

Name: M. Sc. Bernhard Meineke

Titel der Dissertation: Molekulare Eigenschaften des Integrin-regulierenden ADAP-SKAP55-Signalkomplexes

Zusammenfassung:

Die Integrin-vermittelte Migration und Adhäsion von T-Zellen ist entscheidend für ein funktionierendes Immunsystem. Essentielle Komponenten der Regulation der Affinität und Avidität der Integrine nach T-Zellrezeptor-Stimulation sind die Adapterproteine ADAP (Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein) und SKAP55 (Src Kinase-Associated Phosphoprotein of 55 kDa). Über die molekulare Funktionsweise und die Struktur des gesamten ADAP-SKAP55-Komplexes war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Beide Aspekte wurden in der vorliegenden Arbeit adressiert. Nach der rekombinanten Expression der Proteine über einen transient in Insektenzellen produzierten Baculovirus konnte der Komplex aufgereinigt werden. Erstmals wurde für den ADAP-SKAP55-Komplex ein höher oligomerer Komplex beschrieben. Mit Hochmassen-massenspektrometrischen Analysen wurde für den Komplex eine Masse von ca. 259 kDa bestimmt. Dies entspricht einer 2:2 Stöchiometrie der beiden Interaktionspartner. Biochemische Charakterisierungen ergaben eine Dimerisierung von SKAP55 durch den N-Terminus und eine wahrscheinliche Dimerisierung von ADAP über eine potentielle Coiled-Coil-Struktur N-terminal zur hSH3^N-Domäne. Nach Etablierung der GraFix-Methode konnten geeignete Komplexe für die Elektronenmikroskopie erhalten werden. Durch Einzelpartikelrekonstruktion wurden initiale Strukturmodelle des ADAP-SKAP55- sowie des ADAP-Komplexes berechnet, die eine ringförmige, Donut-ähnliche Struktur aufweisen. Zusätzlich wurden fibrillenförmige Partikel in den negativ kontrastierten, elektronenmikroskopischen Aufnahmen der ADAP-SKAP55-Präparationen nachgewiesen.

Die Lokalisation des ADAP-SKAP55-Komplexes an der Plasmamembran nach T-Zellstimulation ist entscheidend bei der Aktivierung der Integrine. Die SKAP55 PH-Domäne wurde daher bezüglich ihrer Bindung an verschiedene Phosphoinositolphosphate charakterisiert. Voraussetzung für eine strukturelle Interpretation waren NMR-Resonanzzuordnungen des PH-Domänen-Rückgrats mit Hilfe sogenannter Triple-Resonanzspektren. In den folgenden Interaktionsstudien wurden die β 1- β 2-, β 3- β 4- und β 6- β 7-Loops als die an der Bindung beteiligten Strukturelemente identifiziert. In NMR-Titrationsexperimenten wurden die Dissoziationskonstanten für die Bindung der Kopfgruppen bzw. der löslichen kurzkettigen Derivate der Phosphoinositolphosphate bestimmt. Die PH-Domäne bindet bevorzugt die Kopfgruppe des PtdIns(3,4,5)P₃ mit einem K_D-Wert von 119 \pm 58 μ M, die Kopfgruppe des PtdIns(3,4)P₂ nur mit 641 \pm 276 μ M. Derivate mit kurzkettigen Acylketten führten zur Verstärkung der Bindung. Dies könnte auf Interaktionen der Acylkette mit dem β 1- β 2-Loop zurückzuführen sein. Ein für das homologe Protein SKAP-HOM beschriebener, von Phosphoinositid abhängiger Regulationsmechanismus wurde auf SKAP55 übertragen und weiterentwickelt.

Name: M. Sc. Bernhard Meineke
Title of dissertation: Molekulare Eigenschaften des Integrin-regulierenden ADAP-SKAP55-Signalkomplexes

Summary:

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

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

The localisation of the ADAP-SKAP55-complex to the plasmamembrane upon TCR-stimulation is a decisive step for integrin activation. To understand the role of the SKAP55 PH domain in this process the domain was analysed. NMR backbone resonance assignments were made on the basis of so-called triple resonance experiments of the SKAP55 PH-domain. Titrations with different phosphatidylinositolphosphates showed that the β 1- β 2-, β 3- β 4- and β 6- β 7-loops are involved in headgroup recognition. NMR titration experiments allowed to determine the K_D -values of different inositol-phosphate headgroups and short chain lipid derivatives thereof. The PH domain bound with a k_D of 119 \pm 58 μ M to PtdIns(3,4,5)P₃ while PtdIns(3,4)P₂ bound with a K_D of 641 \pm 276 μ M. Derivatives of phosphatidylinositolphosphate with short acylchains enhanced binding. This might be related to β 1- β 2-loop interactions with the acylchain of the lipid. Further, an autoinhibitory regulatory mechanism, similar to that previously proposed for SKAP-HOM, could be derived from the data presented here.