

Erkennung Prolin-reicher Motive (PRMs) durch Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen

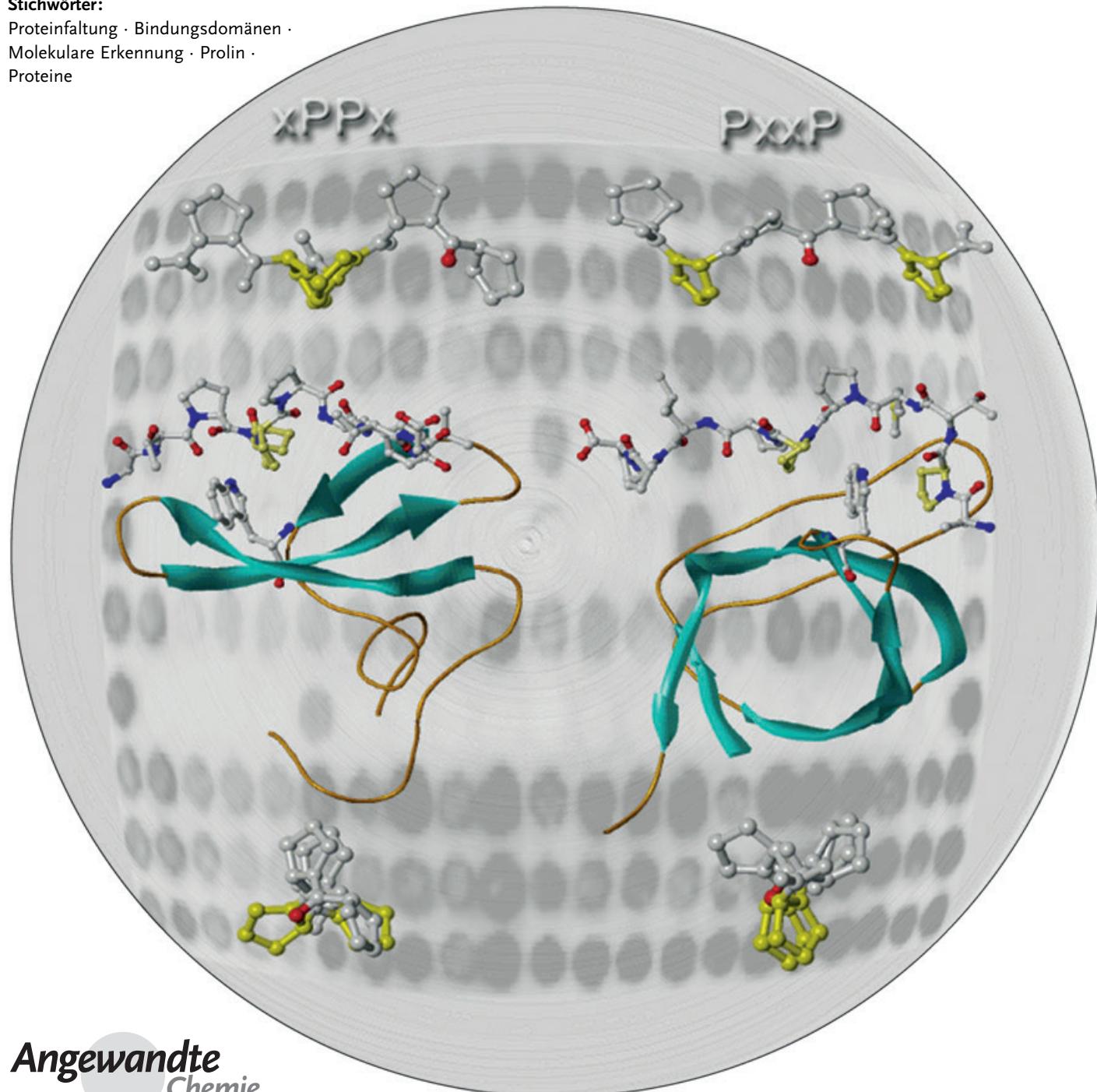
Linda J. Ball,* Ronald Kühne, Jens Schneider-Mergener und Hartmut Oschkinat*

Stichwörter:

Proteinfaltung · Bindungsdomänen ·

Molekulare Erkennung · Prolin ·

Proteine



Protein-Protein-Wechselwirkungen sind für alle Aspekte zellulärer Aktivität wichtig. Bildung und Dissoziation der Multiproteinkomplexe erfolgen auf spezifische Weise, oft mit ähnlichen Mechanismen. Bei der Signalübertragung sind häufig Proteindomänen beteiligt, die Prolin-reiche Motive binden (PRMs); Prolin begünstigt die spezifische Erkennung derartiger Motive, ohne dass dabei hohe Affinitäten benötigt werden. In diesem Aufsatz stellen wir eine detaillierte und quantitative Bewertung der Strukturmerkmale vor, die die Wechselwirkungen zwischen den PRM-Bindungsdomänen und den PRMs der Liganden festlegen, und untersuchen die Spezifität der PRM-Erkennung. Durch Kombination mit Ergebnissen des Screenings von Peptidbibliotheken konnten wir verschiedene hoch konservierte Wechselwirkungen identifizieren, die in allen Komplexen von PRM-Bindungsdomänen vorkommen. Das Unterdrücken von Protein-Protein-Wechselwirkungen mithilfe kleiner Moleküle ist eine große Herausforderung – daher ist es wichtig, zunächst genau die kritischen Wechselwirkungen zu identifizieren, die beim Design von Inhibitoren von PRM-Bindungsdomänen zu berücksichtigen sind.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	2913
2. SH3-Domänen	2916
3. WW-Domänen	2919
4. EVH1-Domänen	2921
5. GYF-Domänen	2924
6. UEV-Domänen	2925
7. Profilin	2925
8. Allgemeine Merkmale der Wechselwirkungen von Proteinen mit PRMs	2926
9. Zusammenfassung und Ausblick	2928

1. Einleitung

Modulare Proteine, die an der Signalübertragung beteiligt sind, nutzen oft hoch konservierte nichtkatalytische Adapterdomänen, die während des Aufbaus der signalgebenden Multiproteinkomplexe die Bildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. Die Ausprägung der Protein-Protein-Wechselwirkungen unterliegt dabei mehreren Voraussetzungen: Erstens muss die fehlerfreie Erkennung des Bindungspartners gewährleistet sein, um eine hohe Spezifität der Wechselwirkung zu garantieren. Zweitens muss die Wechselwirkung hoch reversibel sein, um eine schnelle Dissoziation der Komplexe nach der Beendigung des Stimulus zu erreichen. Entsprechend werden Affinitäten im mikro- und nanomolaren Bereich benötigt.

Es ist bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Familien von Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen beschrieben worden (Übersichtsartikel siehe Lit. [1–6]). In den meisten Fällen erkennen diese Domänen Zielmotive, die phosphorylierte Reste enthalten; bekannte Beispiele dafür sind die Src-homology-2(SH2)-Domänen und die Phosphotyrosin-bindenden (PTB) Domänen, die Sequenzmotive mit phosphoryliertem Tyrosin erkennen.^[7–9] Die häufig in Signalproteinen vorkommende Forkhead-associated(FHA)-Domäne bindet an Proteinsegmente, die Phosphoserin oder Phosphothreonin enthalten. Daraus lässt sich schließen, dass FHA-Domänen die SH2-Äquivalente in den Phosphoserin- und Phosphothreonin-abhängigen Signalwegen sind.^[10] Phosphoserin und Phosphothreonin werden auch von Proteinen der 14-3-3-Familie und den WW-Domänen der Klasse IV gebunden, was interessante und unerwartete Ähnlichkeiten zwischen diesen Familien offenbart. Eine ebenfalls gut untersuchte Gruppe von Adapterdomänen ist die Familie der Postsynaptic-density/Disc-large/ZO1(PDZ)-Domänen, die die äußersten C-

terminalen Sequenzen des Bindungspartners erkennen und daran binden.^[7] Weiterhin sind verschiedene Familien von Proteindomänen bekannt, die spezifisch Peptide mit Prolin-reichen Sequenzen (PRM) binden. Diese PRM-bindenden Domänen sind besonders häufig an Signalübertragungen unter Mitwirkung von Multiproteinkomplexen beteiligt und sind das Thema dieser Übersicht.

1.1 Erkennung von Prolin-reichen Motiven durch PRM-bindende Module

Zurzeit sind sechs Familien von PRM-bindenden Modulen bekannt: die Src-homology-3(SH3)-Domänen,^[13,14] die WW-Domänen,^[15,16] die EVH1-Domänen,^[17–19] die GYF-Domänen (auch als CD2-Bindungsdomänen bezeichnet),^[20,21] die UEV-Domänen^[22,23] und das aus einer Domäne bestehende Profilin.^[24,25] Alle diese Domänen interagieren mit den PRMs im Bereich eines K_d -Wertes zwischen 1 und 500 μM und benötigen weitere, flankierende Epitope, um die notwendige Spezifität zu erreichen. In Abbildung 1 sind die hochaufgelösten Strukturen von jeweils einem Repräsentanten der derzeit bekannten Familien von PRM-Bindungsdomänen

[*] Dr. L. J. Ball, Dr. R. Kühne, Prof. Dr. H. Oschkinat
Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax.: (+49) 30-94793-169
E-mail: linda@fmp-berlin.de
oschkinat@fmp-berlin.de
Prof. Dr. J. Schneider-Mergener
Institut für Medizinische Immunologie
Charité, Humboldt Universität
Hessische Straße 3–4, 10115 Berlin (Deutschland)

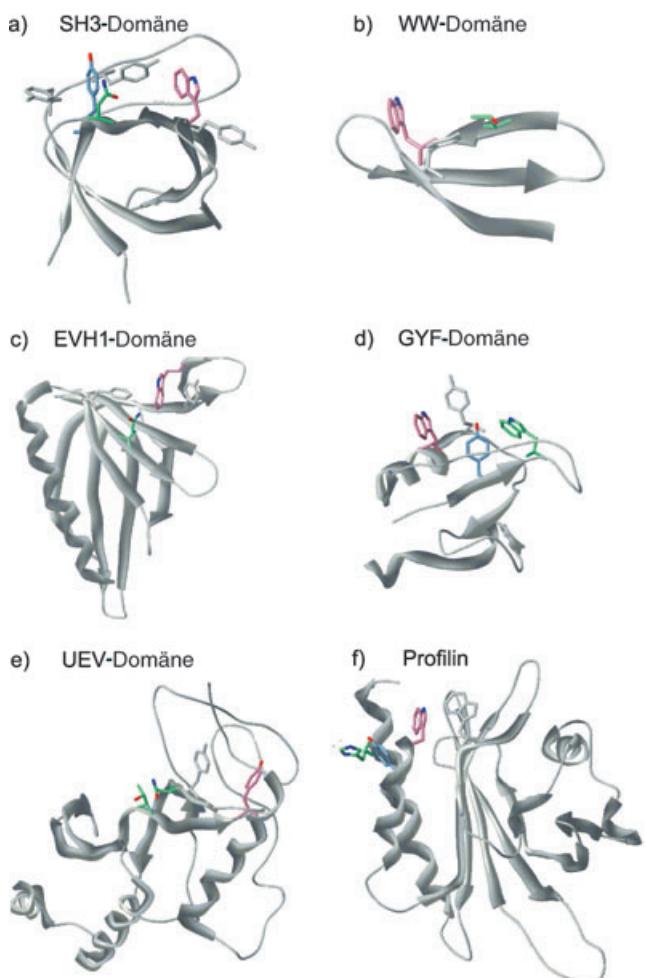


Abbildung 1. Dreidimensionale Strukturen von repräsentativen Beispielen aus jeder der bekannten PRM-Bindungsdomänenfamilien im Komplex mit PRM enthaltenden Peptiden. a) SH3-Domäne der menschlichen Fyn Tyrosinkinase (1fyn), b) WW-Domäne des menschlichen Dysphosphins (1eg4), c) EVH1-Domäne des Maus-Ev1 (1qc6), d) GYF-Domäne des menschlichen CD2BP2 (1l2z), e) UEV-Domäne des menschlichen Tsg101 (1m4p) und (f) Profilin aus menschlichen Blutplättchen (1cjf). Die Abbildung zeigt die Faltung der Domänen und die entsprechenden Peptidbindungsstellen mit den exponierten aromatischen Clustern. Die Peptidliganden binden an diese Bindungsstelle, indem sie die Prolinringe in die hydrophoben Taschen um die Trp- (pink) und Tyr-Seitenketten (blau) einbringen. Die grün eingezzeichneten Aminosäurereste der Domäne bilden zusätzliche Wasserstoffbrücken zum Peptid.



Linda J. Ball studierte Chemie an der University of Oxford (Großbritannien) und erhielt 1997 den PhD in Biochemie und Strukturbioologie an der University of Cambridge (Großbritannien). Anschließend wechselte sie als EMBO-Stipendiatin zur Gruppe von Prof. Dr. H. Oschkinat in die Abteilung für NMR-unterstützte Strukturbioologie am FMP Berlin. Ihre Forschungsgruppe überprüft NMR-spektroskopisch die Strukturen und Wechselwirkungen von signalgebenden Domänen und regulativen Proteinen des Cytoskeletts.

dargestellt. Die C- und N-Termini der Domänen sind im Allgemeinen räumlich sehr nahe beieinander; dies erleichtert die Einpassung der Domänen in das jeweilige Trägerprotein, ohne dessen Gesamtstruktur wesentlich zu verändern, und ermöglicht einen guten Zugang zur Domäne, was eine Voraussetzung für die Rekrutierung des Zielproteins ist. Ein Charakteristikum aller PRM-bindenden Domänen sind hoch konservierte, räumlich nahe beieinander liegende und an der Oberfläche lokalisierte Anhäufungen aromatischer Aminosäuren, die auch als „aromatische Wiege“^[26] bezeichnet werden und die für die Erkennung spezifischer PRMs verantwortlich sind (siehe Abbildung 1). Im Folgenden wird beschrieben, in welcher Weise die relative Orientierung und die Abstände zwischen den aromatischen Seitenketten des Clusters die Spezifität der PRM-Erkennung festlegen.

Die PRM-bindenden Domänen erkennen ein 3–6 Reste umfassendes, Prolin enthaltendes „Kernmotiv“, das Teil eines 5–10 Aminosäuren langen Sequenzabschnittes an der Oberfläche des Bindungspartners ist. Das Kernmotiv wird häufig von mehreren Mitgliedern einer Domänenfamilie erkannt. Innerhalb einer Domänenfamilie wird die Affinität und Spezifität einer Domäne bezüglich der bindenden Peptidsequenz des Partnerproteins zusätzlich bestimmt durch spezifische Wechselwirkungen der Epitope des Peptides, die das Kernmotiv flankieren, und den exponierten Aminosäuren auf der Domänenoberfläche (bekannt als Epsilon-Determinanten^[27]). Die Kern-flankierenden Epitope können aus einzelnen Aminosäuren, kleinen Gruppen von Aminosäuren, post-translational veränderten Resten oder auch aus Kombinationen all dieser Möglichkeiten bestehen; bezogen auf das Kernmotiv können sie sowohl C- als auch N-terminal (Fn bzw. Fc^[27]) angeordnet sein. In Abhängigkeit von den Beiträgen der flankierenden Epitope zur Bindungsenergie zeigen die Domänen einer Familie unterschiedliche Präferenzen bezüglich eines bestimmten Kernmotivs – eine einzelne Domäne kann aber immer noch unterschiedliche Peptide erkennen, sofern deren Bindungsaffinitäten innerhalb eines bestimmten Bereiches liegen. Diese Promiskuität ermöglicht es vielen an Signaltransduktionsprozessen beteiligten Proteinen, multiple oder überlappende Funktionen zu erfüllen.

Dieser Aufsatz befasst sich mit den spezifischen strukturellen Voraussetzungen der PRM-Erkennung durch die sechs verschiedenen Familien von PRM-Bindungsdomänen. Die Bevorzugung eines bestimmten Kernmotivs durch die jewei-



Ronald Kühne studierte Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, wo er 1980 promovierte. Nach einer Beschäftigung in der Forschungsgruppe für Molecular Modeling am Institut für Wirkstoffforschung ist er nun Leiter der Forschungsgruppe für Molecular Modeling/Ligandendesign am FMP. Schwerpunkt seiner Arbeit ist die Modellierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen unter Verwendung von MD-Simulationen und automatisierten Docking-Verfahren.

lige Familie wird anhand von hochauflösten NMR- und Röntgenkristallstrukturen diskutiert, die für eine Vielzahl von Domänen und ihren Komplexen mit Peptidliganden vorliegen. Die Bindungsmotive werden durch das Screening von Peptidbibliotheken, besonders unter Verwendung der SPOTs-Synthesetechnik,^[28–32] auf spezifitätsbestimmende Reste untersucht. Durch eine Kombination der verfügbaren Struktur- und Bindungsdaten konnten wir Gemeinsamkeiten feststellen, die bei allen bekannten PRM-Bindungsdomänen und ihren Komplexen mit Peptidliganden auftreten. Die Beobachtung derartiger Struktureigenschaften bei anderen Proteinen kann ein nützlicher Hinweis auf deren PRM-Bindungsaktivität sein und bei der Suche nach möglichen Bindungspartnern helfen. Außerdem lassen sich aus diesen Informationen Schlussfolgerungen zur Funktion dieser Proteine ableiten.

1.2. Prolin-Konservierung in Prolin-reichen Motiven und in der PPII-Helix

Die Prolin-reichen Zielpeptide, die in Signalketten erkannt werden, enthalten im Allgemeinen mehrere aufeinander folgende Proline, von denen einige essenziell für die Bindung sind, andere dagegen weniger wichtig zu sein scheinen. Die Konservierungsmuster für essenzielle Proline innerhalb des Kernmotivs können größtenteils durch die Sekundärstruktur von Poly-L-prolin in wässriger Lösung erklärt werden. Die dabei auftretenden, charakteristischen Torsionswinkel des Peptidrückgrates von $\Phi = -78^\circ$ und $\Psi = +146^\circ$ bewirken eine gestreckte Konformation, die als linksdrehende Polyprolin-II(PPII)-Helix bezeichnet wird.^[33–36] Eine solche Struktur (Abbildung 2a) weist eine pseudo- C_3 -Rotationssymmetrie um die Helixachse mit genau drei Resten pro Drehung auf. Daher überrascht es nicht, dass sich bei der Mehrzahl der Prolin-reichen Zielsequenzen die Proline mit einer Periodizität von drei wiederholen (z.B. PxxPxxP oder PPxPPxPP). Auf diese Weise bildet die PPII-Helix ein einzigartiges Erkennungsmotiv, bei dem die Prolin-Seitenketten und die Carbonylgruppen des Peptidgrundgerüsts in regelmäßigen Intervallen dem Lösungsmittel ausgesetzt sind. Bedingt durch das Fehlen von intramolekularen Wasserstoffbrücken innerhalb der PPII-Helix (wegen fehlender Rückgrat-Amidfunktionen in Prolin) können die Carbo-

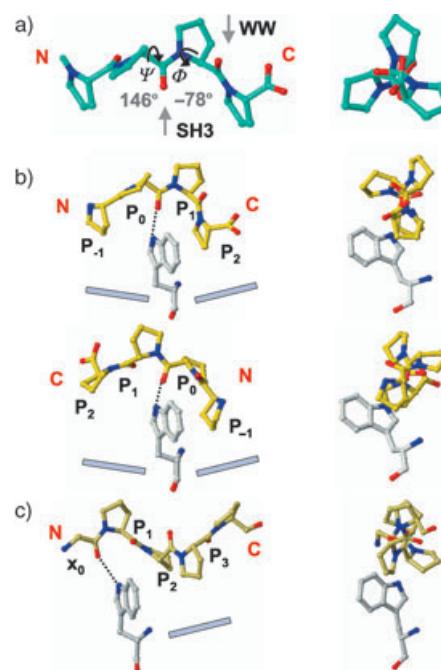


Abbildung 2. a) Linksdrehende PPII-Helix von der Seite und in senkrechter Ansicht zur Verdeutlichung der senkrechten C_2 - und C_3 -Rotations-Pseudosymmetrie. b) Bindungsmodus 1 (SH3- und EHV1-Domänen und Profilin). Die Peptide bilden eine schirmartige Struktur um die aus der Domäne herausragende aromatische, einen Wasserstoffbrücken-Donor tragende Seitenkette der Domäne (Trp oder Tyr). Die selben Wasserstoffbrücken-Donoren werden unabhängig von der Orientierung des Peptids verwendet. c) Bindungsmodus 2 (WW-, GFY- und UEV-Domänen). Das Peptid bindet an der gegenüberliegenden Seite des PPII-Peptids. Die grauen Balken zeigen schematisch die Bindungstaschen, die durch die umgebenden aromatischen Seitenketten der PRM-Erkennungsstelle gebildet werden.

nylgruppen des Peptidrückgrates intermolekulare Wasserstoffbrücken mit den PRM-Domänen eingehen. Außerdem hat die Carbonylgruppe von Prolin eine höhere Elektronendichte als die Carbonylgruppen des Rückgrates der anderen natürlichen Aminosäuren^[33,37,38] und ist damit ein besonders guter Acceptor für Wasserstoffbrücken. Ein weiteres Kennzeichen der PPII-Helix ist eine zweite, C_2 -pseudosymmetrische Rotationsachse senkrecht zur langen Helixachse. Eine Rotation von 180° um diese Achse belässt das Peptidgrund-



Jens Schneider-Mergener studierte Chemie in Bielefeld und München und promovierte 1986 an der LMU München. Von 1987 bis 1990 war er Postdoc am California Institute of Technology in Pasadena (Kalifornien, USA). 1991 wurde er Gruppenleiter an der medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, wo er 1999 zum Professor berufen wurde. Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Rolle von Peptiden in der biomedizinischen Forschung. Er ist außerdem Gründer der Jerini AG, die sich mit der Entdeckung und Entwicklung von aus Peptiden abgeleiteten Wirkstoffen beschäftigt.



Hartmut Oschkinat studierte Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt, wo er 1986 promovierte. Von 1986 bis 1987 war er Postdoc bei Prof. G. Bodenhausen an der Universität Lausanne (Schweiz). Anschließend erhielt er eine Stelle am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. 1992 habilitierte er sich in Biophysikalischer Chemie an der TU München. Von 1992 bis 1998 war er Gruppenleiter am EMBL in Heidelberg, und seit 1998 ist er Leiter der Abteilung für NMR-unterstützte Strukturbioologie am FMP sowie Professor für strukturelle Chemie an der FU Berlin.

gerüst und die Seitenketten in nahezu derselben Position (siehe Abbildung 2b). Daraus leitet sich die Möglichkeit einer Bindung in zwei Orientierungen ab (meist vorwärts und rückwärts genannt), wobei jeweils dieselben Erkennungsselemente des Peptids sowie die gleichen Wasserstoffbrücken-Donoren der Seitenketten und hydrophoben Bindungsstellen der Domäne verwendet werden. Für SH3-Domänen, WW-Domänen und Profilin wurden beide Bindungsvarianten gefunden; dennoch zeigen unterschiedliche Domänenklassen innerhalb einer gegebenen PRM-Bindungsfamilie in der Regel unterschiedliche Präferenzen für eine entweder N-C-terminale oder C-N-terminale Ausrichtung von Peptiden.

Die PRM-Bindungsdomänen können sich den Peptiden aus entgegengesetzten Richtungen nähern, wie in Abbildung 2a durch die Pfeile angedeutet. Im Falle von Profilin sind, bedingt durch die C_3 -Pseudosymmetrie der PPII-Helix, das erste und vierte Prolin in der Peptidsequenz (P_{-1} und P_2 in Abbildung 2b) zur Domäne hin orientiert. Die $C\beta$ -, $C\gamma$ - und $C\delta$ -Atome dieser beiden Proline stehen in engem Kontakt zur Domäne und ergeben das konservierte Muster $PxxP$ in den Profilin-Liganden. Im zweiten Bindungsmodus, der beispielsweise bei WW-Domänen beobachtet wird, interagieren zwei direkt benachbarte Proline des Liganden mit einer hydrophoben Bindungsstelle der Domäne (Abbildung 2c). In diesem Fall haben das $C\beta$ -Atom von P_1 und das $C\delta$ -Atom von P_2 den engsten Kontakt zur Domäne. Das erste Prolin kann durch andere Aminosäuren ersetzt sein (man findet dort z. B. Leucin), in der zweiten Position darf sich wegen der $C\delta$ -Substitution am Amidstickstoffatom aber ausschließlich ein Prolin befinden. Daraus resultiert ein konserviertes xP-Motiv, das mit der so genannten „xP“-Bindungstasche der Domäne wechselwirkt.^[39]

Der jeweils bevorzugte Bindungsmodus bestimmt eindeutig das Muster der konservierten Proline im Liganden: entweder $PxxP$ (Modus 1) oder $xPPx$ (Modus 2). Andere Aminosäuren als Prolin vervollständigen dieses Kernmotiv und stellen dadurch die Spezifität für eine bestimmte Familie und Klasse von Domänen sicher. Sind, wie im Falle der SH3- und Profilin-Komplexe, die Prolin-reichen Sequenzen des Liganden lang genug, werden auch Kombinationen der beiden oben erwähnten Bindungsmodi beobachtet (siehe Abbildung 3).

Ein weiterer Vorteil der Bindung an Peptide mit Prolin-reichen Segmenten ist die günstige Entropiebilanz der Bindung; da bei der Bindung eines PRM an die Bindungsstelle zwei wohldefinierte, vorgeformte Oberflächen in Kontakt treten, ist die Entropieabnahme gering. Ein Hauptgrund ist die geringe Zahl an Rotationsfreiheitsgraden im Prolin entlang dem Peptidrückgrat im Vergleich zu anderen Aminosäuren: Im Kernmotiv xP hat man nur zwei der sonst üblichen vier Rotationsfreiheitsgrade, und jeder Rotationsfreiheitsgrad entspricht bei einer Temperatur von 300 K etwa 3.5 kJ mol^{-1} ,^[40] woraus folgt, dass im Falle des xP-Motivs der Beitrag zum ΔG -Wert der Komplexbildung um 7 kJ mol^{-1} höher ist als bei anderen Dipeptid-Motiven.^[40] Dieser geringere Entropieverlust durch die Bindung ist die Ursache für die höhere Gesamtbindungsenergie für Komplexe mit PRM-Peptiden gegenüber der für Komplexe mit flexibleren Peptiden. Die Affinität von PRMs kann auch durch das Auftreten

mehrerer PRM-Kopien im interagierenden Protein erhöht werden. Dies wurde z. B. beschrieben für Zyxin und ActA, die beide an Ena/VASP-EVH1-Domänen^[41, 42] binden, und die cytoplasmatische Region von CD2, die durch die GYF-Domäne gebunden wird.^[20]

Prolin bildet in der Regel den Hauptbestandteil der PPII-Helices, man findet aber auch andere Aminosäuren, welche die Proline flankieren oder deren Abfolge unterbrechen. Besonders häufig tritt in PPII-Helices und in deren Nähe die Aminosäure Glu auf, denn das Wasserstoffbrückenmuster von Polyglutaminsäure fördert die Bildung der PPII-Struktur. Andere oft in PPII-Helices vorkommende Aminosäuren sind Gln, Arg, Ala, Leu, Ser, Asp und His, die in Prolin-reichen Sequenzen mit vier und mehr Resten zu finden sind.^[43]

2. SH3-Domänen

Src-Homologie-3(SH3)-Domänen sind kleine Proteinwechselwirkungsmodule mit ca. 60 Aminosäureresten (Abbildung 1a), die in einer Vielzahl von eukariotischen Proteinen des Cytoskeletts oder in Signalketten gefunden werden.^[44-46] Proteine mit SH3-Domänen sind unter anderem für die Kontrolle der Zellkompartimentierung, die Lokalisierung von Proteinen an Mikrofilamente des Cytoskeletts und Membranausstülpungen sowie die Regulierung von Enzymaktivitäten verantwortlich.^[1]

2.1. Klassifikation von SH3-Domänen und Zielsequenzpräferenzen

SH3-Domänen binden Prolin-reiche Sequenzen mit dem charakteristischen PxxP-Motiv (eine genauere Beschreibung des Motivs ist $Pp\phi P$, wobei p einen nicht an der Bindung beteiligten Prolin-Rest und ϕ einen hydrophoben Rest, normalerweise Leu, Pro oder Val, beschreibt^[27]). Bisher wurden die SH3-Domänen ausschließlich danach klassifiziert, in welcher Orientierung (N- zu C-terminal, im Folgenden als Orientierung 1 bezeichnet, oder C- zu N-terminal, Orientierung 2) der PRM enthaltende Ligand an die Bindungsstelle der SH3-Domäne angelagert wird. SH3-Domänen der Klasse I erkennen Sequenzen mit einer positiven Ladung an ihrem N-Terminus mit einem Consensusmotiv (R/K)xxPxxP, während SH3-Domänen der Klasse II Peptide in umgekehrter Anordnung binden und demzufolge eine positive Ladung am C-Terminus aufweisen, was zu einem entsprechend veränderten Consensusmotiv PxxPPP ϕ (R/K) führt (siehe Tabelle 1).^[14, 35, 47] Diese grobe Klassifikation reicht jedoch nicht für das Verständnis der Bindungspräferenzen einer derart großen Familie von Domänen aus. Aus diesem Grunde werden gegenwärtig intensive Untersuchungen zur Erkennung von Peptiden durch unterschiedliche SH3-Domänen durchgeführt, deren Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Spezifitätsklassen mittels Phagen-Display nachgewiesen wurde.^[112] Die Ergebnisse dieser Untersuchungen tragen nicht nur zu einer besseren Klassifizierung der Domänen bezüglich ihrer Ligandspezifität bei, sondern helfen auch bei der Identifizierung ihrer zellulären Bindungspartner.

Tabelle 1: Unterschiedliche Bindungsdomänen für PRM-haltige Peptide.^[a]

Domänen und Klassen	Beispiele für „Wirt“-Proteine	Consensus-PRM
1. SH3-Domänen Klasse I	Src, Yes, Abl, Grb2-A, Lyn, PI3K, Fyn	(R/K)p ϕ Px ϕ P
	Src, Cortactin, p53BP2, PLC γ , Crk-A, Nck SH3-B, CAP SH3-C, Amphiphysin	ψ Pp ϕ P ϕ (R/K)
2. WW-Domänen Klasse I	BAG3, YAP65, Nedd-4, Dystrophin	(L/P)Pp(Y/poY)
Klasse II Klasse III(a) Klasse III(b) Klasse IV Klasse V	FBP-11	PPLP p
	FE65	(p/ ϕ)P(p/g)PPpR
	FBP21	(p/ ϕ)PP(R/K)gpPp
	Ess1, PIN1, Nedd-4	(poS/poT)P
	PRP40-2	(p/ ϕ)PPPPP
3. EVH1-Domänen Klasse I Klasse II	Ena, Mena, VASP, Evl	(D/E)FPx ϕ P
	Homer-1a, Vesl-2	PPxx(F/Y)
4. GFY-Domänen	Cytoplasmatischer Teil von CD2	(R)xxPPgxR
5. UEV-Domänen	Viral-Gag-Proteine	P(T/S)AP
6. Profilin	Profilin (Protein besteht aus einer Domäne)	Poly-L-prolin

[a] ψ , ϕ , x: aliphatische, hydrophobe bzw. andere Aminosäurereste; poS: Phosphoserin; poT: Phosphothreonin. Kleine Buchstaben repräsentieren bevorzugte, aber nicht konservierte Aminosäurereste. Bei mehr als zwei Kopien einer Domäne innerhalb des Wirtproteins ist die dem N-Terminus am nächsten stehende mit A gekennzeichnet.

2.2. Die SH3:PRM-Kontaktfläche und die Ableitung von Consensusmotiven für SH3-Zielsequenzen

Dank der Verfügbarkeit vieler hochaufgelöster NMR- und Röntgenkristallstrukturen von Komplexen unterschiedlicher SH3-Domänen mit Prolin-reichen Peptiden^[13,48-58] können wir wichtige, periodisch wiederkehrende Merkmale erkennen und die Konservierung des Aminosäuremusters in den Peptidsequenzen verstehen. Die Abbildungen 3a und b zeigen Ausschnitte aus der SH3:PRM-Kontaktfläche als repräsentative Beispiele jeweils einer Ligandenbindung in Vorwärts- und Rückwärtsorientierung. Zwei exponierte aromatische Seitenketten (Trp und Tyr) der Domäne bilden Wasserstoffbrücken zu den Carbonyl-Sauerstoffatomen des Peptids. Durch die PPII-Konformation des Peptids wird gewährleistet, dass das erste und vierte Prolin einer PxxP-Peptidsequenz effizient in die hydrophoben Taschen zu beiden Seiten des exponierten Tyr aufgenommen werden. Diese im engsten Kontakt zur Domänenoberfläche stehenden Peptidreste sind in Abbildung 3 gelb hervorgehoben.

Im Fall der Orientierung 1 erstreckt sich die PPII-Helix nur über das Peptidfragment von Position 0–6 (M₀P₁P₂PL₃P₄PL₅P₆) in Abbildung 3a) und deckt den größten Teil der beiden Bindungsstellen ab, die in den Abbildungen 2b und c gezeigt sind. Das exponierte Trp ist von einem PxxP-Motiv umgeben, das keine vollständige PPII-Helixstruktur aufweist – dadurch nimmt der Ligand im gebundenen Zustand eine Konformation ein, die zwei aneinander gereihten Schirme ähnelt. Der „PPII-Helix-Schirm“ (PxxP) umgibt das zentrale, über eine Wasserstoffbrücke mit dem Liganden verknüpfte Tyr (siehe Abbildung 2b). Der andere, untypische Schirm PxxP umhüllt die Trp-Seitenkette. Bei Orientierung 2 ist das

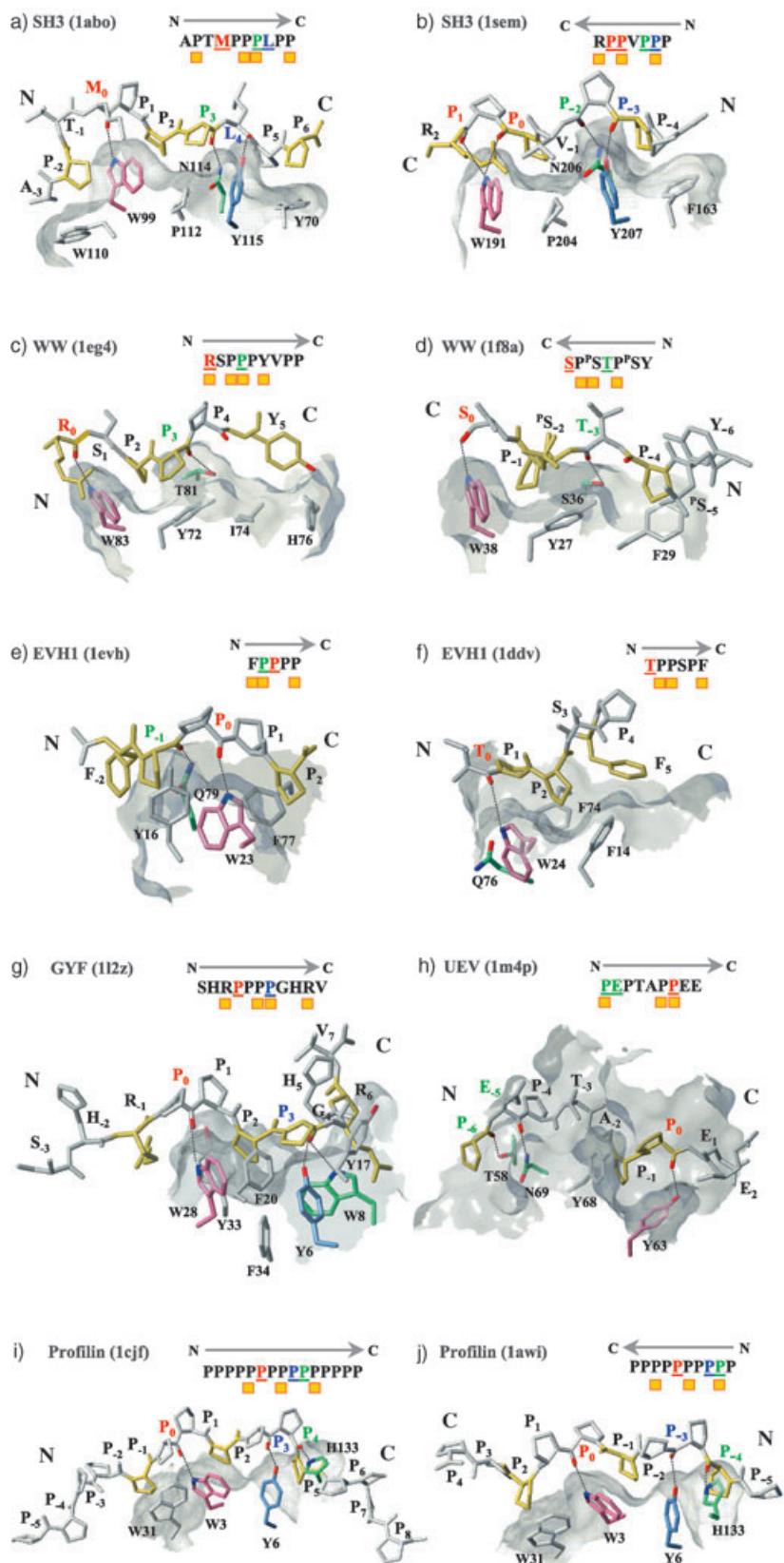
Trp dagegen von einem RxP-Motiv umgeben (Abbildung 3b). In beiden Ausrichtungen werden die Tyr- und Trp-Wasserstoffbrücken durch eine weitere Wasserstoffbrücke einer Asn-Seitenkette ergänzt. Die Bevorzugung einer hydrophoben Aminosäure, die nicht unbedingt Prolin sein muss, an der weniger konservierten, als ϕ bezeichneten Position im Pp ϕ P-Motiv erklärt sich aus dem Side-on-Kontakt dieses Restes mit der hydrophoben Oberfläche der Domäne (siehe Abbildungen 2 und 3). Die Substitution eines der beiden hoch konservierten Proline durch eine andere natürliche Aminosäure führt hingegen zu einem Verlust der Bindung. Wird allerdings einer dieser essentiellen Reste durch eine N-substituierte Aminosäure ersetzt, so kann die Bindungsaffinität erhöht werden^[59] – dies könnte für die Entwicklung selektiver SH3-Inhibitoren von Bedeutung sein.

2.3. Der Einfluss „Kern-flankierender“ Reste des Liganden

Die beiden Orientierungen der bindenden Peptide sind durch die Symmetrie der PRMs bedingt, die wiederum die Ursache für die Entstehung ähnlicher Wasserstoffbrückenmuster in beiden Orientierungen ist (Abbildung 2b). Die Aczeptoren der Wasserstoffbrücken sind die Carbonyl-Sauerstoffatome der Peptidreste, die in Abbildung 3 rot, blau oder grün markiert sind. Die zugehörigen Wasserstoffbrücken-Donoren der Domäne sind in gleicher Weise gefärbt. Die Orientierung der Liganden wird durch PRM-flankierende Wechselwirkungen bestimmt, die nicht von Prolinen ausgehen und die entweder N- oder C-terminal zum PRM auftreten können. Üblicherweise bildet ein direkt neben dem PRM befindlicher, positiv geladener Rest eine ionische Brücke mit einem negativ geladenen Rest auf der Domänenoberfläche. In Fällen einer annähernd palindromen Peptidsequenz wird häufig eine Bindung in beiden Orientierungen beobachtet. Die SH3-Domäne von Src z. B. bindet sowohl das Peptid RPL₁PLP₂ als auch das „umgekehrte“ Peptid PPVPPR (konservierte Proline sind unterstrichen).

2.4. Alternative Ligandenbindung in SH3-Domänen

Außer den bisher vorgestellten zwei Orientierungen bei der Ligandenbindung sind noch weitere SH3:PRM-Bindungsmodi beschrieben worden. In einem dieser Bindungsmodi erkennt die Peptidbindungsstelle der SH3-Domäne ein diskontinuierliches Epitop, bestehend aus Aminosäuren, die



in der Sequenz nicht benachbart sind, aber durch die Tertiärstruktur in räumliche Nähe gebracht werden. Die SH3-Domäne des p53-Bindungsproteins, p53BP2, interagiert auf diese Weise mit zwei Segmenten des L3-Loops von p53.^[60] Die Positionen der Aminosäurereste in diesem diskontinuierlichen Bindungsepitop werden durch die Gesamtstruktur von p53 bestimmt und bilden kein lineares PRM.

Ein weiteres Beispiel einer diskontinuierlichen Bindungsoberfläche wurde für die SH3-Domäne von Csk gefunden: Diese interagiert mit einem Peptidrest aus 25 Aminosäuren aus der Pro/Glu/Ser/Thr-reichen Region (PEST-Region) des PEP-Proteins. Zur Bindung dieses Peptidrestes an die SH3-Domäne sind zwei räumlich getrennte Interaktionen mit dem Liganden erforderlich: zum einen die konventionelle PPII-Helix-Erkennung und zum anderen Wechselwirkungen mit zwei hydrophoben Resten (Ile und Val), die näher am C-Terminus des Peptids lokalisiert sind.^[58] NMR-spektroskopischen Untersuchungen zufolge weisen die Wechselwirkungen dieser beiden Epitope mit der Csk-SH3-Domäne unabhängige Dynamiken auf.^[58]

Bei einer anderen ungewöhnlichen SH3-Ligand-Wechselwirkung wird die Spezifität für eine bestimmte Zielsequenz durch die Dimerisierung von SH3-Domänen erreicht. So bildet die SH3-Domäne von Eps8, dem Rezeptorsubstrat des epidermalen Wachstumsfaktors, ineinander verwundene Dimere.^[61] Im Dimer wird die PxxP-Bindungsstelle teilweise verdeckt und dadurch die Ligandenspezifität verändert, weshalb das SH3-Dimer das reguläre PxxP-Motiv nicht erkennt und an ein neues Motiv

Abbildung 3. Intermolekulare Wechselwirkungen repräsentierter Beispiele aus jeder der bekannten PRM-Bindungsfamilien mit ihren Peptidliganden. Beispiele für beide Ausrichtungen der Peptidbindung: a), b) SH3-Domäne; c), d) WW-Domäne; i), j) Proline. Für die EVH1-Domäne ist bislang noch keine reverse Bindungsorientierung bekannt, es gibt aber zwei unterschiedliche Bindungsarten, in denen das Peptid in derselben Richtung bindet (e, f). Der einfache Bindungsmodus der GFY- und UEV-Domänen ist in (g) und (h) gezeigt. Pink: aromatischer Rest (H-Brücken-Donor), Stiel der „Schirmstruktur“ (meist Trp bzw. Tyr in der UEV-Domäne); blau: aromatischer Rest, Tyr (H-Brücken-Donor), Stiel des „Doppelschirms“; grün: variabler H-Brücken-Donor, Asn, Thr, Ser, Gln oder His; gelb: Seitenketten des Liganden, der hydrophobe Wechselwirkungen mit der Domäne eingeht. Die Sequenz des Liganden ist jeweils oben gezeigt. H-Brücken-Acceptoren sind unterstrichen (rot: H-Brücke zum ersten „Stiel“ Trp/Tyr; blau: zweiter „Stiel“, H-Brücke zu Tyr; grün: H-Brücke zu variablen Aminosäureresten der Domäne). Die Einfärbung der Liganden entspricht der in den Tabellen 2–7. Gelbe Kästchen: Positionen in engem Kontakt zur Domäne. Der erste H-Brücken-Acceptor im Liganden erhält die Ziffer Null. Nur jene Aminosäuren des Peptids sind gezeigt, die tatsächlich detektiert wurden. Die volle Peptidlänge in allen analysierten Komplexen ist dem PDB-Code zu entnehmen (in Klammern).

bindet (PxxDY).^[62] Die Multimerisierung der SH3-Domänen kann somit als ein Mechanismus zur Veränderung der Bindungsspezifität betrachtet werden; auf diese Weise kann Eps8 auf unterschiedliche zelluläre Erfordernisse reagieren.

SH3-Domänen sind auch in der Lage, intramolekulare Wechselwirkungen zu modulieren. Die Src-, Hck- und Abl-Proteine enthalten sowohl SH3-Domänen als auch SH2- und katalytische Kinase-Domänen. Die SH3-Domäne wechselwirkt mit einem Sequenzabschnitt, der die SH2-Domäne mit der katalytischen Kinase-Domäne verbindet, und hält so beide Domänen in einer katalytisch inaktiven Konformation.^[63-68] In einem anderen Beispiel bindet eine SH3-Domäne des zellulären onkogenen Produkts, Itk, an eine intramolekulare KPLPPTP-Sequenz.^[69] Solche Wechselwirkungen mit intramolekularen PRMs spielen augenscheinlich eine wichtige Rolle bei der Regulation der eukariotischen Signaltransduktion und bei cytoskeletalen Ereignissen.

Bemerkenswerterweise interagieren einige SH3-Domänen auch mit Motiven, die nicht Prolin-reich sind. Die C-terminale SH3-Domäne des Gads-T-Zell-Adapterproteins bindet ein Peptid aus SLP-76, das ein RxxK-Motiv enthält.^[70] Das Peptid hat in diesem Komplex eine rechtsdrehende helicale Konformation, die sich stark von der linksdrehenden PPII-Helix unterscheidet, wie man sie für die Prolin-reichen Peptide findet. Weitere Beispiele enthalten die Erkennung von RKxxYxxY-Sequenzen durch eine Anzahl von SH3-Domänen der Klasse I.^[47] Anders als bei den meisten Klasse-I-Wechselwirkungen, die nur entweder Arg oder Lys erfordern, werden hier beide positiv geladenen Reste für die SH3-Bindung benötigt.

3. WW-Domänen

Die WW-Domäne ist ein aus 34–40 Aminosäuren bestehendes Modul (Abbildung 1b), das in einer Vielzahl von signalgebenden und regulativen Proteinen gefunden wird.^[71-73] Der Name dieser Domäne ist von zwei hoch konservierten Tryptophanen abgeleitet, von denen das eine essenziell für die Faltung und das andere auf der Proteinoberfläche exponiert ist. Dieses ist Teil eines hydrophoben Clusters, in dem die aromatischen Seitenketten eines Tyr und eines Trp im Winkel von etwa 90° angeordnet sind und so die Form der Prolin-Bindungstasche bestimmen.^[16,26] In der WW-Domäne des menschlichen Yes-Kinase assoziierten Proteins (YAP65) besteht der hydrophobe Cluster aus Trp 39, Tyr 28 und Leu 30.

3.1. Klassifikation der WW-Domänen und die Bevorzugung von Zielsequenzen

Durch umfangreiche Bindungs- und Substitutionsstudien ist es gelungen, die konservierten Bindungsmotive einer großen Zahl von WW-Domänen zu ermitteln. Zurzeit sind fünf Klassen von WW-Domänen bekannt,^[74-76] die in Tabelle 1 zusammengestellt sind. Die WW-Domänen der Klasse I, z. B. YAP65, erkennen ein (L/P)Pp(Y/poY)-Motiv^[77,78] (*po*: phosphorylierter Rest^[27]). Vermutlich reguliert die Tyrosin-

Phosphorylierung die Aktivität der Domäne; allerdings beobachtet man auch häufig, dass phosphorylierte Sequenzen nur geringfügig schwächer binden.^[79] Die zweite Klasse der WW-Domänen erkennt spezifisch PPLPp-Motive. Ein Vertreter dieser Klasse ist z. B. die WW-Domäne des Formin-bindenden Proteins, FBP-11. Die dritte Klasse bindet Pro-Arg-reiche Motive; sie kann weiter in zwei unabhängige Unterklassen unterteilt werden, die Sequenzmotive des Typs (p/φ)P(p/g)PPpR und (P/φ)PP(R/K)gpPp erkennen,^[76,80] die z. B. durch die WW-Domäne von FE65 bzw. FBP21 gebunden werden. Vertreter der vierten Klasse der WW-Domänen, z. B. die PIN1-WW-Domäne, binden Motive, bei denen dem Prolin phosphorylierte Serine oder Threonine vorangehen (*poS/poT*)P.^[11,12,76] Die fünfte Klasse, zu der die in zweifacher Wiederholung vorkommenden N-terminalen WW-Domänen des Hefc-PRP40-Proteins gehören, bindet reine Polyprolinsequenzen vom Typ (p/φ)PPPPP, bei denen die erste Aminosäure hydrophob sein muss.^[76] Interessanterweise erkennen beide PRP40-WW-Domänen Bindungsmotive sowohl der Klasse I als auch der Klasse II.^[81] Wahrscheinlich sind diese „Tandem“-WW-Domänen in der Lage, gleichzeitig PRMs unterschiedlicher Bindungspartner zu binden und auf diese Weise zum Aufbau von Proteinkomplexen beizutragen.^[81]

Auch wenn verschiedene Klassen von WW-Domänen bestimmte PRMs bevorzugen, beobachtet man doch bis zu einem gewissen Grad eine Variabilität innerhalb der bindenden Ligandsequenzen. Dies wird gut illustriert durch die Ergebnisse des Screenings von Peptidbibliotheken mithilfe der SPOTs-Technik und durch Peptidbindungsstudien. Abbildung 4a zeigt die von der menschlichen YAP65-WW-Domäne bevorzugten Aminosäuresequenzen, die durch Bindungsuntersuchungen von sechs zweifach substituierten Varianten des bekannten PPPY-Bindungsmotivs ermittelt wurden.^[113] In diesem Experiment wird jede der jeweils variablen Positionen innerhalb des PPPY-Motivs simultan durch die restlichen 19 Aminosäuren ersetzt. Es wurde gefunden, dass die YAP65-WW-Domäne nur solche Motive stark bindet, die Tyr in der letzten Position und entweder Pro oder Leu in der ersten Position enthalten und damit das Consensusmotiv (L/P)PxY aufweisen. Eine signifikant schwächere Bindung findet man bei Motiven mit Arg oder Tyr in der ersten Position (z. B. YRPY, RRPY, RPRY, YPRY). Unter Beibehaltung der ersten (Pro) und letzten (Tyr) Position können auch Lys oder Ala in Position (3) stehen, was den PPxY-Consensus bestärkt (siehe hierzu auch Abbildung 4c). Abbildung 4b zeigt den Effekt der Substitution jeder einzelnen Aminosäure eines längeren YAP65-Liganden der Sequenz GTPPPPYTVG durch alle anderen natürlichen Aminosäuren.^[16,82] Das minimale Bindungsmotiv PPPY wird durch systematische N- und C-terminale Verkürzung des Peptids erhalten (Abbildung 4c).^[82] Interessanterweise ist die Toleranz bezüglich des Aminosäureaustausches in den einzelnen Positionen der Peptidsequenz bei GTPPLPPYTVG geringer als bei GTPPPPYTVG (Abbildung 4d). Dies ist wahrscheinlich durch die schwächeren Wechselwirkungen des Peptids mit der Domäne bedingt, verursacht durch die Substitution von P durch L im Motiv (L/P)PxY. Aus Abbildung 4 geht klar hervor, dass das zweite Prolin im (L/P)PxY-Motiv unabdingbar und eine Voraussetzung für die Bindung

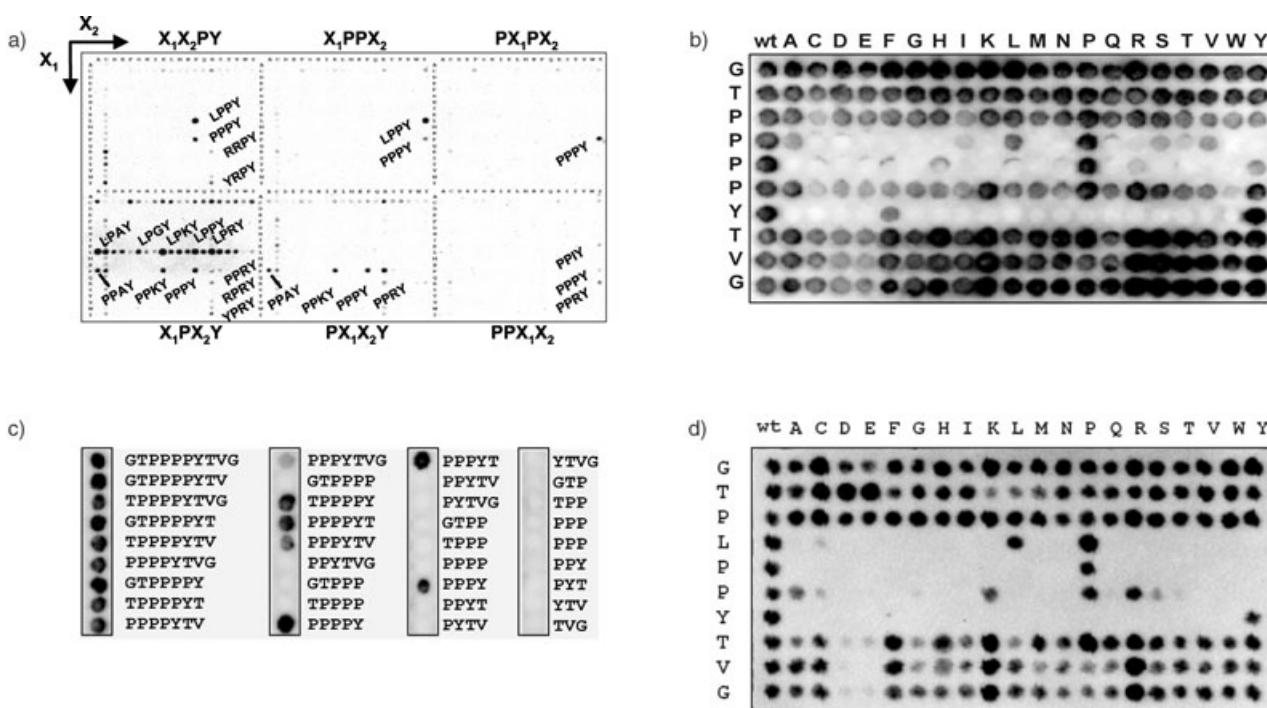


Abbildung 4. a) Doppelsubstitutionsanalyse des PPPY-Bindungsmotivs der Klasse-I-WW-Domänen (am Beispiel der WW-Domäne des menschlichen YAP65). Alle möglichen Kombinationen der doppelt substituierten Varianten dieses Motivs wurden an sechs zweidimensionalen Gittern synthetisiert. Die unterschiedlichen Paare der gleichzeitig substituierten Aminosäuren X_1 und X_2 sind auf der vertikalen und der horizontalen Achse des Gitters gezeigt. b) Die Einzelsubstitutionsanalyse von GTPPPYTVG zeigt die am meisten konservierten Reste; wt = Wildtyp. c) Minimierung des Bindungsepitops; das kleinste Bindungsmotiv ist PPPY. d) Einzelsubstitutionsanalyse von GTPLPPYTVG; ähnliche Konservierung wie in (b) mit generell schwächerer Bindung an die WW-Domäne.

der PPII-Helix an die hydrophobe Bindungsstelle der WW-Domäne der Klasse I ist.

In einem „reversen“ Substitutionsexperiment^[83] wurden alle 47 Aminosäuren der vollständigen WW-Domäne von YAP65 nacheinander substituiert (Abbildung 5). Dies ermöglicht die Identifizierung derjenigen kritischen Reste der WW-Domäne, die sowohl für die Stabilisierung der Faltung als auch für die Ligandenbindung (in diesem Fall das 13-mer EYPPYPPPPYPSG^[84]) nötig sind. Ein hoher Grad an Konservierung bei innerhalb der Domäne gelegenen Aminosäuren ist ein Indiz für deren wichtigen Beitrag zur Proteinfaltung. Der hohe Konservierungsgrad von bekanntermaßen an der Oberfläche liegenden Resten lässt dagegen klar auf ihre bedeutende Rolle für die Ligandenwechselwirkung und die Funktion des Proteins schließen. In einer Studie neueren Datums, in der die SPOTs-Synthesetechnik und die Ligation mit nativen Peptiden miteinander kombiniert wurden, konnten mehrere tausend Varianten der menschlichen YAP65-WW-Domäne auf Zellulosemembranen hergestellt werden, um auf diese Weise systematisch die drei Substitutionsorte L30, H32 und Q35 simultan zu untersuchen.^[31] Man muss allerdings hinzufügen, dass ungeachtet der In-vitro-Bindung von GTPPPPYTVG und EYPPYPPPPYPSG an die menschliche YAP65-WW-Domäne die biologische Relevanz dieser Komplexe innerhalb der Zelle noch immer unklar ist.

3.2. Die WW:PRM-Grenzfläche und die strukturelle Bedeutung von Consensusmotiven innerhalb von Zielsequenzen der WW-Domäne

Die Analyse hochaufgelöster Strukturen der Komplexe von WW-Domänen mit Prolin-reichen Peptiden^[12, 26, 82, 85] gewährt den Einblick in die strukturellen Ursachen der bevorzugten Consensusmotive. Das Peptid bindet an die WW-Domäne mithilfe der – verglichen mit Komplexen der SH3-Domäne – entgegengesetzten Seite der PPII-Helix (siehe Abbildung 2). Dies führt zu einer dichten Packung zweier aufeinander folgender Proline (in gelb hervorgehoben) in die hydrophobe Bindungstasche der WW-Domäne (Abbildungen 3c und d). Die WW-Domäne (Klasse I) von Dystrophin^[26] bindet z.B. ein PPPY-Motiv (Abbildung 3c), wobei die beiden unterstrichenen Proline in die hydrophobe Tasche zwischen Tyr 72 und Trp 83 gepackt werden. Zudem besetzt das Peptid-Tyr (PPPY) eine weitere hydrophobe Tasche auf der anderen Seite der Tyr-72-Seitenkette, was wiederum die Konservierung von Y im Consensusmotiv erklärt. Die Substitution von Tyr mit Phe schwächt die Bindung zur YAP65-WW-Domäne um den Faktor 3.^[16] Dies wird durch den Verlust einer Wasserstoffbrücke und/oder eine weniger effiziente Packung des Arylrestes in die zweite hydrophobe Bindungstasche verursacht.

Der Ligand im WW-Komplex weist nur eine Hälfte der schirmartigen Struktur auf, die im Falle der SH3-PRM-

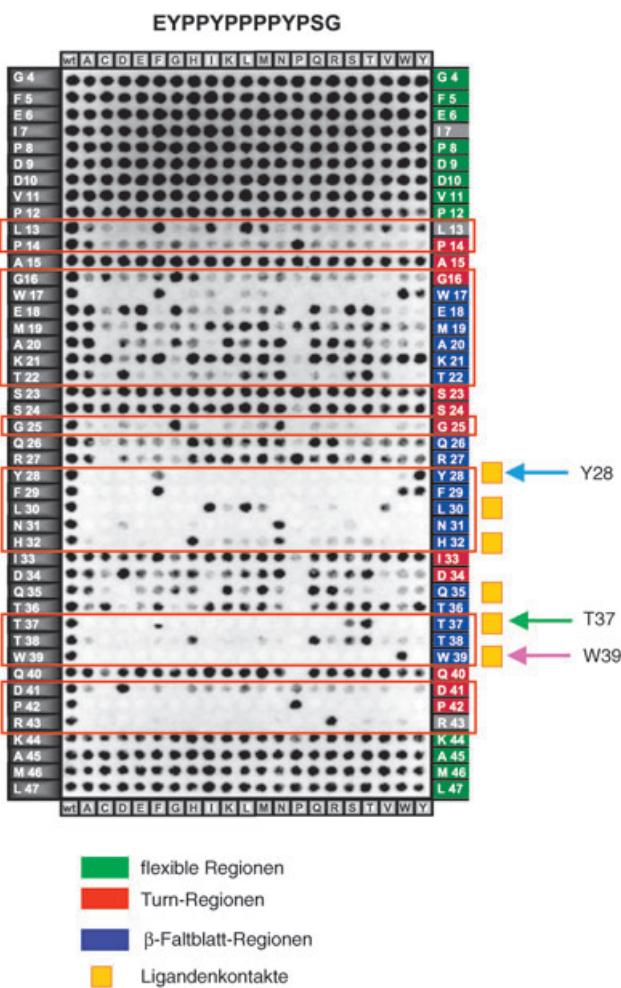


Abbildung 5. Umgekehrter SPOTs-Scan, in dem alle 42 Aminosäuren der WW-Domäne von YAP65 unter Beibehaltung der Peptidsequenz des Liganden (EYPPYPPPPYPSG) substituiert wurden (Nachdruck mit Erlaubnis von Toepert et al.^[83]). Rote Kästen: für die Bindung des Peptids wichtige Regionen der WW-Domäne. Diese enthalten Abschnitte der Sekundärstruktur, die für die Faltung der WW-Domäne notwendig sind, und Reste, die auf der Oberfläche exponiert sind und für die Ligandenbindung benötigt werden. Die Aminosäuren des aromatischen Clusters sind hoch konserviert. Die flexiblen Regionen (grün) sind für die Bindung des Peptids unerheblich.

Wechselwirkung charakteristisch ist (siehe Abbildung 2c). Erneut bildet die exponierte Trp-Seitenkette eine Wasserstoffbrücke zu einem Carbonyl-Sauerstoffatom des Liganden (Position (0)). Eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen einer Thr- oder Ser-Seitenkette der Domäne und dem Carbonyl-Sauerstoffatom in Position (3) des Liganden ist abhängig von der Orientierung des Liganden (Thr in Orientierung 1, Ser in Orientierung 2, siehe Abbildung 3c, d und Tabellen 2–7). Die Reste des Liganden, welche die an der Bindung beteiligten Wasserstoffbrücken-Acceptoren enthalten, sind in beiden Orientierungen ähnlich angeordnet (in den Abbildungen 3c und d rot, grün und blau gefärbt)

3.3. Die Bedeutung von Nicht-Prolin-Resten im PRM

Die Orientierung der Ligandenbindung bei WW-Domänen wird von Nicht-Prolin-Resten im PRM bestimmt. Ein Beispiel ist das C-terminale Tyr im PRM, das spezifisch an WW-Domänen der Klasse I bindet. Anders als bei den Liganden von SH3- und EVH1-Domänen sind die Aminosäuren im PRM der WW-Liganden alleine zuständig für Bindungsaffinität und Spezifität, d.h., diese Liganden verfügen über ein besonders kleines Erkennungsepitop. Die Folge ist, dass sogar kleine Peptide vom Typ Ac-PPPPY-NH₂ mit der vollen Affinität an die WW-Domäne binden.^[82] Das erklärt auch die große Toleranz der WW-Domäne in Bezug auf die Substitution von Aminosäuren außerhalb der PRM (Abbildung 4). Eine Erklärung für diese Beobachtungen ergibt sich aus der geringen Größe der WW-Domäne und der daraus folgenden kleinen Oberfläche, die für die Wechselwirkung mit dem Liganden zur Verfügung steht – das bedeutet, dass alle für die Affinität, Spezifität und Orientierung der Liganden wichtigen Eigenschaften von der kurzen PRM-Sequenz bestimmt werden müssen.

4. EVH1-Domänen

Die Ena/VASP-Homologie-1(EHV1)-Domänen^[86–89] sind aus etwa 115 Aminosäuren bestehende Protein-Domänen (Abbildung 1c), die in einer Vielzahl von signalgebenden Multidomänenproteinen gefunden werden. Zu dieser Gruppe gehören die Ena/VASP-Proteine, die die Actindynamik im Cytoskelett modulieren, die Wiscott-Aldrich-Syndrom-Proteine (WASP), die die Actinaggregation regulieren und den Cdc42- und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat(PIP2)-Signalwegen nachgeordnet sind, sowie die synaptischen Proteinfamilien Homer und Vesl, die bei der lang anhaltenden Anregung erregender (exzitatorischer) Synapsen eine Rolle spielen.^[90] Die Strukturen der EHV1-Domänen von VASP-, Mena-, Evl-, Homer- und N-WASP-Proteinen^[42, 91–94] sind den Pleckstrin-Homologie(PH)- und Phosphotyrosin-bindenden (PTB) Domänen sehr ähnlich,^[95] auch wenn die jeweiligen Sequenzen nur wenig übereinstimmen.

4.1. Klassifizierung der EHV1-Domäne anhand von PRM-Consensussequenzen

Bisher wurden drei Klassen von EHV1-Domänen aufgrund ihrer Ligandenpräferenz identifiziert^[86] (Tabelle 1). Die erste Klasse besteht aus den Ena/VASP-Proteinen, die spezifisch die FPPPP-Sequenz erkennen, die sich in allen fokalen Adhäsionsproteinen wie Zyxin und Vinculin findet. Auch im ActA-Protein des intrazellulären Pathogens *Listeria monocytogenes* tauchen dicht hintereinander Wiederholungen der FPPPP-Sequenz auf.^[87, 96] Die zweite Klasse bilden die EHV1-Domänen der Homer/Vesl-Familie von postsynaptischen Rezeptor-assoziierten Proteinen. Diese erkennen die Consensussequenz PPxF, die in den metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluRs), Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptoren (IP3Rs), Ryanodin-Rezeptoren (RyRs) und in

Tabelle 2: SH3-Domänen mit Peptiden in Orientierung 1 und 2.^{[a],[b]}

Protein-Domäne	Ligand (2 Orientierungen)	PDB-Code (Methode)	Winkel d. Ring-Ebenen Trp _(Domäne) und P _(Ligand)	Winkel d. Ring-Ebenen Tyr _(Domäne) und P _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Trp-NH ₂ zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Tyr-OH zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Asn-NH ₂ zu CO _(Ligand)
Ligand N nach C:							
SH3 Fyn Tyrosin Kinase (Human)	PPRPLP _V APGSKT 2101234567---	1a0n (NMR)	W ₁₂₉ -P ₂ = schlecht def. L bei +2	Y ₁₄₇ -P ₃ = 31 Y ₁₄₇ -P ₆ = 39	W ₁₂₉ -R _{0(CO)} = 4.1 Å	Y ₁₄₇ -V _{4(CO)} = 2.4 Å	N ₁₄₆ -P _{3(CO)} = 2.7 Å
SH3 Fyn Tyrosin Kinase (Human)	PPAYPPP _V PV 3210123456	1fyn (Röntgen)	W ₁₂₉ -P ₂ = 37 W ₁₁₉ -P ₂ = 29	Y ₁₃₇ -P ₃ = 45 Y ₁₃₇ -P ₆ = 40	W ₁₁₉ -Y _{8(CO)} = 2.7 Å	Y ₁₃₇ -P _{4(CO)} = 3.6 Å	N ₁₃₈ -P _{3(CO)} = 2.2 Å
SH3 Abl Tyrosin Kinase (Human)	APSYSPPP 3210123456	1bbz (Röntgen)	W ₃₆ -P ₂ = 34 W ₃₆ -P ₂ = 31	Y ₃₂ -P ₃ = 40 Y ₃₂ -P ₆ = 19	W ₃₆ -Y _{0(CO)} = 2.0 Å	Y ₃₂ -P _{4(CO)} = 2.7 Å	N ₅₁ -P _{3(CO)} = 4.3 Å
SH3 Abl Tyrosin Kinase (Maus)	AP _T MP _P PLPP 3210123456	1abo (Röntgen)	W ₉₉ -P ₂ = 42 W ₉₉ -P ₂ = 37	Y ₁₁₅ -P ₃ = 43 Y ₁₁₅ -P ₆ = 28	W ₉₉ -M _{0(CO)} = 2.1 Å	Y ₁₁₅ -L _{4(CO)} = 2.7 Å	N ₁₁₄ -P _{3(CO)} = 2.4 Å
SH3 e-Src (Geflügel Sarcomavirus)	VSL _A RRL _P PLP --3210123456	1qwf (NMR)	A bei -2 L bei +2	Y ₆₀ -P ₃ = 2 Y ₆₀ -P ₆ = 24	W ₄₂ -R _{0(CO)} = 2.3 Å W ₄₂ -P _{1(CO)} = 3.2 Å	Y ₆₀ -P _{4(CO)} = 2.6 Å	N ₅₉ -P _{3(CO)} = 2.1 Å
SH3-Domäne von c-Src (Huhn)	RAL _P PLPRY 01234567-	1rip (NMR)	kein Rest bei -2 L bei +2	Y ₆₀ -P ₃ = 48 Y ₆₀ -P ₆ = 69	W ₄₂ -R _{0(CO)} = 2.5 Å W ₄₂ -A _{1(CO)} = 3.2 Å	Y ₆₀ -P _{4(CO)} = 2.7 Å	N ₅₉ -P _{3(CO)} = 7.9 Å
SH3-Domäne von c-Src (Huhn)	KPL _P PLP 0123456	1nlo (NMR)	kein Rest bei -2 L bei +2	Y ₆₀ -P ₃ = 4 Y ₆₀ -P ₆ = 24	W ₄₂ -X ¹ _{0(CO)} = 2.3 Å	Y ₆₀ -P _{4(CO)} = 2.8 Å	N ₅₉ -P _{3(CO)} = 2.5 Å
SH3-Domäne von c-Src (Huhn)	λPL _P PLP 0123456	1nlp (NMR)	kein Rest bei -2 L bei +2	Y ₆₀ -P ₃ = 9 Y ₆₀ -P ₆ = 25	W ₄₂ -X ² _{0(CO)} = 2.3 Å	Y ₆₀ -P _{4(CO)} = 2.6 Å	N ₅₉ -P _{3(CO)} = 2.4 Å
Ligand C nach N:							
N-terminale SH3 Mut. Grb2 (Human)	RRR _P E _V PPV 4321012345	1aze (NMR)	W ₃₆ -P ₀ = 43	Y ₅₂ -P ₋₃ = 32 Y ₅₂ -P ₀ = 39	W ₃₆ -P _{0(CO)} = 2.2 Å W ₃₆ -P _{1(CO)} = 2.4 Å	Y ₅₂ -P _{-3(CO)} = 3.4 Å	N ₅₁ -P _{-2(CO)} = 4.9 Å
N-terminale SH3 Grb2 (Maus)	RRR _P E _V PPV 4321012345	4gbq (NMR)	W ₃₆ -P ₀ = 40	Y ₅₂ -P ₋₃ = 23 Y ₅₂ -P ₀ = 28	W ₃₆ -P _{0(CO)} = 3.2 Å W ₃₆ -P _{1(CO)} = 2.9 Å	Y ₅₂ -P _{-3(CO)} = 2.7 Å	N ₅₁ -P _{-2(CO)} = 2.6 Å
N-terminale SH3 c-Crk (Maus)	RKK _P PLAPP 4321012345	1cka (Röntgen)	W ₁₆₉ -P ₀ = 14	Y ₁₈₆ -P ₋₃ = 11 Y ₁₈₆ -P ₀ = 27	W ₁₆₉ -P _{0(CO)} = 2.0 Å W ₁₆₉ -P _{1(CO)} = 2.8 Å	Y ₁₈₆ -P _{-3(CO)} = 3.4 Å	kein H-Brückendor
N-terminale SH3 c-Crk (Maus)	RRR _P E _V PP 4321012345	1ckb (Röntgen)	W ₁₆₉ -P ₀ = 16	Y ₁₈₆ -P ₋₃ = 6 Y ₁₈₆ -P ₀ = 14	W ₁₆₉ -P _{0(CO)} = 2.0 Å W ₁₆₉ -P _{1(CO)} = 2.4 Å	Y ₁₈₆ -P _{-3(CO)} = 2.8 Å	kein H-Brückendor
SH3 c-Src (Geflügel Sarcomavirus)	LRPRNR _P ELPPA --5432101234	1qwe (NMR)	W ₄₂ -P ₀ = 44	Y ₆₀ -P ₋₃ = 48 Y ₆₀ -P ₀ = 44	W ₄₂ -P _{0(CO)} = 2.3 Å W ₄₂ -P _{1(CO)} = 3.1 Å	Y ₆₀ -P _{-3(CO)} = 2.3 Å	N ₅₉ -P _{-2(CO)} = 3.0 Å
C-terminale SH3 Src (C. elegans)	RRR _P E _V PP 432101234	1sem (Röntgen)	W ₁₉₁ -P ₀ = 19	Y ₂₀₇ -P ₋₃ = 8 Y ₂₀₇ -P ₀ = 18	W ₁₉₁ -P _{0(CO)} = 2.5 Å W ₁₉₁ -P _{1(CO)} = 2.5 Å	Y ₂₀₇ -P _{-3(CO)} = 2.7 Å	N ₂₀₆ -P _{-2(CO)} = 2.0 Å
SH3-Domäne von c-Src (Huhn)	RRL _P PPAFA 21012345-	1prl (NMR)	W ₄₂ -P ₀ = 42	Y ₆₀ -P ₋₃ = 75 Y ₆₀ -P ₀ = 65	W ₄₂ -P _{0(CO)} = 4.1 Å W ₄₂ -R _{1(CO)} = 4.9 Å	Y ₆₀ -P _{-3(CO)} = 2.3 Å	N ₅₉ -P _{-2(CO)} = 7.9 Å
SH3-Domäne von c-Src (Maus)	--EPT _R EL _P PPI-- --54321012345-	1jeg (NMR)	W ₄₂ -P ₀ = 24	Y ₆₄ -P ₋₃ = 31 Y ₆₄ -P ₀ = 16	W ₄₇ -P _{0(CO)} = 1.7 Å W ₄₇ -E _{1(CO)} = 2.8 Å	Y ₆₄ -P _{-3(CO)} = 5.5 Å	N ₆₃ -P _{-2(CO)} = 3.7 Å

[a] Quantitativer Vergleich von wichtigen konservierten Winkeln zwischen Ringebenen der Seitenketten und Abständen innerhalb von H-Brücken der Komplexe mit PRM-Bindungsdomänen. Gelb: Seitenketten der Liganden, die tief in die Oberfläche der Domäne eintauchen. H-Brücken-Donoren: rot: Trp, blau: Tyr, grün: andere H-Brücken-Donoren. Die Nummerierung der Liganden beginnt mit (0) für die erste H-Brücke zu Trp/Tyr (siehe Abbildung 3). N-terminal zu (0) stehende Reste: grauer Hintergrund, negative Nummer; C-terminal stehende Reste: weißer Hintergrund, positive Nummer. Nur die in den experimentellen Strukturen aufgelösten Reste sind nummeriert. Bei zwei verschiedenen Orientierungen sind die Komplexe in zwei Gruppen unterteilt. Die dazugehörigen Peptidsequenzen sind dann von links nach rechts entweder von N- nach C-terminal oder von C- nach N-terminal notiert, um die Muster der konservierten Proline hervorzuheben. ψ , ϕ , x : aliphatische, hydrophobe und andere Aminosäurereste. Kleinbuchstaben: favorisierte Reste, die nicht zu 100% konserviert sind. [b] SH3-Komplexe in beiden Ligandenorientierungen. Die übereinstimmenden Bindungssequenzen sind (N)- ψ p ϕ Pp ϕ P-(C) und (C)-(R/K)pP ϕ PpP-(N) (κ und λ sind nicht nichtpeptidische Elemente, die in der PDB-Datei beschrieben sind: 1nlo, 1nlp).

Tabelle 3: WW-Domänen mit Peptiden in Orientierung 1 und 2.^{[a],[b]}

Protein-Domäne	Ligand (2 Orientierungen)	PDB-Code (Methode)	Winkel d. Ring-Ebenen Trp _(Domäne) und P _(Ligand)	Winkel d. Ring-Ebenen Tyr _(Domäne) und P _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Trp-NH ₂ zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Tyr-OH zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Thr-OH zu CO _(Ligand)
Ligand N nach C:							
WW Dystrophin (Human)	--PY _S PP _V VPP --2101234567-	1eg4 (Röntgen)	W ₆₃ -P ₂ = 27	Y ₇₂ -P ₃ = 41	W ₆₃ -R _{0(CO)} = 1.7 Å	Y ₇₂ -P _{3(CO)} = 4.9 Å Y ₇₂ -P _{4(CO)} = 5.3 Å	T ₈₁ -P _{3(CO)} = 3.3 Å
WW YAP (Human) L30K-Mutante	G _P PP _P YTV 101234567	1jmq (NMR)	W ₃₉ -P ₂ = 49	Y ₂₈ -P ₃ = 82	W ₃₉ -T _{0(CO)} = 2.1 Å	Y ₂₈ -P _{3(CO)} = 6.7 Å Y ₂₈ -P _{4(CO)} = 7.7 Å	T ₃₇ -P _{3(CO)} = 2.5 Å
WW III Rnedd4 (Ratte)	--PGT _P PP _N YDSL --2101234567-	1i5h (NMR)	W ₄₈ -P ₂ = 29	Y ₄₇ -P ₃ = 34	W ₄₈ -T ₀ = 3.3 Å	kein H-Brückendor	T ₄₈ -P _{3(CO)} = 4.9 Å
Ligand C nach N:							
WW Pin1 (Human)	SP _P o _S TP _P o _S Y 01 234 5 6	1f8a (Röntgen)	W ₃₈ -P ₁ = 40	Y ₂₇ -P ₋₁ = 65 Y ₂₇ -P ₋₄ = 81	W ₃₈ -S _{0(CO)} = 1.7 Å	Y ₂₇ -P _{-4(CO)} = 3.7 Å Y ₂₇ -T _{-3(CO)} = 4.1 Å	S ₃₆ -T _{-3(CO)} = 2.8 Å

[a] siehe Tabelle 2. [b] WW-Komplexe in beiden Ligandenorientierungen. Die übereinstimmenden Bindungssequenzen sind jeweils (N)-pPPxY-(C) und (C)-PpSxPpSY-(N); poS = Phosphoserin.

Shank-Proteinen vorkommt.^[97,98] Die dritte Klasse umfasst WASP/N-WASP-EVH1-Domänen. Nach bisherigem Kenntnisstand ist die N-WASP-EVH1-Domäne nicht zur Bindung kurzer Peptide in der Lage, kann aber intramolekular ein aus 25 Aminosäuren bestehendes Peptid aus dem WASP-interagierenden Protein (WIP) binden, wenn dieses über einen

fünf Aminosäuren langen Linker mit der Domäne verknüpft ist.^[94]

Untersuchungen zur Substitution einzelner Aminosäuren innerhalb der Peptide (SPOTs-Analyse) ergaben für die Klasse-I-EHV1-Domänen das Consensus-PRM FPxP. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der Substitutionsanalyse für

Tabelle 4: EVH1-Bindungsmodi 1 und 2 in gleicher Peptid-Orientierung.^{[a],[b]}

Protein-Domäne	Ligand (2 Klassen, gleiche Orientierung)	PDB-Code Winkel d. Ring-Ebenen (Methode) Trp _(Domäne) und P _(Ligand)	Winkel d. Ring-Ebenen Tyr _(Domäne) und P _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Trp-NHe₁ zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Tyr-OH zu Ligand	Potenzielle H-Brücken Gln-NHe_{1,2} zu CO _(Ligand)
Klasse 1: N nach C						
EVH1 Mena (Maus)	F ₂ P ₁ P ₂ T 2 1 0 1 2 -	levh W ₂₃ -P ₋₁ = 19 (Röntgen) W ₂₃ -P ₂ = 18	nicht anwendbar	W ₂₃ -P _{0(CO)} = 1.7 Å	keine	Q ₇₉ -P _{-1(CO)} = 2.2 Å
EVH1 Evl (Maus)	FEF ₂ P ₁ P ₂ T DEE - 2 1 0 1 2 3 - -	lqc6 W ₂₃ -P ₋₁ = 17 (Röntgen) W ₂₃ -P ₂ = 12	nicht anwendbar	W ₂₃ -P _{0(CO)} = 1.9 Å	keine	Q ₈₀ -P _{-1(CO)} = 3.2 Å
EVH1 VASP (Human)	SFEP ₂ P ₁ P ₂ T EDEL - 4 3 2 1 0 1 2 3 4 5 6 7	ljng W ₂₃ -P ₋₁ = 11 (NMR) W ₂₃ -P ₂ = 15	nicht anwendbar	W ₂₃ -P _{0(CO)} = 1.8 Å	keine	Q ₈₁ -P _{-1(CO)} = 1.8 Å
Klasse 2: N nach C						
EVH1 Homer (Ratte)	T ₂ E _{3SF 012345}	1ddv (NMR)	W ₂₄ -P ₂ = 18	nicht anwendbar	W ₂₄ -T _{0(CO)} = 3.1 Å	keine kein Peptid-Rest in (-1)-Position

[a] siehe Tabelle 2. [b] EVH1-Komplexe. Bisher ist nur eine Ligandenausrichtung bekannt. Die beiden Klassen von EVH1-Domänen erkennen unterschiedliche Sequenzen: die Klasse I (Ena/VASP-Familie) bindet (N)-FP_xφP-(C) und die Klasse II (Homer/Vesl-Familie) bindet (N)-xPPxF-(C).

Tabelle 5: GYF-Domäne.^{[a],[b]}

Protein	Ligand (nur N-nach-C-Orientierung)	PDB-Code Winkel d. Ring-Ebenen (Methode) Trp 28 _(Domäne) und P _(Ligand)	Winkel d. Ring-Ebenen Tyr _(Domäne) und P _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Trp 28-NHe₁ zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Tyr-OH zu NH _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Trp 8-NHe₁ zu CO _(Ligand)
GYF CD2BP2 (Human)	SHR ₂ P ₁ P ₂ P ₃ GHRV 3 2 1 0 1 2 3 4 5 6 7	11z (NMR)	W ₂₈ -P ₂ = 14 Y ₆ -P ₂ = 64 Y ₆ -P ₃ = 78	W ₂₈ -P _{0(CO)} = 2.1 Å	Y ₆ -P _{3(CO)} = 2.3 Å	W ₈ -P _{3(CO)} = 2.5 Å

[a] siehe Tabelle 2. [b] GYF-Domäne bildet Komplexe mit RPPPGHР-enthaltenden Peptiden des cytoplasmatischen Endes von CD2.

Tabelle 6: UEV-Domäne.^{[a],[b]}

Protein	Ligand (nur N-nach-C-Orientierung)	PDB-Code Winkel d. Ring-Ebenen (Methode) Tyr 63 _(Domäne) und P _(Ligand)	Winkel d. Ring-Ebenen Tyr 68 _(Domäne) und P _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Tyr 63-OH zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Thr-OH zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Asn-NH6_{1,2} zu CO _(Ligand)	
UEV-Domäne von Tsg101 (Human)	BEPTA _{2EE 654321012}	1m4p (NMR)	Y ₆₃ -P ₀ = 45 Y ₆₃ -P ₋₁ = 59	Y ₆₈ -P ₀ = 74 Y ₆₈ -P ₋₁ = 9	Y ₆₃ -P _{0(CO)} = 2.7	T ₃₈ -P _{-6(CO)} = 2.7	N ₆₉ -E _{-5(CO)} = 1.7

[a] siehe Tabelle 2. [b] UEV-Domäne bildet einen Komplex mit dem PTAP-enthaltenden Peptid des HIV-1 viralen Gag-Proteins.

Tabelle 7: Profilin mit Poly-L-prolin in den Orientierungen 1 und 2.^{[a],[b]}

Protein	Ligand (2 Orientierungen)	PDB-Code Winkel d. Ring-Ebenen (Methode) Trp _(Domäne) und P _(Ligand)	Winkel d. Ring-Ebenen Tyr _(Domäne) und P _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Trp-NHe₁ zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken Tyr-OH zu CO _(Ligand)	Potenzielle H-Brücken His-NHe₂ zu CO _(Ligand)	
Ligand N-nach C:							
Platelet profilin (Human)	PPPPP _{2PPPP_{1PPPP_{0PPP_{2 5432101234578}}}}	1cjf (Röntgen)	W ₃ -P ₋₁ = 11 W ₃ -P ₂ = 12 Y ₆ -P ₅ = 18.98	Y ₆ -P ₂ = 29	W ₃ -P _{0(CO)} = 1.7 Å	Y ₆ -P _{3(CO)} = 2.6 Å	H ₁₃₃ -P _{4(CO)} = 1.9 Å
Ligand C-nach N:							
Platelet profilin (Human)	PPPP _{2PPPP_{1PPPP_{0 432101234}}}	1awi (Röntgen)	W ₃ -P ₋₁ = 18 W ₃ -P ₂ = 55	Y ₆ -P ₋₄ = 22 Y ₆ -P ₋₁ = 15	W ₃ -P _{0(CO)} = 1.9 Å	Y ₆ -P _{-3(CO)} = 3.1 Å	H ₁₃₃ -P _{-4(CO)} = 1.9 Å
Platelet profilin (Human)	PPPP _{2PPPP_{1PPPP_{0 2101234}}}	1cf0 (Röntgen)	W ₃ -P ₋₁ = 37 W ₃ -P ₂ = 77	Y ₆ -P ₋₄ = 11 Y ₆ -P ₋₁ = 19	W ₃ -P _{0(CO)} = 2.0 Å	Y ₆ -P _{-3(CO)} = 2.8 Å	H ₁₃₃ -P _{-4(CO)} = 1.9 Å

[a] siehe Tabelle 2. [b] Profilin-Komplex mit Poly-L-prolin in beidseitiger Orientierung.

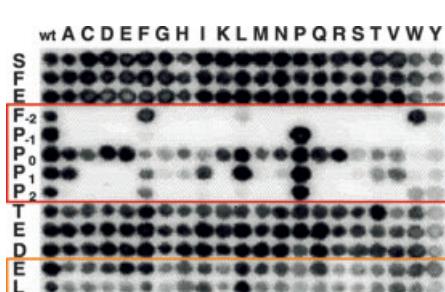


Abbildung 6: Einfache Substitutionsanalyse des Bindungspeptids der EVH1-Domäne von *Listeria monocytogenes* ActA-Protein SFEFPPT-EDEL. Die Abbildung zeigt die Klasse-I-EVH1-Domäne des menschlichen VASP-Proteins.^[42] Roter Kasten: konserviertes PRM, Orangefarbener Kasten: zusätzliches, die ActA-Affinität erhöhendes Epitop.

einen Liganden der EHV1-Domäne des menschlichen VASP-Proteins.^[42] Der Peptidrest, der an der Wasserstoffbrücke zur Seitenkette des konservierten Trp auf der Oberfläche der Domäne (Trp 23 in VASP- oder Mena-Proteinen) beteiligt ist, erhält die Position (0). Proline in den Positionen (-1) und (2) (FPPPP) sind essenziell für die Bindung an EHV1, wogegen die Proline in den Positionen (0) und (1) (FPPP) nicht konserviert sein müssen. Die Position (0) ist weitgehend unspezifisch und kann durch nahezu jede andere Aminosäure eingenommen werden, ohne dass die Bindung an EHV1 geschwächt wird. Position (1) hingegen muss durch eine hydrophobe Aminosäure besetzt sein (Pro, Leu, Ala, Ile oder Val), um die EHV1-Bindung zu ermöglichen.^[86] Proline findet man oft an diesen zentralen Stellen, wahrscheinlich weil ihr Carbonyl-Sauerstoffatom ein hervorragender Wasserstoffbrücken-Acceptor ist und weil sie optimal zu Induktion der PPII-Helix im Liganden geeignet sind.

4.2. Die EHV1:PRM-Wechselwirkung und die strukturelle Bedeutung der PRM-Consensussequenzen für die EHV1-Bindung

Aus den Strukturen der EHV1:PRM-Komplexe^[42, 92, 93] der Klasse I geht hervor, dass die Erkennung von PRMs durch drei hoch konservierte aromatische Reste auf der Oberfläche der Domäne erfolgt (Abbildung 1c). Im Mena-Protein (siehe Abbildung 3e) besteht diese Triade aus den Aminosäuren Tyr 16, Trp 23 und Phe 77. Bei den der Klasse I zugeordneten EHV1:PRM-Komplexen besetzen die Reste P₁ und P₂ des FPPPP-Liganden zwei hydrophobe Bindungstaschen, die von Tyr 16 und Trp 23 sowie Trp 23 und Phe 77 (Aminosäurenummerierung aus der Mena-EHV1) geformt werden. Dies führt zur Bildung einer Schirm-ähnlichen Ligandstruktur (siehe Abbildung 2b), die durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der ε-NH-Gruppe von Trp 23 und dem Carbonyl-Sauerstoffatom von P₀ stabilisiert wird (siehe Abbildung 3e).^[42, 92, 93] Der hydrophobe Kontakt von P₁ und P₂ zur EHV1-Domäne, besonders die coplanare Anordnung der Prolinringe zur Trp-23-Seitenkette, erklärt die Konservierung dieser Proline in der PRM-Consensussequenz. P₀ interagiert dagegen überhaupt nicht mit der Bindungsstelle der Domäne und P₁ nur über Side-on-Kontakte; dies resultiert in einer großen Toleranz gegen den Austausch von Aminosäuren in der Position (0) und der Notwendigkeit eines hydrophoben Restes in der Position (1) (siehe Abbildung 6).

Homer-Proteine werden der Klasse II der EHV1-Domänen zugerechnet. Bei ihnen ist das in Klasse-I-EHV1-Domänen konservierte Tyr 16 durch Ile ersetzt, was zu einer veränderten Oberfläche der hydrophoben Bindungstasche führt, die im Mena-Komplex P₁ bindet. Außerdem ist Met 14 (Mena) durch Phe 14 (Homer) ausgetauscht. Durch diese Substitution steht eine neue Bindungstasche für P₁ und P₂ im Homer-Peptid TPPxxP zwischen den Seitenketten von Phe 14, Trp 24 und Phe 74 zur Verfügung. Einen weiteren Kontakt mit der Domänoberfläche geht der F₅-Rest des Peptids ein (siehe Abbildung 3f). Die Präferenzen beider Klassen von EHV1-Domänen beruhen also auf der Substitution nur weniger konservierter Aminosäuren in der PRM-Bindungsdomäne.^[86]

Bisher wurde nur eine Orientierung von an EHV1-Domänen gebundenen Liganden gefunden. Bei beiden Klassen von EHV-Domänen formt ein Paar konservierter Phe- und Trp-Seitenketten eine hydrophobe Tasche, in die P₂ aufgenommen wird (siehe Abbildung 3e und f).

Das Vorhandensein einer zweiten Wasserstoffbrücke zwischen der ε-NH₂-Gruppe von Gln 79 (Mena) der EHV1-Domäne und dem Carbonyl-Sauerstoffatom von P₁ des Liganden ist charakteristisch für Klasse-I-EHV1-Domänen. Anhand der bislang bekannten Strukturinformationen zu EHV1-Ligand-Komplexen kann man voraussagen, dass diese zweite Wasserstoffbrücke auch bei den Klasse-II-EHV1-Domänen zu finden sein sollte. Das untersuchte Peptid im Homer-1a-Komplex endete allerdings bei Position (0) (Abbildung 3f) und verfügte somit über keinen korrekt platzierten Wasserstoffbrücken-Acceptor – um die genannte Hypothese zu prüfen, müsste dieses Peptid daher mindestens noch um eine N-terminale Aminosäure verlängert werden.^[86]

4.3. Spezifität und Orientierung des Peptids und die Rolle der PRM-flankierenden Reste

Die Bindung von nicht kovalent mit der Domäne verknüpften Peptiden erfolgt bei allen bislang untersuchten EHV1-Peptid-Komplexen nur in einer Peptidorientierung. In Klasse-I(Ena/VASP)-EHV1:PRM-Komplexen besteht das PRM aus einem Phe, dem eine kurze PPII-Helix folgt (z. B. FPPPP). Die Phe-Seitenkette wird dabei in einer speziellen Tasche der Domäne aufgenommen^[42, 93] und bestimmt so die Orientierung des Liganden. Im TPPSPF-Liganden der EHV1-Domäne von Homer-1a liegt das Phe am C-terminalen Ende des PRM, was zunächst darauf schließen lässt, dass das Peptid an Klasse-II-EHV1-Domänen in der umgekehrten Orientierung bindet – die Kristallstruktur des Komplexes belegt aber, dass TPPSPF an diese Domäne in derselben Orientierung bindet wie das FPPPP an die Ena/VASP-EHV1-Domäne.^[91] Es zeigt sich, dass die Phe-Seitenketten an zwei unterschiedlich lokalisierte Bindungsstellen der EHV1-Domänen binden. In beiden Fällen bestimmt dieses Phe die Ausrichtung des PRM an der EHV1-Domäne. Interessanterweise bindet das Peptid aber in umgekehrter Orientierung, wenn das WIP-Peptid N-terminal mit der N-WASP-EHV1-Domäne fusioniert wird.^[94] Allerdings ist dies keine intermolekulare Wechselwirkung mehr und soll daher an dieser Stelle nicht weiter diskutiert werden.

Die Bindungsaffinitäten isolierter PRMs für EHV1-Domänen sind im Allgemeinen äußerst niedrig und häufig gar nicht mehr nachweisbar,^[42] weshalb noch weitere Wechselwirkungen benötigt werden, um die Affinität auf ein biologisch nutzbares Niveau zu erhöhen. Dies wird durch flankierende Epitope erreicht, die weiter entfernt vom PRM liegen und die Bindung durch zusätzliche hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken verstärken. Das affinitätsverstärkende Epitop des ActA-Oberflächenproteins von *Listeria monocytogenes* besteht aus den zwei Aminosäuren EL, die sich C-terminal zum FPPPP-Motiv befinden. Dieses Epitop interagiert mit einem hydrophoben Bereich auf der Oberfläche der EHV1-Domäne, der sich in direkter Nachbarschaft zur PRM-bindenden Tasche der Domäne befindet.

5. GYF-Domänen

Die GYF-Domänen sind nach dem konservierten GYF-Motiv in der Primärsequenz benannt, werden aber oft auch als CD2-Bindungsdomänen bezeichnet. Sie bestehen aus einer Sequenz von 86 Aminosäuren (Abbildung 1d) und binden Prolin-reiche Sequenzen des Typs PPPPGHR (Tabelle 1). Die GYF-Domäne des CD2-Bindungsproteins 2 (CD2BP2) bindet die Tandem-Repeat-Region PPPPGHR-SQAPSHR-PPPPGHR,^[20] die im cytoplasmatischen Ende des CD2-Rezeptorproteins, das für die T-Zellen-Aktivierung verantwortlich ist, gefunden wird.^[99] Die dreidimensionale Struktur der freien GYF-Domäne von CD2BP2 in Lösung repräsentiert einen neuen Faltungstyp. Die für die Bindung wichtigen Peptidreste wurden durch die Analyse der ¹H, ¹⁵N-chemischen Verschiebungen bei steigender Peptidkonzentra-

tion ermittelt.^[21] Wie bei allen anderen Familien von PRM-Bindungsdomänen findet man auch bei der GYF-Domäne einen konservierten, an der Oberfläche exponierten aromatischen Cluster, der für die Peptidbindung unabdingbar ist.

5.1. Die GYF:PRM-Wechselwirkung

Die Struktur des Komplexes der GYF-Domäne mit dem Peptid SHRPPPPGHRV in Lösung gewährt einen tieferen Einblick in den Bindungsmodus (Abbildung 3g).^[100] Im Vergleich zu den an der Proteinoberfläche exponierten aromatischen Clustern der anderen PRM-Bindungsdomänen ist der entsprechende Bereich der GYF-Domäne größer. Eine Hälfte des Clusters wird durch Phe 20, Trp 28 und Tyr 33 gebildet, wobei die ϵ -NH-Gruppe von Trp 28 ähnlich wie bei den WW-Domänen eine Wasserstoffbrücke zu P_0 bildet (siehe Abb 2c). In die hydrophoben Taschen auf beiden Seiten von Trp 28 passen sich die Seitenketten von R_{-1} und P_2 ein. Der zweite Teil des aromatischen Clusters wird von Tyr 6, Trp 8 und Tyr 17 gebildet, und die Wasserstoffbrücken-Donoren der Seitenketten von Trp 8 und Tyr 6 gehen jeweils Wasserstoffbrücken zum Carbonyl-Sauerstoffatom von P_3 ein. Auch G_4 und R_6 interagieren mit der Domänenoberfläche. Die Komplexstruktur legt nahe, dass die Reste mit engem Kontakt zur Domänenoberfläche (in Abbildung 3g in gelb hervorgehoben) im PRM am höchsten konserviert sind und die Reste, die in Kontakt mit der umgebenden Lösung stehen, auch durch andere Aminosäuren ersetzt sein können.^[100] Daraus ergibt sich für die GYF-Domäne ein Consensus-PRM von (R)xxPPgxR.

6. UEV-Domänen

Die Ubiquitin-E2-Variante(UEV)-Domäne besteht aus 145 Aminosäuren (Abbildung 1e) und findet sich im menschlichen Tsg101-Protein (Tumor-Suszeptibilitäts-Gen 101). Die Domäne wird von wichtigen Strukturproteinen der HIV- und Ebola-Viren benutzt, um die virale Vermehrung zu erleichtern. Bei nichtlöslichen Viren ist diese Wechselwirkung essenziell für die Replikation. In diesen Proteinen bindet die UEV-Domäne spezifisch an Peptidmotive der Form P(T/S)AP mit K_d -Werten, die typisch für PRM-Wechselwirkungen sind^[22,23] (Tabelle 1).

6.1. Die UEV:PRM-Wechselwirkung

Abbildung 3h zeigt die Struktur in Lösung des Komplexes der Tsg101-UEV-Domäne mit dem Peptid PEPTAPEE aus dem HIV-1_{NL4-3} p6^{Gag}-Protein ($K_d = 3 \mu\text{M}$).^[22] Der exponierte aromatische Cluster der UEV-Domäne ist dem der anderen PRM-Bindungsdomänen sehr ähnlich, allerdings fehlt der in allen anderen Domänen vorhandene Trp-Rest. In der UEV-Domäne bildet Tyr 63 die primäre Wasserstoffbrücke zum Peptid (in Abbildung 3h pink hervorgehoben). Die Oberfläche der Bindungstasche ähnelt am ehesten der von WW-Domänen (siehe Abbildung 2c), und man würde erwarten,

dass die beiden aufeinander folgenden Proline P_{-1} und P_0 , die von einer hydrophoben Tasche auf der einen Seite von Tyr 63 aufgenommen werden, die am stärksten konservierten Reste in UEV-Liganden sind; bisher stehen jedoch noch keine Daten von entsprechenden Substitutionsanalysen zur Verfügung. Das UEV-Bindungsepitop ist durch weitere Wasserstoffbrücken zwischen den exponierten Asn-69- und Thr-58-Seitenketten (grün in der Abbildung) und den Carbonyl-Sauerstoffatomen von E_{-5} und P_{-6} charakterisiert. Es wurde außerdem vorgeschlagen, dass das Carbonyl-Sauerstoffatom von T_{-3} des Peptids und die Seitenketten von Ser 143 sowie Arg 144 der UEV-Domäne eine gegabelte Wasserstoffbrücke bilden^[22] (nicht dargestellt in Abbildung 3h). Eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Liganden und der Tyr-68-Seitenkette (blau) ist wegen deren Orientierung nicht möglich.

7. Profilin

Die Profiline sind eine Familie von kleinen (12–15 kDa), ubiquitären Proteinen, die an der Regulation der Aggregation von Actinfilamenten und der Actinpolymerisation beteiligt sind. Von den zuvor beschriebenen Domänen unterscheiden sie sich dadurch, dass sie eigenständige Proteine sind und nicht Teil eines modular aufgebauten, größeren Proteins. Profilin können gleichzeitig monomeres G-Actin^[101] und Poly-L-prolin (pLP)^[25,102] binden (Tabelle 1). Außerdem binden sie Phosphatidyl-Inositol-4,5-Biphosphat (PIP₂), eine Komponente des Phosphatidyl-Inositol-Zyklus, der an signalgebenden Ereignissen innerhalb der Zelle beteiligt ist; diese PIP₂-Bindung ist die Ursache für die Dissoziation des Profilin:Actin-Komplexes. Die Kristallstrukturen der Isoformen I und II des Profilins von *Acanthamoeba*,^[92,103,104] des pflanzlichen Profilins von *Arabidopsis thaliana* (eines bedeutsamen menschlichen Allergens)^[105] sowie des Rinder-Profilins allein^[106] und im Komplex mit Rinder-Actin^[25] wurden alle gelöst und weisen große Gemeinsamkeiten auf.^[105]

7.1. Die Profilin:pLP-Wechselwirkung

Die pLP-Bindungsstelle von Profilin wurde mittels Röntgen- und NMR-Spektroskopie,^[107,108] Mutagenesestudien^[109] und Fluoreszenz-Löschenexperimenten^[107,110] aufgeklärt und umfasst die Aminosäuren Trp 3, Tyr 6, Ile 21, Gly 23, Trp 31, Ala 33, Tyr 133 (His 133 im Rinder-Profilin) und Leu 134.

Wie die SH3- und WW-Domänen binden die Profilin Prolin-reiche Liganden in beiden möglichen Orientierungen (Abbildung 3i und j). In allen bislang bekannten Kristallstrukturen von Profilin sind vier aromatische Seitenketten (Trp 3, Tyr 6, His 133, Trp 31) in einem aromatischen Cluster an der Oberfläche exponiert. Ähnlich wie bei den SH3-Domänen sind die Seitenketten der am Cluster beteiligten Aminosäuren in einer Weise angeordnet, die es ermöglicht, zwei Windungen einer PPII-Helix aufzunehmen. Beim an die Profilinoberfläche gebundenen pPL-Ligand befindet sich jedes dritte Prolin in den hydrophoben Taschen zwischen Trp 3 und Tyr 6 sowie Tyr 6 und His 133, was dazu führt, dass der Ligand eine Doppelschirm-Struktur einnimmt (Abbil-

dung 3i und j). Konservierte Wasserstoffbrücken im Komplex treten zwischen den Wasserstoffbrücken-Donoren der Seitenketten von Trp 3 und Tyr 6 und den Carbonyl-Sauerstoffatomen von P_0 und P_3 auf. Eine weitere Wasserstoffbrücke existiert zwischen His 133 und dem Carbonyl-Sauerstoffatom von P_4 .

7.2. Die Orientierung, Spezifität und Affinität des Liganden in Abwesenheit PRM-flankierender Reste

Da die Liganden von Profilin aus langen Ketten von Prolinen zusammengesetzt sind (meist sechs oder mehr in Folge), stehen keine aromatischen oder hydrophoben Seitenketten zur Verfügung, um die Orientierung der Ligandenbindung festzulegen. Dementsprechend können unterschiedliche Profilin:pLP-Komplexe auftreten, bei denen der pLP-Ligand jeweils „rasterverschoben“ bindet. Dieser Effekt wurde bei den röntgenographisch charakterisierten Komplexen aus menschlichem Platelet-Profilin (HPP) und einem pLP-Dekamer beobachtet, die in zwei unterschiedlichen Varianten (HPP-A und HPP-B) vorliegen.^[24] Da in pLP-Liganden alle Seitenketten aus Pyrrolidinringen bestehen, können keine stabilisierenden polaren oder elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein auftreten; das bedeutet, dass der Komplex lediglich durch Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und sterische Präferenzen stabilisiert und in seiner Affinität kontrolliert wird. Das Fehlen Kern-flankierender Reste, die in anderen PRMs Spezifität und Bindungseigenschaften modifizieren, erklärt die Beobachtung, dass alle zellulären Profiline das pLP mit ähnlicher Affinität binden^[24] und dass dieselben Liganden in beiden Orientierungen an Profilin binden können.^[111]

8. Allgemeine Merkmale der Wechselwirkungen von Proteinen mit PRMs

Aus dem Vergleich der verschiedenen Klassen von PRM-bindenden Kontaktflächen lässt sich eine Reihe allgemeiner Eigenschaften ableiten, die bei der PRM-Erkennung immer wieder von Bedeutung sind:

- 1) Alle Domänen binden die PRMs ihrer jeweiligen Liganden über Cluster von aromatischen Seitenketten auf der Proteinoberfläche. Die Abstände und Winkel zwischen den Seitenketten definieren die Form der Prolin-bindenden Tasche.^[16,26]
- 2) Die Bindung der Liganden wird durch ein konserviertes Netzwerk von Wasserstoffbrücken und die coplanaren Anordnungen der Proline und der aromatischen Ringe bestimmt.
- 3) Die Zusammensetzung und Orientierung des Liganden wird durch Aminosäuren am Rand der PRMs bestimmt, die meist über große Seitenketten verfügen und als Anker fungieren. Im Falle von SH3-, WW- und EVH1-Domänen sind dies besonders Arg, Tyr und Phe.
- 4) Die Affinität der Ligandenbindung wird darüber hinaus durch die Eigenschaften zusätzlicher, das Kernstück des PRM flankierender Epitope beeinflusst.

8.1. Struktureigenschaften von PRM-Bindungsdomänen

Die PRM-Erkennung ist durch die genaue dreidimensionale Anordnung der exponierten aromatischen Seitenketten bestimmt. Das wichtigste Merkmal der Bindungsdomäne ist das Vorhandensein von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten, die Wasserstoffbücken-Donoren tragen (Trp und Tyr) und die senkrecht zur Proteinoberfläche stehen, um eine effektive Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoffatom des Peptidrückgrats des Liganden zu bilden. Diese Aminosäuren werden von anderen aromatischen Seitenketten flankiert, wobei der Winkel zur Seitenkette des Wasserstoffbrücken-Donors nahezu 90° beträgt (siehe Abbildung 1). Die flankierenden aromatischen Seitenketten können entweder parallel oder senkrecht zur Proteinoberfläche stehen, ergeben aber in jedem Fall eine hydrophobe, näherungsweise rechtwinklige Tasche, in die sich die Prolin-Seitenkette des Liganden gut einfügen kann.

8.2. Konservierte Wasserstoffbrücken-Netzwerke und Erkennung der Prolinringe

Die PRM-enthaltenden Peptide werden von ihren jeweiligen Domänen als PPII-Helices erkannt, wobei die Bindungsdomänen die PPII-Helix der Peptide sowohl von der einen als auch von der anderen Seite binden können (siehe Pfeile in Abbildung 2a). Bei dem für SH3, EHV1 und Profilin (Abbildung 2b) beobachteten Bindungsmodus wird die entscheidende Wasserstoffbrücke zwischen der aromatischen H-Donor-Seitenkette von Trp und einem Carbonyl-Sauerstoffatom des Liganden gebildet. Diese Wasserstoffbrücke ist mit dem Stiel eines Regenschirms vergleichbar, dessen Schirm durch die Proline des PRM gebildet wird, die sich an die beiden Seiten der Trp-Seitenkette anlagern (siehe Tabellen 2, 4 und 7). Im Fall eines Liganden mit einer idealen PPII-helicalen Struktur (z. B. F_{PPPPP}) befindet sich die an der Wasserstoffbrücke beteiligte Carbonylgruppe (unterstrichen) im Zentrum des Motivs aus vier Prolinen. Die beiden zentralen Proline treten nicht mit der Proteinoberfläche in Kontakt und können durch andere Reste substituiert werden; die beiden äußeren Proline interagieren dagegen mit der Domäne und sind hoch konserviert. Diese Proline sind nahezu coplanar zur aromatischen Seitenkette des Wasserstoffbrücken-Donors (siehe Spalten 4 und 5 in Tabellen 2, 4 und 7) und weisen außerdem hydrophobe Kontakte mit den flankierenden aromatischen Seitenketten der Bindungsdomäne auf (siehe Abbildung 3); daher befindet sich die Wasserstoffbrücke in einer hydrophoben Umgebung. Diese Wechselwirkungen kommen in beiden Orientierungen vor, wie in Abbildung 2b gezeigt wird. In jedem Fall sind P_1 und P_2 fast coplanar zu dem aromatischen Ring des Wasserstoffbrücken-Donors und haben Kontakt mit den anderen aromatischen Ringen der Ligandenbindungsstelle über die C β -, C γ - und C δ -Atome. In diesem Bindungsmodus werden Sequenzen vom Typ P_xxP erkannt, wobei die konservierten Proline den Schirm um den aromatischen Rest der Domäne bilden, der die Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoffatom von x₀ eingeht.

Beim zweiten Bindungsmodus, beobachtet bei WW-, GYF- und UEV-Domänen, erfolgt die Bindung der PPII-Helix von der gegenüberliegenden Seite (Abbildung 2a, c), beruht aber im Wesentlichen auf demselben Mechanismus: Ein aromatischer Wasserstoffbrücken-Donor, meist Trp, steht senkrecht zur Proteinoberfläche und bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem Carbonyl-Sauerstoffatom des Peptidrückgrates. Ein Prolin des Liganden ist weitgehend coplanar zur aromatischen Seitenkette dieses Restes angeordnet (Winkel und Wasserstoffbrücken siehe Tabellen 3, 5 und 6). Dies entspricht einer der beiden Hälften (rechts oder links) der in Abbildung 2b gezeigten Komplexe. In diesem Bindungsmodus jedoch wird das Peptid mit einem weiteren Prolin fortgesetzt, das coplanar zu einem zweiten aromatischen Rest der Domäne angeordnet ist (Abbildung 3c), der wiederum annähernd parallel zur Proteinoberfläche und senkrecht zum aromatischen H-Brücken-Donor steht. Dieser zweite aromatische Rest bildet keine Wasserstoffbrücke zum Liganden. Bei diesem Bindungsmodus treten Peptide mit zwei sequenziellen Prolinen über ihre C_β- und C_δ-Atome in Kontakt mit einer einzelnen hydrophoben Bindungstasche an einer Seite der zentralen Wasserstoffbrücke („xP[“]-Tasche).^[39] Beispiele hierfür sind die PPxY- und PPLP-Motive der WW-Domäne.

Die allgemeinen Prinzipien für ausgewählte Komplexe der PRM-Bindungsdomänen sind in Abbildung 3 dargestellt. In den SH3- und Profilin-Komplexen findet man die Doppelschirm-Struktur, in der zwei Wasserstoffbrücken (von den Trp- und Tyr-Seitenketten der Domäne) die „Stiele“ in zwei schirmartigen Strukturen bilden. Eine Ausnahme sind SH3-Komplexe in Orientierung 2, bei denen die Trp-Wasserstoffbrücke von einer viel kürzeren RxP-Sequenz umgeben ist. Die Komplexe werden durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen Asn- oder His-Seitenketten der Domäne und Carbonyl-Sauerstoffatomen des Peptidrückgrates stabilisiert. Der entscheidende Unterschied zwischen diesen Komplexen ist, dass in der SH3-Domäne (Orientierung 1) anders als bei Profilin die Liganden-Schirme separiert sind und lediglich einer davon die typische PPII-Helix-Struktur aufweist. Bei Profilin hingegen bilden die pLP-Liganden zwei Windungen in der typischen PPII-Helix-Konformation, wobei das Prolin zwischen den beiden Stielen der Schirme geteilt wird. Die EHV1-Domäne bindet PRM in ähnlicher Weise, verwendet jedoch nur eine einzelne Wasserstoffbrücke als Stiel der Schirmstruktur (Abbildung 3c). Der PRM-Bindungsmodus von WW-, GYF- und UEV-Domänen unterscheidet sich von den zuvor beschriebenen: Hier ist die Seitenkette des Wasserstoffbrücken-Donors (pink) nicht von zwei coplanar angeordneten Prolinringen umgeben; vielmehr ist nur ein Prolin des Liganden coplanar an einer Seite des aromatischen Ringes angelagert. Beide PRM-Bindungsmodi erkennen Liganden in beiden Orientierungen.

Die coplanare Anordnung der Prolinringe zu den umgebenden aromatischen Seitenketten ist von großer Bedeutung: Erstens zeigt sich in der Substitutionsanalyse (Abbildungen 4 und 5), dass die coplanar angeordneten Proline (gelb in Abbildung 3) durchgehend für die Bindung essentiell sind und dem Liganden ein Maximum an Spezifität verleihen; zweitens sind diese Proline in den PRMs der entsprechenden

Domänen hoch konserviert. In den Tabellen 2–7 sind die Winkel zwischen den dichtest gepackten Prolin-Seitenketten der Liganden sowie den Trp- und Tyr-Resten der aromatischen Cluster der unterschiedlichen PRM-Bindungsdomänen zusammengestellt. Innerhalb einer Familie von Bindungsdomänen sind diese Winkel im Allgemeinen ähnlich.

Ein wesentliches Charakteristikum der PRM-Komplexe ist das konservierte Netzwerk von Wasserstoffbrücken, das die aromatischen Reste einbezieht, die an der Oberfläche der Domäne exponiert sind (siehe Abbildung 3). In den meisten Fällen werden zusätzliche Wasserstoffbrücken zwischen weiteren an der Domänoberfläche lokalisierten Asn-, Thr-, Ser-, His- oder Gln-Seitenketten (Tabellen 2–7, grüne Seitenketten in Abbildung 3) und den Carbonyl-Sauerstoffatomen des Ligand-Peptidrückgrats gebildet. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen variieren je nach der Klasse der PRM-Bindungsdomäne und liefern den Rahmen für die Liganden-Spezifität innerhalb der Domänenfamilien (siehe Abbildung 3). In den Tabellen 2–7 sind die Donor-Acceptor-Abstände dieser Wasserstoffbrücken für alle in der PDB depositierten PRM-Komplexstrukturen angegeben.

8.3. Lage und Orientierung der Liganden: die Rolle der Proline und „Anker“-Reste im Kernmotiv

Dank ihrer hoch symmetrischen Struktur kann sich die PPII-Helix, unabhängig von der Orientierung des Peptids, mit einer ihrer zwei gegenüberliegenden Seiten an die Protein-Domäne anlagern und dabei dieselben Wasserstoffbrücken-Donoren und orthogonalen aromatischen Seitenketten der Domäne nutzen. Zusätzlich ermöglicht die Symmetrie der PPII-Helix ein Andocken an eine Vielzahl von Positionen entlang der Peptidbindungsstelle. Dieses Phänomen der multiplen Bindungsorientierung und der Verschiebung der Ligandenposition wurde bereits für SH3- und WW-Domänen sowie für Profilin beschrieben.^[24,57] Die korrekte Positionierung und Orientierung des jeweiligen Peptids muss folglich durch die Wechselwirkungen mit den Nicht-Prolin-Resten der PRMs bestimmt werden. Dies können beliebige Kombinationen aus elektrostatischen, polaren und hydrophoben Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken sein.

Im Allgemeinen besteht ein Teil des PRM-Kerns aus geladenen oder hydrophoben Resten, die die Orientierung des Liganden festlegen. Beispiele hierfür sind das Phe im FPPPP-Motiv, das charakteristisch für Liganden der Ena-VASP-Familie der EHV1-Domänen ist, das Phe des PP_xF-Motivs, das von den Homer-EHV1-Domänen erkannt wird, das Tyr im Consensusmotiv PPxY der Liganden der menschlichen YAP65-WW-Domäne^[16] und die Arg-, Lys- und His-Seitenketten der PPxPx(R/K/H)-Peptide, auf welche die Klasse-II-SH3-Domänen ausgerichtet sind.^[14,35,57] Eine Substitution dieser „Anker“-Reste geht oft mit einem vollständigen Verlust der Bindung einher, weshalb man sie als integralen Teil des Kern-Bindungsmotivs betrachtet.

8.4. Kontrolle von Spezifität und Bindungsaffinität durch weiter entfernte Reste

Kern-flankierende Epitope und „Anker“-Reste außerhalb des PRM können die Bindungsaffinität enorm erhöhen und spielen deshalb eine wesentliche Rolle bei der Festlegung der Spezifität. Sie können die Spezifität des Liganden sogar soweit erhöhen, dass zwischen den Mitgliedern derselben Familie von PRM-Bindungsdomänen unterschieden werden kann. So ist z.B. das Lysin im Peptid PPPALPPKKR des C3G-Proteins verantwortlich für eine hohe Spezifität der Bindung des Liganden an die c-Crk-SH3-Domäne, jedoch bindet dasselbe Peptid nicht an die SH3-Domänen von Nck, Src, Abl, Phospholipase Cy und Spectrin.^[56] Ähnlich verhält es sich mit einem Glu-Leu-Epitop, das in der Peptidsequenz SFEFPPPTEDEL des Oberflächenproteins Acta von *Listeria monocytogenes* vorkommt. Acta bindet mit hoher Spezifität an Klasse-I-EVH1-Domänen.^[42,96] Das EL-Epitop verstärkt die EVH1-Bindungsaffinität von Acta derart, dass andere natürliche, zelluläre, an EVH1-Bindungsdomänen bindende Proteine wie Zyxin und Vinculin, die dieses Epitop nicht aufweisen, nicht mehr konkurrieren können. Weil solche affinitätsbestimmenden Epitope so spezifisch für die sie enthaltenden Proteine sind, sind sie von besonderem Interesse bei der rationellen Entwicklung hoch spezifischer Inhibitoren.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Die Bindung niedermolekularer Liganden an Proteine erfordert ein ausgewogenes Zusammenspiel molekularer Wechselwirkungen. Vor der Entwicklung nichtpeptidischer Kompetitoren für natürliche PRM-Liganden ist es erforderlich zu verstehen, wie diese Wechselwirkungen zur Bildung und Stabilität von Komplexen zwischen Prolin-reichen Peptidmotiven und ihren jeweiligen Bindungsdomänen beitragen. Im Idealfall bildet ein Carbonyl-Sauerstoffatom des Peptidrückgrates eine Wasserstoffbrücke zu einem Wasserstoffbrücken-Donor einer senkrecht zur Domänenoberfläche stehenden, aromatischen Seitenkette (Trp oder Tyr). Die beiden Peptid-Seitenketten, welche die an der Wasserstoffbrücke beteiligte Carbonylgruppe direkt flankieren, sind zum Lösungsmittel hin exponiert. Die danach folgenden beiden Seitenketten auf jeder Seite (in der Regel Prolinringe) sind annähernd coplanar zu der an der Wasserstoffbrücke beteiligten aromatischen Seitenkette angeordnet und sind in die hydrophoben Bindungstaschen an der Proteinoberfläche eingelagert. Die Analyse der meisten hochauflösten Strukturen ergab, dass die Winkel zwischen der Ebene des aromatischen Ringes der Domäne und den Ebenen der umgebenden Prolinringe weniger als 30° betragen (siehe Tabellen 2–7). Zur Optimierung der hydrophoben Kontakte zum Prolinring des Peptids bildet die Domänenoberfläche starre hydrophobe „Boxen“ mittels weiterer aromatischer Reste, die annähernd rechtwinklig zur an der Wasserstoffbrücke beteiligten aromatischen Seitenkette angeordnet sind (d.h. parallel zur Oberfläche der Domäne). Diese aromatischen Reste treten bevorzugt mit den γ - und δ -Kohlenstoffatomen der Prolin-

ringe des Liganden in Kontakt. Die konformative Einschränkung des PRM durch die PPII-Helix ist der Grund dafür, dass die Bindung zwischen PRM und Domäne an zwei genau definierten, vorgeformten Oberflächen stattfindet und damit die entropische Bilanz der Bindung und die konformativen Spannung im Komplex minimiert sind.

Wie können die Erkenntnisse aus dem vorliegenden Aufsatz zur Planung der Synthese von PRM-Mimetika verwendet werden? Erstens können die aus den bekannten Komplexen der WW-, EHV1- und SH3-Domäne abgeleiteten Strukturdaten das Design von Inhibitoren für diese Domänen erleichtern. Bereits sehr kurze Peptide von weniger als fünf Aminosäuren können mit beachtlicher Affinität binden – wir gehen deshalb davon aus, dass Verbindungen im Bereich von 500 bis 700 Da entworfen werden können, die mit hoher Affinität und Selektivität an eine PRM-Erkennungsdomäne binden. Zweitens müssen geeignete Liganden die Bildung einer Wasserstoffbrücke zum Wasserstoffbrücken-Donor einer oberflächenexponierten aromatischen Seitenkette ermöglichen; darüber hinaus müssen sie auch hydrophobe Wechselwirkungen mit den spezifischen hydrophoben Bindungstaschen in direkter Nachbarschaft zu dieser aromatischen Seitenkette aufbauen können. Die optimale Wechselwirkung würde ein „hydrophober Chelatbildner“ garantieren, der den exponierten aromatischen Ring umhüllt.

Die detaillierte Analyse in diesem Aufsatz berücksichtigt und erweitert vorherige Studien zu PRM-Komplexen, die die Bedeutung der hydrophoben Bereiche zwischen rechtwinklig angeordneten Aromaten als Bindungstaschen für N-substituierte Aminosäuren^[26,39] hervorheben. In der Natur nehmen diese Taschen selbstverständlich Prolin auf – sie können aber, wie Substitutionsanalysen unter Einsatz von Peptidbibliotheken zeigen, auch andere hydrophobe Reste wie Leucin und Methionin binden. Diese hydrophobe Wechselwirkung allein ist wahrscheinlich relativ schwach, kann jedoch in Kombination mit der konservierten, hydrophob abgeschirmten Wasserstoffbrücke zu einer beachtlichen Affinität des PRM in Bezug auf die Domänenoberfläche führen. Die hier diskutierten Bindungsmodelle erklären auch die strenge Konserverung von Tryptophan und/oder Tyrosin mit exponierter, einer Wasserstoffbrücken-Donor tragender aromatischer Seitenkette, die in allen PRM-Bindungsdomänen vorhanden ist. Phenylalanin wird folglich nicht in dieser Position beobachtet, ist aber häufig an der Bildung der „aromatischen Wiegen“ beteiligt, die die hydrophobe Wechselwirkung optimieren.^[26] Es ist bemerkenswert, dass die aromatischen Ringe bei den meisten Bindungsstellen senkrecht zur Oberfläche stehen, wie in Abbildung 1 erkennbar.

Die hier vorgestellten Prinzipien sollten es ermöglichen, grundlegende Regeln zur Identifizierung von PRM-Bindungsdomänen in Proteinen aufzustellen, und sollten darüber hinaus Impulse für das rationelle Design von PRM-Mimetika liefern.

Die Autoren danken J. Zimmermann für die Durchsicht des Manuskriptes.

Eingegangen am 11. Juli 2003

Veränderte Fassung am 10. November 2004

- [1] G. B. Cohen, R. Ren, D. Baltimore, *Cell* **1995**, *80*, 237.
- [2] G. W. Reuther, A. M. Pendergast, *Vitam. Horm.* **1996**, *52*, 149.
- [3] M. Sudol, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1996**, *65*, 113.
- [4] S. E. Shoelson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 227.
- [5] T. Pawson, J. D. Scott, *Science* **1997**, *278*, 2075.
- [6] M. Sudol, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 161.
- [7] J. Kuriyan, D. Cowburn, *Annu. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 259.
- [8] G. Waksman, D. Komino, S. C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, R. B. Birge, D. Cowburn, H. Hanafusa, B. J. Mayer, M. Overduin, M. D. Resh, C. B. Rios, L. Silverman, J. Kuriyan, *Nature* **1992**, *358*, 646.
- [9] Z. Songyang, S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider, *Cell* **1993**, *72*, 767.
- [10] M. B. Yaffe, L. C. Cantley, *Nature* **1999**, *401*, 30.
- [11] P.-J. Lu, X. Z. Zhou, M. Shen, K. P. Lu, *Science* **1999**, *283*, 1325.
- [12] M. A. Verdecia, M. E. Bowman, K. P. Lu, T. Hunter, J. P. Noel, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 639.
- [13] H. Yu, J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer, S. Schreiber, *Cell* **1994**, *76*, 933.
- [14] A. B. Sparks, J. E. Rider, N. G. Hoffman, D. M. Fowlkes, L. A. Quilliam, B. K. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1540.
- [15] H. I. Chen, M. Sudol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7819.
- [16] M. I. Macias, M. Hyvönen, E. Baraldi, J. Schultz, M. Sudol, M. Saraste, H. Oschkinat, *Nature* **1996**, *382*, 646.
- [17] M. Reinhard, K. Jouvenal, D. Tripier, U. Walter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7956.
- [18] M. Reinhard, K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B. M. Jockusch, U. Walter, *EMBO J.* **1995**, *14*, 1583.
- [19] M. Reinhard, M. Rüdiger, B. M. Jockusch, U. Walter, *FEBS Lett.* **1996**, *399*, 103.
- [20] K. Nishizawa, C. Freund, J. Li, G. Wagner, E. L. Reinhardt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14897.
- [21] C. Freund, V. Dötsch, N. Kazuhisa, E. L. Reinhardt, G. Wagner, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 656.
- [22] O. Pornillos, S. L. Alam, D. R. Davis, W. I. Sundquist, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 812.
- [23] O. Pornillos, S. L. Alam, R. L. Rich, D. G. Myszka, D. R. Davis, W. I. Sundquist, *EMBO J.* **2002**, *21*, 2397.
- [24] N. M. Mahoney, P. A. Janmey, S. C. Almo, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 953.
- [25] C. E. Schutt, J. C. Myslik, M. D. Rozycski, N. C. W. Goonesekere, U. Lindberg, *Nature* **1993**, *365*, 819.
- [26] X. Huang, F. Pey, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Sudol, M. J. Eck, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 634.
- [27] R. Aasland, C. Abrams, C. Ampe, L. J. Ball, M. T. Bedford, G. Cesarini, M. Gimona, J. H. Hurley, T. Jarchau, L. Veli-Pekka, M. A. Lemmon, R. Linding, B. J. Mayer, M. Nagai, M. Sudol, U. Walter, S. J. Winder, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 141.
- [28] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217.
- [29] A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 25.
- [30] R. Frank, *J. Immunol. Methods* **2002**, *267*, 13.
- [31] F. Toepert, T. Knaute, S. Guffler, J. R. Pires, T. Matzdorf, H. Oschkinat, J. Schneider-Mergener, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1168; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1136.
- [32] K. Bialek, A. Swistowski, R. Frank, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 1006.
- [33] P. M. Cowan, S. McGavin, *Nature* **1955**, *176*, 501.
- [34] P. J. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Hanser, **1988**.
- [35] B. K. Kay, M. P. Williamson, M. Sudol, *FASEB J.* **2000**, *14*, 231.
- [36] M. P. Williamson, *Biochem. J.* **1994**, *297*, 249.
- [37] A. E. Hagerman, L. G. Butler, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4494.
- [38] A. Veis, C. F. Nawrot, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3910.
- [39] A. Zarrinpar, R. P. Bhattacharyya, W. A. Lim, *Sci. STKE* **2003**, *2003*, RE8.
- [40] D. H. Williams, M. S. Searle, J. P. Mackay, U. Gerhard, R. A. Maplestone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1172.
- [41] C. Bachmann, L. Fischer, U. Walter, M. Reinhard, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23549.
- [42] L. J. Ball, R. Kuhne, B. Hoffmann, A. Hafner, P. Schmieder, R. Volkmer-Engert, M. Hof, M. Wahl, J. Schneider-Mergener, U. Walter, H. Oschkinat, T. Jarchau, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4903.
- [43] A. A. Adzhubei, M. J. Sternberg, *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 472.
- [44] B. J. Mayer, M. Hamaguchi, H. Hanafusa, *Nature* **1988**, *332*, 272.
- [45] M. L. Stahl, C. R. Ferenz, K. L. Kelleher, R. W. Kriz, J. L. Knopf, *Nature* **1988**, *332*, 269.
- [46] V. P. Lehto, V. M. Wasenius, P. Salven, M. Saraste, *Nature* **1988**, *334*, 388.
- [47] H. Kang, C. Freund, J. S. Duke-Cohan, A. Musacchio, G. Wagner, C. E. Rudd, *EMBO J.* **2000**, *19*, 2889.
- [48] D. A. Renzoni, D. J. Pugh, G. Siligardi, P. Das, C. J. Morton, C. Rossi, M. D. Waterfield, I. D. Campbell, J. E. Ladbury, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15646.
- [49] A. Musacchio, M. Saraste, M. Wilmanns, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 546.
- [50] M. T. Pisabarro, L. Serrano, M. Williams, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 513.
- [51] S. Feng, C. Kasahara, R. J. Rickles, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 12408.
- [52] S. Feng, J. K. Chen, H. Yu, J. A. Simon, S. L. Schreiber, *Science* **1994**, *266*, 1241.
- [53] S. Feng, T. M. Kapoor, F. Shirai, A. P. Combs, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 661.
- [54] M. Vidal, N. Goudreau, F. Cornille, D. Cussac, E. Gincel, C. Garbay, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 717.
- [55] M. Wittekind, C. Mapelli, V. Lee, V. Goldfarb, M. S. Friedrichs, C. A. Meyers, L. Mueller, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 933.
- [56] X. Wu, B. Knudsen, S. M. Feller, J. Zheng, A. Sali, D. Cowburn, H. Hanafusa, J. Kuriyan, *Structure* **1995**, *3*, 215.
- [57] W. A. Lim, F. M. Richards, R. O. Fox, *Nature* **1994**, *372*, 375.
- [58] R. Ghose, A. Shekhtman, M. J. Goger, H. Ji, D. Cowburn, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 998.
- [59] J. T. Nguyen, C. W. Turck, F. E. Cohen, R. N. Zuckermann, W. A. Lim, *Science* **1998**, *282*, 2088.
- [60] S. Gorina, N. P. Pavletich, *Science* **1996**, *274*, 1001.
- [61] K. V. Kishan, G. Scita, W. T. Wong, P. P. Di Fiore, M. E. Newcomer, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 739.
- [62] A. M. Mongiovì, P. R. Romana, S. Panni, M. Mendoza, W. T. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni, P. P. Di Fiore, *EMBO J.* **1999**, *18*, 5300.
- [63] J. C. Williams, A. Weijland, S. Gonfloni, A. Thompson, S. A. Courtneidge, G. Superti-Furga, R. K. Wierenga, *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 757.
- [64] W. Xu, S. C. Harrison, M. J. Eck, *Nature* **1997**, *385*, 595.
- [65] I. Moarefi, M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, M. Huse, C. H. Lee, J. Kuriyan, W. T. Miller, *Nature* **1997**, *385*, 650.
- [66] F. Sicheri, I. Moarefi, J. Kuriyan, *Nature* **1997**, *385*, 602.
- [67] D. Barila, G. Superti-Furga, *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 280.
- [68] J. C. Williams, R. K. Wierenga, M. Saraste, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 179.
- [69] A. H. Andreotti, S. C. Bunnell, S. Feng, L. J. Berg, S. L. Schreiber, *Nature* **1997**, *385*, 93.
- [70] Q. Liu, D. Berry, P. Nash, T. Pawson, C. J. McGlade, S. S. Li, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 471.
- [71] P. Bork, M. Sudol, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 531.
- [72] B. Andre, J. Y. Springael, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *205*, 1201.
- [73] K. Hofmann, P. Bucher, *FEBS Lett.* **1995**, *358*, 153.
- [74] M. Sudol, T. Hunter, *Cell* **2000**, *103*, 1001.

- [75] M. J. Macias, S. Wiesner, M. Sudol, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 30.
- [76] L. Otte, U. Wiedemann, B. Schlegel, J. R. Pires, M. Beyermann, P. Schmieder, G. Krause, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 491.
- [77] H. I. Chen, A. Einbond, S. J. Kwak, H. Linn, E. Koepf, S. Peterson, J. W. Kelly, M. Sudol, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17070.
- [78] H. Linn, K. S. Ermekova, S. Rentschler, A. B. Sparks, B. K. Kay, M. Sudol, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 531.
- [79] J. L. Isley, M. Sudol, X. Espanol, S. J. Winder, *Cell Signal.* **2001**, *13*, 625.
- [80] M. T. Bedford, D. Sabassova, J. Xu, P. Leder, M. B. Yaffe, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10359.
- [81] S. Wiesner, G. Stier, M. Sattler, M. J. Macias, *J. Mol. Biol.* **2002**, *324*, 807.
- [82] J. R. Pires, F. Taha-Nejad, F. Toepert, T. Ast, U. Hoffmüller, J. Schneider-Mergener, R. Kühne, M. J. Macias, H. Oschkinat, *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 1147.
- [83] F. Toepert, J. R. Pires, C. Landgraf, H. Oschkinat, J. Schneider-Mergener, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 922; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 897.
- [84] X. Espanol, M. Sudol, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14514.
- [85] V. Kanelis, D. Rotin, J. D. Forman-Kay, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 407.
- [86] L. J. Ball, T. Jarchau, H. Oschkinat, U. Walter, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 45.
- [87] F. B. Gertler, K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland, P. Soriano, *Cell* **1996**, *87*, 227.
- [88] C. Haffner, T. Jarchau, M. Reinhard, J. Hoppe, S. M. Lohmann, U. Walter, *EMBO J.* **1995**, *14*, 19.
- [89] M. Reinhard, M. Halbrugge, U. Scheer, C. Wiegand, B. M. Jockusch, U. Walter, *EMBO J.* **1992**, *11*, 2063.
- [90] A. Kato, F. Ozawa, Y. Saitoh, K. Hirai, K. Inokuchi, *FEBS Lett.* **1997**, *412*, 183.
- [91] J. Beneken, J. C. Tu, B. Xiao, M. Nuriya, J. P. Yuan, P. F. Worley, D. J. Leahy, *Neuron* **2000**, *26*, 143.
- [92] A. A. Fedorov, K. A. Magnus, M. H. Graupe, E. E. Lattman, T. D. Pollard, S. C. Almo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8636.
- [93] K. E. Prehoda, D. J. Lee, W. A. Lim, *Cell* **1999**, *97*, 471.
- [94] B. F. Volkman, K. E. Prehoda, J. A. Scott, F. C. Peterson, W. A. Lim, *Cell* **2002**, *111*, 565.
- [95] M. Saraste, M. Hyvönen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 403.
- [96] K. Niebuhr, F. Ebel, R. Frank, M. Reinhard, E. Domann, U. D. Carl, U. Walter, F. Gertler, J. Wehland, T. Chakraborty, *EMBO J.* **1997**, *16*, 5433.
- [97] S. Naisbitt, E. Kim, J. C. Tu, B. Xiao, C. Sala, J. Valtschanoff, R. Weinberg, P. Worley, M. Sheng, *Neuron* **1999**, *23*, 569.
- [98] J. C. Tu, B. Xiao, J. P. Yuan, A. A. Lanahan, K. Leoffert, M. Li, D. J. Linden, P. F. Worley, *Neuron* **1988**, *21*, 717.
- [99] M. L. Dustin, M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, A. S. Shaw, *Cell* **1998**, *94*, 667.
- [100] C. Freund, R. Kuehne, H. Yang, S. Park, E. L. Reinhardt, G. Wagner, *EMBO J.* **2002**, *21*, 5985.
- [101] T. D. Pollard, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1994**, *10*, 207.
- [102] M. Tanaka, H. Shibata, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *151*, 291.
- [103] W. J. Metzler, K. L. Constantine, M. S. Friedrichs, A. J. Bell, E. G. Ernst, T. B. Lavoie, L. Mueller, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13818.
- [104] V. K. Vinson, S. J. Archer, E. E. Lattman, T. D. Pollard, D. A. Torchia, *J. Cell Biol.* **1993**, *122*, 1277.
- [105] K. S. Thorn, H. E. Christensen, R. Shigeta, D. Huddler, L. Shalaby, U. Lindberg, N. H. Chua, C. E. Schutt, *Structure* **1997**, *5*, 19.
- [106] E. S. Cedergren-Zeppezauer, N. C. Goonesekere, M. D. Rozycski, J. C. Myslik, Z. Dauter, U. Lindberg, C. E. Schutt, *J. Mol. Biol.* **1994**, *240*, 459.
- [107] W. J. Metzler, A. K. Bell, E. Ernst, T. B. Lavoie, L. Mueller, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4620.
- [108] S. J. Archer, V. K. Vinson, T. D. Pollard, D. A. Torchia, *FEBS Lett.* **1994**, *337*, 145.
- [109] C. Bjorkegren, M. Rozycski, C. E. Schutt, U. Lindberg, R. Karlsson, *FEBS Lett.* **1993**, *333*, 123.
- [110] I. Perelroizen, J.-B. Marchand, L. Blanchet, D. Didry, M.-F. Carlier, *Biochemistry* **1994**, *33*, 8472.
- [111] N. Mahoney, D. A. Rozwarski, E. Fedorov, A. A. Fedorov, S. C. Almo, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 666.
- [112] J. Schneider-Mergener, G. Cesareni, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [113] J. Schneider-Mergener, H. Oschkinat, unveröffentlichte Ergebnisse.