

Untersuchungen zur konformationellen Regulation von Ligandenbindungsstellen des Zytoskelettproteins Talin

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anett Ritter

(geb. Koch)

aus

Erfurt

Bonn 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter O. Fürst

2. Gutachter: PD Dr. Gregor Kirfel

Tag der Promotion: 29.06.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Berichte aus der Biologie

Anett Ritter

**Untersuchungen zur konformationellen
Regulation von Ligandenbindungsstellen
des Zytoskelettproteins Talin**

D 98 (Diss. Universität Bonn)

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Bonn, Univ., Diss., 2011

Copyright Shaker Verlag 2011

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0319-2

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Ganz besonders will ich mich bei Prof. Dr. Dieter O. Fürst für die externe Betreuung und Begutachtung der Arbeit, die hilfreichen Ratschläge sowie für sein Interesse an der Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich Dr. Wolfgang H. Ziegler für die Möglichkeit diese interessante Fragestellung zu bearbeiten, die Betreuung der Arbeit, sowie für die steten fachlichen Diskussionen und den ermöglichten thematischen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas.

Bei Dr. Mirko Himmel möchte ich mich für die anregenden Diskussionen bedanken, für seine stete Unterstützung und nicht zuletzt für die zahlreichen Stunden am FRAP-Mikroskop. Auch danke ich ihm für amüsante und interessante Gespräche während unserer Mittagspausen, ohne die ich diese Arbeit wahrscheinlich nicht zu Ende gebracht hätte.

Meinen Kollegen gilt es Dank zu sagen für ihre Hilfestellung bei Fragen und Problemen des Laboralltags. Vor allem möchte ich mich bei Frau Gabriele Oehme für die zahlreichen Midi-Präparationen und bei Frau Sabine Schnorr für viele Protein-Expressionen bedanken.

Bei allen Doktoranden, vor allem aber bei Susanna Marg, möchte ich mich für die rege Diskussionsbereitschaft, die angenehmen gemeinsamen Mittagspausen und den Beistand während schwierigen Phasen dieser Arbeit bedanken.

Für die Einführung in die Welt des FRETs danke ich besonders Prof. Dr. Fred Wouters, Dr. Gertrude Bunt und Dr. Ekatherina Papusheva.

Bei Dr. Klemens Rottner bedanke ich mich für die Bereitstellung von kostbarer Messzeit am FRAP-Mikroskop und bei Prof. Dr. David R. Critchley und Dr. Alexander Gingras für die vorzeitig zur Verfügung gestellten Strukturinformationen von TalinC.

Ausdrücklich möchte ich hiermit auch meinen Eltern für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Meinem geliebten Mann und meinen liebevollen Kindern widme ich diese Arbeit, da ich ohne sie nicht vollkommen wäre.

An Eides statt versichere ich, dass ich die Dissertation persönlich, selbständig und unter Offenlegung der erhaltenen Hilfen angefertigt habe. Diese oder eine ähnliche Arbeit wurde noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Teile der Dissertation wurden auszugsweise veröffentlicht:

Publikationen

Himmel M.*, **Ritter A.***, Rothemund S., Pauling B. V., Rottner K., Gingras A. R., Ziegler W. H.; "Control of high affinity interactions in the talin C terminus: how talin domains coordinate protein dynamics in cell adhesions.", J Biol Chem. 2009 May 15;284(20):13832-42.

*Both authors contributed equally

Gingras A. R., Ziegler W. H., Bobkov A. A., Joyce M. G., Fasci D., Himmel M., Rothemund S., **Ritter A.**, Grossmann J. G., Patel B., Bate N., Goult B. T., Emsley J., Barsukov I. L., Roberts G. C., Liddington R. C., Ginsberg M. H., Critchley D. R.; "Structural determinants of integrin binding to the talin rod." J Biol Chem. 2009 Mar 27;284(13):8866-76.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zell-Matrix-Verbindungen	1
1.2	Zellmigration und Dynamik von Fokalen Adhäsionen	2
1.3	Die Proteine: Integrin, Vinculin und Talin	4
1.3.1	Integrin	4
1.3.2	Vinculin	6
1.3.3	Talin	9
1.4	Zielstellung dieser Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Verwendete Materialien	17
2.1.1	Chemikalien, Kulturmedien, Medienzusätze und Puffer	17
2.1.2	Geräte	18
2.1.3	Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	19
2.1.4	Oligonukleotide, Plasmide und cDNA-Expressionskonstrukte	19
2.1.5	Antikörper	21
2.2	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1	Transformation in <i>E.coli</i> -Zellen	22
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.2.3	Verwendung von Glycerolstocklösungen	24
2.2.4	DNA-Restriktion und Dephosphorylierung von Plasmiden	24
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	24
2.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.2.7	Zielgerichtete Mutagenese und ungerichtete Insertion mit Hilfe eines Transposase-Systems	26
2.2.8	Ligation	27
2.2.9	Klonierung von kurzen Oligonukleotiden (Linker)	28
2.3	Proteinbiochemische Methoden	28

2.3.1	Proteinexpression in <i>E.coli</i>	28
2.3.2	Reinigung von HIS- und GST-markierten Proteinen über Affinitätschromatographie	29
2.3.3	Reinigung von Proteinen über Ionenaustauscherchromatographie	29
2.3.4	Konzentrationsbestimmungen von Proteinen (BCA-Test)	30
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.3.6	Western-Blotting und Immundetektion.....	31
2.3.7	Koimmunpräzipitation (Pull Down)	32
2.3.8	Peptidscan.....	32
2.3.9	Analyse der Dimerbildung	33
2.3.10	Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)	34
2.3.11	Proteolyse-Schutz-Versuch	34
2.3.12	RP-HPLC.....	35
2.3.13	Massenspektrometrie	35
2.4	Zellbiologie	36
2.4.1	Zellkultur.....	36
2.4.2	Transiente Transfektion.....	37
2.4.3	Herstellung von Zellextrakten	38
2.4.4	Immunfluoreszenzfärbung	39
2.5	Mikroskopie	39
2.5.1	Fluoreszenzmikroskopie und Bildbearbeitung	39
2.5.2	FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) – Theorie und Praxis.....	40
2.5.3	Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP).....	44
3	Ergebnisse	47
3.1	Lokalisation von Talinfragmenten in C2C12-Zellen	47
3.2	Biochemische Charakterisierung von TalinC.....	50
3.2.1	TalinC dimerisiert über Helix 62 am Carboxyterminus.....	50
3.2.2	TalinC bindet β -Integrin	52
3.2.3	TalinC und -Fragmente binden Vinculin mit unterschiedlicher Affinität.....	55
3.2.4	Talin VBS H50 Bindung stabilisiert den Vinculinkopf.....	59

3.3	Lokalisation von TalinC-Fragmenten und –Mutanten in C2C12-Zellen.....	62
3.4	Lokalisation von Talin, Talinfragmenten und Mutanten in Vinculin-defizienten Fibroblasten	68
3.5	Dynamiken von Talin, TalinC und TalinC-Fragmenten in Fokalen Adhäsionen.....	72
3.6	Generierung und Charakterisierung von TalinC-Konformationssensoren für FRET- Messungen.....	77
3.6.1	Fluorophor-Insertion in TalinC mittels <i>Tn5</i> -Transposase.....	78
3.6.2	Subzelluläre Lokalisation und Expression der TalinC-Konstrukte mit internen CFP-Positionen	80
3.6.3	Vinculinbindung der TalinC-Konstrukte mit internen CFP-Positionen.....	86
3.6.4	Integrinbindung der TalinC-Konstrukte mit internen CFP-Positionen	87
3.6.5	Dimerisierung der TalinC-Konstrukte mit internen CFP-Positionen.....	88
3.6.6	Unterscheidung zwischen inter- und intramolekularem FRET der TalinC-FRET- Sensoren	89
3.7	Analyse der TalinC-FRET-Sensoren in Vinculin <i>knock-out</i> Zellen.....	99
4	Diskussion	101
4.1	TalinC als Modell für die Regulation von Liganden-bindungsstellen.....	101
4.2	Biochemische Charakterisierung von Liganden-bindungsstellen in TalinC.....	104
4.2.1	TalinC dimerisiert über die C-terminale Helix 62	104
4.2.2	TalinC bindet an die membranproximale Region von β -Integrinen.....	105
4.2.3	TalinC beinhaltet eine kryptische, aktivierbare und eine konstitutiv aktive Bindungsstelle für Vinculin.....	107
4.3	Einfluss der Bindungsstellenaktivität auf die subzelluläre Lokalisation von TalinC111	
4.3.1	Einfluss der Integrinbindung auf die Lokalisation der IBS2-Domäne	112
4.3.2	Einfluss der Aktivität der ABS3 auf die Lokalisation der ABS3/DS-Domäne .	113
4.3.3	Einfluss der Vinculinbindung auf die Lokalisation der TalinC-Domänen.....	116
4.3.4	Wechselseitige Abhängigkeit der Aktivität der TalinC-Domänen IBS2 und ABS3/DS	116
4.4	Analyse von Proteindynamiken von Talin in Fokalen Adhäsionen.....	118
4.4.1	Einfluss der IBS2- und ABS3/DS-Domäne auf die Austausch-rate von TalinC in Fokalen Adhäsionen.....	119

4.4.2	Regulation der Ligandenbindung an die IBS2-Domäne.....	120
4.4.3	Sequentielle Aktivierung von Ligandenbindungsstellen in TalinC.....	121
4.5	Generierung und Etablierung von TalinC-FRET-Konformationssensoren	125
4.5.1	Charakterisierung der TalinC-Konstrukte mit internem CFP.....	125
4.5.2	Unterscheidung von inter- und intramolekularem FRET in TalinC-FRET-Sensoren	128
4.5.3	FRET in TalinC in Abhängigkeit von Vinculin	130
4.6	Ausblick	133
5	Zusammenfassung	137
	Literaturverzeichnis.....	139
Anhang A.	Abkürzungsverzeichnis.....	I
Anhang B.	Abbildungsverzeichnis.....	III
Anhang C.	Tabellenverzeichnis.....	V
Anhang D.	Nuklein- und Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine	VI
Anhang E.	cDNA-Konstrukte	XIX
Anhang F.	Oligonukleotide	XXII
Anhang G.	Vektorkarten	XXVI
Anhang H.	Lokalisation von Talin, Talinfragmenten und Mutanten in Vinculin-defizienten Fibroblasten.....	XXXVI