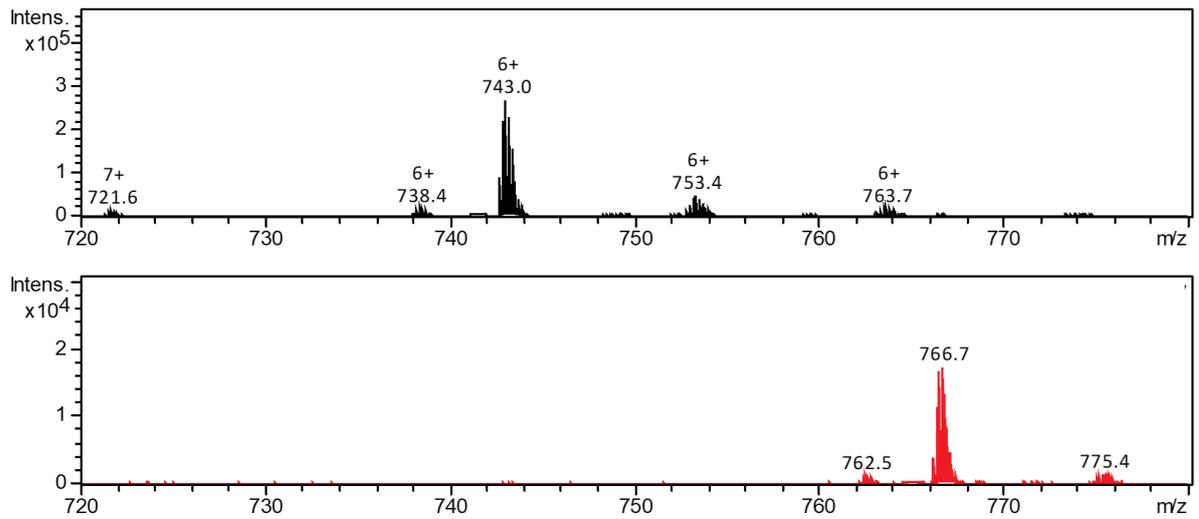


Abbildung 54 | ESI-MS-Spektren von Integrin-β3 nach der Behandlung mit SIGMAFAST™ Proteaseinhibitor Cocktail und einer Woche Lagerung bei 4 °C ohne (schwarz) und mit Behandlung mit AEBSF (rot).

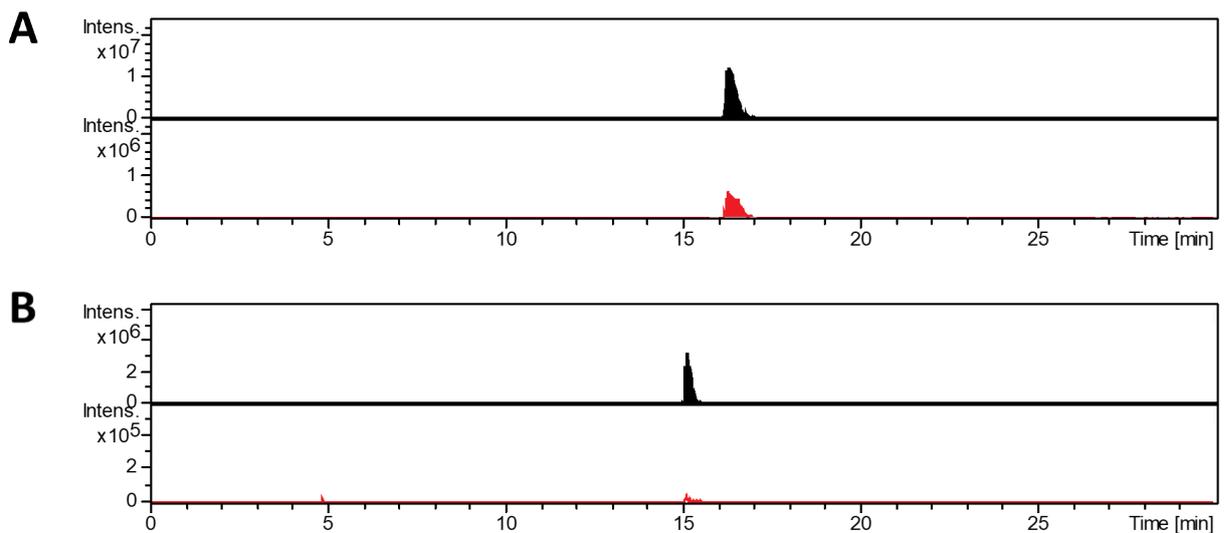


Abbildung 55 | LC-Chromatogramme von unmodifiziertem (schwarz) und AEBSF-modifiziertem Integrin-β3 (rot) nach Zugabe von A) drei Mal 2 mM AEBSF und B) einmal 2 mM AEBSF.

12.3.2 Interaktionsstudien von Integrin- β 1/ β 3 mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin

12.3.2.1 Bindungsstudie der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 mit der LIM3-Domäne von Paxillin

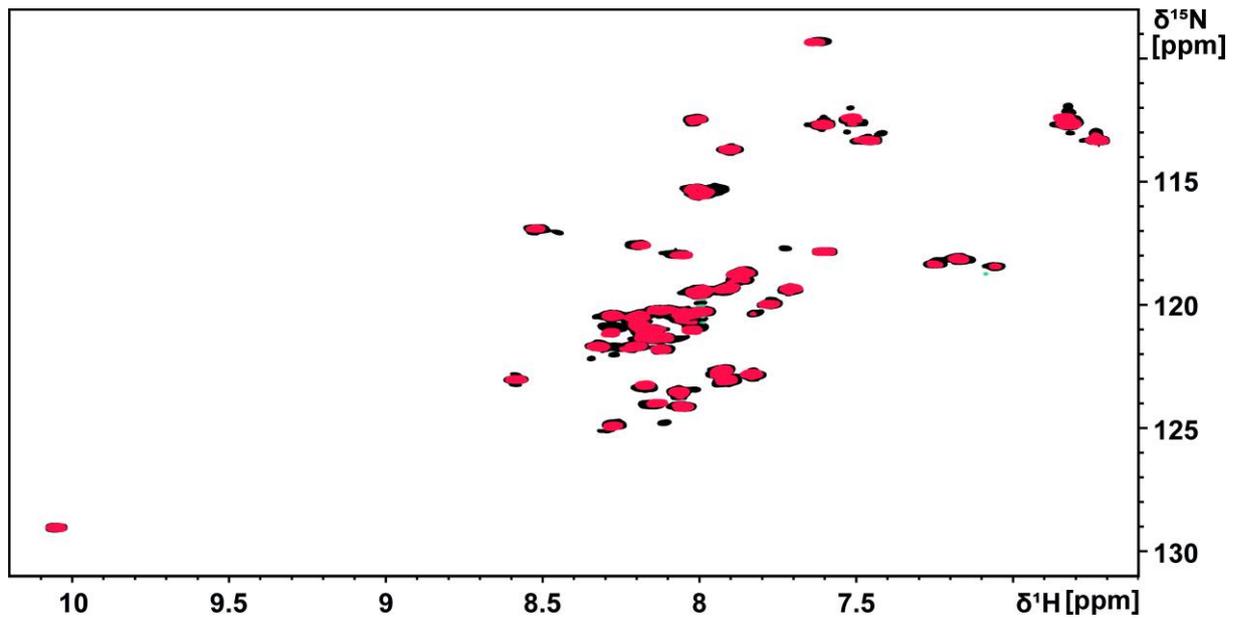


Abbildung 56 | Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Integrin- β 3 vor (schwarz) und nach Zugabe von 900 μM Paxillin LIM3 (rot).

12.3.2.2 Bindungsstudie der verkürzten zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 3 mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin

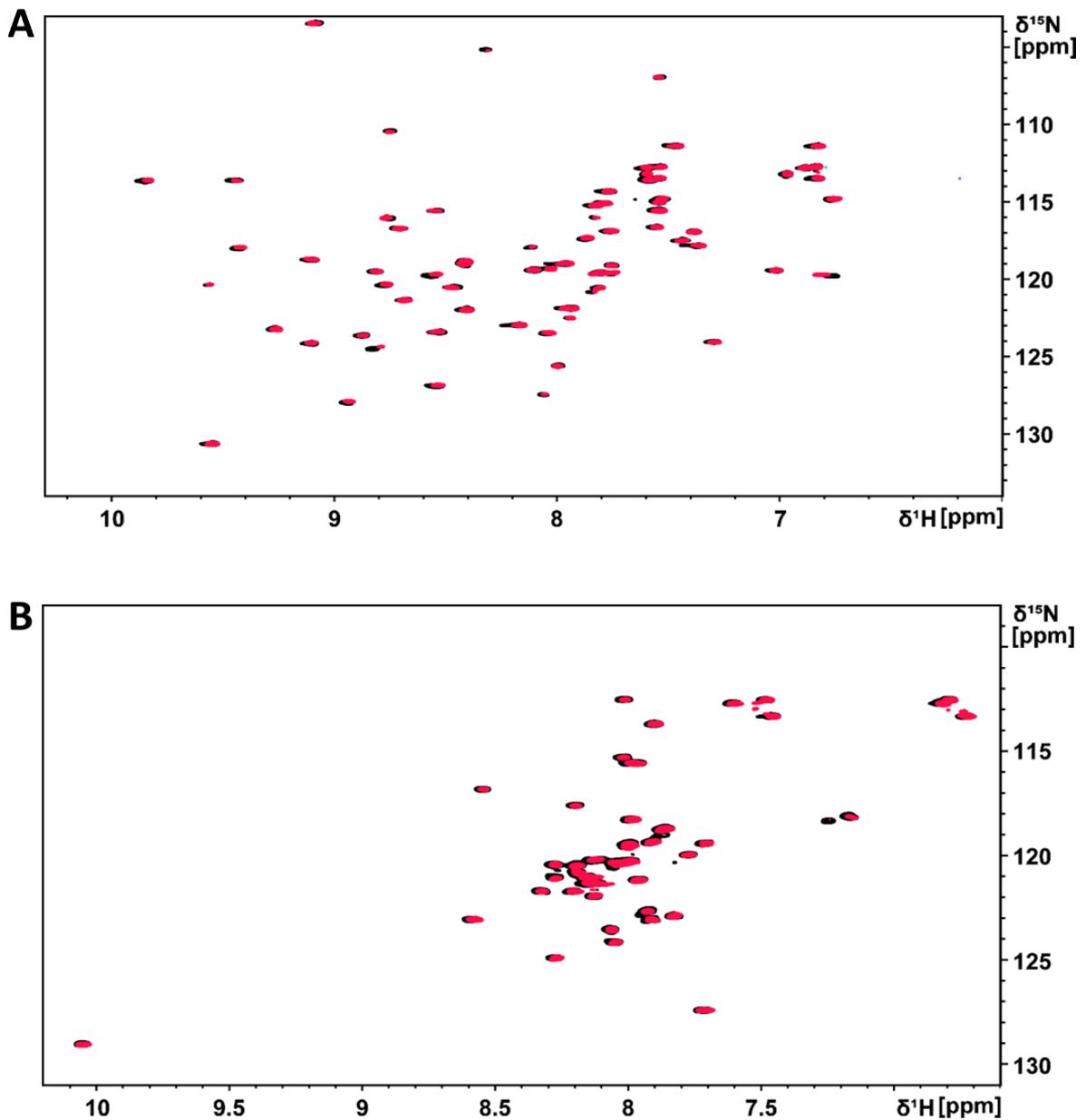


Abbildung 57 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Paxillin LIM2/3 vor (schwarz) und nach Zugabe von 840 μM Integrin- β 3 Δ RGT (rot). B) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Integrin- β 3 Δ RGT vor (schwarz) und nach Zugabe von 1050 μM Paxillin LIM2/3 (rot).

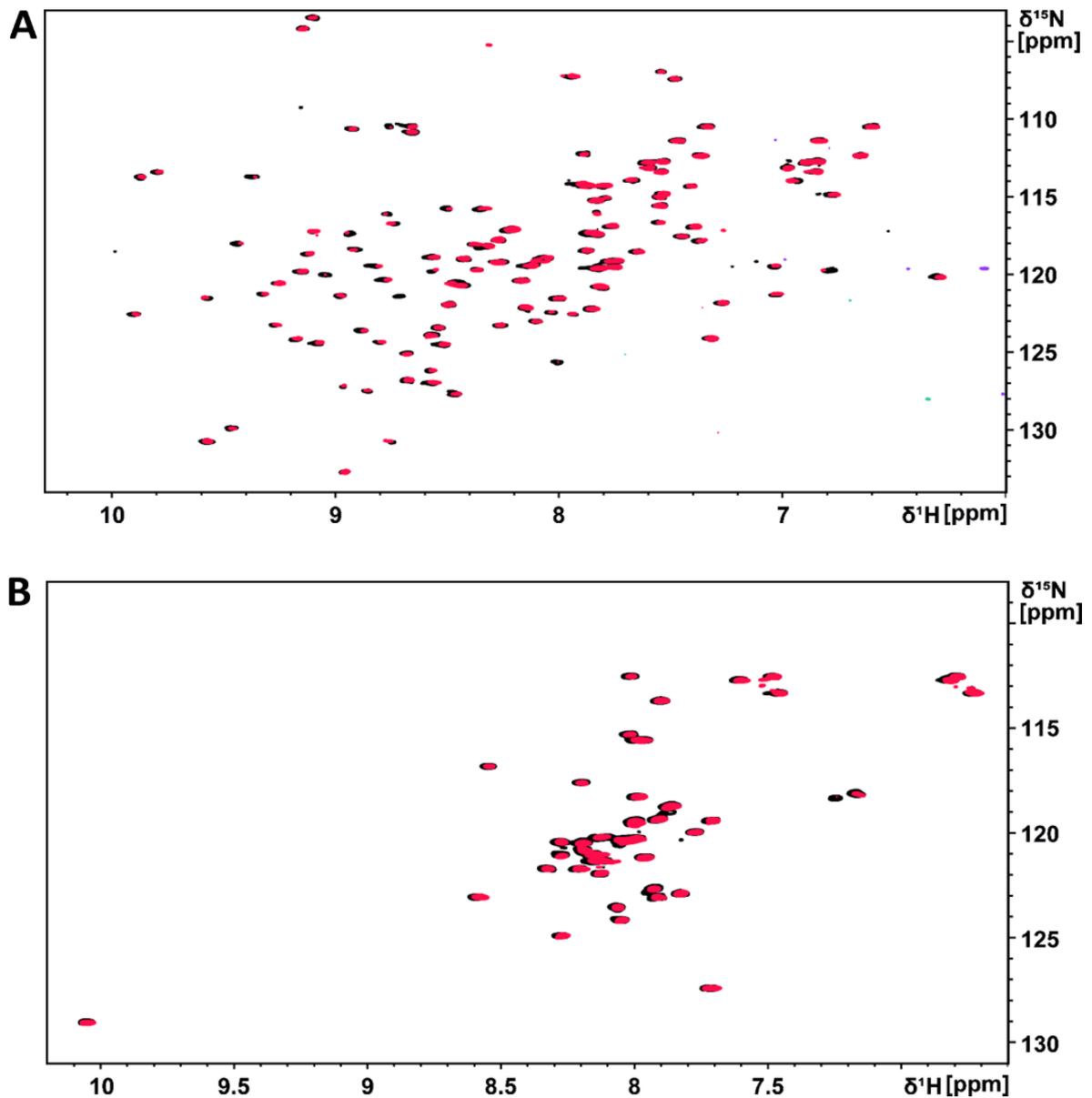


Abbildung 58 | A) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Paxillin LIM3 vor (schwarz) und nach Zugabe von $500\ \mu\text{M}$ Integrin- $\beta 3\Delta\text{RGT}$ (rot). B) Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Integrin- $\beta 3\Delta\text{RGT}$ vor (schwarz) und nach Zugabe von $1000\ \mu\text{M}$ Paxillin LIM3 (rot).

12.3.2.3 Bindungsstudie der zytoplasmatischen Domäne von Integrin- β 1 mit der LIM2/3-Tandem-Domäne von Paxillin

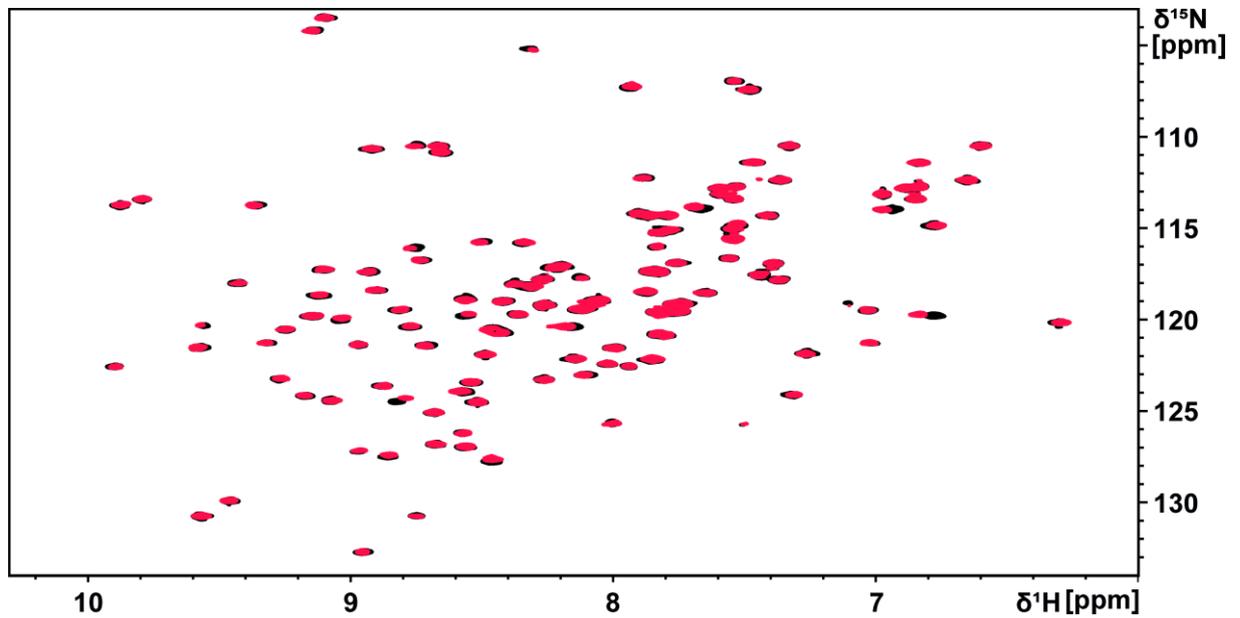


Abbildung 59 | Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von Paxillin LIM2/3 vor (schwarz) und nach Zugabe von 500 μM Integrin- β 1 (rot).