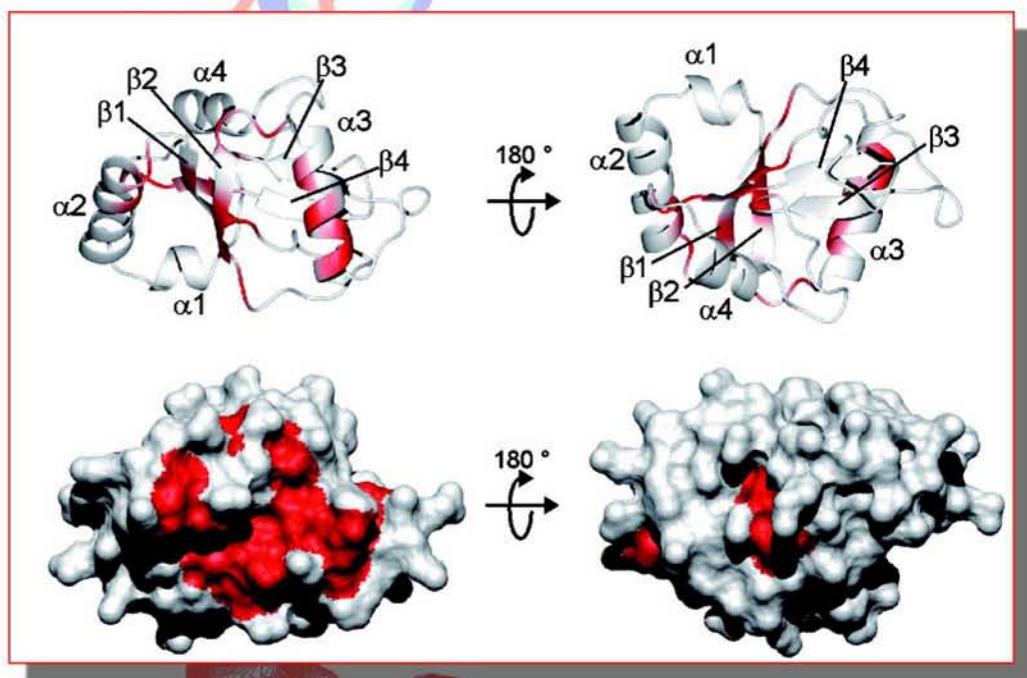




Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen

Jeannine Mohrlüder

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Neurowissenschaften und Biophysik (INB)
Molekulare Biophysik (INB-2)

Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen

Jeannine Mohrlüder

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 3

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-511-1

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.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2008

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 3

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2007)

ISSN 1866-1785
ISBN 978-3-89336-511-1

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der GABA _A -Rezeptor	2
1.2 Das GABA _A -Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP).....	5
1.2.1 Proteincharakterisierung GABARAP.....	5
1.2.2 GABARAP-bindende Proteine	7
1.2.3 GABARAP-homologe Proteine.....	12
1.2.4 Mögliche zelluläre Funktion von GABARAP	14
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	15
2 MATERIALIEN	16
2.1 Antikörper, Enzyme und Proteine.....	16
2.2 Bakterienstämme	16
2.3 Biochemikalien, Chemikalien und Kits	17
2.4 Datenbanken und Internet-Tools zu DNA- und Aminosäuresequenzen sowie Strukturen von Proteinen	18
2.5 Eukaryotische Zellen	18
2.6 Größenmarker	19
2.7 IMAGE-cDNA-Klone.....	19
2.8 Oligonukleotide	20
2.9 Peptide	20
2.10 Phagendisplay-Peptid-Bibliothek	21
2.11 Plasmide	22
2.12 Software	23
2.13 Sonstige Materialien	23

3	METHODEN	24
3.1	Klonierung	24
3.1.1	Kultivierung und Lagerung von E. coli-Stämmen	24
3.1.2	Transformation von E. coli	24
3.1.3	DNS-Isolierung	25
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von DNS	25
3.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
3.1.6	Gelelektrophorese von DNS	27
3.1.7	Enzymatischer Verdau von DNS durch Restriktionsenzyme	28
3.1.8	Präparative Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	28
3.1.9	Dephosphorylierung	28
3.1.10	Ligation von DNS	29
3.1.11	Sequenzierung von DNS	29
3.2	Proteinreinigung	30
3.2.1	GABARAP	30
3.2.2	CRT	34
3.2.3	MAP-LC3b	35
3.3	SDS-PAGE nach Laemmli	36
3.4	Protein-Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektrometer	38
3.5	Circulardichroismus (CD)	38
3.6	Phagendisplay	39
3.7	Anti-Phagen „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)	42
3.8	Anzucht einzelner Phagenklone	43
3.9	Pulldown-Experimente	43
3.10	Fluoreszenzspektroskopie	44
3.10.1	Fluoreszenzmessung von GABARAP mit fN1-, fN2- und fN3-Peptid	45
3.10.2	Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) aus den Fluoreszenzdaten	46
3.11	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	47
3.11.1	Aminkopplung von GABARAP oder MAP-LC3	50
3.11.2	Bindungsstudie GABARAP an N1-Peptid, CRT (178-188) und CHC (510-522)	50
3.11.3	Bindungsstudie GABARAP an CRT	51
3.11.4	Bindungsstudie MAP-LC3 an CRT	51
3.11.5	Datenprozessierung	51
3.12	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)	53
3.12.1	Probenvorbereitung für die NMR-Messung	54
3.12.2	NMR-Messbedingungen und Spektrenauswertung	54

4	ERGEBNISSE	55
4.1	Identifizierung von GABARAP-bindenden Peptiden und Charakterisierung der Interaktion.....	55
4.1.1	Expression und Reinigung GABARAP	55
4.1.2	Phagendisplay-Selektion.....	57
4.1.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	57
4.1.4	Bestimmung der Bindungsaffinität der über Phagendisplay selektierten Peptide an GABARAP	61
4.1.5	Strukturelle Charakterisierung der Bindung von N1-Peptid an GABARAP mit NMR-Spektroskopie.....	64
4.2	Motiverstellung und Datenbanksuche zur Identifizierung von physiologischen GABARAP-bindenden Proteinen	67
4.2.1	Erstellung eines Konsensusmotivs aus den Phagen Display-selektierten Peptidsequenzen	67
4.2.2	Datenbanksuche nach physiologischen GABARAP-bindenden Proteinen mit Hilfe des generierten Konsensusmotivs	70
4.3	Charakterisierung der GABARAP-CRT Interaktion.....	73
4.3.1	Bestimmung der Bindungsaffinität von GABARAP und CRT über Oberflächenplasmonenresonanz Messung	73
4.3.2	Klonierung, Expression und Reinigung von humanem CRT.....	74
4.3.3	Konformationelle Untersuchung von CRT mit Circular-Dichroismus (CD) Spektroskopie	76
4.3.4	NMR-Spektroskopische Untersuchungen der GABARAP-CRT-Interaktion.....	78
4.3.5	Untersuchung der GABARAP-CRT-Bindung im Pulldown Experiment.....	80
4.3.6	Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der CRT-GABARAP-Bindung mit Oberflächenplasmonenresonanz	82
4.3.7	Bestimmung der Bindungsaffinität von CRT(178-188) an GABARAP	83
4.3.8	Strukturelle Untersuchung der GABARAP-CRT (178-188) Bindung	84
4.4	Untersuchung der Wechselwirkung von MAP-LC3b mit CRT.....	87
4.4.1	Klonierung, Expression und Reinigung von MAP-LC3b	87
4.4.2	Strukturelle Untersuchung von MAP-LC3b	90
4.4.3	Untersuchung der Bindung von CRT an MAP-LC3b.....	91
4.4.4	Untersuchung der Bindung von CRT (178-188) an MAP-LC3b	92
4.5	Charakterisierung der GABARAP-Clathrin-Interaktion.....	94
4.5.1	Untersuchung der Bindung von endogenem CHC und rekombinantem GABARAP	94
4.5.2	Kompetition von endogenem CHC und rekombinantem CRT um die Bindung an rekombinantes GABARAP.....	95
4.5.3	Strukturelle Untersuchung der Bindung von CHC (510-522) an GABARAP	95

5	DISKUSSION	99
5.1	Expression und Reinigung von GABARAP	100
5.1.1	Die Expression und Reinigung von GABARAP verliefen erfolgreich	100
5.2	Identifikation von GABARAP-bindenden Peptiden und Untersuchung der Interaktion	100
5.2.1	Bei der Phagendisplay-Selektion gegen GST-GABARAP wurden GABARAP-bindende Peptide selektiert	100
5.2.2	Die synthetischen Peptide fN1, fN2, fN3 und N1 interagieren mit GABARAP	102
5.2.3	Kartierung der N1-Bindestelle von GABARAP	103
5.3	Identifizierung von physiologischen GABARAP-bindenden Proteinen mit Hilfe der Phagendisplay-selektierten Peptidsequenzen	106
5.3.1	Generierung von Konsensusmotiven anhand der Phagendisplay-selektierten Peptidsequenzen	106
5.3.2	Die Datenbanksuche mit Hilfe der erstellen Konsensusmotive identifizierte Calretikulin und Clathrin als physiologische, potentiell GABARAP-bindende Proteine	107
5.4	Klonierung, Expression und Reinigung von CRT	109
5.4.1	Die Klonierung, Expression und Reinigung von CRT verliefen erfolgreich	109
5.5	CRT interagiert mit GABARAP	110
5.5.1	CRT bindet direkt und hochaffin an GABARAP	110
5.5.2	Rekombinantes CRT bindet an endogenes GABARAP	112
5.5.3	Rekombinantes GABARAP bindet an endogenes CRT	112
5.5.4	CRT bindet an nativ gefaltetes GABARAP und kann durch N1-Peptid von GABARAP verdrängt werden	113
5.5.5	Die GABARAP-CRT Interaktion ist nicht kalziumabhängig	113
5.5.6	CRT (178-188) bindet direkt an GABARAP	114
5.5.7	Kartierung der CRT (178-188)-Bindestelle von GABARAP	116
5.5.8	Mögliche Relevanz der GABARAP-CRT Interaktion	118
5.6	Untersuchung der MAP-LC3b – CRT Interaktion	121
5.6.1	Die Klonierung, Expression und Reinigung von MAP-LC3b verliefen erfolgreich	121
5.6.2	CRT bindet nicht an MAP-LC3b	121
5.6.3	CRT (178-188) bindet nicht an MAP-LC3b	122
5.7	CHC interagiert mit GABARAP	123
5.7.1	Rekombinantes GABARAP bindet an endogenes CHC	123
5.7.2	Die GABARAP- CHC Bindung lässt sich im Pulldown-Experiment durch CRT kompetieren	123
5.7.3	Kartierung der CHC (510-522)-Bindestelle von GABARAP	124
5.7.4	Mögliche Relevanz der GABARAP-CHC Interaktion	128
5.7.5	Funktionale Zusammenhänge der beiden GABARAP-bindenden Proteine CRT und CHC	131
5.8	Tryptophan als Bindungsdeterminante für die Interaktion eines Liganden zu GABARAP	132

5.9	Zusammenfassung	134
5.10	Summary	135
5.11	Ausblick	136
6	LITERATUR	138
7	ANHANG	148
7.1	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	148
7.2	Abbildungsverzeichnis	153
7.3	Tabellenverzeichnis	156
7.4	(¹ H- ¹⁵ N)-HSQC Spektrum von MAP-LC3 (Kouno et al. 2004)	157
7.5	Danksagung	158

1 Einleitung

An neuromuskulären und neuronalen Synapsen erfolgt die Signalübertragung durch eine Abfolge aus elektrischen und chemischen Signalen. Die chemischen Signale werden dabei durch molekulare Botenstoffe, so genannte Neurotransmitter, vermittelt. Werden diese an der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt entlassen, binden sie an Rezeptoren in der postsynaptischen Membran, zum Beispiel an liganden-gesteuerte Ionenkanäle. Die Bindung eines Liganden an einen liganden-gesteuerten Ionenkanal bewirkt eine konformationelle Änderung des Rezeptors, so dass sich der Ionenkanal öffnet und ein selektiver Ionenfluss stattfindet. Es resultiert ein verändertes Membranpotential der postsynaptischen Membran. Somit wird das chemische Neurotransmittersignal in ein elektrisches Signal umgewandelt und dieses entlang der postsynaptischen Membran weitergeleitet. Man unterscheidet erregende und inhibitorische Neurotransmissionen, die jeweils von spezifischen Neurotransmittern und deren Rezeptoren vermittelt werden. Bedeutende Vertreter von liganden-gesteuerten Ionenkanälen für erregende Neurotransmission an neuromuskulären bzw. neuronalen Synapsen sind der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor und der Glutamat-Rezeptor. Der Glycin-Rezeptor und der Rezeptor für γ -Aminobuttersäure vom Typ A (GABA_A-Rezeptor) sind wichtige Beispiele von liganden-gesteuerten Ionenkanälen für inhibitorische Neurotransmission im Gehirn und im Rückenmark. Liganden-gesteuerte Ionenkanäle und Mechanismen zu deren Modulierung und Regulation sind von zentraler Bedeutung bei der neuronalen und neuromuskulären Signaltransduktion und daher bedeutende Ziele der pharmakologischen Wirkstoffsuche.

1.1 Der GABA_A-Rezeptor

Der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der Ligand des γ -Aminobuttersäure Rezeptors vom Typ A (GABA_A-Rezeptor) und vermittelt schnelle, inhibitorische Neurotransmission im Gehirn und im Rückenmark. Der GABA_A-Rezeptor ist ein Chloridionenkanal und gehört zur Cys-*Loop* Superfamilie, die eine Hauptgruppe der Rezeptor-gekoppelten Ionenkanäle darstellt. Rezeptoren der Cys-*Loop* Superfamilie weisen fünf Untereinheiten auf, die jeweils eine charakteristische Sequenz von 13 Aminosäuren im extrazellulären Sequenzabschnitt beinhalten. Diese ist von zwei Cysteinen umgeben, die kovalent miteinander verbunden sind und so zu der Bildung einer geschlossenen *Loop*-Struktur beitragen (Sine and Engel 2006). Die Rezeptoruntereinheiten innerhalb dieser Superfamilie weisen eine gemeinsame Membrantopologie auf, die eine große extrazelluläre aminoterminal Domäne, vier durch *Loops* getrennte Transmembransegmente (TM1-4), sowie einen extrazellulären Carboxyterminus beinhaltet (Abb. 1.1, A). Der zwischen TM3 und TM4 befindliche intrazelluläre *Loop* (TM3/TM4-*Loop*) ist Ziel verschiedener Kinasen und potentieller Interaktionsbereich, welcher bei der Rezeptorverankerung und/oder dem Rezeptortransport eine Rolle spielen könnte (Macdonald and Olsen 1994; Moss and Smart 2001). Dieser Bereich besitzt gleichzeitig die größte Sequenzdiversität zwischen den Rezeptoruntereinheiten (Moss and Smart 2001). Im Rezeptor lagern sich die Transmembransegmente der einzelnen Untereinheiten so zusammen, dass die Segmente 2 (TM2) die Wand des Ionenkanals bilden. Die anderen Transmembransegmente ordnen sich um diesen zentralen Ionenkanal herum an (Abb.1.1, B).

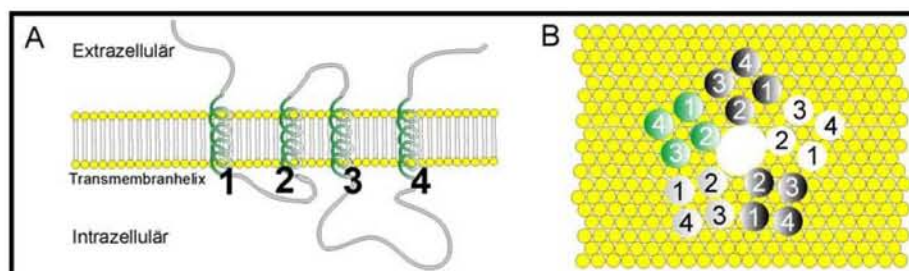


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Membrantopologie der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten und deren Assemblierung im Rezeptor. A: Alle Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors weisen eine gemeinsame Membrantopologie auf, wobei ein extrazellulärer amino- und carboxyterminaler Teil, vier Transmembranhelices (TM1-4) und zwei zytoplasmatische *Loops* (TM1/2 *Loop* und TM3/4 *Loop*) vorhanden sind. B: Im Rezeptor lagern sich die Transmembransegmente 2 (TM2) der einzelnen Untereinheiten so zusammen, dass sie die Wand des Ionenkanals bilden.

Die Untereinheiten des heteropentameren GABA_A-Rezeptors lassen sich sieben Familien (α , β , γ , δ , ϵ , θ und π) mit verschiedenen Isoformen (z.B. $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\gamma 1$ - $\gamma 4$) zuordnen (Barnes 2001; Whiting 1999). Dabei sind verschiedene *Splicing*-Varianten einiger Isoformen zu beobachten, z.B. $\gamma 2S$ und $\gamma 2L$. Diese beachtliche Diversität kann sowohl wichtig für die subzelluläre Lokalisierung (Kneussel 2002), also auch für die Funktion (Moss and Smart 2001) des Rezeptors sein.

Die verbreitetsten Rezeptor-Subtypen sind aus $\alpha 1$ -, $\beta 2$ - oder $\beta 3$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten zusammengesetzt (De Blas 1996). Funktionelle GABA-gesteuerte Ionenkanäle können bereits durch Koexpression der α - und β -Untereinheiten erreicht werden (Angelotti and Macdonald 1993). Die Anwesenheit der γ -Untereinheit ist hingegen notwendig für die Rezeptormodulation durch Benzodiazepine (Pritchett et al. 1989).

Regulationsmechanismen, die die Anzahl von Neurotransmitter-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran beeinflussen, sind von grundlegender Bedeutung für funktionelle Neurotransmission (Barnes 2001). Es handelt sich dabei um dynamische und modulierte Prozesse, die die Synthese, Assemblierung und Transportmechanismen des Rezeptors zu und von der postsynaptischen Membran weg umfassen. Nach der Synthese und Assemblierung der Rezeptoren im ER werden diese über den Golgi-Apparat in sekretorischen Vesikeln an die Zellmembran transportiert. Bei diesem Vorgang ist ein selektiver Transport von einzelnen Rezeptor Subtypen an bestimmte Synapsen denkbar. Durch konstitutive Endozytose werden Neurotransmitter Rezeptoren von der Zellmembran zu den Endosomen transportiert und von dort entweder zur Wiederverwertung an die Zelloberfläche zurücktransportiert oder abgebaut. Diese Vorgänge sind für den GABA_A-Rezeptor schematisch in Abbildung 1.2 zusammengefasst. Sie sind für die Konstruktion, funktionelle Aufrechterhaltung und Modulation von GABAergen Synapsen notwendig und werden auch als intrazelluläres *Trafficking* bezeichnet (Barnes 2001). Des Weiteren hat das Ansammeln diffus verteilter GABA_A-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran in so genannte *Cluster* einen großen Einfluss auf die Funktionalität GABAerger Synapsen. So unterscheiden sich Rezeptorkinetik und Bindungsaffinität für GABA bei diffus verteilten und in *Clustern* angehäuften GABA_A-Rezeptoren (Chen et al. 2000). Durch Verankerung der GABA_A-Rezeptoren am Zytoskelett werden die Rezeptor-*Cluster* stabilisiert (Meyer et al. 2000). Dabei ist die $\gamma 2$ -Untereinheit ein für das *Clustering* und die synaptische Lokalisation notwendiger Bestandteil des GABA_A-Rezeptors (Essrich et al. 1998).

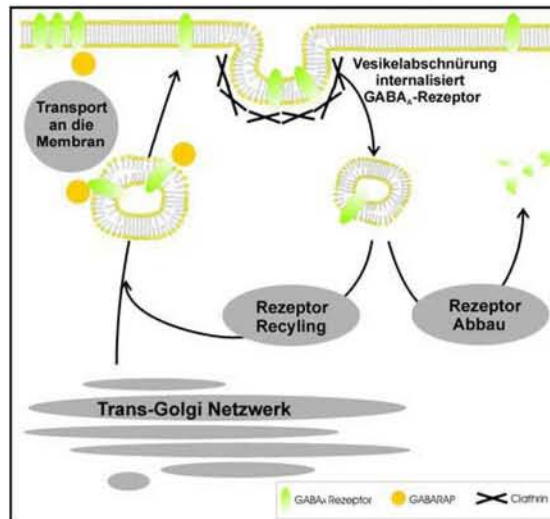


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der zellulären GABA_A-Rezeptor Transportwege. Nach der Rezeptorsynthese und Assemblierung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird der GABA_A-Rezeptor (grün) via Golgi-Apparat in sekretorischen Vesikeln an die postsynaptische Membran transportiert, wo er diffus verteilt oder in *Clustern* zusammengelagert vorliegen kann. Der Rezeptor wird in *Clathrin-gecoateten* Vesikeln internalisiert und entweder in einem Wiederverwertungsprozess zurück an die Membran transportiert oder degradiert. GABARAP (gelb) bindet an den GABA_A-Rezeptor und ist an dessen Transportmechanismen beteiligt.

1.2 Das GABA_A-Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP)

1.2.1 Proteincharakterisierung GABARAP

GABARAP ist ein 14 kDa umfassendes Protein, dessen genaue Funktion bisher nicht bekannt ist. Es wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert, wobei sich die subzelluläre Lokalisierung auf das Zytosol beschränkt. GABARAP wird dabei vornehmlich an membranösen Strukturen nachgewiesen (Coyle et al. 2002; Kittler et al. 2001).

GABARAP lässt sich nach einer sequenzbasierten Proteinklassifizierung der Superfamilie der Ubiquitin-*like* und zu der Familie der *Mikrotubuli-associated protein light chain 3-like* (MAP-LC3-*like*) Proteine zuordnen. Diese umfasst neben GABARAP sieben weitere homologe Proteine, deren Sequenzidentität zu GABARAP zwischen 30 und 87% liegen: Atg8, GABARAPL1, GABARAPL2, GABARAPL3, MAP-LC3A, MAP-LC3B und MAP-LC3C. Diese werden in Kapitel 1.2.3 im Detail vorgestellt.

Strukturelle Untersuchungen von GABARAP (Bavro et al. 2002; Coyle et al. 2002; Knight et al. 2002; Stangler et al. 2002) und homologen Proteinen (Kouno et al. 2005; Paz et al. 2000; Sugawara et al. 2004) wiesen eine Ubiquitin-ähnliche Faltung mit zwei zusätzlichen, aminoterminalen α -Helices auf, die im Rahmen einer strukturbasierten Proteinklassifizierung die GABARAP-*like* Proteinfamilie von anderen Proteinen der Ubiquitin-*like* Superfamilie unterscheiden (Abb. 1.3).

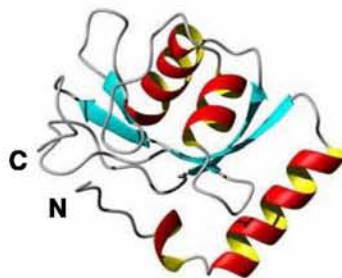


Abbildung 1.3: Ribbondarstellung der Lösungsstruktur des humanen GABARAP-Proteins (Stangler et al. 2002).

Vorhandene Sekundärstrukturelemente sind farblich hervorgehoben (α -Helix: rot/gelb; β -Faltblatt: türkis) und Amino- und Carboxyterminus beschriftet.

Neben der strukturellen Ähnlichkeit zu Ubiquitin, besteht auch eine funktionelle Gemeinsamkeit. GABARAP wird in einem Ubiquitylierungs-ähnlichen Protein-Konjugationssystem modifiziert. Ubiquitin formt in einem drei-Schritt-Mechanismus ein Konjugat mit seinem Zielprotein. Es wird zunächst an seinem carboxyterminalen Glycin durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym

(*Ubiquitin-activating Enzyme*, E1-Enzym) aktiviert und bildet via Thioester-Bindung ein Konjugat mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums des E1-Enzyms. Aktiviertes Ubiquitin wird anschließend zu einem E2-Enzym transferiert und letztlich mit einem Lysinrest des Zielproteins mittels Isopeptidbindung verbunden. Dieser Schritt wird durch ein Enzym der Ubiquitin-Protein-Ligase-Familie, einem E3-Enzym, katalysiert.

Analog dazu wird GABARAP durch die Cysteinprotease Atg4 prozessiert, so dass der carboxyterminale Arginin-Aminosäurerest abgespalten wird (Tanida et al. 2004) und das resultierende Protein carboxyterminal ein Glycinrest aufweist. Das verkürzte GABARAP wird anschließend durch Atg7 aktiviert, welches einem Ubiquitin-aktivierenden E1-Enzym entspricht (Tanida et al. 1999). Es folgt ein Transfer des aktivierten GABARAPs zu Atg3, welches einem Ubiquitin-E2-Enzym entspricht (Tanida et al. 2002). Diese Prozesse sind für eine carboxyterminale Lipidierung durch Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin und damit für die Verankerung von GABARAP in der Membran notwendig (Sou et al. 2006) (Abb. 1.4). Es wurde gezeigt, dass die carboxyterminale Prozessierung von GABARAP notwendig für GABARAP-vermittelte Transportvorgänge des GABA_A-Rezeptors ist (Chen and Olsen 2007).

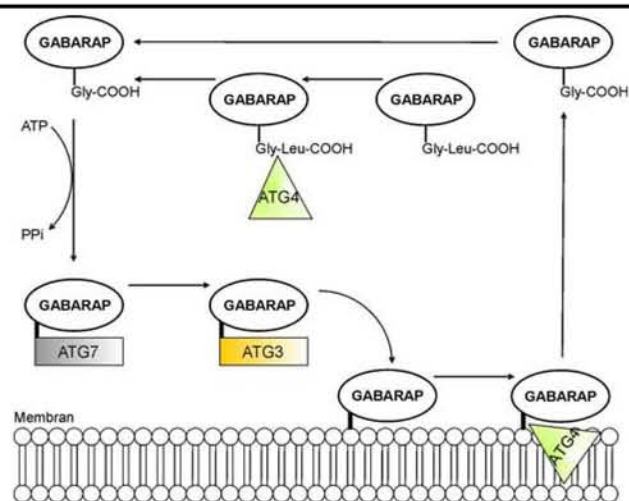


Abbildung 1.4: Ubiquitinierungs-ähnliche Prozessierung von GABARAP. Zunächst wird GABARAP durch die Cysteinprotease Atg4 (grün) prozessiert, wodurch carboxyterminal ein Glycinrest freigelegt wird. Anschließend erfolgen die Aktivierung von GABARAP durch Atg7 (E1) (grau) unter ATP-Verbrauch und der Transfer zu Atg3 (E2) (gelb). GABARAP wird als Phospholipid-Konjugat mit Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin in der Membran verankert und kann durch Atg4 wieder von dieser abgelöst werden. Diese Vorgänge werden am Beispiel der GABARAP Prozessierung demonstriert, gelten jedoch analog für die GABARAP-homologen Proteine GATE-16, MAP-1C3 und Atg8. Abbildung editiert aus Marino et al. (Marino and Lopez-Otin 2004).

1.2.2 GABARAP-bindende Proteine

1.2.2.1 GABA_A-Rezeptor

Via *Yeast-Two-Hybrid*-System wurde ein Klon des für GABARAP(36-117) kodierenden Gens identifiziert, welches mit dem intrazellulären TM3/TM4-*Loop* der γ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors interagiert (Wang et al. 1999). Die Interaktion von GABARAP(1-117) mit GABA_A-Rezeptor wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (Nyman-Andersen et al. 2002; Wang et al. 1999). Allerdings konnte GABARAP nicht an GABAergen Synapsen lokalisiert werden (Kneussel et al. 2000). GABARAP fördert das Rezeptor *Clustering* und moduliert die Kinetik und Leitfähigkeit des Ionenkanals (Chen et al. 2000; Luu et al. 2006). In Neuronen konnte ein funktioneller Effekt von GABARAP auf das *Trafficking* des GABA_A-Rezeptors gezeigt werden (Leil et al. 2004). Durch quantitative *Yeast-Two-Hybrid* Analyse wurden 23 Aminosäuren der γ 2L-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, γ 2L(389-411), als für maximale Interaktion notwendig und 18 Aminosäuren, γ 2L(394-411), als für die Interaktion noch ausreichend identifiziert (Nyman-Andersen et al. 2002; Wang et al. 1999). Im Rahmen von Fluoreszenztitrations-Experimenten konnte neben der Interaktion des synthetischen Peptids γ 2L(394-411) auch für verkürzte Peptidsequenzen der γ 2-Untereinheit, γ 2L(394-406) und γ 2L(396-406), eine Bindungsaffinität zu GABARAP im mikromolaren Bereich ermittelt werden (Coyle et al. 2002).

1.2.2.2 Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)

NSF spielt eine Rolle bei verschiedensten Vesikeltransportvorgängen, wie z.B. beim Transport der AMPA-Typ Glutamat- und β -adrenergen Rezeptoren (McDonald et al. 1999; Nishimune et al. 1998; Song et al. 1998) und interagiert direkt mit der β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Goto et al. 2005). Bei Vorgängen des Vesikeltransports ist die Membranfusion von Vesikel- und Zielmembran von grundlegender Bedeutung, bei der die Interaktion von so genannten SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor* [NSF]-*attachment protein receptor*)-Proteinen notwendig ist. Es wird je nach Lokalisierung zwischen v-SNAREs (Vesikelmembran) und t-SNAREs (Zielmembran) unterschieden. Nach der Bildung eines v-SNARE-t-SNARE Komplexes bindet dieser NSF und SNAP (*soluble NSF-attachment protein*), welche den Komplex unter ATP-Hydrolyse dissoziieren (Brunger 2001; Sollner et al. 1993). NSF kolokalisiert mit GABARAP an intrazellulären Membranstrukturen in Neuronen und bindet direkt an GABARAP (Kittler et al. 2001).

1.2.2.3 Tubulin

GABARAP interagiert mit der löslichen und der polymerisierten Form von Tubulin und assoziiert mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten (Wang and Olsen 2000), deren Ausbildung und Bündelung es fördert. Die Interaktion findet über den Aminoterminus von GABARAP statt (Coyle et al. 2002). α - und β -Tubulin sind molekulare Bausteine von Mikrotubuli, röhrenförmige Strukturen der Zelle, die mit ca. 20-28 nm den größten Durchmesser aller Komponenten des Zytoskeletts haben. Es kann daher spekuliert werden, dass GABARAP als *Linker* zwischen dem Zellzytoskelett und GABA_A-Rezeptoren fungieren könnte (Coyle and Nikolov 2003).

1.2.2.4 *Unc-51-like kinase* (ULK1)

Das GABARAP-assoziierte Protein ULK1 ist eine neuronale Serin/Threonin-spezifische Kinase, die im Zusammenhang mit neuronalem Wachstum steht. In diesem Kontext wird über einen Zusammenhang von vesikulärem GABA_A-Rezeptor Transport und axonaler Elongation spekuliert (Okazaki et al. 2000). Chan et al. identifizierten ULK1 als Modulator von Autophagozytose (Chan et al. 2007). Dies ist ein kontrollierter Selbstverdauungsprozess, welcher in Hunger- oder Stresssituationen aktiviert wird. Dabei werden Zytoplasma und Organellen in Vesikeln, so genannten Autophagosomen, nicht-selektiv zu den Lysosomen oder Vakuolen transportiert und dort abgebaut oder wiederverwertet (Klionsky and Emr 2000).

1.2.2.5 Gephyrin

Des Weiteren wurde die Interaktion von GABARAP zu dem Tubulin-bindenden Protein Gephyrin nachgewiesen. Dieses verankert inhibitorische Glycinrezeptoren am Zytoskelett in synaptischen *Clustern*. Obwohl die direkte Interaktion von Gephyrin mit dem GABA_A-Rezeptor nicht nachgewiesen werden konnte, so spielt es dennoch eine wichtige Rolle beim *Clustering* von GABA_A-Rezeptoren mit der $\gamma 2$ -Untereinheit (Kneussel et al. 2000). In $\gamma 2$ -*knockout* Mäusen gehen synaptische *Cluster* Gephyrins parallel zu denen von GABA_A-Rezeptoren verloren. Es wird daher spekuliert, dass GABA_A-Rezeptor *Cluster* mit $\gamma 2$ -Untereinheit von einem Gephyrin-Gerüst zusammengehalten werden könnten (Coyle and Nikolov 2003). Eine mögliche *Linker*-Funktion von GABARAP für die Interaktion von GABA_A-Rezeptor und Gephyrin wurde bisher nicht experimentell bestätigt.

1.2.2.6 PRIP

PRIP ist ebenfalls ein GABARAP-bindendes Protein (Harada et al. 2005; Kanematsu et al. 2002), welches zunächst unter dem Namen p130 bekannt war. Aufgrund einer Domäne, die dem Aufbau der Phospholipase C- $\delta 1$ ähnelt, ohne jedoch deren Phospholipaseaktivität zu besitzen, wurde p130 später in „phospholipase C-related inactive protein“ (PRIP) umbenannt. PRIP bindet Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP3), ein zentrales Molekül eines Ca^{2+} -vermittelten *second messenger*-Systems der Zelle. Es wird vermutet, dass es IP3 gegen die ansonsten schnell stattfindende Hydrolyse schützt und so in die IP3-vermittelte Ca^{2+} -Signalvermittlung involviert

ist. PRIP bindet außerdem die β - und γ 2-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Chen and Olsen 2007; Kanematsu et al. 2002; Mizokami et al. 2007) und inhibiert die Bindung der γ 2-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors an GABARAP kompetitiv. Die überwiegend intrazelluläre Lokalisation von PRIP und die Kolokalisation mit GABARAP lassen darauf schließen, dass PRIP in die GABA_A-Rezeptorassembly und/oder Rezeptortransportvorgänge involviert sein könnte (Coyle and Nikolov 2003; Kanematsu et al. 2002).

1.2.2.7 Transferrin-Rezeptor

GABARAP interagiert des Weiteren mit dem Transferrin Rezeptor (TfR), einem integralen Membranprotein, welches die Internalisierung von Eisen-beladenem Transferrin vermittelt. Green et al. zeigten, dass das zytoplasmatische TfR Internalisierungsmotiv YXX Φ (wobei X jede beliebige Aminosäurerest und Φ ein (bulky) Aminosäurerest mit hydrophober Seitenkette darstellt) für diese Interaktion wichtig ist. Sie konnten GABARAP nicht an der Zellmembran von HeLa-Zellen nachweisen und eine Überexpression von GABARAP zeigte keinen Einfluss auf die TfR Endozytoserate in HeLa-Zellen. Green et al. schlussfolgerten daher, dass GABARAP eine universellere Transportfunktion haben muss (Green et al. 2002).

1.2.2.8 *Glutamate receptor interacting protein 1 (GRIP1)*

GABARAP assoziiert weiterhin mit dem Protein GRIP1. Dieses bindet an die GluR2 Untereinheit von Glutamat Rezeptoren und ist an Transportvorgängen und dem Rezeptor-*Clustering* von Glutamat Rezeptoren beteiligt. GABARAP interagiert dabei mit den PDZ-Domänen 4 bis 6 von GRIP1. Aufgrund der Kolokalisation beider Proteine kann über eine Rolle von GRIP1 im Zusammenhang mit inhibitorischen Synapsen spekuliert werden (Kittler et al. 2004).

1.2.2.9 DEAD box Polypeptid 47 (DDX 47)

Die RNA-Helikase DDX 47 (DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp/His) box Polypeptid 47) ist ebenfalls ein GABARAP-bindendes Protein. Bei Kotretransfektion von GABARAP und DDX 47 cDNA in Tumorzellen wird Apoptose induziert, was den ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von GABARAP an apoptotischen Prozessen darstellt (Lee et al. 2005).

1.2.2.10 *Ras-related protein* RAB 24

Basierend auf Yeast-Two Hybrid Experimenten identifizierten Wu et al. kürzlich das humane Protein RAB 24 als GABARAP-Interaktionspartner (Wu et al. 2006). RAB 24 assoziiert mit Autophagosomen in Zellen unter Hungerstress. Des Weiteren konnte die Kolokalisation von RAB 24 mit dem Autophagosomen-Markerprotein MAP-LC3 nachgewiesen werden (Munafò 2002). Über eine Beteiligung von RAB 24 bei der Autophagozytose und anderen zellulären Transportmechanismen wird spekuliert (Maltese et al. 2002).

Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht aller bekannten GABARAP-bindenden Proteine.

Tabelle 1.1: Bindungspartner von GABARAP, Tabelle editiert aus (Coyle and Nikolov 2003).

GABARAP Interaktionspartner	Quellenangabe	Mögliche Funktion der Interaktion
γ -Untereinheit des GABA _A -Rezeptors	(Wang et al. 1999)	GABA _A -Rezeptor <i>Trafficking</i> und <i>Clustering</i>
NSF	(Kittler et al. 2001)	Vesikeltransportvorgänge
Tubulin	(Wang and Olsen 2000)	Transport des GABA _A -Rezeptors entlang von Mikrotubuli
ULK1	(Okazaki et al. 2000)	Vesikeltransportvorgänge und axonale Elongation, Autophagozytose
Gephyrin	(Kneussel et al. 2000)	<i>Clustering</i> von Neurotransmitter Rezeptoren an der Synapse
PRIP	(Kanematsu et al. 2002)	Assemblierung und Transport von GABA _A -Rezeptoren
Transferrin Rezeptor	(Green et al. 2002)	Transport des Transferrin Rezeptors
GRIP1	(Kittler et al. 2004)	ungeklärt
DDX47	(Lee et al. 2005)	Apoptose
RAB 24	(Wu et al. 2006)	Autophagozytose

1.2.3 GABARAP-homologe Proteine

Atg8 (auch als Apg8/Aut7/Cvt5 bezeichnet) ist ein GABARAP-orthologes Protein aus Hefe, welches 55% Sequenzidentität zu GABARAP aufweist.

Humane GABARAP-homologe Proteine sind Teil der MAP-LC3 Familie, deren Mitglieder eine größere Diversität aufweisen. Neben GABARAP beinhaltet diese Familie die GABARAP-homologen Proteine GABARAPL1 (GEC1, Sequenzidentität 87 %) (Vernier-Magnin et al. 2001), GABARAPL2 (GATE-16, 57%) (Sagiv et al. 2000), GABARAPL3 (82%), und die leichten Ketten (LC) der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) MAP-LC3A (30%), MAP-LC3B (31%) und MAP-LC3C (38%). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind evolutiv in allen eukaryotischen Zellen konserviert, was auf eine wichtige Funktion dieser Proteine in Säugerzellen schließen lässt. Die hohe Sequenzidentität zwischen den GABARAP-artigen Proteinen und der fehlende „GABARAP-*knock-out*-Maus-Phänotyp“ (O'Sullivan et al. 2005) lassen vermuten, dass sich die Mitglieder der MAP-LC3 Proteinfamilie untereinander funktionell ersetzen können.

1.2.3.1 Atg8

Atg8 weist 55% Sequenzidentität zu GABARAP auf und ist bisher das einzige bekannte GABARAP-orthologe Hefeprotein. Atg8 ist in die Autophagozytose involviert (Kirisako et al. 1999). Analog zu GABARAP wird Atg8 in einem ubiquitinylierungs ähnlichen Protein-Konjugationssystem an Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin gekoppelt (Abb. 1.4). Dieser Prozess ist für die Verankerung von Atg8 in der Membran notwendig (Ichimura et al. 2000) und ist essentiell für die Funktionalität der Autophagozytose (Kirisako et al. 2000; Nakatogawa et al. 2007).

1.2.3.2 GEC1/GABARAPL1

GEC1/GABARAPL1 besitzt mit 87% Sequenzidentität die größte Ähnlichkeit zu GABARAP innerhalb der MAP-LC3 Proteinfamilie. Ebenso wie GABARAP bindet es Tubulin, NSF und interagiert mit dem GABA_A-Rezeptor (Chen et al. 2006; Mansuy et al. 2004). Es wird über eine mögliche Funktion von GEC1/GABARAPL1 als potentieller Linker zwischen dem GABA_A-Rezeptor und dem Zytoskelett diskutiert (Mansuy et al. 2004). Die Bindung von GEC1 an den K-Opioid Rezeptor wurde kürzlich identifiziert (Chen et al. 2006).

1.2.3.3 GATE-16/GABARAPL2

GATE-16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*) weist 75 % Sequenzähnlichkeit zu GABARAP auf und spielt eine Rolle bei Vesikeltransportvorgängen des intra-Golgi-Transportes. GATE-16 assoziiert mit NSF (Kap. 1.2.2.2) unter Verstärkung von dessen ATPase-Aktivität. Es interagiert NSF-abhängig mit dem Golgi v-SNARE GOS-28 (Legesse-Miller et al. 1998; Paz et al. 2000; Sagiv et al. 2000). GATE-16 bindet des Weiteren an die GABARAP-assoziierte Unk-51-~~like~~ Kinase (ULK1) (Okazaki et al. 2000). Analog zu GABARAP findet auch bei GATE-16 eine Kopplung an Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin statt, die durch ein Ubiquitylierungs-ähnliches Protein-Konjugationssystem vermittelt wird (Tanida et al. 2003) (Abb. 1.4).

1.2.3.4 *Microtubule-associated protein – light chain 3*/MAP-LC3

Analog zu GABARAP bindet auch MAP-LC3 an Mikrotubuli (Mann and Hammarback 1994). Des Weiteren konnte die Bindung an AU-reiche Sequenzen der 3'-UTR der Fibronectin-mRNA nachgewiesen werden (Zhou et al. 1997). MAP-LC3 wurde als Autophagosomen-Markerprotein definiert (Mizushima 2004; Yoshimori 2004). Ebenso wie GABARAP wird auch MAP-LC3 in einem Ubiquitylierungs-ähnlichen Protein-Konjugationssystem an Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylserin gekoppelt (Sou et al. 2006).

1.2.4 Mögliche zelluläre Funktion von GABARAP

Die Homologie von GABARAP zu Atg8, MAP-LC3 und GATE-16, die Interaktion mit NSF, PRIP und ULK1, sowie die Beobachtung, dass GABARAP vornehmlich mit Membranen von intrazellulären Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes und der subsynaptischen Cisternae assoziiert ist (Kittler et al. 2001), lassen klar auf eine Rolle von GABARAP in Vesikeltransportmechanismen schließen, wie z.B. bei Transportvorgängen des GABA_A-Rezeptors. Die selektive Interaktion ausschließlich mit γ -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors (Nymann-Andersen et al. 2002) könnte die Grundlage bei Sortierungsvorgängen von speziellen Rezeptorsubtypen an bestimmte GABAerge Synapsen sein. Die GABARAP-GABA_A-Rezeptor-Interaktion beeinflusst das *Clustering* von GABA_A-Rezeptoren und die Kinetik des Ionenkanals (Chen et al. 2000). Ein funktioneller Effekt von GABARAP auf Transportvorgänge des GABA_A-Rezeptors konnte in Neuronen nachgewiesen werden (Leil et al. 2004), obwohl GABARAP kein integraler Bestandteil GABAerger Synapsen zu sein scheint (Kittler et al. 2001; Kneussel et al. 2000).

Darüber hinaus kann über GABARAP-Funktionen spekuliert werden, die nicht ausschließlich im Zusammenhang mit Transportvorgängen des GABA_A-Rezeptors stehen (Coyle and Nikolov 2003). Zum Beispiel wird über die mögliche Funktion von GABARAP als Signal diskutiert, welches Proteine kennzeichnet, die zur inhibitorischen Synapse hin oder von dieser weg transportiert werden sollen (Kittler et al. 2004). Die Expression von GABARAP in verschiedensten, auch nicht-neuronalen, Geweben (Nemos et al. 2003) lässt außerdem darauf schließen, dass die Funktion von GABARAP nicht allein auf neuronale Prozesse beschränkt ist. Die Rolle von GABARAP als Tumorsuppressor wurde kürzlich diskutiert (Klebig et al. 2005).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Sortierung, Transport und Degradierung von Neurotransmitter Rezeptoren sind Regulationsmechanismen, die essentiell für die Bildung und Aufrechterhaltung von funktionellen Synapsen sind und grundlegende Vorgänge bei der Modulation synaptischer Plastizität darstellen. GABA_A-Rezeptoren vermitteln schnelle inhibitorische Reizleitung im Gehirn und im Rückenmark und sind Ziele verschiedener pharmakologischer Wirkstoffe, die zur Behandlung psychischer Störungen oder zur Modulation des Schlaf-Wach-Rhythmus oder der Stimmung eingesetzt werden. Substanzen, die den Transport, den Umsatz oder die Funktion des GABA_A-Rezeptors beeinflussen sind daher von speziellem medizinischem und ökonomischem Interesse. GABARAP interagiert mit dem GABA_A-Rezeptor und ist Teil einer Proteinfamilie, die in zelluläre Vesikeltransportmechanismen involviert ist. Dies sind grundlegende Prozesse bei der Autophagozytose, einem kontrollierten Selbstverdauungsprozess, der eine Schlüsselrolle bei neuronaler Entwicklung, Neurodegeneration und Apoptose spielt. Die genaue Bedeutung der GABARAP-GABA_A-Rezeptor-Interaktion ist bisher nicht bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung von neuen GABARAP-interagierenden Substanzen via Phagendisplay-Selektion und die Charakterisierung der entsprechenden Interaktion mit Hilfe von *Pulldown*-Analysen, Oberflächenplasmonenresonanz, NMR- und Fluoreszenzspektroskopie. Dies soll zu einem fortgeschrittenen Verständnis der Prozesse an der postsynaptischen Membran beitragen und neue Möglichkeiten zur Modulation dieser Vorgänge eröffnen.

2 Materialien

2.1 Antikörper, Enzyme und Proteine

Tabelle 2.1: Enzyme, Proteine und Antikörper

Enzyme, Proteine und Antikörper	Firma
- <i>Bam</i> HI, <i>Xba</i> I	MBI Fermentas, Leon-Rot
- Taq-Polymerase	MBI Fermentas, Leon-Rot
- Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, Leon-Rot
- T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Leon-Rot
- DNase A	AppliChem, Darmstadt
- Vent-Polymerase	New England Biolabs Frankfurt am Main
- Thrombin-Protease	Roth, Karlsruhe
- CRT-His Fusionsprotein	Abcam, Cambridge
- Kaninchen Anti-CRT	Affinity BioReagents, Golden, USA
- Maus Anti-CHC	BD Biosciences, Pharmingen
- Kaninchen Anti-GABARAP	Hergestellt bei Pineda, Berlin (Antigen: GABARAP volle Länge)
- Ziege Anti-Kaninchen; HRP-konjugiert	PIERCE, Illinois, U.S.A.
- Ziege Anti-Maus; HRP-konjugiert	PIERCE, Illinois, U.S.A.
- Anti-gpVIII (M13)	PROGEN, Heidelberg

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 2.2: Name, Genotyp und Referenz der Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Tet ^r Δ (<i>morCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a	Stratagene Europe, Amsterdam
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	B F- <i>ompT hsdS(r_B-m_B) dcm⁺ Tet^r galλ (DE3) endA Hte [argU ileY <i>leuW</i> Cam^r]^a</i>	Stratagene Europe, Amsterdam
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	[F' <i>ompT hsdS_B (r_B-m_B) gal dcm</i> (DE3)]	(Miroux and Walker 1996)
<i>E. coli</i> ER2738	F', <i>proA⁺B⁺</i> , <i>lacI^q</i> , Δ (<i>lacZ</i>)M15zzf::Tn10(Tet ^R), <i>fbuA2</i> , <i>glnV</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>thi-1</i> , Δ (<i>hsdS-morB</i>)5	New England Biolabs, Frankfurt

2.3 Biochemikalien, Chemikalien und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in den Reinheitsgraden *reinst* oder *pro analysi* (p.a.) bezogen.

Tabelle 2.3: Name und Herkunft der Biochemikalien, Chemikalien und Kits

Biochemikalien, Chemikalien und Kits	Firma
Acrylamid 4 K Lösung (30%) (Mix 29:1)	AppliChem, Darmstadt
Agarose MP	AppliChem, Darmstadt
Amine Coupling Kit	Biacore AB, Uppsala
Ammoniumchlorid [¹⁵ N]	Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich
BIAmaintenance Kit	Biacore AB, Uppsala
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
Complete-Protease-Inhibitor-Tablette	Roth, Karlsruhe
dNTPs (desoxy-Nukleosid-Triphosphate)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco/BRL, Eggenstein
Glutathion, reduziert	Sigma, München
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim, BRD
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Roth, Karlsruhe
Midi Nucleobond AX 20 und AX100 Kit	Machery-Nagel, Düren
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC)	Sigma, München
Nickel-NTA-Agarose fast flow	Qiagen, Hilden
Nucleo Spin Kit	Machery-Nagel, Düren
Tween 20	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
QIAprep 96 M13 Kit	Qiagen, Hilden

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in ähnlicher Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (München) bezogen.

2.4 Datenbanken und Internet-Tools zu DNA- und Aminosäuresequenzen sowie Strukturen von Proteinen

Die Internet-Datenbanken SwissProt und TrEMBL (<http://www.expasy.ch/sprot/>) lieferten Informationen zu DNS- und Aminosäuresequenzen. Durch die Proteindatenbank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) konnte auf Proteinstrukturdaten zugegriffen werden. Primergenerierungen sowie die Auswertung von DNS-Sequenzierungen wurden *online* mit dem BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) durchgeführt. Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Tools ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) analysiert (z.B. Ermittlung des Extinktionskoeffizienten, Molekulargewicht und des isoelektrischen Punktes). Tabelle 2.4 zeigt eine Übersicht der zur Analyse der Phagendisplay-selektierten Sequenzen verwendeten Programme.

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Software zur Analyse der Phage Display Sequenzen

Funktion	Name	Internet Adresse
Multiples Sequenz Alignment	ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
Erstellung einer <i>position specific scoring matrix</i> (PSSM)	Blocks Multiple Alignment Processor	http://blocks.fhcrc.org/blocks/process_blocks.html
Datenbanksuche mit erstellten Motiven	Motif alignment and search tool (MAST)	http://meme.sdsc.edu/meme/mast.html
Visualisierung von Proteinstrukturen	MOLEcule analysis and MOLEcule display (MOLMOL)	http://bigin.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/

2.5 Eukaryotische Zellen

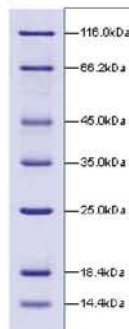
Im Rahmen der *Pulldown*-Experimente wurde Hirngewebe von Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Rattenhirne ohne Hirnrinde wurden von der Firma Biomol GmbH, Hamburg bezogen.

2.6 Größenmarker

Prestained Protein Ladder
(MBI Fermentas)



Protein Molecular Weight Marker
(MBI Fermentas)



2.7 IMAGE-cDNA-Klone

Für die Klonierung des für CRT (CRT) kodierenden Gens (CRT 18-417) in einen prokaryotischen Expressionsvektor (pET15b_kombi; Abb. 2.2) wurde der IMAGE-cDNS-Klon *IRAU_{p969F116D}* des Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) als Templat benutzt. Die Klonierung des humanen MAP-LC3 (1-125) Konstrukts fand ebenfalls in pET15b_kombi statt, wobei hier der IMAGE-cDNS-Klon *IRAU_{p969H0456D}* des Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) als Templat diente.

2.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide zur Sequenzierung der Einzelstrang-DNS aus M13-Phagen und des pET15b_kombi-Vektors sowie zur Amplifizierung des CRT- und MAP-LC3b-Gens sind in der Tabelle 2.5 aufgeführt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ (Berlin) bezogen.

Tabelle 2.5: Name und DNS-Sequenz der verwendeten Oligonukleotide

Name	DNS-Sequenz (5'-3')
gp3_96	ccc tca tag tta gcg taa cg
T7-Promotor-(pET)	taa tac gac tca cta tag gg
T7-Terminator-(pET)	ggg tta tgc tag tta ttg c
pOTB7_CRT_Fwd	tga ccc atg gag cct gcc gtc tac ttc aag
pOTB7_CRT_Rev	cgc ctc gag aat tct tac agc tcg tcc ttg gcc tg
MAP-LC3_Fwd	gca gga tcc atg ccg tcg gag aag acc
maplc3_125rev	tgc cgc tcg agc gcc cgc tta cac tga caa ttt cat ccc

2.9 Peptide

Die Peptide wurden von der Firma Jerini BioTools GmbH (Berlin) oder dem Analytischen Zentrallabor des BMFZ (Düsseldorf) synthetisiert. Die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide und die entsprechenden Fluoreszenzmarkierungen sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6: Name, Aminosäuresequenz und Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Peptide.

Name	Aminosäuresequenz (N→C) / (Fluorophor)
fN1	H-SHKSDWIFLPNA-Lys(5,(6)Carboxyfluorescein)-NH ₂
fN2	H-SHFQSWELVSTP-Lys(5,(6)Carboxyfluorescein)-NH ₂
fN3	H-NHRTPELGHYEW-Lys(5,(6)Carboxyfluorescein)-NH ₂
N1	H-SHKSDWIFLPNA-NH ₂
CRT (178-188)	COCH ₃ -SLEDDWDFLPP-NH ₂
CHC (510-522)	COCH ₃ -TPDWIFLLRNVMR-NH ₂

2.10 Phagendisplay-Peptid-Bibliothek

Für die Identifizierung von Peptid-Liganden wurde eine kommerzielle Phagenbibliothek (Ph.D.-12™ Phage Display Library Kit, New England Biolabs, Frankfurt) mit 12 randomisierten Aminosäureresten verwendet. Die Phagenbibliothek besteht aus $2,7 \times 10^9$ verschiedenen Sequenzen, wobei in einem Volumen von 10 µl durchschnittlich 55 Kopien jeder Sequenz vorliegen. Die Bibliothek ist nach der Signalsequenz vor das gpIII-Gen insertiert, so dass das entsprechende Peptid an den Aminoterminus des Phagenhüllprotein gpIII gekoppelt ist (Abb. 2.1).

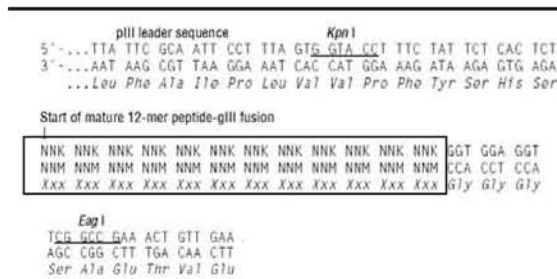


Abbildung 2.1: DNS-Sequenzabschnitt der verwendeten Phagenbibliothek. Der randomisierte DNA-Sequenzabschnitt ist mit einem Kästchen markiert.

2.11 Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor pGEX-GABARAP (Lorenz Mayr, Basel) zur Expression des GABARAP-Gens verwendet. Die für GABARAP kodierende DNS-Sequenz ist über *Bam*H1 und *Not*I-Restriktionsschnittstellen in den pGEX-4T-1 Vektor (Amersham, Pharmacia, Freiburg) eingefügt. Eine Fusion von für Glutathion-S-transferase (GST), eine Thrombin-Proteaseschnittstelle und GABARAP-kodierende DNS-Sequenzen steht unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors. Nach der Thrombinspaltung des Fusionsproteins weist GABARAP aufgrund der Proteaseschnittstelle aminoterminal einen zusätzlichen Glycin- und Serin-Aminosäurerest auf.

Bei der Klonierung der für CRT und MAP-LC3 kodierenden DNS-Sequenzen wurde ein modifizierter pET15b Vektor (Novagen/Merck, Darmstadt) benutzt (pET15b_kombi), bei dem die *Bam*H1-Restriktionsschnittstelle in der für die Thrombinschnittstelle kodierenden Sequenz liegt (Abb. 2.2). Die Fusion von für einen His-Tag, eine Thrombin-Proteaseschnittstelle und CRT bzw. MAP-LC3 kodierende Sequenz steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors/lac-Operators. Nach der Thrombinspaltung der resultierenden Fusionsproteine weisen CRT bzw. MAP-LC3 aufgrund der Proteaseschnittstelle aminoterminal einen zusätzlichen Glycin- und Serin-Aminosäurerest auf.



Abb. 2.2: DNS-Sequenz der multiplen Klonierungsstelle von pET15b_kombi. Die für eine Thrombin-Proteaseschnittstelle kodierende Sequenz ist in dunkel- und hellblau dargestellt, wobei hellblau gleichzeitig die *Bam*H1-Restriktionsschnittstelle kennzeichnet. Grau markiert sind Bereiche für verschiedene weitere Restriktionsschnittstellen. Sequenzbereiche, die sich vom Originalvektor pET15b (Novagen, Merck) unterscheiden, sind unterstrichen.

2.12 Software

Fluoreszenzspektroskopische Daten wurden mit der FL WinLab Software (PerkinElmer, Boston, USA) aufgenommen und anschließend mit Hilfe von Microsoft Excel und Sigmaplot visualisiert. Biacore-Daten wurden mit der dazugehörigen BIACORE X Control Software (Biacore AB, Uppsala) aufgenommen und mit der Biaevaluation Software (Biacore AB, Uppsala) prozessiert. Zur Prozessierung und Visualisierung der NMR-Daten wurden die Programme NMRPipe (Version 2.3; Delaglio et al.), NMRDraw (Version 1.7, Delaglio et al.) (Delaglio et al. 1995) und NMRView (Johnson et al.) (Johnson and Blevins 1994) verwendet.

Die Erzeugung von Graphen und die Durchführung nicht-linearer Regressionsrechnungen erfolgten mit SigmaPlot2001 (SPSS Inc., USA). Weitere graphische Bearbeitung erfolgte mit CorelDraw 9. Die vorliegende Arbeit wurde in Microsoft Word erstellt.

2.13 Sonstige Materialien

Tabelle 2.7: Sonstige Materialien

Name	Hersteller
Spectra/Por-Dialyseschlauch (MWCO: 1000 und 3500 Da)	Roth, Karlsruhe
Minisart Sterilfilter (0,22 µm)	Sartorius, Göttingen
Mikrotiterplatten Polysorp 96F	Nunc, Wiesbaden
Ultrafiltrations-Konzentratoren (MWCO: 1000 Da)	Amicon, Beverly, USA

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von der Firmen VWR-International (Darmstadt), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf) und Sartorius (Göttingen) bezogen.

3 Methoden

3.1 Klonierung

3.1.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

Zur Klonierung von Genkonstrukten wurde der *E. coli* XL10-Gold Stamm verwendet. Die Kulturen wurden jeweils mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte oder aus Glycerinkulturen angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin unter Schütteln (200 rpm) bzw. auf LB-Agarplatten über Nacht. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}). Dabei entspricht eine OD_{600} von 1,0 einer Dichte von ca. 10^9 Zellen/ml Kultur. Für die Langzeitkonservierung wurden 700 µl einer Übernachts-Bakterienkultur mit 300 µl sterilem 70 %igem Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Transformation von *E. coli*

Die bei -80 °C gelagerten, chemisch kompetenten Bakterien wurden für ca. 10 min auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 200 µl Bakterienlösung vorsichtig mit einem Ligationsansatz bzw. mit 100 ng Plasmid-DNS versetzt und zunächst 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 42 s eine Hitzeaktivierung bei 42 °C und nach Zugabe von 800 µl LB-Medium eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Danach wurden im Allgemeinen 100 µl und 900 µl der Bakteriensuspension auf je eine Ampicillin-haltige LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Nur Bakterien, die das im eingesetzten Plasmid vorhandene Ampicillin-Resistenzgen enthalten, können sich vermehren und sichtbare Kolonien bilden. Die Transformanten wurden anschließend mittels Kolonie-PCR analysiert.

3.1.3 DNS-Isolierung

Plasmidpräparation aus *E.coli* Zellen. Basierend auf der Methode der alkalischen Lyse nach Ish-Horowicz und Burke (Ish-Horowicz and Burke 1981) erfolgte die Reinigung von kleineren Mengen an Plasmid-DNS (10-30 µg) mit dem Nucleo Spin Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers. Größere Mengen von Plasmid-DNS (bis zu 100 µg) wurden mit Hilfe des Midi Nucleobond AX100-Kits (Machery-Nagel, Düren), ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers, gewonnen.

Isolierung von Einzelstrang-DNS aus M13-Phagen. Die für die Sequenzierung benötigte M13-Phagen-Einzelstrang-DNS (ssDNS) wurde mit Hilfe des QIAprep 96 M13 Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers präpariert.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNS

Die Konzentrationsbestimmung von DNS wurde mit einem Lambda 25 UV/VIS-Spektrometer von PerkinElmer instruments (USA) durchgeführt und erfolgte gemäß Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989) durch fotometrisches Vermessen der Lösung bei 260 nm (OD_{260}), wobei eine OD_{260} von eins einer DNS-Konzentration von 50 ng/µl entspricht.

3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) (Mullis et al. 1986) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Fragmenten definierter Länge und definierter Sequenz von einer DNS-Matrize. Dabei können die Moleküle in kürzester Zeit um den Faktor 10^6 bis 10^8 vermehrt werden. Bei diesem Verfahren setzt man die DNS-Matrize mit zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (*Primern*), deren Sequenzen komplementär zu den Anfangs- und Endsequenzen der zu amplifizierenden DNS sind, sowie weitere Agenzien in einen Temperaturzyklus ein. Nach jeder Reaktionsfolge aus DNS-Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung und Auffüllreaktion kommt es zu einer Verdopplung der DNS und somit in einer Kettenreaktion zur exponentiellen Anreicherung der zu amplifizierenden DNS-Sequenz. Die PCR diente sowohl präparativ zur Herstellung rekombinanter Gene (DNS-Amplifizierung), als auch analytisch zum spezifischen Nachweis bestimmter Nukleinsäuresequenzen (Kolonie-PCR).

3.1.5.1 Amplifizierung von DNS

Zur Amplifizierung von (rekombinanter) DNS wurden PCR-Ansätze in einem Volumen von 20 µl bis 100 µl mit 1x PCR-Puffer, 100 µM dNTPs, 1 µM 5'-*Primer*, 1 µM 3'-*Primer* und 1-2 U Vent-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) angesetzt. Als Templat wurden 50 - 100 ng gereinigte (Plasmid-) DNS benutzt. Entsprechend der Schmelztemperatur der eingesetzten *Primer* und der Länge des zu amplifizierenden DNS-Segmentes wurden die Einzelschritte der Reaktion den jeweiligen Erfordernissen angepasst. Allen Reaktionen gemeinsam war jedoch eine anfängliche Denaturierung der DNS für 1 min bei 95 °C, gefolgt von einem variablen, zyklischen 3-Temperaturprogramm für 30 Zyklen (Denaturierung bei 95 °C für 1 min, Anlagerung der Primer bei 50-60 °C für 40 s, Kettenverlängerung bei 72 °C für 1 min) und einer abschließenden Kettenverlängerung für 7 min bei 72 °C. Die PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler Biozym PTC-200 (Oldendorf) durchgeführt. Bei der präparativen Amplifikation von DNS wurde nach Beendigung der Synthese der Erfolg der PCR mittels Gelelektrophorese überprüft. Die gewünschten PCR-Fragmente wurden, wie unter Kapitel 3.1.8 beschrieben, gereinigt und standen danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

3.1.5.2 Kolonie-PCR mit *E. coli*

Die Kolonie-PCR ermöglichte das Auffinden von mit Vektoren transformierten *E. coli*-Klonen, die das gewünschte Insert-DNS-Fragment inseriert haben, ohne dass die DNS vorher isoliert werden muss. Dabei wurde eine *E. coli*-Kolonie von einer Kulturplatte in 20 µl TE-Puffer, pH 8,0, 1 % (v/v) Nonidet P40 (NP40) überführt, resuspendiert und durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C lysiert. Nach Abkühlen auf RT und Zentrifugation (1 min, 8000 g) wurden dann 5 µl des Überstandes für eine PCR (Ansatzgröße 20 µl) mit 25 Zyklen eingesetzt. Dabei wurden Primer verwendet, die flankierend zu der multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) sind. Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes über Gelelektrophorese auf Amplifikation überprüft. Wenn kein Insert vorhanden war, entstanden PCR-Produkte mit einer für den jeweiligen Vektor charakteristischen Größe. Positive Klone wurden in 5-10 ml LB-Medium angezogen, die DNS isoliert (3.1.3) und anschließend mittels Sequenzierung (Kap. 3.1.11) auf die Richtigkeit der *Insert*-Sequenz überprüft.

3.1.6 Gelelektrophorese von DNS

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der kontinuierlichen Auftrennung von DNS-Fragmenten entsprechend ihrer Größe und somit zur Reinigung und Identifizierung von DNS-Fragmenten. Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von in Flüssigkeit dispergierten oder kolloidal gelösten, geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld (Dechwer et al. 1999). Dabei bewegen sich die Partikel mit positiver Ladung zur Kathode, die negativ geladenen zur Anode. Maßgebend für die Trennschärfe der Elektrophorese ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen. Diese wiederum ist abhängig von der Form und Größe der Teilchen, ihrer Ladung, des pH-Wertes, der Temperatur sowie der Viskosität des Agarosegels und der Feldstärke. Kleinere DNS-Fragmente legen deshalb im elektrischen Feld eine größere Strecke zurück als größere Fragmente.

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (Amersham Biosciences). Je nach Größe des zu analysierenden Fragmentes wird eine 0,8 bis 2,5 %ige Agaroselösung in 1x TAE-Puffer mit 1 mg/l Ethidiumbromid (EtBr) hergestellt (Sambrook et al. 1989). Bei der analytischen und präparativen Auftrennung wurde die MP-Agarose (AppliChem) verwendet. Vor dem Auftragen der DNS-Probe wurde diese mit etwa 1/5 Volumen (v/v) 5x-DNS-Auftragspuffer versetzt und je nach Elektrophorese-Apparatur bei einer konstanten Stromspannung von 90 V getrennt. Die Detektion der DNS erfolgte im UV-Licht. EtBr interkaliert zwischen die Basen der DNS und verändert dabei sein Anregungsspektrum, so dass die Fluoreszenzemission bei Bestrahlung mit UV-Licht stark erhöht wird. Die Ergebnisse der Elektrophorese wurden auf dem Geldokumentationssystem mit UV-Durchlicht und Thermodrucker der Firma Bio-Rad („GelDoc 2000“ mit „Quantity One“-Software, Version 5.01, München) festgehalten.

Agaroselösung	TAE-Puffer	5x-DNS-Auftragspuffer
0,8- 2,5 % (w/v) Agarose	40 mM Tris-Acetat	50 mM EDTA
in TAE-Puffer	1 mM EDTA	50 % (v/v) Glycerin
1 mg/ml EtBr	pH 8,0	0,15 % (w/v) Bromphenolblau
		0,15 % (w/v) Xylencyanol

3.1.7 Enzymatischer Verdau von DNS durch Restriktionsenzyme

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen fand der analytische und präparative Verdau von DNS (Vektoren und PCR-Amplifikat) statt.

Die käuflich erworbenen Restriktionsenzyme und die dazu gelieferten Reaktionspuffer wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt etwa 1 bis 10 µg DNS in einem Volumen von 20 bis 50 µl. Dieser wurde 1 bis 2 h bei geeigneter Temperatur mit einer Enzymaktivität von 5 U/µg eingesetzter DNS inkubiert, was einem 5-fachen Überverdau entspricht. Danach wurde ein Aliquot des Ansatzes parallel zu einem DNS-Größenmarker auf einem Agarosegel aufgetrennt und die entstandenen DNS-Fragmente auf die Richtigkeit ihrer Größe überprüft.

3.1.8 Präparative Reinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNS-Fragmente mit Hilfe eines präparativen Agarosegels wurde das gewünschte DNS-Fragment unter UV-Licht aus dem Gel isoliert. Die weitere Reinigung erfolgte unter Verwendung des QIAEXII-Kits (Qiagen, Hilden) nach der Anleitung des Herstellers. Die Elution erfolgte stets in Wasser. Diese Methode wurde nach Restriktionsverdau von PCR-Amplifikaten oder Plasmiden zur Reinigung verwendet.

3.1.9 Dephosphorylierung

Um die Re-Ligation der Vektorenden von enzymatisch verdauten DNS-Molekülen zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe der "*Shrimp Alkaline Phosphatase*" (SAP) entfernt. Dazu wurde ca. 1 µg DNS mit 16 µl ddH₂O und 2 µl 10x SAP-Puffer versetzt. Nach Zugabe des Enzyms (1 U/µl) wurde der Reaktionsansatz eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C wurde das Enzym inaktiviert. Anschließend konnte die DNS direkt in die Ligation eingesetzt werden.

3.1.10 Ligation von DNS

Für die Insertion eines DNS-Fragmentes in ein zuvor linearisiertes Plasmid wurde die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4-DNS-Ligase; GE Healthcare, München) verwendet. Für die Ligation wurden ca. 100 ng Plasmidvektor und ein zwei- bis zehnfacher molarer Überschuss an Insert-DNS mit 1 mM ATP und 1 U T4-DNS-Ligase über Nacht bei RT oder bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl chemisch kompetente *E. coli* XL10 Gold-Zellen mit maximal 10 µl des Ligationsansatzes transformiert.

3.1.11 Sequenzierung von DNS

500 bis 800 ng gereinigte Plasmid-DNS wurden mit 20 pmol des entsprechenden Sequenzierungsprimers in einem Gesamtvolumen von 7 µl an die Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen) zur Sequenzierung geschickt.

3.2 Proteinreinigung

3.2.1 GABARAP

3.2.1.1 Anzucht der Bakterien

Die Zellanzucht wurde in mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 200 rpm (Unitron, Infors-HT, Einsbach) durchgeführt. Für die Herstellung einer Vorkultur wurden 50 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (100 µg/ml - entspricht 270 µM) versetzt und mit einer Kolonie von einer LB-Platte oder mit einer Glyzerinkultur inokuliert und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur zentrifugiert (1 min, 3000 g, RT), das Pellet in frischem LB-Medium resuspendiert und damit die Expressionskultur auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 eingestellt. Die Anzucht der Expressionskultur erfolgte bei 37 °C in einem Schüttelinkubator solange, bis die Bakterien eine Dichte von OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 erreicht hatten (2 bis 3 h). Die Expression wurde durch die Induktion mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) gestartet und über Nacht unter denselben Bedingungen weiter inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation (30 min bei 3000 g und 4 °C) geerntet. Nach einmaligem Waschen des Bakterienpellets in PBS-Puffer wurde dieses zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

LB-Medium (l)	LB-Platte
10 g Trypton	2 % (w/v) Agar
5 g Hefeextrakt	in LB-Medium
10 g NaCl	

Sollten die Proteine für (¹H-¹⁵N)-HSQC-Messungen verwendet werden, so wurde statt dem LB-Medium ¹⁵N-isotopenangereichertes M9-Minimalmedium benutzt.

M9-Minimalmedium

9,1 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 3 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 0,5 g/l NaCl
 0,5 g/l $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
 100 μM CaCl_2 (aus einer 1 M Stammlösung)
 2 mM MgSO_4 (aus einer 1 M Stammlösung)
 10 μM Fe(III)citrat (aus einer 10 mM Stammlösung)
 4 g/l Glukose
 5 mg/l Thiaminhydrochlorid
 0,2 % (v/v) TS2 Spurenelemente aus einer Stammlösung
 0,1% (v/v) Vitamin-Cocktail Stammlösung

TS2 / Spurenelemente (Stammlösung)

30 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
 58,8 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 300 mg/l H_3BO_3
 200 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
 20 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
 10 mg/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 900 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 20 mg/l Na_2SeO_3

Vitamin-Cocktail (Stammlösung)

1 g/l Biotin
 1 g/l Cholinchlorid
 1 g/l Folsäure
 1 g/l Nicotinamid
 1 g/l Natrium-D-panthothenat
 1 g/l Pyridoxalhydrochlorid
 0,1 g/l Ribolavin

Zur Analyse der Expression von GABARAP wurden vor der Induktion und zu verschiedenen Zeitpunkten der Expression Aliquots entnommen und mittels Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate*, SDS-PAGE) analysiert.

3.2.1.2 Aufschluss der Bakterien

Beim Zellaufschluss wurde das Bakterienpellet in 5 ml Aufschlusspuffer pro g Nasszellgewicht aufgenommen und resuspendiert. Die dabei stets eisgekühlten Zellen wurden anschließend mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) durch dreimaliges Sonifizieren für jeweils 30 s aufgeschlossen. Nach dem Abtrennen nicht aufgeschlossener Zellen und der Zellwandbestandteile durch Zentrifugation (30 min, 55000 g, 4 °C) wurde der zellfreie Rohextrakt abgezogen und für die weitere Reinigung verwendet. Aufschluss- und Bindungspuffer wurden vor der Zugabe von β -ME, Proteaseinhibitoren bzw. DNase A mindestens 20 min mit Stickstoff begast.

1 x PBS-Puffer

140 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10 mM Na_2HPO_4
 1,8 mM KH_2PO_4
 pH 7,4

Aufschlusspuffer GABARAP

1 x PBS
 1 mM β -ME
 1 Complete-Protease-Inhibitor-Tablette/20 ml
 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase A

3.2.1.3 Affinitätschromatographie

Die Reinigung der Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine erfolgte an Glutathion-Sepharose 4B (GSH-Sepharose) (GE Healthcare, München). Hierbei beruht das Prinzip auf der Bindung GST an den Liganden Glutathion, der kovalent an die Sepharose gekoppelt ist, und der anschließenden Elution der GST-Fusionsproteine durch reduziertes Glutathion.

Zur Reinigung des GST-GABARAP-Fusionsprotein wurde zuerst eine leere Chromatographiesäule (GE Healthcare, München) mit 1,5 ml GSH-Sepharose pro Gramm Zellnassgewicht befüllt, mit fünf Säulenvolumen H₂O gewaschen und mit fünf Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert. Nach dem Auftrag des zellfreien Rohextraktes wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen kaltem Bindungspuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen GST-GABARAP-Fusionsproteins erfolgte durch Auftragen des Elutionspuffers und war nach 20 ml abgeschlossen. Anschließend wurden Proben aller Fraktionen über SDS-PAGE analysiert.

Bindungspuffer GABARAP	Elutionspuffer GABARAP
PBS	50 mM Tris-HCl,
1 mM β -ME	10 mM reduziertes Glutathion
pH 7,4	pH 8,0

3.2.1.4 Proteolytischer Verdau des GST-GABARAP-Fusionsproteins

Zur Spaltung wurde das eluierte Fusionsprotein durch Dialyse in den Proteolysepuffer (PBS) überführt. Für ein Gramm Ausgangszellmaterial wurden ungefähr 125 Einheiten Thrombin (Merck, Darmstadt) zugesetzt. Die Spaltung erfolgte unter Sauerstoffausschluss. Luft im Gefäß des Spaltungsansatzes wurde durch Stickstoff verdrängt und ersetzt. Der proteolytische Verdau wurde für 48 h bei RT inkubiert und dabei langsam gerührt. Anschließend wurde eine Probe genommen und die Vollständigkeit der Proteolyse mittels SDS-PAGE verifiziert.

3.2.1.5 Größenausschlusschromatographie

Die Ausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Form und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Dabei können Moleküle ab einer bestimmten Größe nicht in die Poren des Trenngels eindringen und werden zuerst eluiert. Kleinere Moleküle dagegen können in die Poren eindringen, erfahren dadurch eine Verzögerung und werden später eluiert.

Für die Trennung der proteolytischen Spaltprodukte wurde eine Größenausschlusschromatographie mit der Superdex75-Säule der Firma GE Healthcare (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg) durchgeführt. Der Spaltungsansatz wurde mittels Ultrafiltration (Macrosep, Pall Filtron, Dreieich) auf 3 ml Auftragsvolumen konzentriert. GABARAP eluierte klar separiert von GST, Fusionsprotein und Thrombin. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und GABARAP-enhaltende Fraktionen je nach Reinheitsgrad vereint. Diese wurden anschließend gegen 3 x 5 l H₂O dialysiert und im Lyophilisator (Alpha 1-4, Christ, Osterode am Harz) gefriergetrocknet.

3.2.2 CRT

3.2.2.1 Bakterienanzucht und Zellaufschluss

Die Bakterienanzucht zur Expression von CRT (CRT), sowie der Zellaufschluss entsprachen dem unter Kap 3.2.1 beschriebene Protokoll für GST-GABARAP. Für den Zellaufschluss wurde der im Folgenden aufgeführte Puffer verwendet.

Aufschlusspuffer CRT
50 mM Natriumphosphat
300 mM NaCl
pH 8,0
1 mM β ME
1 Complete-Protease-Inhibitor-Tablette/20 ml
10 μ g/ml DNase A

3.2.2.2 Ni-NTA-Agarose

Der erste Reinigungsschritt von CRT erfolgte über Affinitätschromatographie mit Hilfe von Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose. Das Reinigungsprinzip beruht dabei auf der Bildung eines Komplexes basierend auf der Wechselwirkung des Ni-Metallkations mit einem kovalent gebundenem Chelator und einem histidinhaltigen Protein (hier: 6 aminoterminal Histidinreste (6xHis)). Art und Stärke der Komplexbindung sind abhängig vom verwendeten Chelator und Metall.

Eine leere Chromatographiesäule (GE Healthcare, München) wurde zunächst mit 1,5 ml Ni-NTA-Agarose pro Gramm Nasszellgewicht befüllt, mit fünf Säulenvolumen H_2O gewaschen und mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer äquilibriert. Das zellfreie Rohextrakt wurde zusammen mit dem Säulenmaterial mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und nicht gebundene Bestandteile im Durchfluss aufgefangen. Nach einem Waschschrift mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer wurde das 6xHis-CRT Fusionsprotein in einem Stufengradienten von ansteigenden Imidazolkonzentrationen bei etwa 100 mM eluiert. Anschließend wurden Proben aller Fraktionen über SDS-PAGE analysiert.

3.2.3 MAP-LC3b

3.2.3.1 Bakterienanzucht und Zellaufschluß

Die Bakterienanzucht zur Expression von MAP-LC3b, sowie der Zellaufschluß entsprachen dem unter Kap 3.2.1 beschriebenen Protokoll für GST-GABARAP. Für den Zellaufschluß wurde der im Folgenden aufgeführte Puffer verwendet.

Aufschlusspuffer MAP-LC3b
50 mM Natriumphosphat
300 mM NaCl
pH 8,0
1 mM β ME
1 Complete-Protease-Inhibitor-Tablette/20 ml
10 μ g/ml DNase A

3.2.3.2 Ni-NTA-Agarose

Der erste Reinigungsschritt von MAP-LC3b erfolgte über Affinitätschromatographie mit Hilfe von Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose entsprechend dem in Kapitel 3.2.2 ausgeführten Protokoll für CRT. Die Elution des 6xHis-MAP-LC3b Fusionsprotein erfolgte bei Imidazolkonzentrationen zwischen 50 und 150 mM. Anschließend wurden Proben aller Fraktionen über SDS-PAGE analysiert.

3.2.3.3 Spaltung des His-Fusionsproteins

Zwecks proteolytischem Verdau wurde das eluierte 6xHis-MAP-LC3 Fusionsprotein durch Dialyse in den Proteolysepuffer (PBS) überführt. Für ein Gramm Ausgangszellmaterial wurden ungefähr 150 Einheiten Thrombin (Merck, Darmstadt) zugesetzt. Die Spaltung erfolgte unter Sauerstoffausschluss. Luft im Gefäß des Spaltungsansatzes wurde durch Stickstoff ersetzt. Der Spaltansatz wurde für 24 h bei Zimmertemperatur inkubiert und dabei langsam gerührt. Dabei wurde die Vollständigkeit der Spaltung nach verschiedenen Zeitpunkten mittels SDS-PAGE verifiziert.

3.2.3.4 Größenausschlusschromatographie

Für die Trennung der Spaltprodukte wurde eine Größenausschlusschromatographie mit der Superdex75-Säule der Firma GE Healthcare (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg) durchgeführt. Der Spaltungsansatz wurde mittels Ultrafiltration (Macrosep, Pall Filtron, Dreieich) auf ein Auftragsvolumen von maximal 7 ml konzentriert. MAP-LC3b eluierte bei einem Retentionsvolumen von ca. 150 ml. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und MAP-LC3b-enhaltende Fraktionen je nach Reinheitsgrad vereint. Diese wurden anschließend gegen 3 x 5 l H₂O dialysiert und im Lyophilisator (Alpha 1-4, Christ, Osterode am Harz) gefriergetrocknet.

3.3 SDS-PAGE nach Laemmli

Zur Auftrennung und Analyse von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese) bestehend aus einem Sammel- und Trenngel nach Laemmli angewandt (Laemmli 1970). Die SDS-Elektrophorese trennt nach Molekülgröße auf. Durch Behandlung mit dem im Probenpuffer enthaltenen anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat werden die Eigenladungen von Proteinen überdeckt; es entstehen anionische Micellen. Das SDS lagert sich dabei an das Protein an, so dass die spezifische Ladung, d.h. Ladung pro Masse, zum entscheidenden Parameter für die Auftrennung wird. β -ME wird zugesetzt, um Schwefelbrücken, die zwischen Cysteinen gebildet werden können, reduktiv zu spalten.

Im Sammelgel sind die Poren so groß, dass sie für die Trennung oder Konzentrierung der Proteine keine Rolle spielen. Der Konzentrierungseffekt wird vielmehr dadurch erreicht, dass sich im Gel andere Ionen (Leitionen) als im Elektrodengefäß (Folgeionen) befinden. Dabei wandert das Leition am schnellsten und zieht die Proteine nach sich, während das Folgeion am langsamsten wandert und die Proteine in entsprechender Weise vor sich herschiebt. So werden die Proteine zu einer schmalen, scharf begrenzten Zone hoher Konzentration gesammelt. Diese Zone bewegt sich in Richtung Anode, bis sie an die Grenzschicht des engporigen Trenngels gelangt. Die Proteine erfahren plötzlich einen hohen Reibungswiderstand, so dass ein Stau entsteht, der zu einer weiteren Zonenschärfung führt. Das niedermolekulare Leition ist davon nicht betroffen und überholt die Proteine.

Die Gele hatten eine Größe von 10 cm x 10,5 cm und eine Dicke von 0,75 mm. Der Gellauf wurde in vertikalen Plattenelektrophoresekammern (Mighty Small II, Hoefer/ Amersham Bioscience, Freiburg) durchgeführt.

5%-Sammelgel	15%-Trenngel	Laufpuffer	4-fach-SDS-Probenpuffer
5 % (v/v) Acrylamid	15 % (v/v) Acrylamid	50 mM Tris-HCl	40 % (v/v) Glycerin
125 mM Tris/ HCl	375 mM Tris/ HCl	385 mM Glycin	8 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	8 % (v/v) β -ME
pH 6,8	pH 8,8	pH 8,3	200 mM Tris pH 6,8
0,06 % (v/v) APS	0,1 % (v/v) APS		3 g/l Bromphenolblau
0,06 % TEMED	0,04 % (v/v) TEMED		

Die Proben wurden vor dem Lauf im Verhältnis 1:4 mit einem 4-fach-Probenpuffer nach Laemmli versetzt. Wurde die Gesamtproteinmenge von Bakterienzellen untersucht, so wurde das Volumen der einzusetzenden Bakterienkultur nach Gleichung 3.1 berechnet, um Proteinmengen verschiedener Proben quantitativ miteinander vergleichen zu können.

$500 / OD_{600} = \text{Volumen der einzusetzenden Bakterienkultur}$	(Gleichung 3.1)
--	-----------------

Das entsprechende Bakterienpellet wurde anschließend mit 50 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert. Vor dem Lauf wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert, bei 10000 g abzentrifugiert und 5 μ l des Überstandes auf das Gel aufzutragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30-40 mA/Gel für ca. 1 h. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel in ca. 100 ml Coomassie-Färbelösung für 3 min in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gel in kochendem H₂O bis zum gewünschten Grad entfärbt. Die Dokumentation erfolgte auf dem Gerät Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München).

Coomassie-Färbelösung

25 % Isopropanol
10 % Essigsäure
0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250

3.4 Protein-Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektrometer

Absorptionsmessungen im UV/VIS-Bereich wurden mit einem Spektralphotometer des Typs Lambda25 (PerkinElmer, Überlingen) durchgeführt. Die Konzentration von Proteinen bzw. Peptiden wurde mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Demnach gilt folgender Zusammenhang zwischen der Extinktion E und der Konzentration c :

$E = d \cdot c \cdot \epsilon$	(Gleichung 3.2)
--------------------------------	-----------------

Dabei steht ϵ für den molaren Extinktionskoeffizienten, d für die Schichtdicke der Küvette und c für die Konzentration. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine bzw. Peptide wurden anhand der Zusammensetzung der aromatischen Aminosäuren ermittelt (Gill and von Hippel 1989).

3.5 Circulardichroismus (CD)

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie wird zur Analyse von Proteinsekundärstrukturen herangezogen. Sie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV-VIS-Bereich des Spektrums. Unter CD versteht man die unterschiedliche Absorption von rechts und links zirkular polarisiertes Licht durch eine optisch aktive Probe. Der CD der Proteine wird vor allem von den asymmetrischen Elementen im Bereich des Peptidrückgrats und von den aromatischen Aminosäuren hervorgerufen. Bei allen Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin ist das C_α -Atom asymmetrisch substituiert. Das führt zur unterschiedlichen Absorption von rechts und links zirkular polarisiertes Licht durch diesen Chromophor. Die konkrete Elektronenkonfiguration der Peptidbindungen wird weiterhin ganz entscheidend von den Sekundärstrukturen bestimmt, die das Peptidrückgrat ausbildet. Das führt letztlich zu den spezifischen und im Wesentlichen von der Konformation der Proteine bestimmten CD-Spektren des Peptidbereichs von 180 nm bis 250 nm, die eine Analyse der Sekundärstruktur ermöglichen. Zur Bestimmung der mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäurerest ($[\Theta]_{MRW}$) wurde die Gleichung 3.3 angewendet.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta}{10 \cdot (N-1) \cdot d \cdot c} \quad \text{(Gleichung 3.3)}$$

$[\Theta]_{MRW}$ = mittlere molare Elliptizität pro Amidbindung [$\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$]

Θ = gemessene Elliptizität [mGrad] d = Schichtdicke der Küvette [cm]

N = Anzahl der Aminosäuren c = Konzentration des Proteins/ Peptids [M]

Für die Bestimmung der Sekundärstruktur von CRT wurden Fern-UV-CD-Messungen mit einem Jasco-J810 CD-Spektrometer (Jasco, Groß-Umstadt) durchgeführt. Die Konzentration von CRT betrug jeweils $4 \mu\text{M}$. Die verwendeten Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim) hatten eine Schichtdicke von $0,05 \text{ cm}$. Der aufgezeichnete Wellenlängenbereich verlief von 190 bis 260 nm . Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 20 nm/min , die Auflösung 1 nm , die Zeitkonstante 2 s , die Empfindlichkeit des Gerätes 100 mGrad und die Bandbreite 1 nm . Jedes Spektrum wurde dreifach akkumuliert. Die Messungen fanden bei RT statt. Bei allen Spektren wurde als Kontrolle und als Hintergrundmessung das dazugehörige Pufferspektrum aufgenommen. Die Spektren wurden nach Subtraktion des Hintergrundes ausgewertet.

3.6 Phagendisplay

Phagendisplay ist eine effektive und zuverlässige Methode, um Protein-Protein-Interaktionen vorherzusagen und zu charakterisieren. Man macht sich hierbei zu Nutze, dass Bakteriophagen gewisse Veränderungen innerhalb der Strukturgene tolerieren. Bei der Erstellung einer Phagen-insertierten Peptidbibliothek wird daher eine randomisierte Nukleotidsequenz in das Genom des M13-Phagen eingebracht, so dass die resultierenden Phagen ein verändertes Oberflächenprotein (hier GP3) produzieren, welches ein Peptid der Peptidbibliothek enthält. Der Genotyp ist so mit dem Phänotyp verknüpft.

Bei der Durchführung der Phagendisplay-Selektion wird das Targetprotein auf einer Plastikoberfläche immobilisiert und freie Bindungsstellen anschließend blockiert. Nach der Inkubation mit der Phagenbibliothek werden nicht-bindende Phagen in mehreren Waschschritten entfernt. Am Ende jeder Selektionsrunde werden die noch gebundenen Phagen eluiert, amplifiziert und (immer in gleicher Anzahl) in die nächste Selektionsrunde eingesetzt. Nach

mehreren Selektionsrunden wird der Erfolg der Selektion mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) überprüft und gegebenenfalls die DNS der selektierten Phagen sequenziert.

Der Vorteil der Anwendung von Phagendisplay, im Vergleich zu z.B. einem Yeast Two Hybrid *Screening* ist, dass in kurzer Zeit große Peptidbibliotheken nach Peptiden durchsucht werden können, die eine bestimmte Bindung mit dem Zielprotein eingehen. Dabei kann eine größere Bandbreite an unterschiedlichen Peptiden untersucht werden, da die Verwendung rein synthetischer Peptide eine Randomisierung jeder einzelnen Aminosäureposition zulässt.

Um Peptid-Liganden für GABARAP zu identifizieren wurde eine kommerzielle Phagenbibliothek (Ph.D.-12 Phage Display Library Kit, New England Biolabs, Frankfurt) verwendet, welche die Präsentation von 12 randomisierten Aminosäuren erlaubt. Als Target für die Selektion diente das GST-GABARAP-Fusionsprotein. Als Kontrolle wurde gegen GST selektiert.

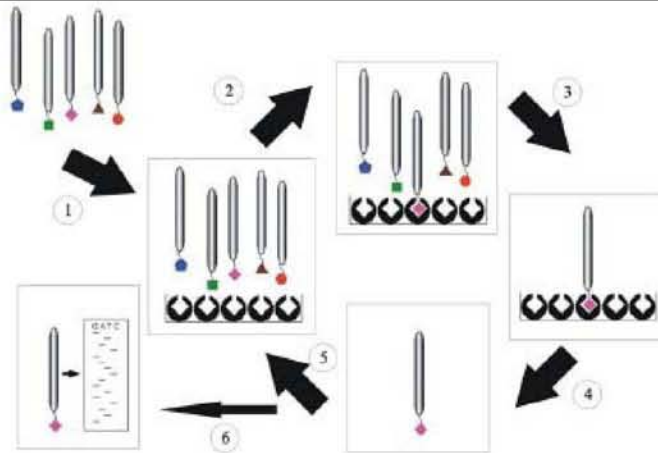


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung einer Phagendisplay-Selektion

1: Eine auf Phagen präsentierte Peptidbibliothek wird dem immobilisierten Zielprotein (GST oder GST-GABARAP) hinzugefügt. 2: Phagen, deren Peptid an das Zielprotein bindet, werden ebenfalls immobilisiert. 3: Nach einer Inkubationsphase werden ungebundene Phagen durch mehrere Waschschriffe entfernt. 4: Die verbliebenen Phagen werden durch eine Senkung des pH-Wertes eluiert. 5: Amplifikation der verbliebenen Phagen in *E. coli*. 6: Nach wiederholter Durchführung der Schritte 1-5 werden einzelne Phagen amplifiziert, deren DNS isoliert und sequenziert (modifiziert nach Kay et al.) (Kay et al. 1998).

Zur Durchführung der Selektion wurde GST-GABARAP in einer Konzentration von 100 µg/ml in 100 µl TBS (100 mM TrisCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) pro Mikrotiterplattenvertiefung immobilisiert. Hierfür wurden jeweils 200 µl Proteinlösung über Nacht bei 4 °C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden verbleibende Bindungsstellen der Mikrotiterplattenvertiefung mit je 200 µl Blockierungs-Puffer für 60 min unter leichtem Schütteln bei RT mit BSA geblockt. Danach wurden sechs Waschschriffe mit 200

µl TBST-Puffer durchgeführt. Für die Selektion wurden 10 µl Phagen der kommerziellen Phagenbibliothek in 100 µl TBST-Puffer für 20 min unter leichtem Schütteln in einer GST-GABARAP-beschichteten Mikrotiterplattenvertiefung inkubiert. Die nicht gebundenen Phagen wurden verworfen und anschließend zehnmal mit 200 µl TBST-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 µl 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2 für 10 min unter leichtem Schütteln. Das Eluat wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,1 neutralisiert und der Phagentiter nach jeder Selektionsrunde überprüft (*Output*-Titer). Zur Amplifikation der im Eluat enthaltenen Phagen wurde 9/10 des Eluats zu 20 ml einer *E. coli* ER2738-Kultur (OD₆₀₀ von 0,1) gegeben und 5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 20 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 1/6 Volumen Polyethylenglycol (PEG)/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde nun über Nacht auf Eis gefällt. Danach wurde 60 min bei 5000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml TBS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h auf Eis gefällt. Abschließend wurde 1 h bei 5000 g zentrifugiert und das Pellet in 100 µl TBS-Puffer resuspendiert. Nach einer Phagentiterbestimmung (*Input*-Titer) konnte immer die gleiche Menge (ca. 1×10^{11}) der so erhaltenen Phagen in die nächste Selektionsrunde eingesetzt werden. Nach fünf Selektionsrunden wurde der Erfolg der Selektion anhand eines „Anreicherungs-ELISAs“ überprüft. Dabei wird die durchschnittliche Bindungsstärke der Phagenmischung an das Zielprotein nach jeder Selektionsrunde im Verhältnis zu anderen Selektionsrunden gemessen. Bei einer erfolgreichen Selektion steigt das im ELISA detektierte Farbsignal unter Verwendung der Phagengemische nach den einzelnen Selektionsrunden im Verhältnis zu der Farbreaktion unter Verwendung des Phagengemisches vor Selektion an. War die Selektion erfolgreich, wurde ein „Einzelphagen-ELISA“ durchgeführt, bei dem die relative Bindungsstärke der einzelnen Phagenklone an GABARAP untersucht wurde. Die DNS der nach den ELISA-Ergebnissen ausgewählten Phagenklone wurde anschließend isoliert und die Aminosäuresequenz der auf diesen Phagen präsentierten Peptide über die DNS-Sequenzierung des im Phagen genom kodierten Peptids bestimmt.

TBS	TBS-T	Blockierungs-Puffer	Elutions-Puffer	Tris-HCl	PEG/NaCl
50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,5	0,1 % Tween-20 in TBS	10 mg/ml BSA in TBS	0,2 M Glycin-HCl pH 2,2	1 M Tris-HCl pH 9,1	20 % PEG-8000 2,5 M NaCl

3.7 Anti-Phagen „*Enzyme-linked immunosorbent assay*“ (ELISA)

Dieser Bindungstest ist ein häufig verwendeter Test zur schnellen Bestimmung relativer Bindungsstärken selektierter Peptide, die physikalisch mit dem Phagen verknüpft vorliegen. Er dient auch zur Bestimmung von (bei dieser Methode nicht selten auftretenden) Phagenvarianten, die z.B. aufgrund ihrer Affinität zur Plastikoberfläche der verwendeten Mikrotiterplatten angereichert werden, und die somit zur Verfälschung der Ergebnisse führen können. Die grundsätzliche Durchführung dieser Methode wurde von Sparks et al. beschrieben (Gill and von Hippel 1989; Sparks et al. 1995). Für den „Anreicherungs-ELISA“ wurden die Phagengemische vor der Selektion und nach den einzelnen Selektionsrunden verwendet, während beim „Einzelphagen-ELISA“ isolierte Phagenklone untersucht wurden. In Mikrotiterplatten wurden je Vertiefung 150 µl GST-GABARAP-Protein (1 µg/ml) in TBST-Puffer über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Verbleibende Bindungsstellen wurden durch eine 2-stündige Inkubation mit BSA-haltigem Blockierungspuffer abgesättigt. Je 20 µl der zu testenden Phagen wurden mit 180 µl Blockierungspuffer in einer Mikrotiterplatte für 20 min vorinkubiert. Es wurden immer gleiche Phagemengen eingesetzt. Anschließend wurde das Phagensuspension-Blockierungspuffer-Gemisch für 1 h zum immobilisierten GST-GABARAP-Protein gegeben. Nach sechs Waschschritten mit je 200 µl TBST-Puffer wurden je Ansatz 150 µl Anti-gpVIII/M13 Antikörper (PROGEN, Heidelberg) in einer 1:1000 Verdünnung zugegeben und die Platten für eine Stunde inkubiert. Nach weiteren sechs Waschschritten mit je 200 µl TBST-Puffer wurden je Vertiefung 150 µl des mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Anti-Maus Zweitantikörpers (PIERCE, Illinois, U.S.A.) in einer Verdünnung von 1:50000 zugesetzt. Erneut wurde sechs Mal mit je 200 µl TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion der gebundenen Phagen fand nach zehn weiteren Waschschritten unter Verwendung von 100 µl des Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)/Wasserstoffperoxid statt. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und oxidiert TMB, welches in seiner oxidierten Form eine tiefblaue Farbe zeigt. Die auftretende Farbreaktion wurde mit 100 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Farbintensität konnte mittels eines Fluostar Optima Mikrotiterplatten-Lesegerätes (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg) bei 450 nm quantifiziert werden.

ELISA-Färbelösung

1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in 1 ml DMSO +

9 ml 0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer (1 Kapsel Phosphat-Citrat-Puffer mit Natrium Perborat)

3.8 Anzucht einzelner Phagenklone

Zur Isolierung der Phagenklone wurden *E.coli* ER2738 Kolonien von einer Agarplatte in 20 ml LB/Tet-Medium übertragen und mehrere Stunden bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Erreichte diese Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6, wurde sie mit LB-Medium zu einer Bakteriensuspension mit einer OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Je 2 ml dieser Bakteriensuspension wurden in geeigneten Glasröhrchen vorgelegt und Einzelphagen von den Agarplatten der *Output*-Titer Bestimmung in je ein Aliquot überführt. Nach einer 5-stündigen Inkubationsphase bei 37 °C und 170 rpm wurden die Bakterien bei 4 °C und 3000 g abzentrifugiert und die Phagenüberstände bis zur weiteren Verwendung beim Einzelphagen-ELISA oder DNS-Isolierung bei 4 °C gelagert.

3.9 Pulldown-Experimente

Das *Pulldown*-Experiment ist eine *in vitro* Methode zur Bestimmung von Protein-Protein Interaktionen. Es dient als initiales *Screening*-Experiment zur Identifizierung von bisher unbekannten Protein-Protein-Wechselwirkungen, wird jedoch auch zur Bestätigung von vorhergesagten Interaktionen eingesetzt. Bei der Durchführung des *Pulldown*-Experiments wird das gereinigte Zielprotein (Köder) mit Hilfe eines *Tags* oder kovalent an ein Trägermaterial gebunden und einer Proteinlösung ausgesetzt. An das Zielprotein direkt oder indirekt bindende Proteine (Beute) können so aus der Lösung isoliert werden und nach einem Waschschriff und entsprechender Elution durch SDS-PAGE und Westernblot oder tryptischem Verdau mit anschließender Massenspektrometrie identifiziert werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurde rekombinantes Zielprotein (GABARAP oder CRT) an N-hydroxysuccinimid-aktivierte Sepharose (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) nach den Angaben des Herstellers gekoppelt. Gehirne von adulten Sprague Dawley Ratten wurden in Puffer A homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 13000 g entfernt. Der Zelleextrakt wurde anschließend zu je 100 µl Sepharose-gekoppeltem Zielprotein und zu 100 µl einer nicht gekoppelten Kontrollsepharose gegeben und 1,5 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Sepharose mit Puffer A wurden gebundene Proteine durch Zugabe von Puffer B eluiert und sofort mit einer Endkonzentration von 100 mM Tris, pH 8,8 neutralisiert. Eluierte Proteine wurden mit Hilfe von Methanol/Chloroform gefällt und auf ein Volumen von 30 µl eingengt. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE. CRT, GABARAP und CHC konnten immunologisch per Western Blot nachgewiesen werden. Die Stromstärke wurde während des

Blotvorgangs konstant auf 95 mA gehalten und überschritt nie die Spannung von 15 V. Die Blotzeiten variierten je nach Protein. Es wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Antikörper	Produktnummer/ Firma/ Firmensitz
Kaninchen Anti-GABARAP (polyklonal)	Bei Pineda/ Berlin hergestellt und affinitätsgereinigt.
Kaninchen Anti-CRT (polyklonal)	PA3-900/ Affinity BioReagents, Golden, USA
Maus Anti-CHC (monoklonal)	C43820-150/ BD Biosciences, Pharmingen
Ziege Anti-Kaninchen/HRP-gekoppelt	31460/ PIERCE, Illinois, U.S.A.
Ziege Anti-Maus/HRP-gekoppelt	31430/ PIERCE, Illinois, U.S.A.

Primärantikörper wurden generell 1:2000 verdünnt und über Nacht inkubiert, während die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper 1:15000 verdünnt wurden und nur 2 h bei RT inkubierten. Die Blotsignale wurden durch Chemilumineszenz visualisiert (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA) und mit Hilfe eines geeigneten Chemilumineszenz-Detektionssystems dokumentiert (ChemiDoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Puffer A	Puffer B
10 mM HEPES	50 mM Glycin, pH 2,3
150 mM NaCl	
pH 7,4	
3 mM EDTA	
1 mM β -ME	
Protease Inhibitor (Complete Mini, Roche	
Diagnostics, Germany),	
0,1 mg/ml DNase	
0,5 % Triton)	

3.10 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine Methode zur Untersuchung zahlreicher struktureller und dynamischer Eigenschaften von Biomolekülen. Dabei wird ein System mit fluoreszenten Eigenschaften durch Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt. Durch spontane Emission von Licht, welches detektiert wird, fällt das System in seinen Grundzustand zurück. Üblicherweise wird ein mit einem Fluorophor markiertes Substrat vorgelegt und der Ligand in aufsteigenden Konzentrationen hinzugeben. Durch die Bindung des Liganden an das Substrat und die damit verbundenen Konformationsänderungen (Änderung der chemischen Umgebung) verändern sich auch die fluoreszenten Eigenschaften des Fluorophors. Die Aminosäurereste Tyrosin, Phenylalanin und vor allem Tryptophan besitzen intrinsische fluoreszierende Eigenschaften, so dass diese Reste bei Proteinen alternativ zu anderen Fluorophoren verwendet werden können. Bei der vorliegenden Arbeit diente die Methode der Fluoreszenz-Titration zur Bestimmung der Dissoziationskonstante

(K_D -Wert) einer Substrat-Liganden-Wechselwirkung. Alle Messungen wurden an einem PerkinElmer LS55 Luminescence-Photometer (PerkinElmer, Überlingen) durchgeführt.

3.10.1 Fluoreszenzmessung von GABARAP mit fN1-, fN2- und fN3-Peptid

Drei, im Rahmen des Phagendisplays selektierte, Peptide wurden über Auftragssynthese beschafft (Jerini BioTools GmbH, Berlin) und waren carboxyterminal Fluorescein-gekoppelt (fN1, fN2 und fN3; Tab. 2.6). Sie wurden während der Fluoreszenzmessung als Substrat vorgelegt und die Fluoreszenzänderung von Fluorescein bei Zugabe des Liganden GABARAP gemessen. GABARAP enthält neun Tyrosinreste und sieben Phenylalaninreste, jedoch keinen Tryptophanrest. Die Anregungswellenlänge für Fluorescein liegt bei etwa 490 nm, die Fluoreszenzemission bei etwa 514 nm. Die Anregungswellenlänge des Fluoreszenzspektrometers wurde nach ersten Testmessungen auf 465 nm eingestellt und der Detektor auf die Emissionswellenlänge von 520 nm justiert. Die Spaltbreite des Anregungslichtes betrug 8 nm und die des Emissionslichtes 3 nm. Es wurden 2 μ M des jeweiligen Peptides in 1 ml des unten genannten Puffers in einer 1 ml Quarzküvette (Hella, Mühlheim) bei 25 °C (Thermo Haake 10) vorgelegt. Das in den gleichen Puffer dialysierte GABARAP Protein wurde in aufsteigenden Konzentrationen unter Rühren hinzu titriert und jeweils vor Datenaufnahme 2 min zwecks vollständiger Vermischung inkubiert. Pro Messpunkt wurden 300 Datenpunkte innerhalb von 30 s aufgenommen und gemittelt. Sobald keine signifikante Änderung der Fluoreszenz mehr erkennbar war, wurde die Titration beendet. Die Titrationsreihen wurden durch Mehrfachbestimmungen verifiziert und die Hintergrundfluoreszenz durch eine Kontrollmessung bestimmt, bei der statt GABARAP Puffer zu dem jeweiligen Peptid gegeben wurde. Zudem wurde in einer weiteren Kontrollmessung die Bindung des Fluorophors Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an GABARAP überprüft.

Puffer der Fluoreszenzmessung

20 mM HEPES
50 mM KCl
5 mM MgCl₂
pH 7,2

3.10.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) aus den Fluoreszenzdaten

Die Affinität der Bindung zwischen GABARAP und den Phagendisplay-selektierten Peptiden lässt sich durch die Dissoziationskonstante (K_D) beschreiben:

$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[PL]} \quad \text{(Gleichung 3.4)}$$

Dabei steht [P] für die Konzentration an freien Protein, in diesem Fall für GABARAP, [L] für die freie Liganden- bzw. Peptidkonzentration und [PL] für die Konzentration des Komplexes aus beiden Bindungspartnern.

Um die K_D -Werte aus den Fluoreszenzdaten abzuschätzen, wurde eine nichtlineare Regressionsrechnung mit dem SigmaPlot-Programm (Version 8.0) nach der Gleichung 3.5 angewendet.

$$F = F_{\min} + \left(\frac{[P_{\text{ges}}] + [L_{\text{ges}}] + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[P_{\text{ges}}] + [L_{\text{ges}}] + K_D}{4} \right)^2 - [P_{\text{ges}}] \cdot [L_{\text{ges}}]} \right) \cdot \frac{(F_{\max} - F_{\min})}{P_{\text{ges}}} \quad \text{(Gleichung 3.5)}$$

F = Fluoreszenz-Intensität des Proteins bei der entsprechenden Peptidkonzentration

P_{ges} = Gesamtprotein-Konzentration [μM]

L_{ges} = Gesamtligand-Konzentration [μM]

$F_{\min}$ = Fluoreszenz-Intensität des Peptids bei Titrationsstart

$F_{\max}$ = Fluoreszenz-Intensität des Peptids bei gesättigter GABARAP-Konzentration

K_D = Dissoziationskonstante [μM]

Gleichung übernommen aus (Tran 2005).

3.11 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR)-Spektroskopie ist eine markierungsfreie Technik zur Ermittlung der kinetischen Parameter von molekularen Interaktionen in Echtzeit. Das Detektionssystem eines SPR-Gerätes setzt sich aus einer monochromatischen, polarisierten Lichtquelle, einem Glasprisma, einem dünnen Goldfilm an der Basis des Prismas und einem Photodetektor zusammen (Abb. 3.2, A)

Der SPR-Effekt beruht auf einer kollektiven Schwingungsanregung freier Elektronen in sehr dünnen Edelmetallfilmen. Physikalische Grundlage ist die interne Totalreflexion von Licht in einem Prisma. Befindet sich an der Basis des Prismas eine von Flüssigkeit umgebende Edelmetallschicht, resultiert aus der Totalreflexion des eingestrahlt Lichtes ein evaneszendes Feld, welches mit Oberflächenplasmonen an der Metall/Flüssigkeitsgrenzfläche in Wechselwirkung tritt. Die Kopplung von reflektiertem Licht und Oberflächenplasmonen tritt nur bei einem speziellen Winkel (SPR-Winkel) auf, der von den optischen Eigenschaften des Prismas, dem Metall, der Schichtdicke des Metalls, der umgebenden Flüssigkeit und der Wellenlänge abhängt. Bei diesem Winkel tritt in dem reflektierten Licht ein Intensitätsminimum auf. Da der SPR-Winkel sensitiv für den Brechungsindex der Flüssigkeit in Kontakt mit dem Metall ist, ist der SPR-Effekt geeignet, um kleine Volumina nahe der Metalloberfläche auf Änderung des Brechungsindex zu untersuchen.

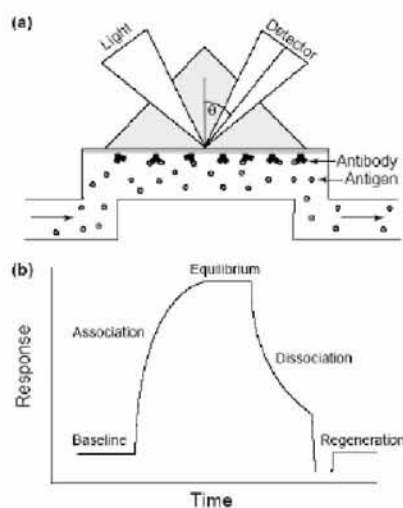


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines SPR-Experimentes. A: Schematische Darstellung einer SPR Detektionseinheit. Der Ligand (hier: Antikörper) wird an der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert. Der Analyt (hier: Antigen) fließt durch die mikrofluidische Flusszelle. Die Bindung von Ligand und Analyt kann als Änderung des Brechungsindex in der Flusszelle detektiert werden. B: Schematische Darstellung eines typischen Sensorgramms bei der Bindung des Analyten an den Liganden. Ist die Basislinie des Systems stabil, wird der Analyt injiziert. Die Bildung des Komplexes aus Analyt und Ligand kann in der Assoziationsphase beobachtet werden. Das Gleichgewicht (Equilibrium, *steady-state* Phase) ist erreicht, wenn die Dissoziation und die Assoziation des Analyten in gleichem Maße stattfinden. Nach dem Injektionsende kann die Dissoziation des Analyten im Sensorgramm beobachtet werden. Es erfolgt ein Regenerationsschritt, z.B. mit Puffer, um an der Oberfläche verbliebene Moleküle des Analyten abzuspülen. Abbildung aus Myszka und Rich (Myszka and Rich 2000).

Es werden Liganden an der Metall/Flüssigkeitsgrenzfläche immobilisiert und mit Puffer oder Injektionen von Analyten überströmt (Abbildung 3.2, A). Dieser Bereich wird Flusszelle genannt. Die Änderung des SPR-Winkels als Funktion der Zeit wird in *Response Units* (RU) in einem Sensorgramm dargestellt und erlaubt im Idealfall die Ermittlung kinetischer Charakteristika (Assoziations- und Dissoziationsrate) einer bi- oder multimolekularen Interaktion. Diese können mit Hilfe der Biaevaluation Software und unter Verwendung eines geeigneten Fitting-Modelles aus den Sensorgramm-Rohdaten gewonnen werden. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Algorithmus (1:1 Langmuir binding) geht von einer bimolekularen Interaktion aus und fittet Assoziations- und Dissoziationsraten aller Analytkonzentrationen global. Sind Assoziations- und Dissoziationsrate bekannt, kann die Dissoziationskonstante K_D nach folgender Formel berechnet werden.

$$K_D = \frac{K_{off}}{K_{on}} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Dabei steht K_{off} für die Dissoziations- und K_{on} für die Assoziationsrate. Können Assoziations- und Dissoziationsrate z.B. aufgrund von ungünstigen kinetischen Phänomenen nicht bestimmt werden, kann die Dissoziationskonstante alternativ über gemittelte Signalintensität des Analyten in Abhängigkeit von dessen Konzentration berechnet werden. Abbildung 3.2, B zeigt ein typisches Sensorgramm vor, während und nach der Injektion eines Analyten auf eine Liganden-gekoppelte Flusszelle.

Für jeden Fit wird von der BiaEvaluation Software ein χ^2 -Wert angegeben. Dies ist ein Parameter, der die Genauigkeit des Fits beschreibt und wird nach folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = \frac{\sum_1^n (r_f - r_x)^2}{n - p} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Dabei entspricht r_f dem gefitteten Wert bei einem gegebenen Datenpunkt, r_x dem Wert des entsprechenden Datenpunktes, n der Anzahl aller Datenpunkte und p der Anzahl der Fittingparameter. Bei Sensorgrammdaten ist die Anzahl der Datenpunkte viel größer als die Anzahl der gefitteten Datenpunkte, so dass $n-p \approx n$ angenommen wird. In der Praxis sind χ^2 -Werte kleiner als zehn üblich.

Die Immobilisierung eines Liganden auf einen Sensorchip kann mit unterschiedlichen Methoden erreicht werden. Dazu gehören kovalente Kopplungen, High Affinity Capture Methoden (Streptavidin-Biotin) und Adsorption von Lipidmono- und Lipidbilayern. Im Rahmen dieser

Arbeit wurden alle verwendeten Liganden per Aminkopplung kovalent an einen CM5-Chip gekoppelt. Dabei wird die Dextranmatrix mit 1-Ethyl-3(dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert, so dass die Carboxylgruppen der Dextranschicht des Sensorchips zu N-hydroxysuccinimid-Estern umgesetzt werden. So kann der Ligand über freie primäre Amine eine Peptidbindung zur Matrix ausbilden und ist kovalent immobilisiert. In einem letzten Schritt werden freie N-hydroxysuccinimid-Ester mit der Zugabe von Ethanolamin deaktiviert. Die Änderung des SPR-Winkels, welche bei der Bindung eines Moleküles an den Sensorchip im Sensorgramm verfolgt werden kann, ist proportional zu seiner Größe und erlaubt eine Abschätzung des Maximalsignals, welches bei der Bindung eines Analyten an den an die Messzelle immobilisierten Liganden zu erwarten ist.

Sensorgramme wurden ausschließlich mit dem auf SPR basierenden Biosensor Biacore X und der Software BIACORE X Control Software (Biacore AB, Uppsala) aufgenommen. Messungen wurden mit einer Datenerfassungsgeschwindigkeit von 1 oder 5 Hz, bei einer Temperatur von 21,5 °C durchgeführt.

Kopplungspuffer SPR
10 mM Na-Acetat, pH 5,5

Laufpuffer SPR (HBS-EP)
10 mM HEPES
150 mM NaCl
3 mM EDTA
0,005 % Surfactant P20 (SP20)
pH 7,4

Surfactant P20 (Polyoxyethylensorbitan) ist ein nicht-ionisches Detergenz, das adsorptive Effekte hydrophober Moleküle an den Oberflächen des Flusssystems, als auch nicht spezifische Bindung an die Oberfläche des Sensorchips verhindern soll. Nach der Äquilibration des BiacoreX-System bzw. nach Erreichen einer stabilen Puffer-Basislinie konnte die Kopplung und anschließend Bindungsstudien durchgeführt werden. Dabei wurden die Proben prinzipiell mit der so genannten „*Double Bubble*“-Technik aufgetragen, bei der die Probe gefolgt von 5 µl Luft und weiteren 5 µl Probe in das System injiziert wird. Dadurch soll die Diffusion der jeweiligen Probe in den Laufpuffer verhindert werden.

3.11.1 Aminkopplung von GABARAP oder MAP-LC3

Für die GABARAP- bzw. MAP-LC3-Kopplung wurden CM5 Sensorchips (Biacore AB, Uppsala) verwendet; die Flussgeschwindigkeit betrug 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zur Oberflächen-Aktivierung des Sensorchips wurden 35 μl eines NHS/EDC-Gemisches injiziert (0,05 M NHS, 0,2 M EDC). In der Kopplungsphase wurden 35 μl GABARAP bzw. MAP-LC3 (1 bis 2 μM GABARAP bzw. MAP-LC3 in Kopplungspuffer) injiziert und der Sensorchip anschließend durch Zugabe von 35 μl Ethanolamin (1 M) deaktiviert. Diese Prozedur wurde für beide Flusszellen (Fc) getrennt durchgeführt, wobei nur die Messzelle Fc2 mit GABARAP bzw. MAP-LC3 gekoppelt und anschließend die Referenzzelle Fc1 in gleicher Weise, jedoch ohne Protein behandelt wurde.

Bei den folgenden Messungen wurde das Signal der Referenzzelle bei der Datenprozessierung vom Signal der Messzelle abgezogen, um Änderungen des Brechungsindex und unspezifische Bindungseffekte an die Chip-Oberfläche zu eliminieren und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern.

3.11.2 Bindungsstudie GABARAP an N1-Peptid, CRT (178-188) und CHC (510-522)

Die Peptide CRT (178-188) und CHC (510-522) wurden vom Analytischen Zentrallabor des BMFZ (Düsseldorf) durch Auftragssynthese beschafft, das N1-Peptid von Jerini BioTools GmbH (Berlin). Die Bindungsstudien von GABARAP an das entsprechende Peptid (Tab. 2.6) wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt um Massentransportlimitierung zu vermeiden. Dieses Phänomen kann zwischen Ligand (hier: GABARAP) und Analyt (hier: Peptid) auftreten, wenn Analytverarmung zu einer Verlangsamung der apparenten Assoziationsrate führt. Massentransporteffekte können durch hohe Flussraten vermieden werden. Bei der Beurteilung der Kinetiken ist es wichtig, Massentransportlimitierung ausschließen zu können, da Massentransport-limitierte Reaktionen niedrigere kinetische Raten vortäuschen, als tatsächlich vorhanden sind.

Es wurden verschiedene Konzentrationen (0,1 bis 100 μM) von in Laufpuffer gelöstem Peptid hergestellt. Die Injektion von je 60 μl pro Probe fand statt, wenn das Signal die Basislinie wieder erreicht hatte. Dabei erfolgte die Reihenfolge der Probeninjektionen willkürlich, um systematische Fehler zu vermeiden. Die SPR-Bindungsstudie von CRT (178-188) an GABARAP wurde in Zusammenarbeit mit Frau Yvonne Hoffmann durchgeführt.

3.11.3 Bindungsstudie GABARAP an CRT

Die Bindungsstudie von GABARAP an CRT (Abcam, Cambridge) wurde bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt um das Phänomen des Massentransportes zu vermeiden. Dabei wurden verschiedene CRT-Konzentrationen (0,1 bis 2 μM) in beliebiger Reihenfolge in das System injiziert, um systematische Fehler zu reduzieren. Nach jeder Injektion fand eine Regeneration der Chipoberfläche durch Injektion eines Hochsalzpuffers (HBS-EP, 500 mM NaCl) und anschließender Injektion von 10 μM eines hochaffinen ($K_D=150$ nM) GABARAP-Peptidliganden statt.

3.11.4 Bindungsstudie MAP-LC3 an CRT

Es wurde bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ gearbeitet, um das Phänomen des Massentransportes zu vermeiden. Um Konzentrationseffekte zu umgehen wurden verschiedene CRT-Konzentrationen (0,1 bis 7,5 μM) in beliebiger Reihenfolge injiziert. Eine Regeneration der Chipoberfläche war nicht notwendig, da die Basislinie nach Injektionsende innerhalb von Sekunden wieder das Niveau vor Injektion erreichte. Nach einem Waschschrift mit Laufpuffer wurde hier die nächste Injektion vorgenommen.

3.11.5 Datenprozessierung

Die Referenzierung der Daten fand mit Hilfe der Biaevaluation Software (Biacore AB, Uppsala) durch Subtraktion des Sensorgramms der Referenzzelle Fc1 von dem entsprechenden Sensorgramm der Messzelle Fc2 statt. Damit werden Unterschiede im Brechungsindex und unspezifische Interaktionen mit der Chipoberfläche eliminiert und das „Signal-zu-Rausch-Verhältnis“ verbessert. Durch die Durchführung eines „*Double Referencing*“, bei dem von dem Signal jeder Probeninjektion das Signal einer Pufferinjektion abgezogen wird, können Einflüsse, die durch den Puffer verursacht wurden, eliminiert werden (Myszka 1999).

3.11.5.1 GABARAP – N1, CRT (178-188) und CHC (510-522)

Der Injektionsstart der referenzierten Daten von jeder Injektion aus dem entsprechenden Versuch, wurde mit Hilfe der BiaEvaluation-Software auf die Koordinaten ($t=0$ s, Response=0 RU) gebracht. Die Sensorgramme aller Injektionen aus einem Versuch wurden in einem Plot übereinander gelegt und in dieser Form in Biaevaluation ausgewertet. Dabei erfolgte die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D durch Analyse der Daten der Gleichgewichtsphase (*steady state* Phase) jeder Injektion.

3.11.5.2 GABARAP - CRT

Der Injektionsstart der referenzierten Daten von jeder Injektion aus dem entsprechenden Versuch wurde mit Hilfe der BiaEvaluation-Software auf die Koordinaten ($t=0$ s, Response=0 RU) gebracht. Die Injektionen wurden in einem Plot übereinander gelegt und mit Hilfe der Biaevaluation Software ausgewertet. Die Parameter der Bindungskinetik wurden mit dem Modell eines „1:1 (Langmuir) Binding“, welches für die gesamte Konzentrationsreihe globale Assoziations- und Dissoziationsphase fittet, ausgewertet.

3.12 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die Kernresonanz-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) ist eine Methode, die unter anderem zur Aufklärung der Struktur, sowie zur Untersuchung von Dynamik und Interaktionen von biologischen Makromolekülen dient (Stangler et al. 2006). Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie, bei der nur kristallisierte Festkörper analysiert werden können, arbeitet die NMR-Spektroskopie mit wässrigen Proteinlösungen, die den physiologischen Bedingungen näher kommen.

Das NMR-Titrationsexperiment ist eine weit verbreitete und sensitive Methode, um Protein-Protein- bzw. Protein-Ligand-Interaktionen strukturell zu untersuchen und ihre Kontaktstellen zu kartieren (Otting and Wuthrich 1990; Zuiderweg 2002). Mit dieser Methode können auch Protein-Protein-Interaktionen mit geringer Affinität beobachtet und charakterisiert werden. Meistens wird dafür ein heteronukleares 2D Einbindungskorrelationsexperiment für (^1H - ^{15}N -) Korrelationen ((^1H - ^{15}N)-HSQC) aufgenommen. Dafür muss das Protein ^{15}N -isotopenangereicht sein. Ein (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum weist für jede Amidgruppe des Protein-Rückgrats ein Signal bei der spezifischen Resonanzfrequenz (bzw. der chemischen Verschiebung) des Amidprotons und des Amidstickstoffs auf, wobei diese chemischen Verschiebungen von der chemischen Umgebung der jeweiligen Amidgruppe abhängen. Auch die Amidgruppen der Aminosäureseitenketten Trp, Asn und Gln zeigen im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum ein Signal. Eine Änderung der chemischen Umgebung der Amidgruppen z.B. durch Bindung eines Liganden kann somit direkt als eine Änderung der chemischen Verschiebung der Korrelationssignale im (^1H - ^{15}N)-HSQC beobachtet werden.

3.12.1 Probenvorbereitung für die NMR-Messung

Für die Aufnahme von (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren wurde lyophilisiertes ^{15}N -isotopenangereichertes GABARAP Protein ($[U\text{-}^{15}\text{N}]\text{-GABARAP}$) in einer Konzentration von 30-210 μM im unten genannten Puffer 25 mM Natriumphosphat, 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 100 μM Natriumazid, pH 6,9 aufgenommen. Der zu untersuchende, nicht-isotopenangereicherte Peptid- bzw. Proteinligand wurde in den gleichen Puffer gebracht und während der (^1H - ^{15}N)-Experimente dem vorgelegten ($U\text{-}^{15}\text{N}$)-GABARAP Protein hinzugefügt. Die Messung der NMR-Proben erfolgte in 5 mm Shigemi NMR-Probenröhrchen (BMS-005V, Shigemi, Tokio). Die (^1H - ^{15}N)-HSQC Titration von $[U\text{-}^{15}\text{N}]\text{-GABARAP}$ mit dem Peptid CRT (178-188) wurde in Zusammenarbeit mit Frau Yvonne Hoffmann durchgeführt.

Puffer der NMR-Messungen

25 mM Natriumphosphat
100 mM KCl
100 mM NaCl
100 μM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
50 μM EDTA
5 % Deuterium
0,02 % (w/v) Natriumazid
pH 6,9

3.12.2 NMR-Messbedingungen und Spektrenauswertung

Die NMR-Spektren wurden bei 25 °C an Varian UNITY INOVA Spektrometern bei einer Protonenfrequenz von 600 MHz aufgenommen, die mit einem Varian 5mm XYZ-PFG- $^1\text{H}\{^{13}\text{C}^{15}\text{N}\}$ oder einem cryogen gekühlten Varian Z-PFG- $^1\text{H}\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ Probenkopf ausgestattet waren. Die Prozessierung erfolgte mit den Programmen VNMRJ (Version 1.1C, Varian, Palo Alto, USA) und NMRPipe (Version 1.7; Delaglio et al.). Für die Visualisierung und Auswertung wurden die Programme NMRDraw (Version 1.7) (Delaglio et al. 1995) und NMRView (Johnson and Blevins 1994) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von GABARAP-bindenden Peptiden und Charakterisierung der Interaktion

Zunächst wurde GST-GABARAP exprimiert und gereinigt, um es anschließend in die Phagendisplay-Selektion einzusetzen. Via Anreicherungs- und EinzelpHagen-ELISA wurde der Erfolg der Phagendisplay-Selektion überprüft und die DNS-Sequenz der GABARAP-bindenden Peptide analysiert. Die Interaktion von einzelnen Peptiden zu GABARAP wurde mit Hilfe von Fluoreszenztitrationsexperimenten, Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) Messungen und Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) charakterisiert.

4.1.1 Expression und Reinigung GABARAP

Für die Untersuchung von GABARAP mittels NMR-Spektroskopie wurde die Expression des GST-GABARAP-Fusionsproteins in M9-Minimalmedium (Sambrook et al. 1989) durchgeführt, wobei ^{15}N -Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle diente. Für alle weiteren Experimente wurde nicht-isotopenangereichertes GST-GABARAP-Fusionsprotein in LB-Medium exprimiert. Dabei wurden 1 bis 4 l Medium mit pGEX-GABARAP tragenden *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Bakterien beimpft und die Expression des GST-GABARAP-Fusionsproteins bei einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6 bis 0,8 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. 10 bis 12 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet und der Erfolg der Expression mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 4.1, Spuren 2 und 3). Pro Liter Bakterienkultur konnten 3 bis 4 g Zellen (Nassgewicht) gewonnen werden.

Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und das Zelllysate zentrifugiert. Das im Überstand (Rohextrakt) verbleibende GST-GABARAP-Fusionsprotein wurde im Zuge einer Affinitätschromatographie an eine GSTrap-Säule gebunden und nach einigen Waschschritten der Säule mit Puffer durch die Zugabe von reduziertem Glutathion eluiert (Abb. 4.1, Spuren 4 und 5). Zur Durchführung der Phagendisplay-Selektion wurde das GST-GABARAP-Fusionsprotein anschließend gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Aliquots dieses Proteins mit geeigneter

Quantität und Qualität wurden anschließend in TBS Puffer aufgenommen und in die Selektion eingesetzt. Zur Reinigung von GABARAP wurde das eluierte GST-GABARAP-Fusionsprotein mittels Dialyse in einen geeigneten Proteolysepuffer (PBS) überführt und nach Zugabe von 125 U Thrombinprotease pro g Nasszellgewicht unter weitgehendem Sauerstoffausschluss bei RT inkubiert. Die Spaltung des Fusionsproteins in GST und GABARAP war nach 24 bis 48 h weitgehend abgeschlossen und wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.1, Spuren 5 und 6). Der proteolytische Verdau wurde auf ein maximales Volumen von 7 ml eingengt und die Spaltprodukte über Größenausschlußchromatographie voneinander getrennt (Abb. 4.2) und wurde mittels SDS-PAGE verifiziert (Abb. 4.1, Spur 7).

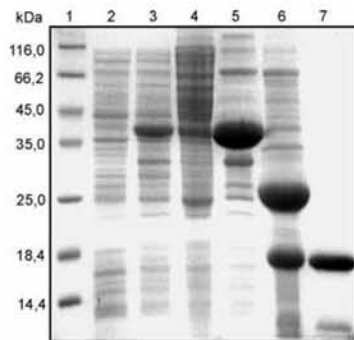


Abbildung 4.1: 15% SDS-PAGE zur Analyse der Expression und Reinigung von rekombinantem GABARAP. Spur 1: Molekulargewichts-Marker (MBI, Fermentas); Spur 2: Bakterienrohlysat vor Induktion; Spur 3: Bakterienrohlysat 10 h nach Induktion; Spur 4: Überstand des Zellaufschlusses nach Zentrifugation; Spur 5: Eluat des GST-GABARAP-Fusionsproteins nach affinitätschromatographischer Reinigung über GSTrap-Säule und vor Thrombinverdau; Spur 6: Thrombinspaltprodukte GST und GABARAP nach 24 h Verdau; Spur 7: GABARAP nach Trennung der Spaltprodukte durch Größenausschlußchromatographie

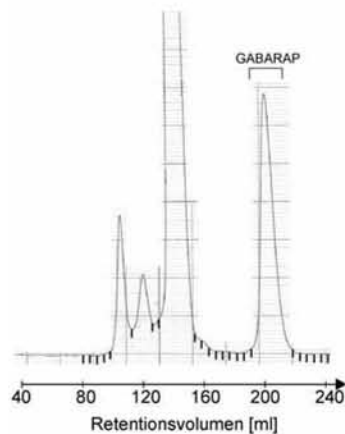


Abbildung 4.2: Chromatogramm der Größenausschlußchromatographie der Spaltprodukte nach Thrombinverdau des GST-GABARAP-Fusionsproteins. Verwendet wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 75 µg Gelfiltrationssäule. GABARAP eluierte bei einem Retentionsvolumen zwischen 190 und 218 ml. Deutlich zu sehen ist die Trennung von GST, restlichem GST-GABARAP-Fusionsprotein und Thrombin, welche zwischen 100 bis 150 ml Retentionsvolumen eluieren.

4.1.2 Phagendisplay-Selektion

Zur Identifizierung von GABARAP-bindenden artifiziellen Peptiden wurde ein *Screening* der Ph.D.-12-Phagenbibliothek durchgeführt. Die Phagen dieser Bibliothek präsentieren auf ihrer Oberfläche Peptide mit 12 randomisierten Aminosäuren. Bei der sequenziellen Durchführung mehrerer Selektionsrunden sollten diejenigen Phagen angereichert werden, die auf ihrer Oberfläche Peptide mit einer hohen Bindungsaffinität zum Zielmolekül, in diesem Fall GABARAP, besitzen. Die Selektion wurde, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, in Mikrotiterplatten mit dem Selektionspuffer TBS durchgeführt. Am Ende jeder Selektionsrunde wurde der *Output*-Titer der Phagen-Elution und nach der anschließenden Amplifikation der jeweilige *Input*-Titer bestimmt. In jede neue Selektionsrunde wurden ca. 1×10^{11} Phagen eingesetzt. Nach fünf Selektionsrunden wurde ein „Anreicherungs-ELISA“ durchgeführt, um den Erfolg der Selektion zu überprüfen.

4.1.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

GST-GABARAP oder GST wurden auf einer Plastikoberfläche immobilisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit der Phagenmischung aus den einzelnen Selektionsrunden, wobei die Anzahl der zugesetzten Phagen immer gleich groß war. Nach acht Waschschritten wurde die Menge der gebundenen Phagen mittels Farbreaktion visualisiert und zwecks Quantifizierung die Absorption bei 450 nm detektiert. Da die Signalintensität proportional zu der Menge des umgesetzten Substrates ist und diese wiederum proportional zu der Menge des gebundenen Antigens, gibt die Signalintensität die mittlere Bindungsstärke der getesteten Phagenmischungen zu GABARAP relativ zueinander an. Es wurden jeweils Zweifachbestimmungen durchgeführt und die Ergebniswerte gemittelt. Bei den Phagen vor Selektion (Selektionsrunde 0) ist die Signalintensität deutlich schwächer als bei den Phagen der folgenden Selektionsrunden (1 bis 5), was auf eine erfolgreiche Anreicherung von GABARAP-bindenden Phagen schließen lässt (Abb. 4.3).

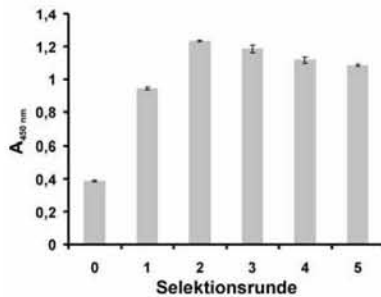


Abbildung 4.3: Anreicherungs-ELISA: Signalquantifizierung über die Absorption bei 450 nm. GABARAP wurde auf einer Plastikoberfläche immobilisiert und mit Phagengemischen der entsprechenden Selektionsrunde inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurden die gebundenen Phagen mittels Farbreaktion visualisiert und bei 450 nm detektiert. Je größer das detektierte Signal, desto mehr GABARAP-bindende Phagen sind nach der jeweiligen Selektionsrunde angereichert worden. Die Fehlerbalken werden durch die Differenz zwischen den beiden originalen Messwerten definiert.

Bevor die Sequenzierung der Phagen-DNS erfolgte, wurden mittels „Einzelphagen-ELISA“ eventuell vorhandene Plastik-bindende, GST-bindende oder nicht-bindende Einzelphagen ermittelt und zwischen stark und schwach bindenden Phagen unterschieden. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem „Anreicherungs-ELISA“, hier wurden 70 isolierte Einzelklone untersucht. Als Kontrolle diente immobilisiertes GST, welches in einem parallelen Ansatz mit den Einzelphagen inkubiert wurde. Die Intensität der Färbung gibt die relative Bindungsstärke der getesteten Phagenvarianten zueinander an. Die Phagenklone 24, 30, 32 und 66 zeigen die schwächste Bindung an GST-GABARAP. Alle weiteren Phagenklone zeigen eine deutlich stärkere Bindung an GST-GABARAP, als an GST alleine. Ein besonders starkes Signal ist bei Phagenklon Nummer 8 zu beobachten (Abb. 4.4).

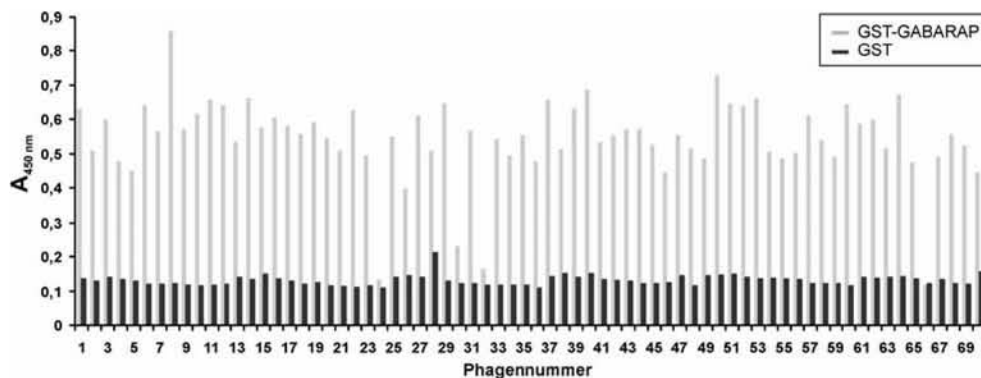


Abbildung 4.4: Einzelphagen-ELISA: Quantifizierung der Absorption bei 450 nm. GABARAP wurde auf einer Plastikoberfläche immobilisiert und mit einer definierten Menge von isolierten Einzelphagen inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurde die Menge an gebundenen Phagen mittels Farbreaktion visualisiert und bei 450 nm detektiert. Je größer das detektierte Signal, desto stärker ist die Bindung des entsprechenden Phagen an GST-GABARAP (graue Balken) bzw. GST (schwarze Balken).

Die Sequenzierung der Phagen-DNS zeigte, dass die selektierten GABARAP-bindenden Peptide keine einzelne dominierende Sequenz aufweisen. In Abbildung 4.4, A sind die Sequenzen aller selektierten Peptide mit Hilfe der ClustalW Software als Sequenzalignment dargestellt. Die Erstellung eines phylogenetischen Baums mit Hilfe der gleichen Software visualisiert die Ähnlichkeitsverhältnisse der selektierten Peptide (Abb. 4.5, B).

Außer dem Peptid des Phagen Nummer 24 enthalten alle Peptide mindestens einen aromatischen Rest, meist ein Tryptophan. Ausnahmen bilden dabei die Peptide der Einzelphagen Nummer 12, 27, 30 und 32, die statt Tryptophan eine andere aromatische Aminosäure beinhalten. Das Peptid des Phagen Nummer 66 besteht aus nur 3 Aminosäuren (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzen SHFQSWELVSTP (N2), NHRTPELGHYEW (N3) und GHLSDWVYVPMR (N4) wurden je dreimal gefunden, während alle restlichen Sequenzen nur zwei- oder einmal vorkommen.

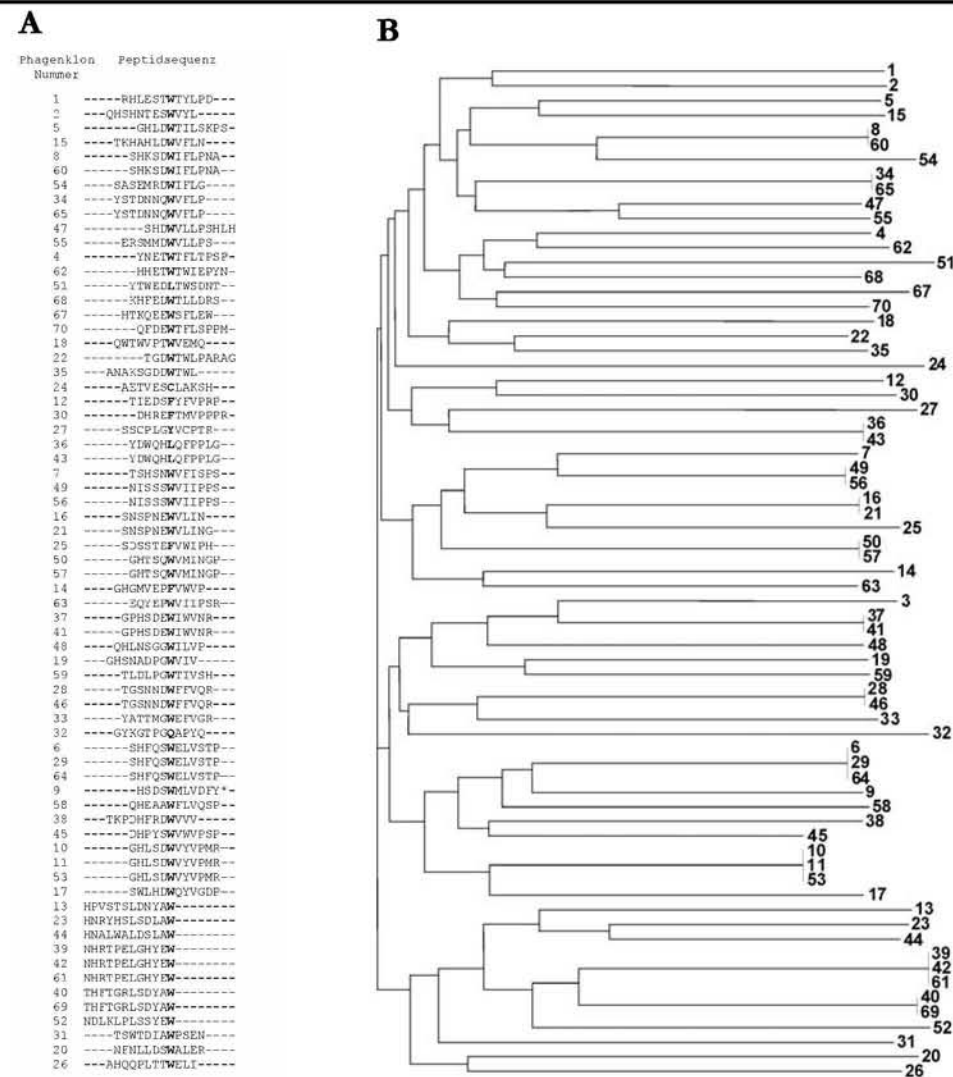


Abbildung 4.5: Analyse der Phagen Display selektierten Peptidsequenzen 1 bis 70 A: Sequenzalignment der Peptidsequenzen, erstellt mit ClustalW. Dick gedruckt ist die Aminosäureposition hervorgehoben, die in den meisten Peptiden ein Tryptophan aufweist. **B:** Phylogramm der selektierten Peptide, erstellt mit Hilfe von ClustalW. Die Zweiglänge zwischen den Knotenpunkten ist proportional zum Maß der Aminosäure-Unterschiede.

4.1.4 Bestimmung der Bindungsaffinität der über Phagendisplay selektierten Peptide an GABARAP

Um die relative Bindungsaffinität einzelner selektierter Peptide zu GABARAP zu bestimmen, wurden drei Peptide per Auftragssynthese hergestellt. Aufgrund der auftretenden Häufigkeit der Sequenzen wurden Peptid SHFQSWELVSTP (N2) und NHRTPELGHYEW (N3) ausgewählt. Zusätzlich wurde das Peptid SHKSDWIFLPNA (N1) benutzt, welches der Sequenz der Phagenklone 8 und 60 entspricht, da das Ergebnis des Einzelphagen-ELISA eine starke Bindungsaffinität zu GABARAP vermuten ließ (Abb. 4.4, Phagenklon 8). Alle drei Peptide wurden mit einem carboxyterminalen Fluorescein-*Label* synthetisiert, um die Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenzspektrometrie zu erleichtern (fN1, fN2 und fN3). N1 wurde zusätzlich auch ohne Fluorescein-*Label* synthetisiert und war carboxyterminal amidiert.

4.1.4.1 Bestimmung der Bindungsaffinität von fN1, fN2 und fN3 zu GABARAP mit Fluoreszenzspektroskopie

Die Bindungsaffinität von fN1, fN2 und fN3 zu GABARAP wurde mittels Fluoreszenztitration untersucht. Dabei wurde die Dissoziationskonstante (K_D -Wert) anhand der Änderung der Fluorescein-Fluoreszenz des jeweiligen Peptids bei GABARAP-Zugabe ermittelt (Kap. 3.10). Zu diesem Zweck wurden 2 μM des jeweiligen Peptides vorgelegt und GABARAP dazu titriert. In einer Kontrollmessung wurde die Bindungsaffinität von GABARAP zu FITC überprüft. In Abbildung 4.6 ist die Änderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der GABARAP-Konzentration dargestellt. Die nichtlineare Regressionsrechnung wurde anhand Gleichung 3.5 durchgeführt. Tabelle 4.1 zeigt die ermittelten K_D -Werte der einzelnen Messungen.

GABARAP interagiert mit einem K_D -Wert von 0,7 μM mit dem Peptid fN1 und mit einem K_D von 1 μM mit fN2. Mit 12 μM ist die Bindungsaffinität zu fN3 ca. um das 15-fache schwächer. Die Dissoziationskonstante von GABARAP zu FITC beträgt 61 μM und stellt somit relativ zur Affinität von fN1 und fN2 zu GABARAP eine vernachlässigbar geringe Interaktionsstärke dar.

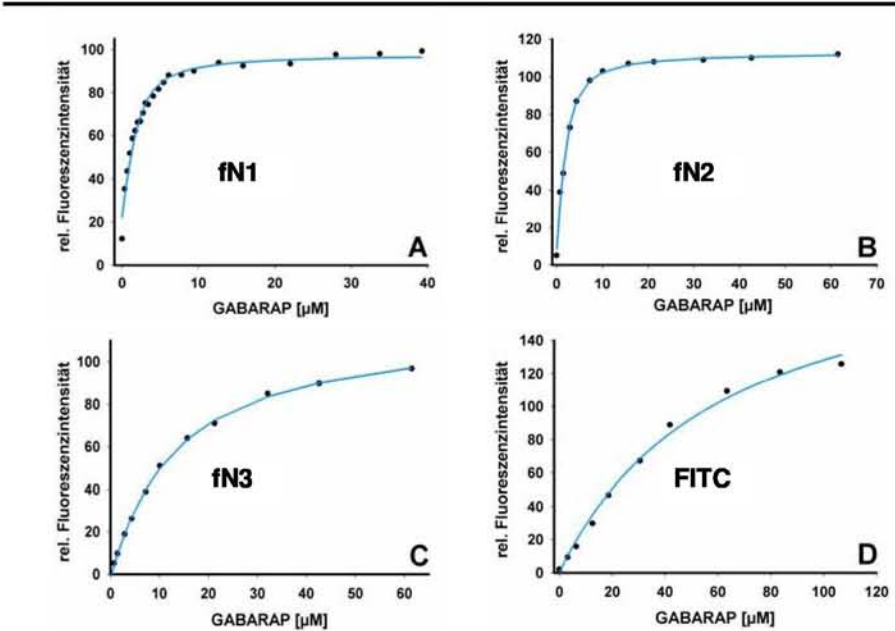


Abbildung 4.6: Fluoreszenztitration von GABARAP zu fN1 (A), fN2 (B), fN3 (C) und FITC (D). Es wurde 2 μM des jeweiligen Peptids bzw. FITC in einem Volumen von 1 ml vorgelegt und GABARAP in aufsteigenden Konzentrationen dazu titriert. Dargestellt sind die gemittelten Fluoreszenzintensitäten nach Abzug des Hintergrundes (schwarze Punkte). Die Excitationswellenlänge war 465 nm und der Detektor wurde auf die Emissionswellenlänge von 520 nm justiert. Der Fit der nichtlinearen Regressionsrechnung der Datenpunkte (blaue Linie) wurde unter Annahme einer einfachen, bimolekularen Reaktion durchgeführt.

	K_D -Wert [μM]
fN1	$0,70 \pm 0,1$
fN2	$0,95 \pm 0,1$
fN3	$11,80 \pm 0,6$
FITC	$61,00 \pm 7,0$

Tabelle 4.1: Dissoziationskonstanten der Interaktion von GABARAP mit fN1, fN2, fN3 und FITC. Die Berechnung der K_D -Werte erfolgte durch nichtlineare Regression der Fluoreszenzdaten (Gleichung 3.5).

4.1.4.2 Bestimmung der Bindungsaffinität von N1 zu GABARAP mit Oberflächenplasmonenresonanz

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität von N1-Peptid zu GABARAP wurden Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR)-Bindungsstudien (Kap. 3.11) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden ca. 2000 RU GABARAP in 10 mM NaAcetat pH 5,5 nach Anweisungen des Herstellers auf einen CM5-Chip gekoppelt (Daten nicht gezeigt). Bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurden anschließend unterschiedliche Konzentrationen von N1-Peptid für jeweils 2 min injiziert. Die Reihenfolge der Injektionen richtete sich dabei nicht nach der jeweiligen Konzentration, sondern wurde zufällig gewählt, um systematische Fehler zu vermeiden. In Abbildung 4.7, A ist die Sensorgramm-Überlagerung der N1-Injektionen gezeigt. Die gemittelte Signalintensität der „*steady state*“ Phase der jeweiligen Bindungskurve ist als schwarzer Balken dargestellt. Wie in Kapitel 3.11 beschrieben, wurden die Daten mit Hilfe der BIAevaluation Software prozessiert und gefittet (Abb. 4.7, B). Dabei ergab sich ein K_D -Wert von 8,6 μM für die GABARAP-N1 Bindung. Der dazugehörige χ^2 -Wert - ein Parameter zur Beschreibung der Genauigkeit des Fits - lag bei einem Wert von 4, was eine hohe Übereinstimmung der Fitdaten mit den Messdaten widerspiegelt.

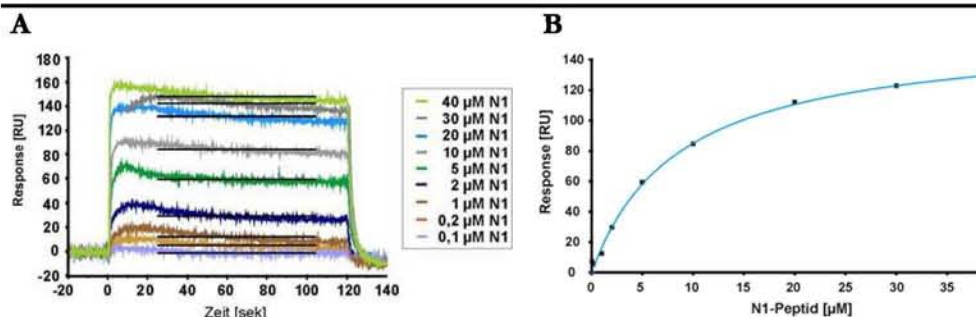


Abbildung 4.7: Bindungsstudie von GABARAP und N1-Peptid mit Oberflächenplasmonenresonanz **A:** Sensorgramm-Überlagerung der Bindungskurven unterschiedlicher N1-Konzentrationen injiziert auf einen GABARAP-gekoppelten CM5-Chip. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurde je 2 min injiziert. Die schwarzen Balken markieren die gemittelte Signalintensität der „*steady state*“ Phase der jeweiligen Injektion. **B:** Bindungskurve der N1-GABARAP Interaktion. Die gemittelte Signalintensität der jeweiligen Injektion ist gegen die entsprechende N1-Konzentration aufgetragen. Der Fit der nichtlinearen Regressionsrechnung ist als blaue Linie dargestellt.

4.1.5 Strukturelle Charakterisierung der Bindung von N1-Peptid an GABARAP mit NMR-Spektroskopie

Zur Kartierung der Bindungsregion von GABARAP für das N1-Peptid wurden NMR-Experimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -isotopenmarkiertem GABARAP vor und nach Zugabe von nicht-isotopenangereichertem N1-Peptid aufgenommen. Wie in Kapitel 3.12 ausgeführt, ist bei einem $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Spektrum für jede Amidgruppe des Protein-Rückrads ein $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -Korrelationssignal zu beobachten. Dabei sind die chemischen Verschiebungen des jeweiligen Korrelationssignals abhängig von der direkten chemischen Umgebung der Amidgruppe. Ändert sich die chemische Umgebung einer Amidgruppe, z.B. durch Bindung eines Liganden, kann dies direkt als Änderung der chemischen Verschiebungen der jeweiligen Amidprotonen- und Amidstickstoffresonanzen im $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Spektrum beobachtet werden. Dieser Effekt gilt für Aminosäurereste, die direkt von der Bindung betroffen sind, aber auch für solche, die durch Konformationsänderungen des Proteins indirekt beeinflusst werden.

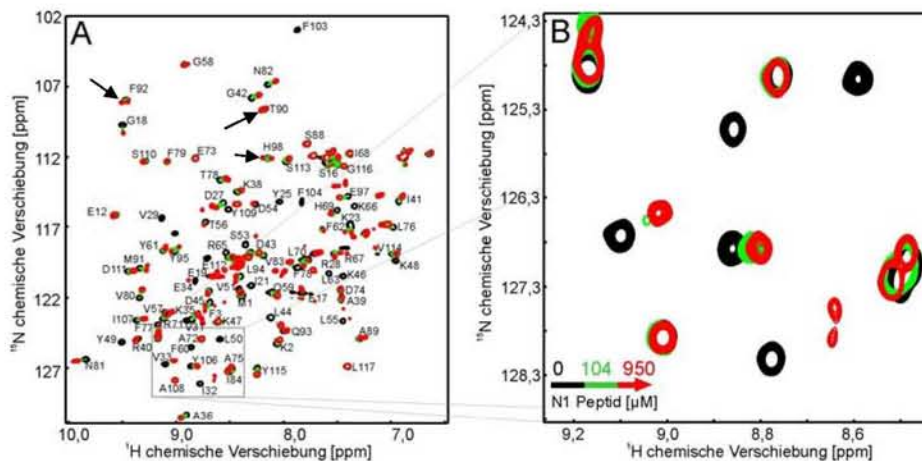


Abbildung 4.8: Überlagerung der $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Spektren von GABARAP im freien Zustand und bei Bindung an das N1-Peptid. A: Überlagerung der Gesamt- $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Spektren von 213 μM GABARAP ohne Zusatz (schwarz) und in Anwesenheit von 104 μM (grün) und 950 μM (rot) N1-Peptid. Die Zuordnung der Protein-Rückrad Resonanzen nach Stangler et al. ist in schwarz angegeben (Einbuchstaben-Aminosäure-Kode)(Stangler et al. 2002). Die Pfeile kennzeichnen beispielhaft Resonanzen, die nach Peptidzugabe einen doppelten Signalsatz zeigen. B: Vergrößerung des in (A) markierten Bereiches.

Abbildung 4.8 zeigt das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von GABARAP-Spektrum vor Titration und nach Zugabe von 104 μM (grüne Signale) und 950 μM (rote Signale) N1-Peptid. Die Zuordnung der Amidprotonen und Amidstickstoffresonanzen des freien GABARAP Proteins im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum fand nach Stangler et al. statt (Stangler et al. 2002). Für die meisten GABARAP-Resonanzen sind eine Änderung der chemischen Verschiebungen und/oder eine Signalverbreiterung nach der Zugabe des N1-Peptids zu sehen. Zur besseren Übersichtlichkeit sind bei der Kartierung der N1-Peptid Bindestelle an GABARAP nur diejenigen Resonanzen berücksichtigt worden, die aufgrund von Signalverbreiterung nicht mehr detektierbar und somit am stärksten betroffen sind. Die Kartierung ist in Abbildungen 4.9 und 4.10 visualisiert.

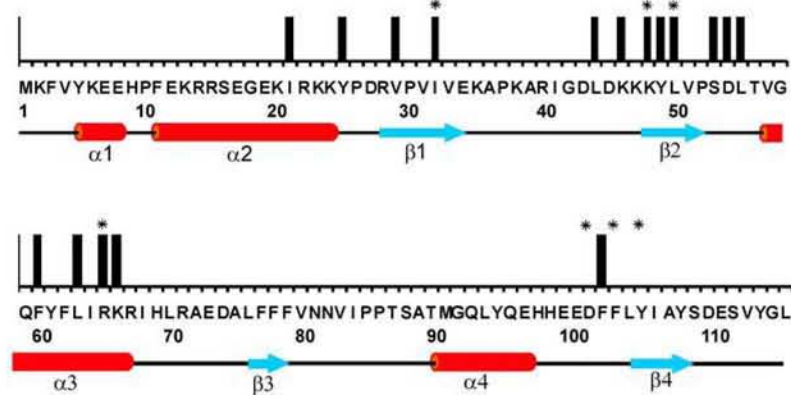


Abbildung 4.9: Lokalisierung der N1-Peptid Bindestelle von GABARAP. Unter der Darstellung der GABARAP-Sequenztopologie (Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode angegeben) sind die entsprechenden Sekundärstrukturelemente auf der X-Achse dargestellt. Von der Bindung des N1-Peptids am stärksten beeinträchtigte Aminosäuren sind auf der Y-Achse mit einem Balken gekennzeichnet. Die mit einem Stern (*) markierten Reste kennzeichnen die Aminosäuren, die in dem GABARAP-orthologen Hefeprotein Atg8 als wichtig für die Autophagozytose identifiziert wurden. Diese sind in GABARAP konserviert (Nakatogawa et al. 2007).

Die von der N1-Peptid Bindung am stärksten beeinflussten GABARAP-Reste (I21, Y25, V29, I32, L44, K48, Y49, L50, S53, D54, L55, F60, L63, R65, K66 und F103) sind in verschiedenen Bereichen des GABARAP-Proteins gruppiert. Dabei sind die Sekundärstrukturelemente $\beta 2$ und $\alpha 3$ besonders stark betroffen (Abb. 4.9 und Abb. 4.10, A). Es wird deutlich, dass eine größere, zusammenhängende Fläche der GABARAP-Oberfläche von der CHC (510-522)-Bindung betroffen ist (Abb. 4.10, B).

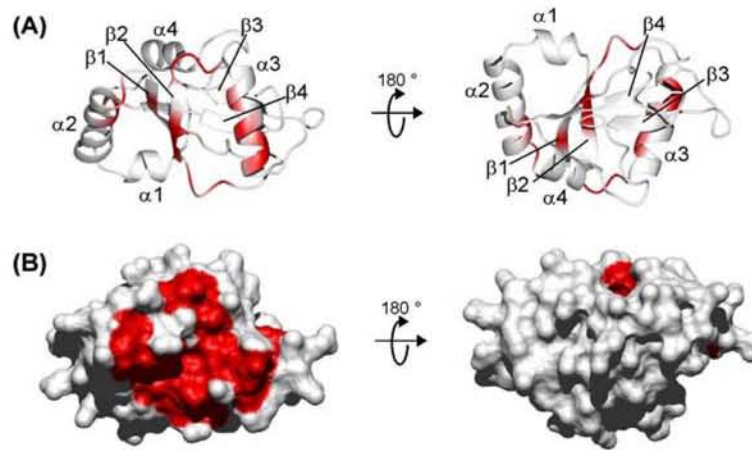


Abbildung 4.10: Visualisierung der N1-Peptid Bindestelle an GABARAP. A: Ribbondarstellung von GABARAP (PDB Code 1kot). Aminosäurereste, deren Resonanzen im HSQC-Experiment von der Bindung des N1-Peptids am stärksten betroffen waren, sind rot eingefärbt. Sekundärstrukturelemente sind mit α (α -Helix) und β (β -Strang) und der entsprechenden Nummerierung gekennzeichnet. **B:** Oberflächendarstellung von A. Ribbon- und Oberflächendarstellung wurden mit Hilfe der Software „MOlecul analysis and MOlecul display“ (MOLMOI) erstellt.

4.2 Motiverstellung und Datenbanksuche zur Identifizierung von physiologischen GABARAP-bindenden Proteinen

Die mittels Phagendisplay selektierten, GABARAP-bindenden Peptide wiesen weder eine einzelne, dominierende Sequenz auf, noch waren stark konservierte Sequenzen zu finden, die sich nur in einzelnen Aminosäurepositionen unterschieden. Die stattdessen vorliegende Sequenzdiversität wurde zur Erstellung eines Konsensusmotivs genutzt, welches die GABARAP-Bindungsspezifität beschreibt. Mit dem erstellten Motiv wurden anschließend Proteindatenbanken nach physiologischen, potentiell GABARAP-bindenden Proteinen durchsucht.

4.2.1 Erstellung eines Konsensusmotivs aus den Phagen Display-selektierten Peptidsequenzen

Zur Erstellung eines Konsensusmotivs, welches die GABARAP-Bindungsspezifität beschreibt, wurden diejenigen Peptidsequenzen der Phagendisplay-Selektion ausgewählt, die im Sequenzalignment (Abb. 4.2) die größte Übereinstimmung mit dem N1-Peptid (Klon 8 und Klon 60) zeigten. Daher wurden die Peptidsequenzen der Phagenklone 1, 2, 5, 15, 8, 60, 54, 34, 65, 47 und 55 verwendet, um mit Hilfe des „Blocks Multiple Alignment Processor“ Tools eine „*position specific scoring matrix*“ (PSSM) zu erstellen. Die PSSM stellt die Aminosäuretoleranz und erwartete Häufigkeit an jeder Position in einem Konsensusmotiv dar, wobei eine logarithmische Gewichtung jeder Aminosäure an jeder Position des Motivs nach folgender Formel stattfindet:

$$profile(r,c) = \sum_{d=1}^{20} \frac{\ln \left[1 - \sum_{i=1}^N \delta(A_{ir}, d) / (1 + N) \right]}{\ln[1 / (1 + N)]} * Comp(residue_d, residue_c) \quad \text{(Gleichung 4.1)}$$

r: Aminosäureposition in Sequenz i

c, d: Reihe und Zeile der Aminosäure Substitutionstabelle

Profile(r,c): Wert der PSSM-Matrix an Position r und Säule c

i: Position der Sequenz im Alignment

N: Zahl der berücksichtigten Sequenzen

$\delta(A_{ir}, d)$: Wert von 1, wenn die Aminosäure an Position r in Sequenz der Aminosäure in Zeile d entspricht

Comp(residue_d, residue_c): Wert der Aminosäure Substitutionstabelle, der der Substitution von Aminosäure d mit c entspricht

Formel aus (Gribskov et al. 1990)

Es wurde ein Motiv (Motiv 1) mit fünf Aminosäurepositionen unter Einbezug aller elf Sequenzen (Abb. 4.11) und ein erweitertes Motiv (Motiv 2) mit sechs Aminosäurepositionen unter Einbezug von nur zehn Sequenzen erstellt, da die sechste Position in Sequenz 2 nicht besetzt ist (Abb. 4.12). Es wurden ausgewählte Bereiche des Sequenzalignments benutzt (Abb. 4.11, A und 4.12, A, Kasten), um die Signifikanz des Motivs nicht zu reduzieren. Die entsprechenden PSSMs sind in Abbildung 4.11, B und 4.12, B als Sequenzlogos dargestellt.

Beide generierten Konsensusmotive weisen ein hoch konserviertes Tryptophan an Position +1 auf. An Motivposition +2 und +4 sind vornehmlich aliphatische Reste vorhanden, während an Position +3 aromatische Reste zu finden sind. Ein Aspartat ist an Motivposition -1 dominierend. Bei Motiv 2 (Abb. 4.11, B) ist außerdem bevorzugt ein Prolin an Position +5 vorhanden.

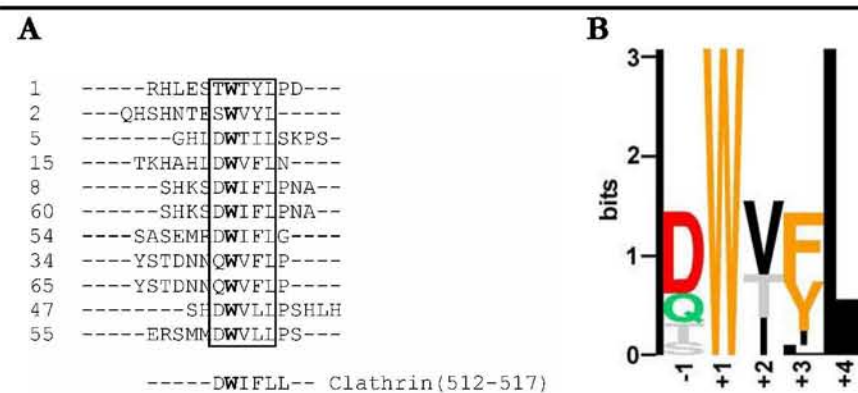


Abbildung 4.11: Erstellung eines „position-specific scoring matrix“ (PSSM) basierten, fünfstelligen Konsensusmotivs (Motiv 1) aus GABARAP-bindenden Peptidsequenzen. **A:** Multiples Sequenzalignment einer Auswahl von Phagendisplay selektierten GABARAP-bindenden Peptiden und der schweren Kette von Clathrin (CHC) (512 bis 517). Links ist die jeweilige Phagenklon-Nummer zu der entsprechenden Peptidsequenz aufgelistet. Der konservierte Tryptophanrest ist fettgedruckt hervorgehoben. Aminosäurepositionen, die bei der Erstellung der PSSM einbezogen wurden, sind mit einem Kasten umrandet. **B:** Das aus der PSSM errechnete Sequenzlogo, welches das Konsensusmotiv (Motiv 1) einer GABARAP-bindenden Sequenz grafisch repräsentiert. Die relative Größe der einzelnen Buchstaben ist dabei proportional zur Häufigkeit des mit diesem Buchstaben bezeichneten Restes an dieser Position und die absolute Höhe der jeweiligen Position ist proportional zum Grad der Konservierung.

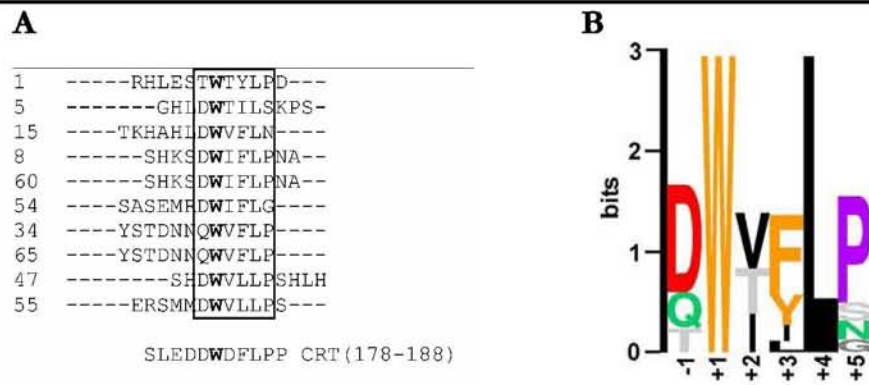


Abbildung 4.12: Erstellung eines „position-specific scoring matrix“ (PSSM) basierten, sechsstelligen Konsensusmotivs (Motiv 2) aus GABARAP-bindenden Peptidsequenzen. **A:** Multiples Sequenzalignment einer Auswahl von Phagendisplay selektierten GABARAP-bindenden Peptiden und CRT (178-188). Links ist die jeweilige Phagenklon-Nummer zu der entsprechenden Peptidsequenz aufgelistet. Der konservierte Tryptophanrest ist fettgedruckt hervorgehoben. Aminosäurepositionen, die bei der Erstellung der PSSM einbezogen wurden, sind mit einem Kasten umrandet. **B:** Das aus der PSSM errechnete Sequenzlogo, welches das Konsensusmotiv (Motiv 2) einer GABARAP-bindenden Sequenz grafisch repräsentiert. Die relative Größe der einzelnen Buchstaben ist dabei proportional zur Häufigkeit des mit diesem Buchstaben bezeichneten Restes an dieser Position und die absolute Höhe der jeweiligen Position ist proportional zum Grad der Konservierung.

4.2.2 Datenbanksuche nach physiologischen GABARAP-bindenden Proteinen mit Hilfe des generierten Konsensusmotivs

Beschränkt sich die Bindestelle einer Protein-Protein-Interaktion in erster Linie auf eine kontinuierliche Peptidsequenz, sollte es möglich sein, diese Interaktion mittels Phagendisplay und Konsensusbestimmung zu identifizieren und eine potentielle *in vivo* Wechselwirkung vorherzusagen. Die PSSM-generierten Konsensusmotive (Kap. 4.2) wurden daher zur Identifizierung von Proteinen eingesetzt, die GABARAP-bindende Peptidsequenzen beinhalten. Zu diesem Zweck wurde eine BLAST-Suche mit den generierten PSSM gegen verschiedene Proteindatenbanken mit Hilfe des „Motif Alignment and Search Tools“ MAST durchgeführt (Bailey and Gribskov 1998). Bei der Suche mit Konsensusmotiv 1 wurden unter anderem die humanen Proteine *clathrin heavy chain-1* und *clathrin heavy chain-2* identifiziert, die eine große Ähnlichkeit mit dem Konsensusmotiv aufweisen (Abb. 4.11 und Tabelle 4.2). Die schwere Kette von Clathrin (*clathrin heavy chain*, CHC) befand sich dabei an zehnter Stelle aller humanen Proteine auf der MAST-Hitliste. Der jedem Treffer der MAST-Hitliste zugeordnete E-Wert gibt die erwartete Anzahl an Sequenzen in einer Zufallsdatenbank der gleichen Größe an, die mit dem verwendeten Suchmotiv in dem gleichen Maß übereinstimmen, wie der jeweilige Treffer. Damit ist der E-Wert ein Maß für die Signifikanz der Übereinstimmung und betrug für beide Proteine 140. Betrachtung der putativen Bindestelle in der CHC Struktur (PDB Code 1XI5) zeigt, dass die Aminosäurereste 512 bis 516 in einer Oberflächen-exponierten α -Helix liegen und somit zumindest teilweise für eine mögliche Bindung an GABARAP zugänglich wären (Abb. 4.13).

Tabelle 4.2: Die MAST-Datenbanksuche mit dem 5-stelligen Konsensusmotiv identifiziert unter anderem humanes Clathrin heavy chain-1 und -2 als putativ GABARAP-bindende Proteine. Auszug der resultierenden MAST-Hitliste bei der Datenbanksuche mit Motiv 1. Aufgelistet sind die Hits mit den niedrigsten E-Werten der MAST-Hitliste.

Sequenz	Name	E-Wert
Q9Y2H1 ST38L_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase 38-like	14
Q01813 K6PP_HUMAN	6-phosphofructokinase type C (Phosphofructokinase 1)	25
Q13630 FCL_HUMAN	GDP-L-fucose synthetase (Protein FX)	43
P00480 OTC_HUMAN	Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial precursor	47
P51788 CLCN2_HUMAN	Chloride channel protein 2	76
P35523 CLCN1_HUMAN	Chloride channel protein 1	83
Q8NFJ5 RAI3_HUMAN	Retinoic acid-induced protein 3	95
P56373 P2RX3_HUMAN	P2X purinoceptor 3 (ATP receptor)	110
P51575 P2RX1_HUMAN	P2X purinoceptor 1 (ATP receptor)	110
Q9HB03 ELOV3_HUMAN	Elongation of very long chain fatty acids protein 3	130
P53675 CLH2_HUMAN	Clathrin heavy chain 2	140
Q00610 CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1	140

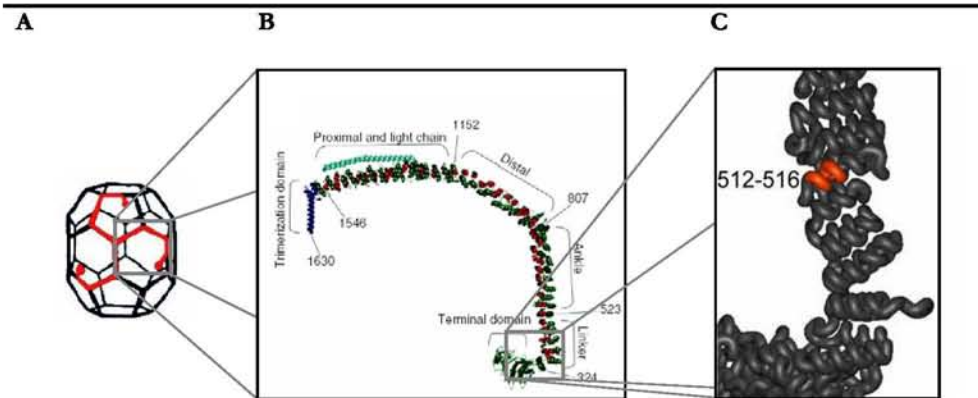
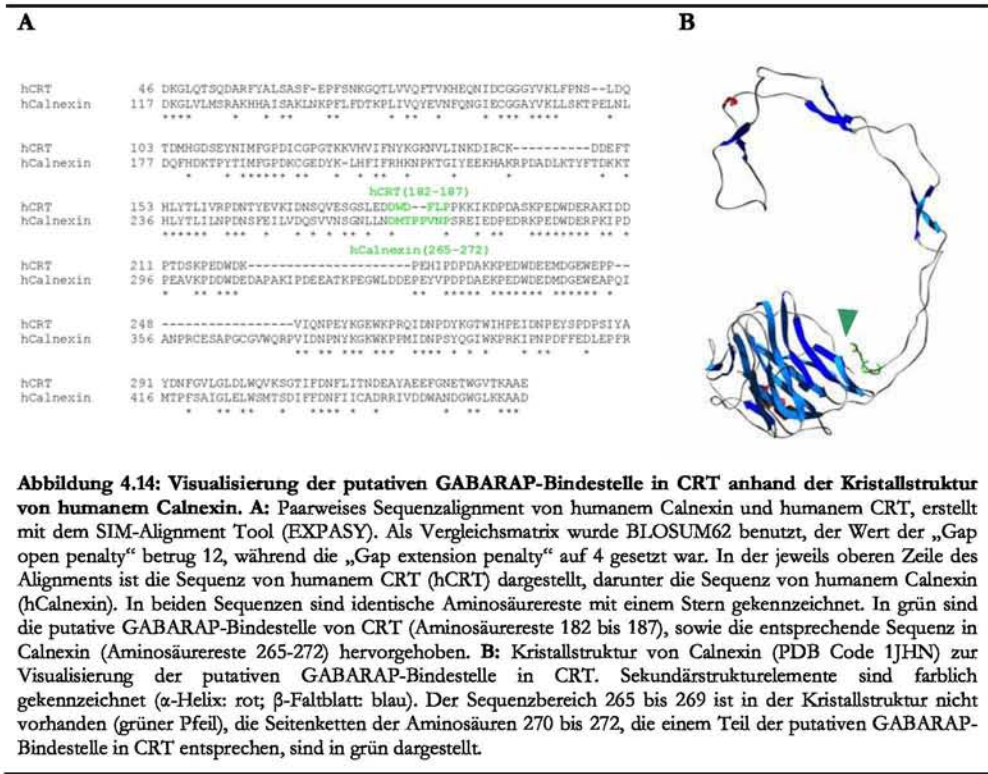


Abbildung 4.13: Lage der putativen GABARAP-Bindestelle (Aminosäurereste 512 bis 516) in der Clathrin heavy chain (CHC) Struktur A: Schema eines hexagonalen Fasses, bestehend aus 36 Clathrin Triskelia (Royle 2006). In rot ist ein einzelnes CHC Triskelion dargestellt. Der grau umrandete Bereich ist in (B) vergrößert zu sehen. B: Darstellung einer einzelnen schweren Kette Clathrin mit Sequenzbereichzuordnung und jeweiliger Beschriftung (Wilbur et al. 2005). Der grau umrandete Bereich ist in (C) vergrößert dargestellt. C: Ausschnitt aus der CHC PDB-Struktur 1X15, dargestellt mit „MOLEcule analysis and MOLEcule display“ (MOLMOL). In rot sind die Aminosäurepositionen 512 bis 516 markiert.

Bei der Suche mit Motiv 2 wurde unter anderem das humane Protein CRT (CRT) identifiziert, welches eine große Ähnlichkeit zu dem Konsensusmotiv aufweist (Abb. 4.12 und Tabelle 4.3). CRT befand sich unter den fünf besten Hits aller humanen Proteine auf der MAST-Hitliste und der entsprechende E-Wert betrug 72. Betrachtung der putativen GABARAP-Bindestelle in der Struktur des zu CRT homologen Proteins Calnexin (PDB Code 1JHN) zeigt, dass die Aminosäurereste 182 bis 187 an einer exponierten Stelle von CRT liegen und so für eine mögliche Interaktion mit GABARAP zugänglich wären (Abb. 4.14).

Tabelle 4.3: Die MAST-Datenbanksuche mit dem 6-stelligen Konsensusmotiv identifiziert unter anderem humanes CRT als putativ GABARAP-bindendes Protein. Auszug der resultierenden MAST-Hitliste bei der Datenbanksuche mit Motiv 2. Aufgelistet sind die Hits mit den niedrigsten E-Werten.

Sequenz	Name	E-Wert
CAI40003.1_HUMAN	Phosphofructokinase	5,9
CAI39990.1_HUMAN	Phosphofructokinase	6,8
CAH69852.1_HUMAN	Phosphofructokinase	22
NP_002618_HUMAN	Phosphofructokinase	22
AAB33287.1_HUMAN	Calreticulin	72



4.3 Charakterisierung der GABARAP-CRT Interaktion

4.3.1 Bestimmung der Bindungsaffinität von GABARAP und CRT über Oberflächenplasmonenresonanz Messung

Um die Bindungsaffinität von CRT an GABARAP bestimmen zu können, wurde zunächst Kaninchen-CRT-His-Fusionsprotein (Abcam, Cambridge) bezogen und erste Messungen durchgeführt. Die Bindungsaffinität von CRT zu GABARAP wurde mittels SPR Messung bestimmt. Die Aminkopplung von ca. 2000 RU GABARAP in 10 mM NaAcetat, pH 5,5 auf einen CM5-Chip wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messungen fanden bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ statt, wobei unterschiedliche CRT-Konzentrationen für jeweils 2 min in beliebiger Reihenfolge injiziert wurden, um systematische Fehler zu vermeiden. Bei zwei Konzentrationen wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Daten zu überprüfen. Dies war notwendig, da CRT nach der jeweiligen Injektion nur sehr langsam von der Oberfläche des GABARAP-gekoppelten Sensorchips dissoziierte und die Regeneration unvollständig war. Bei der Datenauswertung wurden jeweils 2 min der Assoziations- bzw. Dissoziationsphase berücksichtigt.

Abbildung 4.15 zeigt die Sensorgramm-Überlagerung der CRT-Injektionen (hellblau). Der beste Fit eines 1:1 bimolekularen Interaktionsmodells ist in schwarz dargestellt. Die Daten wurden mit Hilfe der BIAevaluation Software prozessiert und gefittet. Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden Assoziations- und Dissoziationsphase, jedoch nicht der Wert der maximalen Signalstärke (R_{max}), global gefittet. Es ergab sich ein k_{on} von $1,3 \times 10^4/\text{M s}$ und ein k_{off} von $8,3 \times 10^{-4}/\text{s}$ und damit eine Dissoziationskonstante K_D von 64 nM. Der χ^2 -Wert des Fits beträgt 62, was eine relativ große Abweichung der Fit-Datenpunkte von den jeweiligen Originaldaten repräsentiert.

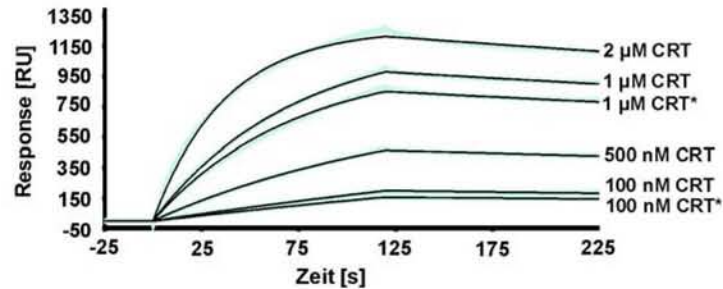


Abbildung 4.15: Kinetische Analyse der CRT-GABARAP Interaktion mittels Oberflächenplasmonenresonanz. Die Sensorgramme (hellblau) wurden sequenziell in der Reihenfolge 100 nM, 1 µM, 2 µM, 500 nM, 100 nM*, 1 µM* aufgenommen. Die Bindungskurven wiederholter Konzentrationen zeigten ein reduziertes Signalmaximum und wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Es wurde je Injektion eine 2-minütige Assoziations- und eine 2-minütige Dissoziationsphase aufgenommen und ausgewertet. Der beste Fit eines 1:1 bimolekularen Interaktionsmodells ist in schwarz dargestellt. Assoziations- und Dissoziationsrate, jedoch nicht das Maximalsignal (R_{max}), wurden global gefittet. Es ergab sich ein $k_{on} = 1,3 \times 10^4 / M \cdot s$ und ein $k_{off} = 8,3 \times 10^{-4} / s$ und damit eine Dissoziationskonstante $K_D = 64 \text{ nM}$.

4.3.2 Klonierung, Expression und Reinigung von humanem CRT

Da die in Kapitel 4.3.1 beschriebenen SPR-Studien mit käuflich erworbenem Kaninchen-CRT die Bindung von CRT zu GABARAP bestätigten, wurde nun humanes CRT rekombinant hergestellt, um weitere Messungen durchführen zu können.

4.3.2.1 Klonierung von humanem CRT

Zur Klonierung des humanen CRT Konstrukts wurde die PCR-Technik angewendet. Als Templat diente der IMAGE-cDNS-Klon *IRAU_{p969F116D}*. Die Reinigung der amplifizierten DNS erfolgte mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion. Als Vektor für die Klonierung wurde das Plasmid pET15b_kombi (Abb. 2.2) verwendet. Sowohl der Vektor, als auch die PCR-generierte DNS wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I geschnitten. Nach der Reinigung der verdauten DNS mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion erfolgte die Ligation der für CRT kodierenden DNS in den pET15b_kombi Vektor. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde anschließend in den Klonierungstamm *E. coli* XL10-Gold transformiert. Die Analyse der Transformanten erfolgte mittels Kolonie-PCR. Zeigten die untersuchten Klone im analytischen

Agarosegel die erwartete Größe, wurde die jeweilige DNS isoliert und mittels Sequenzierung die Richtigkeit der Sequenz verifiziert. pET15b_kombi_CRT wurde anschließend in den Expressionsstamm *E. coli* C43 (DE3) transformiert. Die resultierende Aminosäuresequenz des klonierten CRT Konstruktes ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSG	SEPAVYFKEQ	FLDGDGWTSR	WIESKHKSDF	GKFLVSSGKF
70	80	90	100	110	120
YGDEEKDKGL	QTSQDARFYA	LSASFEPFSN	KGQTLVVQFT	VKHEQNIDCG	GGYVKLFPNS
130	140	150	160	170	180
LDQTDHMGDS	EYNIMFGPDI	CGPGTKKVHV	IFNYKGKNVL	INKDIRCKDD	EFTHLYTLIV
190	200	210	220	230	240
RPDNTYEVKI	DNSQVESGSL	EDDWDFLPPK	KIKDPDASKP	EDWDERAKID	DPTDSKPEDW
250	260	270	280	290	300
DKPEHIPDPD	AKKPEDWDEE	MDGEWEPPVI	QNPEYKGEWK	PRQIDNPDYK	GTWHPIDN
310	320	330	340	350	360
PEYSPDPSIY	AYDNFVGLGL	DLWQVKSGTI	FDNFLITNDE	AYAEFGNET	WGVTKAAEKQ
370	380	390	400	410	420
MKDKQDEEQR	LKEEEDKKR	KEEEEAEDKE	DDEKDEDEE	DEEDKEEDEE	EDVPGQAKDE

L

Abbildung 4.16: Aminosäuresequenz des verwendeten humanen CRT Konstruktes. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Aminosäure-Code (Anhang, S. 152) dargestellt und fortlaufend nummeriert. Blau markiert sind Aminosäuren, die durch proteolytischen Verdau mit Thrombin abgespalten werden können.

4.3.2.2 Expression von humanem CRT

Die Herstellung von humanem CRT erfolgte in LB-Medium. Nach der Transformation von pET15b_kombi_CRT in den Expressionsstamm *E. coli* C43 (DE3) fand die Expression in einem Volumen von 1 bis 3 l Medium statt. Die Zellen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von ca. 0,7 mit 1 mM IPTG versetzt und nach einer Inkubationszeit von ca. 5 h geerntet. Der Erfolg der Überexpression von His-CRT wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.17, Spur 1 und 2). Pro Liter Medium konnten durchschnittlich 2,5 bis 4 g Zellen (Nasszellgewicht) gewonnen werden. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

4.3.2.3 Proteinreinigung His-CRT

Für die Proteinreinigung von humanem CRT wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und das Lysat zentrifugiert. Das His-Fusionsprotein wurde im Zuge einer Affinitätschromatographie aus dem Überstand an Ni-NTA-Agarose gebunden und nach einigen Waschschritten mit niedrigen Imidazol-Konzentrationen (5 bis 10 mM) mit ca. 50 bis 100 mM Imidazol eluiert (Abb. 4.17, Spur 5). Bis zur Verwendung wurde das gereinigte Protein bei 4 °C gelagert. Aus einem Gramm Zellpellet konnten durchschnittlich 2 bis 3 mg His-CRT Fusionsprotein gewonnen werden.

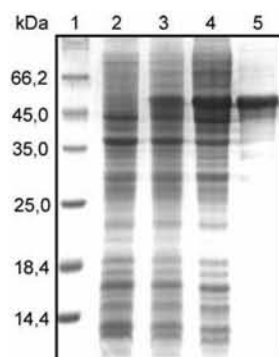


Abbildung 4.17: 15% SDS-PAGE zur Analyse der Expression und Reinigung von rekombinantem CRT. Spur 1: Molekulargewichts-Marker (MBI, Fermentas); Spur 2: Bakterienrohlysate vor Induktion; Spur 3: Bakterienrohlysate 5 h nach Induktion; Spur 4: Überstand des Zellaufschlusses nach Zentrifugation; Spur 5: Elution von CRT nach affinitätschromatographischer Reinigung über Ni-NTA.

4.3.3 Konformationelle Untersuchung von CRT mit Circular-Dichroismus (CD) Spektroskopie

Fern-UV-CD-Spektroskopie kann zur Analyse von Proteinsekundärstrukturen dienen (Kap. 3.5). Durch die Aufnahme eines CD-Spektrums des gereinigten Proteins sollte die Proteinfaltung von CRT mit Literaturdaten verglichen und die native Faltung bestätigt werden. Die identische Probe wurde nach einer Woche wiederholt gemessen, um die Proteinstabilität in 50 mM Natriumphosphat pH 8,0 bei 4 °C zu prüfen. Frisch gereinigtes CRT zeigte ein Minimum bei 208 nm und eine deutliche Schulter bei ca. 229 nm (Abb. 4.18, durchgezogene Linie). Die Messung der identischen Probe nach einer Woche bei 4 °C ergab ein CD-Spektrum mit den gleichen Minima, die Gesamtsignalstärke war jedoch leicht herabgesetzt (Abb. 4.18, gestrichelte Linie).

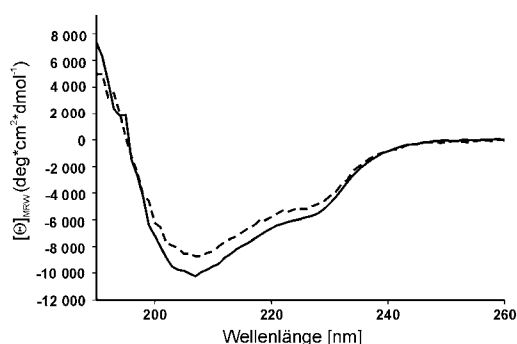


Abbildung 4.18: Untersuchung der CRT-Faltung und -Stabilität über die Zeit mittels Fern-UV-CD. 4 μ M (0,19 mg/ml) CRT in 50 mM NaPhosphat pH 8,0, wurde in einer Quarzküvette mit 0,5 mm Schichtdicke gemessen. Die durchgezogene Linie zeigt das Spektrum von frisch gereinigtem CRT, während die gestrichelte Linie das Spektrum der identischen Probe nach einer Woche darstellt. Bei beiden Spektren ist das entsprechende Pufferspektrum schon abgezogen.

Der Anteil an Alpha-Helix, Beta-Faltblatt, Beta-Turn und ungeordnetem Protein wurde mit Hilfe der CD-Pro Software (Sreerama and Woody 2004) ermittelt, welche die Sekundärstrukturbestimmungs-Software SELCON3 (Sreerama et al. 1999; Sreerama and Woody 1993), CONTIN (Provencher and Glockner 1981; van Stokkum et al. 1990) und CDSSTR (Manavalan and Johnson 1987; Sreerama and Woody 2000) parallel anwendet. Dabei wurde der Datenbereich zwischen 260 und 200 nm des CD-Spektrums berücksichtigt, da zwischen 190 und 200 nm die Datenqualität abnimmt. Das Ergebnis der CDpro-Auswertung ist in Tabelle 4.4 zusammengefasst und mit Literaturwerten verglichen. Guo et al. bestimmten die Sekundärstrukturanteile von CRT ebenfalls mittels CD-Spektroskopie.

Tabelle 4.4: Vergleich der ermittelten CRT-Sekundärstrukturanteile von Literaturwerten (Guo et al. 2003) mit den Werten aus der vorliegenden Arbeit. Die CRT-Sekundärstrukturdaten der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des Programmes CDpro ermittelt. Bei der Auswertung wurde der Datenbereich zwischen 200 und 260 nm des CD-Spektrums berücksichtigt. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse Algorithmen SELCON3, CONTIN und CDSSTR wurden gemittelt.

Sekundärstruktur-analyse aus:	α -Helix	β -Faltblatt	β -Turn	ungeordnet
dieser Arbeit	17 %	28 %	22 %	33 %
(Guo et al. 2003)	14 %	40 %	18 %	27 %

4.3.4 NMR-Spektroskopische Untersuchungen der GABARAP-CRT-Interaktion

4.3.4.1 Untersuchung der Bindung von CRT an GABARAP

Um die Bindung von CRT an GABARAP in Lösung nachzuweisen, wurden NMR-Experimente (Kap. 3.12) durchgeführt. Hierfür wurde ein (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von 20 μM [U - ^{15}N]-isotopenmarkiertem GABARAP und 20 μM CRT in 25 mM Natriumphosphat pH 6,9, 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 100 μM Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF), 50 μM EDTA, 0,02 % (w/v) NaN_3 und 5 % (v/v) Deuteriumoxid aufgenommen (Abb. 4.19, B, rote Signale). Diese, für NMR-Experimente sehr niedrigen, Konzentrationen wurden eingesetzt, um das darauf folgende Konkurrenzexperiment zu ermöglichen. Abbildung 4.19 B zeigt, dass die Amidgruppen-Resonanzsignale von GABARAP bei Anwesenheit von äquimolaren Mengen CRT bis auf wenige Ausnahmen stark verbreitert und daher nicht mehr detektierbar sind (rote Signale).

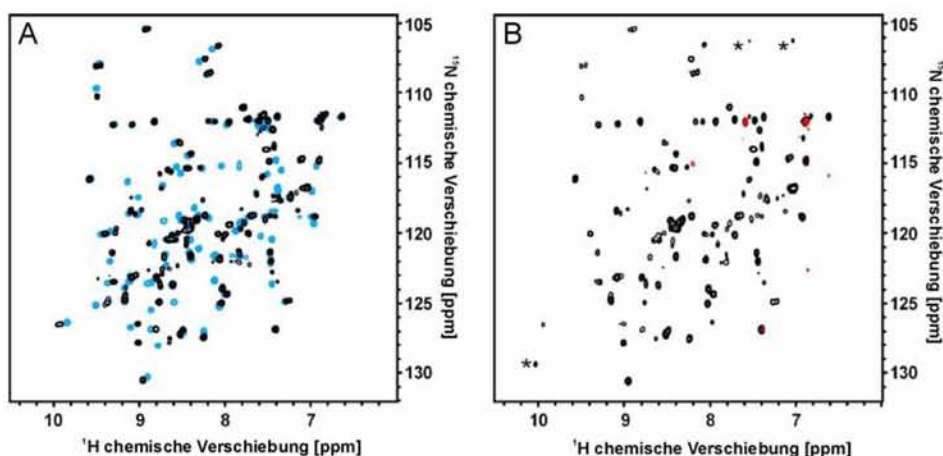


Abbildung 4.19: (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektren von GABARAP in An- und Abwesenheit von Liganden **A:** GABARAP interagiert mit N1-Peptid. Überlagerung von (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektren von 190 μM GABARAP in Abwesenheit (blaue Signale) und in Anwesenheit (schwarze Signale) von 950 μM N1-Peptid. **B:** N1-Peptid kompetiert mit CRT um die Bindung zu GABARAP. (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektrum von 20 μM GABARAP in Anwesenheit von 20 μM CRT (rote Signale) überlagert mit einem Spektrum von 16 μM GABARAP, 16 μM CRT und 1180 μM N1-Peptid (schwarze Signale). Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Resonanzsignale entsprechen freiem N1-Peptid und treten aufgrund der natürlichen Häufigkeit von ^{15}N auf.

4.3.4.2 Konkurrenz von N1-Peptid und CRT um die GABARAP-Bindung

Um festzustellen, ob N1 und CRT überlagernde GABARAP-Bindungsstellen haben, wurden der in Kapitel 4.3.4.1 beschriebenen Probe 1180 μM N1-Peptid beigefügt, um eine mögliche Konkurrenz von CRT durch N1-Peptid um die Bindung zu GABARAP nachzuweisen. Dies verdünnte die Konzentrationen von GABARAP und CRT auf jeweils 16 μM . Abbildung 4.19, B (schwarze Signale) zeigt den Einfluss von N1-Peptid auf den CRT-GABARAP-Komplex. Nach der Zugabe des N1-Peptids zum CRT-GABARAP Komplex erschienen sehr viele GABARAP-Amidresonanzen. Zum Vergleich sind in Abbildung 4.19, A das (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von GABARAP alleine (blaue Signale) und von GABARAP im Komplex mit N1-Peptid (schwarze Signale) zu sehen. Bei Vergleich mit dem N1-gebundenen GABARAP-Spektrum, lassen sich diese erscheinenden Resonanzsignale GABARAP im N1-gebundenen Zustand zuordnen. Dies deutet auf die Verdrängung von CRT durch N1-Peptid hin.

4.3.5 Untersuchung der GABARAP-CRT-Bindung im *Pulldown* Experiment

Um die Bindung von endogenem CRT an rekombinantes GABARAP, sowie die Interaktion von endogenem GABARAP mit rekombinatem CRT nachzuweisen, wurden *Pulldown* Experimente durchgeführt. Dabei wurde, wie in Kapitel 3.9 beschrieben, jeweils das rekombinante Protein an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt und mit Hirnhomogenat von adulten Sprague Dawley Ratten inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurden gebundene Proteine eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Eluat vorhandenes, endogenes CRT bzw. endogenes GABARAP durch Western Blot Analyse nachgewiesen.

4.3.5.1 Untersuchung der Bindung von rekombinatem CRT und endogenem GABARAP

Der generelle Ablauf des *Pulldown* Versuches ist in Kapitel 3.9 beschrieben. Der Blotvorgang erfolgte in 15 min. Bei Betrachtung von Abbildung 4.20 ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Signalintensität der GABARAP-Immunoreaktivität in Spur 2 und 3 zu sehen. Während bei der Kontrolle (ungekoppelte Sepharose) kein Signal auftritt, ist bei dem Ansatz mit CRT-gekoppelter Sepharose eine deutliche Immunoreaktivität für GABARAP zu beobachten, was auf die Bindung von endogenem GABARAP zu rekombinatem CRT hinweist. Kürzere Expositionszeiten (Daten hier nicht gezeigt) machen deutlich, dass das obere der beiden in Spur 3 beobachtbaren GABARAP-Signale aus zwei Einzelsignalen besteht.

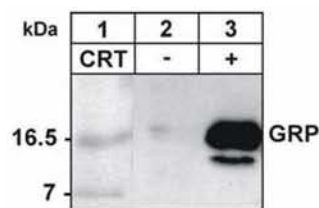


Abbildung 4.20: Endogenes GABARAP bindet an immobilisiertes CRT. Kontrollsepharose allein (Spur 2) und Sepharose-gekoppeltes CRT (Spur 3) wurden mit Rattenhirnextrakten inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Proteine eluiert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von GABARAP erfolgte durch Western Blot Analyse. Spur 1 zeigt Signale des Prestained Protein Markers (Prestained Protein Marker, Broad Range, NEB, Beverly, MA, USA).

4.3.5.2 Untersuchung der Bindung von rekombinantem GABARAP und endogenem CRT

Der generelle Ablauf des *Pulldown* Versuches ist in Kapitel 3.9 beschrieben. Der Blotvorgang erfolgte in 30 min. Bei Betrachtung von Abbildung 4.21 ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Signalintensität der CRT-Immunoreaktivität des Ansatzes mit ungekoppelter Sepharose (Spur 2) und mit GABARAP-gekoppelter Sepharose (Spur 3) zu sehen. Während bei der Kontrollsepharose kein Signal auftritt, ist bei dem Ansatz mit GABARAP-gekoppelter Sepharose eine deutliche Immunoreaktivität für CRT zu beobachten, was auf die Bindung von rekombinantem GABARAP zu endogenem CRT hinweist.

4.3.5.3 Konkurrenz von endogenem CRT und N1 Peptid um die Bindung zu rekombinantem GABARAP

Parallel zu den in Kapitel 4.3.5.2 beschriebenen Versuchen wurde einem Ansatz während der Inkubation der GABARAP-gekoppelten Sepharose mit Hirnhomogenat 1150 μ M N1-Peptid zugesetzt, um anhand eines Konkurrenzexperimentes nachzuweisen, ob die GABARAP-Bindungsstellen von N1-Peptid und CRT überlappen. Wie in Abbildung 4.21 (Spur 4) zu sehen ist, kann bei Anwesenheit von N1-Peptid nur eine sehr schwache Immunoreaktivität für CRT beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass das N1-Peptid CRT erfolgreich von GABARAP verdrängt hat.

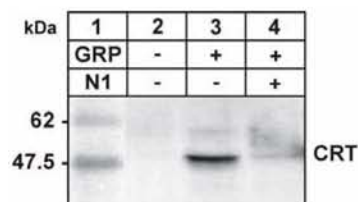


Abbildung 4.21: Endogenes CRT bindet an immobilisiertes GABARAP. Ungekoppelte Sepharose (Spur 2) und Sepharose-gekoppeltes GABARAP in Abwesenheit (Spur 3) und Anwesenheit (Spur 4) von 1150 μ M N1-Peptid wurden mit Rattenhirnextrakten inkubiert. Nach mehreren Waschschr ten wurden gebundene Proteine eluiert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von CRT erfolgte durch Western Blot Analyse. Spur 1 zeigt Signale des Prestained Protein Markers (Prestained Protein Marker, Broad Range, NEB, Beverly, MA, USA).

4.3.6 Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der CRT-GABARAP-Bindung mit Oberflächenplasmonenresonanz

Um festzustellen, ob die GABARAP-CRT-Interaktion kalziumabhängig ist, wurden SPR-Bindungsstudien (Kap. 3.11) durchgeführt. Die Aminkopplung von GABARAP auf einen CM5-Chip wurde wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben durchgeführt. Bei der Durchführung der darauf folgenden Messreihe wurde dem HBS-EP Laufpuffer statt der üblichen 3 mM EDTA entweder 10 mM EDTA (Puffer 1) oder 5 mM CaCl_2 (Puffer 2) zugesetzt und das System mit dem jeweiligen Puffer äquilibriert. Anschließend wurden mehrere Injektionen von je 400 nM CRT im entsprechenden Puffer durchgeführt und die Kinetik der einzelnen Bindungskurven mit Hilfe der BiaEvaluation Software ermittelt. In Abbildung 4.22 sind zwei Bindungskurven pro Puffersystem überlagert dargestellt. Die Daten wurden mit Hilfe der BIAevaluation Software prozessiert und gefittet. Zur Ermittlung der kinetischen Parameter (Tabelle 4.5) wurden Assoziations- und Dissoziationsphase, jedoch nicht der Wert der maximalen Signalstärke (R_{max}), global gefittet. Der beste Fit eines 1:1 bimolekularen Interaktionsmodells ist in schwarz dargestellt.

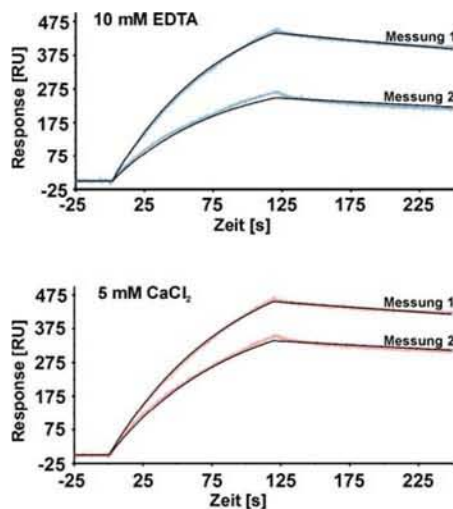


Abbildung 4.22: Kinetische Analyse der Kalziumabhängigkeit der GABARAP-CRT Bindung mittels SPR. Es wurde wiederholt 400 nM CRT in zwei verschiedenen Laufpuffern (**Puffer 1:** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,005% Surfactant P20 (SP20), pH 7,4; **Puffer 2:** 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0,005% Surfactant P20 (SP20), pH 7,4) auf einen GABARAP-gekoppelten CM5-Chip injiziert. Pro Bindungskurve wurden eine 2-minütige Assoziations- und eine 2-minütige Dissoziationsphase in die anschließende Berechnung der Fitparameter einbezogen. Der beste Fit eines 1:1 bimolekularen Interaktionsmodells ist in schwarz dargestellt. Assoziations- und Dissoziationsrate, jedoch nicht das Maximalsignal (R_{max}), wurden global gefittet. Die resultierenden Fitparameter sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Aus SPR-Daten ermittelte Fitparameter der GABARAP-CRT Bindung in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration.

Puffersystem	K_{on} [1/M s]	K_{off} [1/s]	K_{D} [nM]	χ^2 -Wert
Puffer 1 (10 mM EDTA)	$3,0 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^{-4}$	29	41
Puffer 2 (5 mM CaCl_2)	$2,8 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^{-4}$	23	23

4.3.7 Bestimmung der Bindungsaffinität von CRT(178-188) an GABARAP

Das Peptid CRT (178-188) ($\text{COCH}_3\text{-SLEDDWDFLPP-NH}_2$) entspricht dem CRT Aminosäure-Sequenzausschnitt, der nach der Phagendisplay-Selektion gegen GABARAP (Kap. 4.1) mittels Konsensusmotiverstellung und Datenbanksuche (Kap. 4.2) als potentiell GABARAP-bindend ermittelt wurde. SPR-Bindungsstudien dienen zur Bestimmung der Bindungsaffinität (K_D) von CRT (178-188) zu GABARAP. Zunächst wurden ca. 2000 RU GABARAP in 10 mM Natriumacetat pH 5,5 nach den Anweisungen des Herstellers auf einen CM5-Chip gekoppelt. Anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen CRT (178-188) bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l/min}$ für jeweils 2 min injiziert, wobei die Reihenfolge der Injektionen zufällig gewählt wurde, um systematische Fehler zu vermeiden. Die Durchführung einer Doppelbestimmung (15 μM CRT (178-188)) fand statt, um die Reproduzierbarkeit der Daten zu überprüfen. Mit Hilfe der BiaEvaluation Software wurden die Daten prozessiert und gefittet. In Abbildung 4.23, A sind die Sensorgramme aller CRT (178-188) Injektionen überlagert dargestellt. Die gemittelte Signalintensität der jeweiligen „steady state“ Phase ist als schwarzer Balken in die Sensorgramme eingezeichnet. Abbildung 4.23, B stellt die Bindungskurve der GABARAP-CRT (178-188) Bindung dar. Der ermittelte K_D -Wert beträgt 11,5 μM , der χ^2 -Wert - ein Parameter zur Beschreibung der Genauigkeit des Fits - liegt bei einem Wert von 3,5 und spiegelt eine relativ große Übereinstimmung der Fitdaten mit den originalen Messwerten wieder. Der ermittelte K_D -Wert ist somit als zuverlässig zu betrachten.

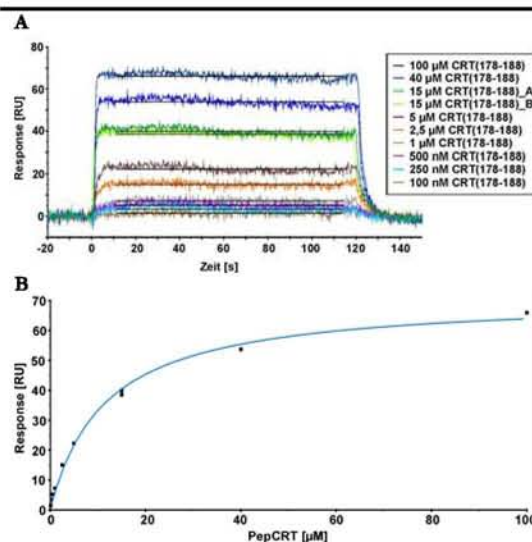


Abbildung 4.23: Bindungsstudie von GABARAP und CRT (178-188) mit Oberflächenplasmonenresonanz

A: Sensorgramm-Überlagerung der Injektion von unterschiedlichen CRT (178-188)-Konzentrationen auf einen GABARAP-gekoppelten CM5-Chip. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 $\mu\text{l/min}$ wurde je 2 min injiziert. Die Konzentrationen wurden dabei sequenziell in der Reihenfolge 100 nM, 15 μM_A , 40 μM , 2,5 μM , 100 μM , 500 nM, 5 μM , 250 nM und 15 μM_B vermessen. Die schwarzen Balken markieren die gemittelten Signalintensitäten der „steady state“ Phasen der jeweiligen Injektion. **B:** Bindungskurve der CRT (178-188)-GABARAP Interaktion. Die gemittelte Signalintensität der jeweiligen Injektion ist gegen die entsprechende CRT (178-188)-Konzentration aufgetragen. Der Fit der nichtlinearen Regressionsrechnung ist als blaue Linie dargestellt. Der resultierende K_D -Wert beträgt 11,5 μM und χ^2 liegt bei einem Wert von 3,5.

Das nicht-isotopenangereicherte Peptid wurde in einem (^1H - ^{15}N)-HSQC-Experiment zu (U - ^{15}N)-GABARAP titriert. Für jede Amidgruppe des GABARAP-Proteinrückgrats ist im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum eine Resonanz zu beobachten (Kap. 3.12). Die Lage bzw. die chemische Verschiebung des jeweiligen Resonanzsignals ist dabei abhängig von der direkten chemischen Umgebung der Amidgruppe. Ändert sich diese, z.B. durch Bindung eines Liganden, kann dies direkt als Änderung der chemischen Verschiebung des jeweiligen Resonanzsignals im HSQC-Spektrum beobachtet werden. Dieser Effekt gilt für Aminosäurereste, die direkt von der Bindung betroffen sind, aber auch für solche, die durch Konformationsänderungen des Proteins indirekt beeinflusst werden.

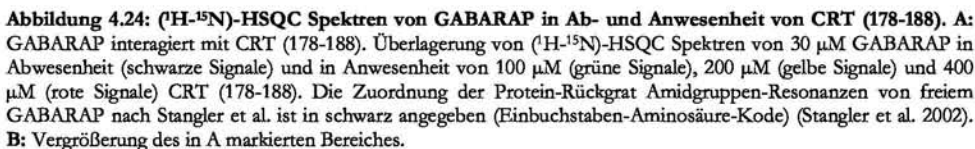


Abbildung 4.24: (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektren von GABARAP in Ab- und Anwesenheit von CRT (178-188). **A:** GABARAP interagiert mit CRT (178-188). Überlagerung von (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektren von 30 μM GABARAP in Abwesenheit (schwarze Signale) und in Anwesenheit von 100 μM (grüne Signale), 200 μM (gelbe Signale) und 400 μM (rote Signale) CRT (178-188). Die Zuordnung der Protein-Rückgrat Amidgruppen-Resonanzen von freiem GABARAP nach Stangler et al. ist in schwarz angegeben (Einbuchstaben-Aminosäure-Code) (Stangler et al. 2002). **B:** Vergrößerung des in A markierten Bereiches.

Abbildung 4.24 zeigt das GABARAP-Spektrum vor Titration (schwarze Signale) und nach Zugabe von 100 μM (grüne Signale), 200 μM (gelbe Signale) und 400 μM (rote Signale) CRT (178-188) Zugabe. Die Zuordnung der Resonanzsignale der Amidgruppen des freien GABARAP Proteins im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum fand entsprechend der Zuordnung von Stangler et al. statt (Stangler et al. 2002). Für die meisten GABARAP Amidgruppen-Resonanzen sind eine Änderung der chemischen Verschiebung und/oder eine Signalverbreiterung nach der Zugabe des CRT (178-188) Peptids zu sehen. Zur besseren Übersichtlichkeit sind bei der Kartierung der CRT (178-188) Bindungsstelle an GABARAP nur diejenigen Resonanzsignale berücksichtigt worden, die aufgrund von Signalverbreiterung nicht mehr detektierbar und somit am stärksten betroffen sind. Die Kartierung ist in Abbildung 4.25 und 4.26 visualisiert.

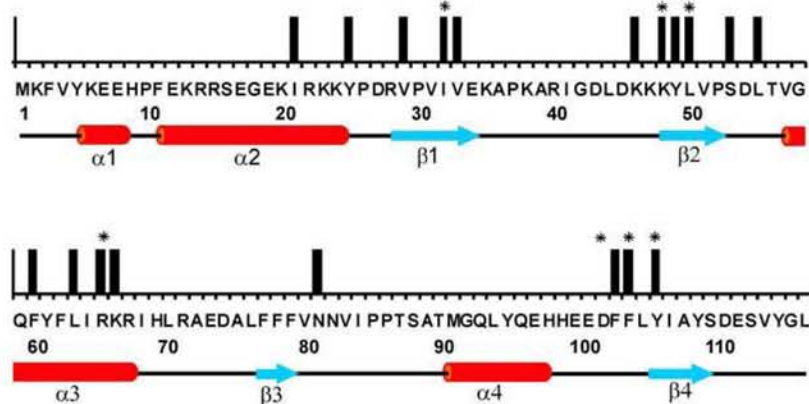


Abbildung 4.25: Lokalisierung der CRT (178-188) Bindestelle von GABARAP. Unter der Darstellung der GABARAP-Sequenztopologie (Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Aminosäure-Kode angegeben) sind die entsprechenden Sekundärstrukturelemente auf der X-Achse dargestellt. Von der Bindung des CRT (178-188)-Peptids am stärksten beeinträchtigte Aminosäuren sind auf der Y-Achse mit einem Balken gekennzeichnet. Die mit einem Stern (*) markierten Reste kennzeichnen die Aminosäuren, die in dem GABARAP-orthologen Hefeprotein Atg8 als wichtig für die Autophagozytose identifiziert wurden. Diese sind in GABARAP konserviert (Nakatogawa et al. 2007).

Die von der CRT (178-188)-Bindung am stärksten beeinflussten GABARAP-Reste (I21, Y25, V29, I32, V33, K46, K48, Y49, L50, S53, L55, F60, L63, R65, K66, N81, F103, F104 und Y106) sind in verschiedenen Bereichen des GABARAP-Proteins gruppiert. Dabei sind die Sekundärstrukturelemente β 1, β 2 und α 3 besonders stark betroffen (Abb. 4.25 und Abb. 4.26, A). Es wird deutlich, dass mit diesen Resten eine größere, zusammenhängende Fläche der GABARAP-Oberfläche von der CHC (510-522)-Bindung beeinflusst wird (Abb. 4.26, B).

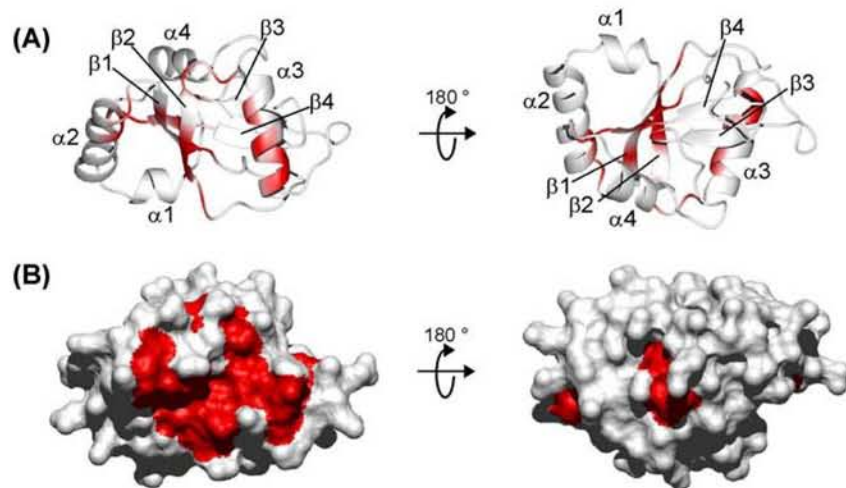


Abbildung 4.26: Visualisierung der CRT (178-188) Bindestelle an GABARAP. **A:** Aminosäurereste, deren Amidgruppen-Resonanzen im $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Experiment von der Bindung des CRT (178-188)-Peptids am stärksten betroffen waren, sind rot eingefärbt. Sekundärstrukturelemente sind mit α (α -Helix) und β (β -Strang) und der entsprechenden Nummerierung gekennzeichnet. **B:** Oberflächendarstellung von A. Ribbon- und Oberflächendarstellung wurden mit Hilfe der Software „MOLEculum analysis and MOLEculum display“ (MOLEculum) erstellt.

4.4 Untersuchung der Wechselwirkung von MAP-LC3b mit CRT

CRT wurde im Rahmen dieser Arbeit als GABARAP-bindendes Protein identifiziert. Mittels SPR-Analyse sollte getestet werden, ob CRT neben GABARAP auch andere Proteine der MAP-LC3 Proteinfamilie bindet. Diese besteht aus 7 Proteinen, deren Sequenzidentitäten zu GABARAP zwischen 30% und 87% liegen. Obwohl die Sequenzidentität von MAP-LC3b zu GABARAP nur bei ca. 31% liegt, wurde zunächst dieses stellvertretend für die MAP-LC3 Proteinfamilie ausgewählt, um eine mögliche Bindung zu CRT zu testen, da es in die Autophagozytose involviert (Kabeya et al. 2000) und funktionell gut untersucht ist.

4.4.1 Klonierung, Expression und Reinigung von MAP-LC3b

4.4.1.1 Klonierung von MAP-LC3b

Zur Präparation des humanen MAP-LC3b (1-125) Konstrukts wurde die PCR-Technik angewendet. Als Templat diente der IMAGE-cDNS-Klon *IRAU_{p969H0456D}*. Die Reinigung der amplifizierten DNS erfolgte mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion. Als Vektor für die Klonierung wurde das Plasmid pET15b_kombi (Abb. 2.2) verwendet. Sowohl der Vektor, als auch die PCR-generierte DNS wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*H1 und *Xho*1 verdaut. Nach der Reinigung der verdauten DNS mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion erfolgte die Ligation der für MAP-LC3b kodierenden DNS in den pET15b_kombi Vektor. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde anschließend in den Klonierungsstamm *E. coli* XL10-Gold transformiert. Die Analyse der Transformanten erfolgte mittels Kolonie-PCR. Zeigten die PCR-Amplifikate der untersuchten Klone im analytischen Agarosegel die erwartete Größe, wurde die jeweilige DNS isoliert und mittels Sequenzierung die Richtigkeit der Sequenz verifiziert. pET15b_kombi_MAP-LC3b wurde anschließend in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Die resultierende Aminosäuresequenz des klonierten MAP-LC3b Konstruktes ist in Abbildung 4.27 dargestellt.

10	20	30	40	50	60	70
MGSSHHHHH	SSGLVPRGSM	PSEKTFKQRR	TFEQRVEDVR	LIREQHPTKI	PVIIERYKGE	KQLPVLDTK
80	90	100	110	120	130	140
FLVPDHNMS	ELIKIIRRL	QLNANQAFFL	LVNGHSMVSV	STPISEVYES	EKDEGFLYM	VYASQETFGM
						KLSV

Abbildung 4.27: Aminosäuresequenz des verwendeten humanen MAP-LC3b Konstruktes. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Aminosäure-Code (Anhang, S. 152) dargestellt und fortlaufend nummeriert. Blau markiert sind Aminosäuren, die bei der Proteolyse mit Thrombin abgespalten werden.

4.4.1.2 Expression von humanem MAP-LC3b

Die Herstellung von (U - ^{15}N)-MAP-LC3b für NMR-HSQC-Experimente erfolgte in M9-Minimalmedium, wobei [^{15}N]-Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle zugegeben wurde. Für alle weiteren Experimente erfolgte die Expression von MAP-LC3b in LB-Medium. Nach der Transformation von pET15b_kombi_MAPLC3b in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL fand die Expression in einem Volumen von 1 bis 3 l Medium statt. Die Zellen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von ca. 0,7 mit 1 mM IPTG versetzt und nach einer Inkubationszeit von ca. 5 h geerntet. Der Erfolg der Überexpression von His-MAP-LC3b wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.28, A, Spur 1 und 3). Pro Liter Medium konnten durchschnittlich 2,5 bis 4 g Zellen (Nasszellgewicht) gewonnen werden. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.4.1.3 Reinigung von rekombinantem MAP-LC3b

Für die Proteinreinigung von MAP-LC3b wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und das Lysat zentrifugiert. Das Fusionsprotein wurde im Zuge einer Affinitätsreinigung aus dem Überstand an Ni-NTA-Agarose gebunden und nach einigen Waschschritten mit niedrigen Imidazol-Konzentrationen (5 bis 20 mM) mit ca. 50 bis 100 mM Imidazol eluiert (Abb. 4.28, A). Der proteolytische Verdau mit Thrombin fand während der folgenden Dialyse der Elutionsfraktionen gegen PBS, pH 7,4 statt. Dabei wurde die aus 1 l gewonnene Menge Fusionsprotein mit 450 U Thrombinprotease innerhalb von ca. 5 h gespalten. Die Vollständigkeit der Proteolyse wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.28, B). Der proteolytische Verdau

wurde anschließend auf ein maximales Volumen von 7 ml eingengt und die Spaltprodukte, sowie Thrombin über Größenausschlußchromatographie voneinander getrennt (Abb. 4.29, A). Die MAP-LC3b enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und qualitativ überprüft (Abb. 4.29, B). Über die Absorption bei 280 nm konnte photometrisch die Proteinkonzentration ermittelt werden, wobei aus einem Gramm Ausgangszellmasse durchschnittlich 4 mg MAP-LC3b isoliert werden konnten.

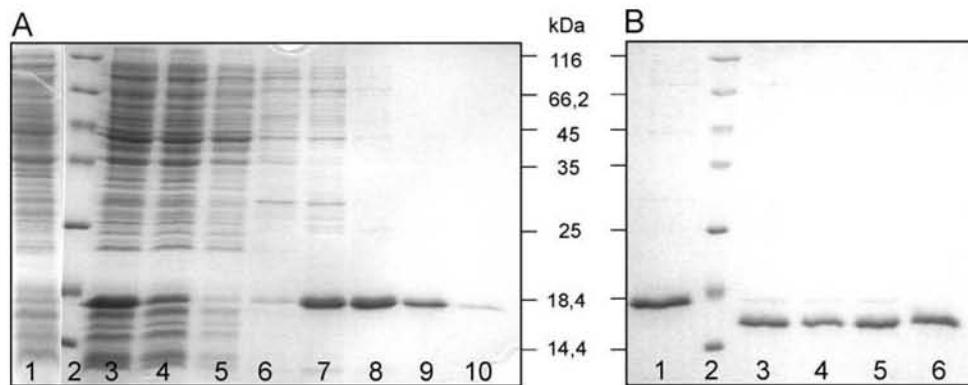


Abbildung 4.28: Reinigung und Proteaseverdau von rekombinantem MAP-LC3b. A: 15% SDS-PAGE zur Analyse der Expression und Ni-NTA-Reinigung von rekombinantem MAP-LC3b. **Spur 1:** Bakterienrohlysate vor Induktion; **Spur 2:** Molekulargewichts-Marker (MBI, Fermentas); **Spur 3:** Überstand des Zellaufschlusses nach Zentrifugation; **Spur 4:** Durchfluss; **Spur 5:** Waschschrift mit Bindungspuffer; **Spur 6:** Elution mit 10 mM Imidazol; **Spur 7:** Elution mit 50 mM Imidazol; **Spur 8:** Elution mit 100 mM Imidazol; **Spur 9:** Elution mit 150 mM Imidazol; **Spur 10:** Elution mit 500 mM Imidazol B: 15% SDS-PAGE zur Analyse des Proteaseverdaus von MAP-LC3b mit Thrombin bei RT. **Spur 1:** MAP-LC3b vor Proteaseverdau; **Spur 2:** Molekulargewichts-Marker (MBI, Fermentas); **Spur 3:** Thrombinverdau nach 30 min Inkubationszeit; **Spur 4:** Thrombinverdau nach 60 min Inkubationszeit; **Spur 5:** Thrombinverdau nach 90 min Inkubationszeit; **Spur 6:** Thrombinverdau nach 24 h Inkubationszeit

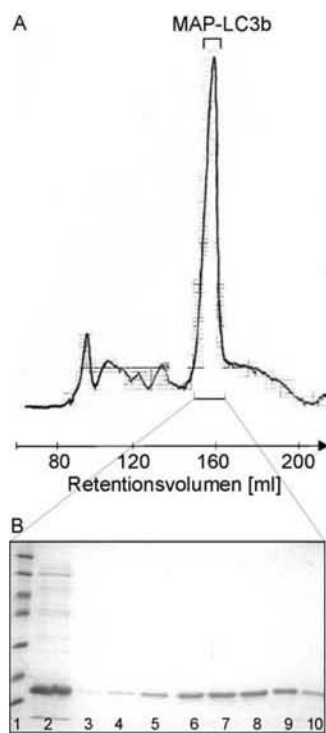
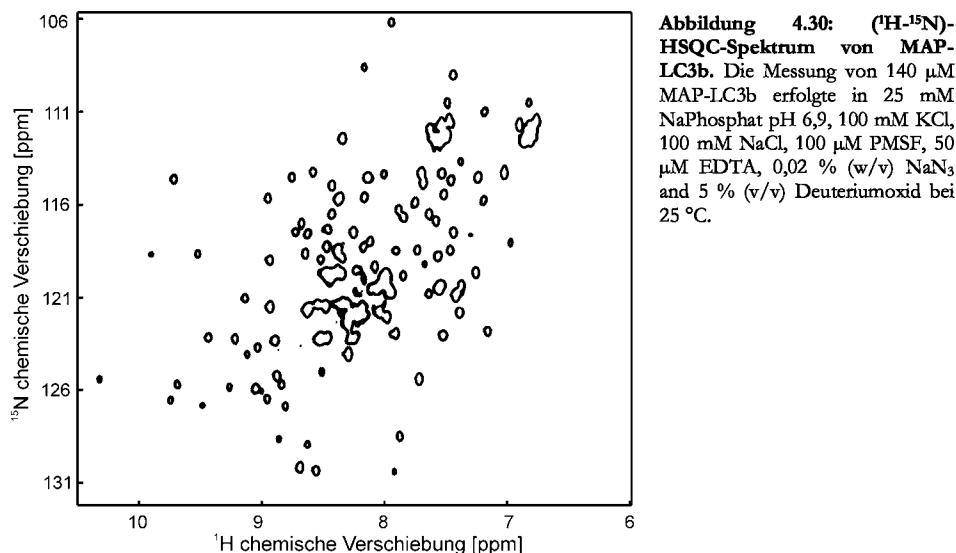


Abbildung 4.29: Analyse der größenausschlusschromatographischen Reinigung der His-MAP-LC3b Spaltprodukte. A: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie der Spaltprodukte nach Thrombinverdau von His-MAP-LC3b. **B:** 15% SDS-PAGE zur Analyse der größenausschlusschromatographischen Reinigung von MAP-LC3b nach proteolytischen Verdau mit Thrombin. 1: Molekulargewichts-Marker (MBI, Fermentas); 2: MAP-LC3b nach Proteaseverdau; 3-10: MAP-LC3b enthaltende Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie. Verwendet wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 75 pg Gelfiltrationssäule. MAP-LC3b eluierte bei einem Retentionsvolumen zwischen 150 und 165 ml. Deutlich zu sehen ist die Trennung von Thrombin und einigen Verunreinigungen, welche zwischen 90 und 150 ml Retentionsvolumen eluieren.

4.4.2 Strukturelle Untersuchung von MAP-LC3b

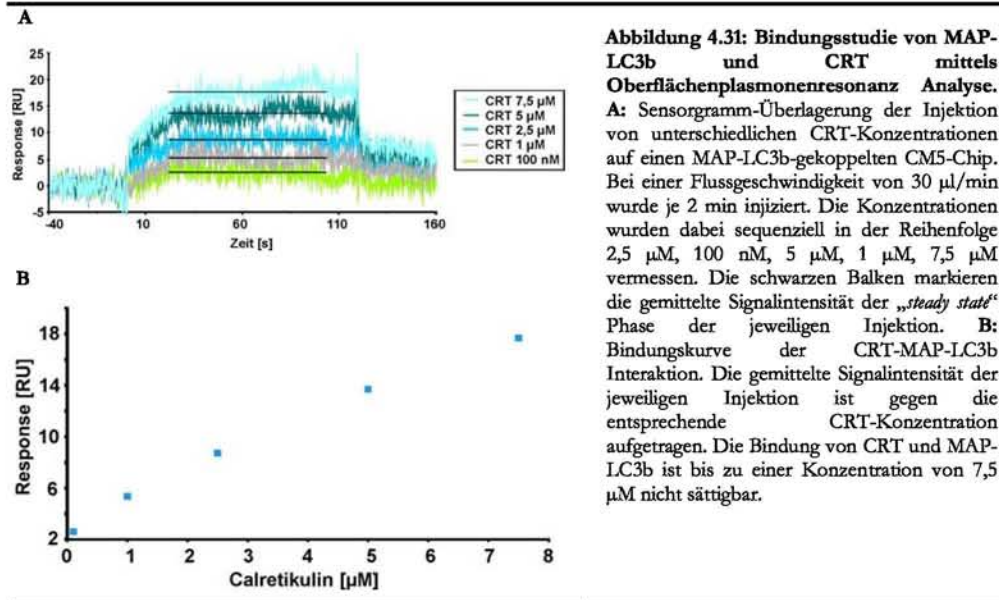
Um sicherzustellen, dass das rekombinante MAP-LC3b seine native Faltung besitzt, wurde zunächst ein (^1H - ^{15}N)-HSQC NMR-Spektrum mit gereinigtem (U - ^{15}N)-MAP-LC3b in 25 mM Natriumphosphat pH 6,9, 100 mM KCl, 100 mM NaCl, 100 μM Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF), 50 μM EDTA, 0,02 % (w/v) NaN_3 und 5 % (v/v) Deuteriumoxid aufgenommen. Wie bereits in Kapitel 3.12 beschrieben, ist im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum für jede Amidgruppe des ^{15}N -isotopenmarkierten Proteins eine (^1H - ^{15}N)-Resonanzkorrelation zu beobachten, wobei die chemische Verschiebung der jeweiligen Resonanz dabei von der direkten chemischen Umgebung der Amidgruppe abhängig ist. In Abbildung 4.30 ist das MAP-LC3b (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum dargestellt. Die spektrale Dispersion der Resonanzsignale und der Vergleich mit einem MAP-LC3 Referenzspektrum (Kouno et al. 2004) (Kap. 7.4) lassen darauf schließen, dass MAP-LC3b seine native Faltung aufweist.



4.4.3 Untersuchung der Bindung von CRT an MAP-LC3b

Die Bindungsaffinität von CRT an MAP-LC3b wurde mittels SPR-Messung (Kap. 3.11) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden ca. 2000 RU MAP-LC3b in 10 mM Natriumacetat, pH 5,5 an einen CM5-Chip nach Angaben des Herstellers gekoppelt. Unterschiedliche CRT-Konzentrationen zwischen 100 nM und 7,5 μM wurden bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf die Chipoberfläche für jeweils 2 min injiziert. Die Reihenfolge der Konzentrationen war beliebig, um systematische Fehler zu vermeiden. Konzentrationen über 7,5 μM führten zu Aggregationseffekten auf der Messzelle, so dass die Datenauswertung erschwert war (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 4.31, A ist die Sensorgramm-Überlagerung der CRT-Injektionen zu sehen. Die gemittelte Signalintensität der jeweiligen Injektion ist als schwarzer Balken dargestellt. Wie in Kapitel 3.11 beschrieben, wurden die Daten mit Hilfe der BIAevaluation Software prozessiert. Abbildung 4.31, B zeigt die Bindungskurve der MAP-LC3b-CRT Bindung. Es zeigte sich, dass die MAP-LC3b-CRT Bindung bis zu einer Konzentration von 7,5 μM nicht sättigbar ist. Die Bindungsaffinität (K_D) liegt dementsprechend über 3 μM , wenn überhaupt eine Bindung stattfindet.

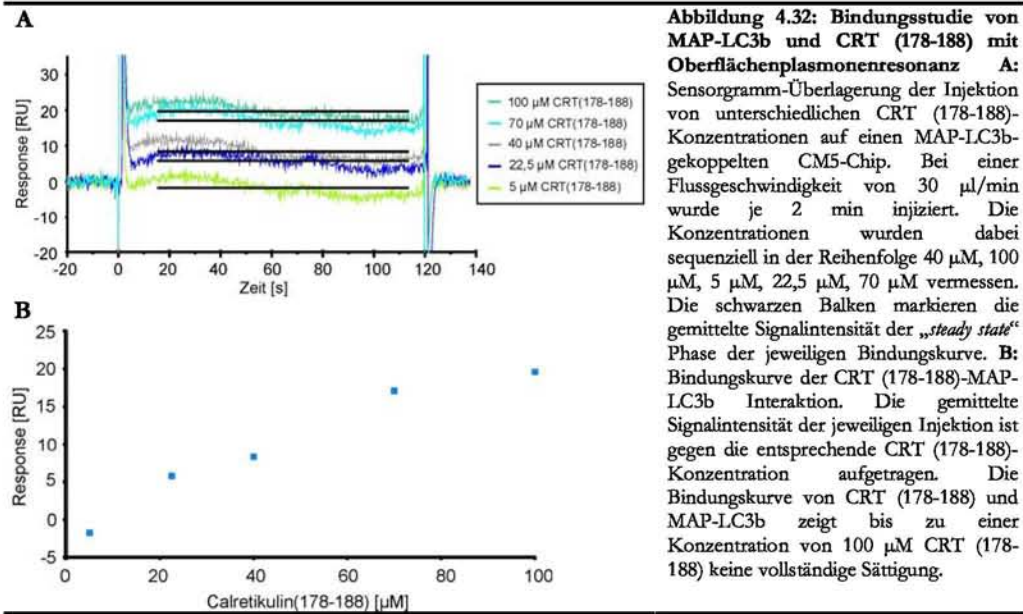


4.4.4 Untersuchung der Bindung von CRT (178-188) an MAP-LC3b

Entsprechend der SPR-Messreihe von CRT an MAP-LC3b (Kap. 4.4.3) wurden Bindungsstudien zur Untersuchung der CRT (178-188)-MAP-LC3b Interaktion durchgeführt. Unterschiedliche CRT (178-188) Konzentrationen wurden in beliebiger Reihenfolge auf den MAP-LC3b-gekoppelten CM5-Chip injiziert. Es konnten im Vergleich zu den Messungen mit CRT deutlich höhere Konzentrationen CRT (178-188) eingesetzt werden, da keine Aggregationseffekte auftraten. In Abbildung 4.32, A ist eine Sensorgramm-Überlagerung von verschiedenen CRT (178-188) Injektionen zu sehen. Am Anfang und am Ende jeder Injektion traten so genannte *Spikes* auf, die das Fitten der Assoziations- und Dissoziationsphase unmöglich machten.

Diese können z.B. entstehen, wenn Luft in das System eintritt. Dies ist in diesem Fall unwahrscheinlich, da die *Spikes* systematisch am Anfang und am Ende jeder Injektion auftreten und die Luftspikes in aller Regel eine größere Signalintensität zeigen. Eine weitere Ursache kann darin liegen, dass das Signal der Referenzzelle, welches von dem Signal der Messzelle abgezogen werden sollte, zeitlich leicht versetzt sein kann. Werden in diesem Fall die Daten der Messzelle durch Subtraktion des Referenzzellsignals referenziert, resultieren *Spikes*, die typischerweise am Anfang und am Ende jeder Injektion auftreten. Dieses Zeitfenster ist wichtig bei der Berechnung

der Assoziations- und Dissoziationsraten, die daher unter den hier vorliegenden Bedingungen nicht ermittelt werden konnten.



Die gemittelten Signalintensitäten sind als schwarze Balken in die Sensorgramme eingezeichnet. Abbildung 4.32, B zeigt die Bindungskurve der MAP-LC3b-CRT (178-188) Interaktion, wobei die gemittelten Signalintensitäten der Injektionen gegen die jeweilige CRT (178-188) Konzentration aufgetragen sind. Die Bindung zeigt bis zu einer Konzentration von 100 μM CRT (178-188) keine vollständige Sättigung. Dies deutet auf einen K_D -Wert von über 40 μM hin, wenn überhaupt eine Bindung stattfindet.

4.5 Charakterisierung der GABARAP-Clathrin-Interaktion

4.5.1 Untersuchung der Bindung von endogenem CHC und rekombinantem GABARAP

Die Bindung von endogenem CHC an GABARAP wurde mittels *Pulldown* Versuch nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurde GABARAP an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt und mit Hirnlysate von adulten Sprague Dawley Ratten inkubiert. Nach mehreren Waschschritten konnten gebundene Proteine eluiert und CHC mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Der genaue Ablauf der *Pulldown* Prozedur ist in Kapitel 3.9 beschrieben. Der Blotvorgang erfolgte 45 min. In Abbildung 4.33 kann man deutlich einen Unterschied zwischen der Signalintensität der GABARAP-Immunoreaktivität in Spur 2 und 3 erkennen. Im Gegensatz zu dem Ansatz mit Kontrollsepharose, bei der nur eine schwache Immunoreaktivität für CHC zu sehen ist, kann man eine deutlich erhöhte Immunoreaktivität für CHC bei dem Ansatz mit GABARAP-gekoppelter Sepharose erkennen. Dies lässt auf die Bindung von endogenem CHC zu GABARAP schließen.

4.5.2 Konkurrenz von endogenem CHC und rekombinantem CRT um die Bindung an rekombinantes GABARAP

Parallel zu den in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Versuchen wurde die Fähigkeit von CRT überprüft, CHC von GABARAP im *Pulldown* Versuch zu verdrängen, um festzustellen, ob beide Proteine eine gemeinsame GABARAP-Bindungsstelle haben. Zu diesem Zweck wurden dem Versuchsansatz während der Inkubation von GABARAP-gekoppelter Sepharose mit Hirnlysat 70 μ M CRT beigelegt. Das resultierende CHC Western Blot Signal (Abb. 4.33, Spur 4) ist im Vergleich zu dem Ansatz ohne CRT (Abb. 4.33, Spur 3) stark reduziert, was auf eine Verdrängung von GABARAP-gebundenem CHC durch CRT hindeutet.

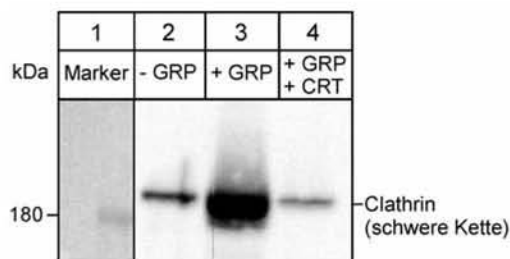
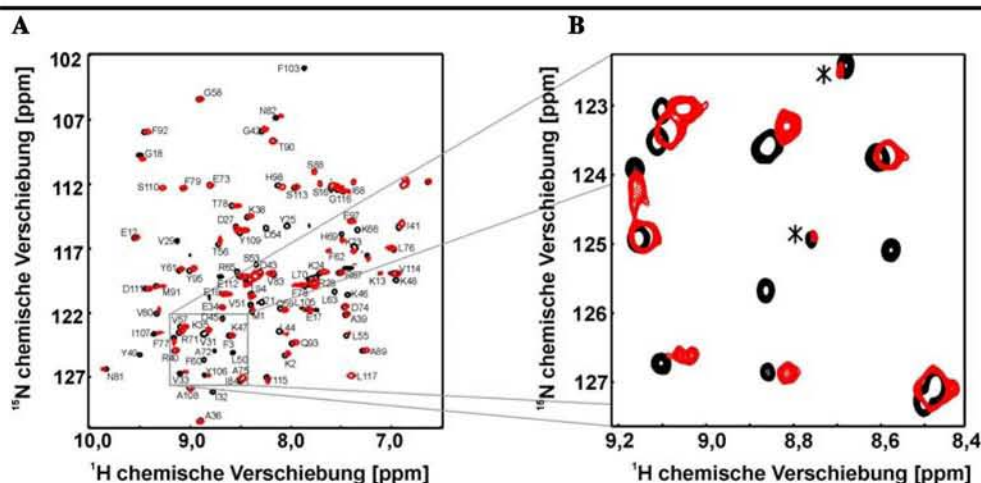


Abbildung 4.33: Endogenes Protein CHC bindet an immobilisiertes, rekombinantes GABARAP. Ungekoppelte Sepharose (Spur 2) und Sepharose-gekoppeltes GABARAP in Abwesenheit (Spur 3) und Anwesenheit (Spur 4) von 70 μ M CRT wurden mit Rattenhirnextrakten inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Proteine eluiert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von ggf. vorhandenem CRT erfolgte durch Western Blot Analyse. Spur 1 zeigt Signale des Prestained Protein Marker, Broad Range, NEB, Beverly, MA, USA).

4.5.3 Strukturelle Untersuchung der Bindung von CHC (510-522) an GABARAP

Zur Untersuchung der direkten Interaktion bzw. zur Kartierung der Bindestelle von CHC an GABARAP wurden NMR-Titrationsexperimente durchgeführt. CHC ist mit ca. 190 kDa für die Aufnahme von (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren ungeeignet, da die Resonanzdetektion von großen Molekülen aufgrund einer ungünstigen Dynamik erschwert ist. Daher wurde ein Peptid [CHC (510-522)] ($\text{COCH}_3\text{-TPDWIFLLRNVMR-NH}_2$) beschafft, welches dem CHC Aminosäure-Sequenzausschnitt entspricht, der nach einer Phagendisplay-Selektion gegen GABARAP (Kap. 4.1) mittels Konsensusmotiverstellung und Datenbanksuche (Kap. 4.2) als potentiell GABARAP-bindend ermittelt wurde. CHC (510-522) wurde außerdem nach Löslichkeitsaspekten ausgewählt. Das nicht-isotopenangereicherte Peptid wurde in einem (^1H - ^{15}N)-HSQC Experiment zu (^{15}N)-GABARAP titriert. Für jede Amidgruppe des GABARAP-Proteinrückgrats ist im (^1H - ^{15}N)-

HSQC-Spektrum eine (^1H - ^{15}N)-Resonanzkorrelation zu beobachten. Die chemische Verschiebung des jeweiligen Resonanzsignals ist dabei abhängig von der direkten chemischen Umgebung der Amidgruppe. Ändert sich diese, z.B. durch Bindung eines Liganden, kann dies direkt als Änderung der chemischen Verschiebungen des jeweiligen Resonanzsignals im (^1H - ^{15}N)-HSQC beobachtet werden. Dieser Effekt gilt für Aminosäurereste, die direkt von der Bindung betroffen sind, aber auch für solche, die durch Konformationsänderungen des Proteins indirekt beeinflusst werden.



Signalverbreiterung nicht mehr detektierbar und somit am stärksten betroffen sind. Die Kartierung ist in Abbildungen 4.35 und 4.36 visualisiert.

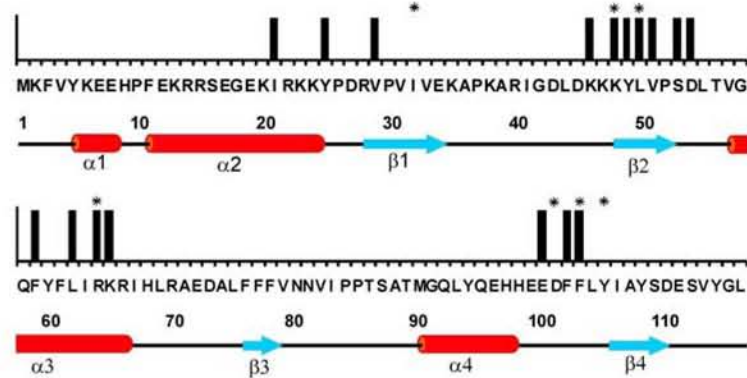


Abbildung 4.35: Lokalisierung der CHC (510-522) Bindestelle von GABARAP. Unter der Darstellung der GABARAP-Sequenztopologie (Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Aminosäure-Code angegeben, Anhang S. 156) sind die entsprechenden Sekundärstrukturelemente dargestellt. Von der Bindung von CHC (510-522) am stärksten beeinflusste Aminosäuren sind auf der Y-Achse mit einem Balken gekennzeichnet. Die mit einem Stern (*) markierten Reste kennzeichnen die Aminosäuren, die in dem GABARAP-orthologen Hefeprotein Atg8 als wichtig für die Autophagozytose identifiziert wurden und sind in GABARAP konserviert (Nakatogawa et al. 2007).

Die von der CHC (510-522)-Bindung am stärksten beeinflussten Reste (I21, Y25, V29, K46, K48, Y49, L50, V51, S53, D54, F60, L63, R65, K66, E101, F103 und F104) sind in verschiedenen Bereichen des GABARAP-Proteins gruppiert, vor allem in den Sekundärstrukturelementen $\beta 2$ und $\alpha 3$ (Abb. 4.35 und Abb. 4.36, A). Es wird deutlich, dass mit diesen Resten eine größere, zusammenhängende Fläche der GABARAP-Oberfläche von der CHC (510-522)-Bindung betroffen ist (Abb. 4.36, B).

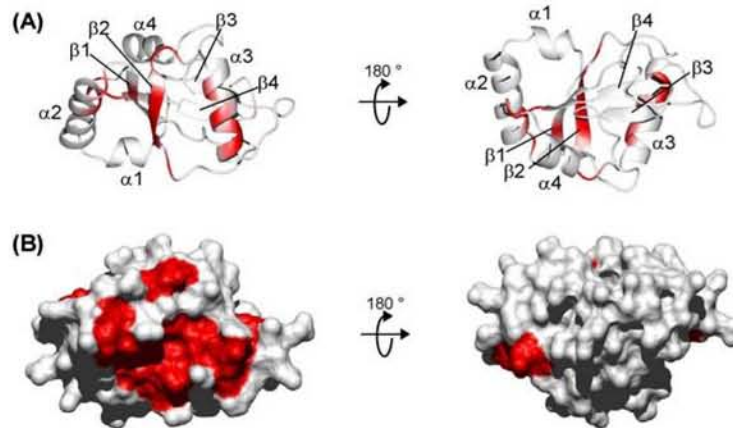


Abbildung 4.36: Visualisierung der CHC (510-522) Bindestelle an GABARAP. A: Ribbondarstellung von GABARAP (PDB Code 1kot). Aminosäurereste, deren Resonanzen im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Experiment von der Bindung des CHC (510-522) Peptids am stärksten betroffen waren, sind rot eingefärbt. Sekundärstrukturelemente sind mit α (α -Helix) und β (β -Strang) und der entsprechenden Nummerierung gekennzeichnet. **B:** Oberflächendarstellung von A. Ribbon- und Oberflächendarstellung wurden mit Hilfe der Software „MOLEcule analysis and MOLEcule display“ (MOLMOL) erstellt.

5 Diskussion

GABA_A-Rezeptoren sind Ziele verschiedener pharmakologischer Wirkstoffe, die zur Behandlung psychischer Störungen und zur Modulation des Schlaf-Wach-Rhythmus oder der Stimmung eingesetzt werden. Sie vermitteln schnelle inhibitorische Reizleitung im Gehirn und im Rückenmark. Daher sind Substanzen, die Transport, Umsatz oder Funktion des GABA_A-Rezeptors beeinflussen von speziellem medizinischem und ökonomischem Interesse.

GABARAP interagiert mit dem GABA_A-Rezeptor und ist Teil der MAP-LC3 Proteinfamilie, die in zelluläre Vesikeltransportmechanismen involviert ist. Dies sind grundlegende Prozesse bei der Autophagozytose, einem kontrollierten Selbstverdauungsprozess. Autophagozytose spielt eine Schlüsselrolle bei neuronaler Entwicklung, Neurodegeneration und Apoptose. Die genaue Bedeutung der GABARAP-GABA_A-Rezeptor-Interaktion ist bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden synthetische Peptid- und zelluläre Proteinliganden von GABARAP mit Hilfe einer Phagendisplay-Selektion identifiziert und die resultierenden Interaktionen mittels Fluoreszenzspektroskopie, SPR-Messungen, *Pulldown*-Versuchen und NMR-spektroskopischen Methoden charakterisiert, um ein erweitertes Verständnis von den Prozessen an der postsynaptischen Membran und deren Modulierungsmöglichkeiten zu erhalten.

5.1 Expression und Reinigung von GABARAP

Zu Beginn dieser Arbeit standen der Expressionsvektor pGEX-GABARAP, sowie das entsprechende standardisierte Reinigungsprotokoll für GST-GABARAP-Fusionsprotein und GABARAP (Stangler et al. 2001) zur Verfügung.

5.1.1 Die Expression und Reinigung von GABARAP verliefen erfolgreich

GST-GABARAP wurde in löslicher Form in *E. coli* exprimiert. Der erste Reinigungsschritt des GST-GABARAP-Fusionsproteins konnte daher nativ durch Affinitätschromatographie an GSH-Sephrose stattfinden. Die durchschnittlichen Ausbeuten lagen dabei zwischen 5 und 10 mg Fusionsprotein pro g Nasszellgewicht. Nach dem proteolytischen Verdau mit Thrombin konnte das GST-Spaltprodukt durch Größenausschlusschromatographie von GABARAP getrennt werden (Abb. 4.2). Pro g Nasszellgewicht konnten durchschnittlich 2 bis 4 mg GABARAP gewonnen werden, was für die Durchführung der im Rahmen dieser Arbeit geplanten Experimente ausreichend war. Es bestand deshalb kein Anlass, das Reinigungsprotokoll weiter zu optimieren.

5.2 Identifikation von GABARAP-bindenden Peptiden und Untersuchung der Interaktion

Phagendisplay-Selektion mit einer randomisierten Peptidbibliothek ist eine zuverlässige und effektive Methode zur Ermittlung von Protein-Protein Interaktionspartnern (Smothers and Henikoff 2001; Smothers et al. 2002). Dabei ist Voraussetzung, dass die Bindestelle der entsprechenden Protein-Protein Interaktion kontinuierlich ist und durch ein 12mer Peptid dargestellt werden kann.

5.2.1 Bei der Phagendisplay-Selektion gegen GST-GABARAP wurden GABARAP-bindende Peptide selektiert

Die Phagendisplay-Selektion gegen GABARAP wurde erfolgreich durchgeführt. Dies konnte zunächst durch das Ergebnis des Anreicherungs-ELISAs bestätigt werden, bei dem die durchschnittliche Affinität der Phagenmischung zu GST-GABARAP vor Selektion und nach den

einzelnen Selektionsrunden anhand einer Farbreaktion quantifiziert wurde (Abb. 4.3). Die steigende Signalintensität der Phagenmischungen nach Selektion im Vergleich zu dem Signal der Phagenmischung vor Selektion ist ein Hinweis auf die Anreicherung von GST-GABARAP-bindenden Phagenvarianten. Nach der zweiten Selektionsrunde steigt das Signal im Anreicherungs-ELISA nicht weiter an. Dies kann aus einer nach Selektionsrunde 2 abgeschlossenen Anreicherung resultieren, wenn z.B. alle vorhandenen Phagen-exponierten Peptide mit ähnlichen Affinitäten an GABARAP binden und so in den folgenden Selektionsrunden keine Anreicherung von stärker bindenden Peptiden bzw. ihrer Phagenklone mehr stattfindet. Ein weiterer Grund könnte ein hoher Messfehler sein, da die gemessenen Signalintensitäten in einem Detektionsbereich über 1 liegen.

Die Durchführung eines anschließenden Einzelphagen-ELISAs diente zur Ermittlung eventuell vorhandener Plastik-bindenden, GST-bindenden oder nichtbindenden Phagen und relativen Quantifizierung der Einzelphagenbindung an GABARAP. Wie auch beim Anreicherungs-ELISA ist hier die Signalintensität proportional zur Bindungsstärke des entsprechenden Einzelphagen an das Zielprotein (GST oder GST-GABARAP) bzw. zur Plastikoberfläche. Das Ergebnis des Einzelphagen-ELISAs bestätigte die spezifische Bindung der Peptide der meisten Phagenklone an GABARAP (Abb. 4.4). Dies zeigt sich in einer drastischen Signalreduktion, wenn statt GST-GABARAP nur GST als Zielprotein gekoppelt wurde. Bei nur vier der 70 untersuchten Phagenklone (Nummer 24, 30, 32 und 66) war die Bindungsstärke zu GST bzw. der Plastikoberfläche genauso groß wie zu GABARAP. Die Signalintensitäten der GABARAP-bindenden Phagenklone lagen in einem Bereich zwischen 0,45 und 0,85 und unterschieden sich damit maximal um den Faktor zwei voneinander. Klon 8 wies mit einer Signalintensität von ca. 0,85 die größte Bindungsstärke auf.

Die Sequenzierung der Phagen-DNS zeigte, dass die selektierten GABARAP-bindenden Peptide keine einzelne dominierende Peptidsequenz aufweisen (Abb. 4.5). Die drei Sequenzen SHFQSWELVSTP (im Folgenden N2 genannt), NHRTPELGHYEW (N3) und GHLSDWVYVPMR (N4) wurden je dreimal gefunden, während alle restlichen Sequenzen nur zwei- oder einmal vorkamen. Es wird deutlich, dass der Fehler des Einzelphagen-ELISAs groß sein muss, da z.B. die Peptidsequenzen der Phagenklone 8 und 60 identisch sind, im Einzelphagen-ELISA jedoch Farbeintensitäten von 0,85 und 0,65 zu sehen sind, was einer prozentualen Differenz von ca. 25 % entspricht.

Alle Peptidsequenzen, außer dem Peptid des Phagenklons Nummer 24, enthalten einen oder mehrere aromatische Reste, meist ein Tryptophan. Dies lässt vermuten, dass das Vorhandensein einer aromatischen Aminosäure, bevorzugt Tryptophan, für die Bindung eines Peptides an GABARAP eine wichtige Rolle spielt. Übereinstimmend mit dem Ergebnis des Einzelphagen-

ELISAs ist bei den Peptiden der nicht-bindenden Phagenklone Nummer 24, 30, 32 und 66 kein Tryptophan vorhanden, was eine zentrale Rolle von Tryptophan für die Peptid-GABARAP-Interaktion bestätigt. Ausnahmen bilden die Peptide der Phagenklone Nummer 12 und 27. Diese zeigen im Einzelphagen-ELISA eine deutliche Bindung zu GABARAP, ohne jedoch ein Tryptophan in ihrer Sequenz zu beinhalten. Die auftretenden Häufigkeiten der Peptidsequenzen, bzw. das Fehlen einer einzelnen, dominierenden Sequenz nach mehreren Selektionsrunden, lassen vermuten, dass alle selektierten Peptide (außer den Peptiden der Phagenklone Nummer 24, 30, 32 und 66) eine ähnliche Bindungsaffinität zu GABARAP besitzen. Die im Einzelphagen-ELISA beobachtbaren, ähnlichen Signalintensitäten aller untersuchten GABARAP-bindenden Phagenklone, die sich maximal um den Faktor zwei unterscheiden, unterstützen diese Theorie. Es kann daher spekuliert werden, dass GABARAP in der Lage ist, eine Reihe von Proteinen über ähnliche, jedoch nicht identische Erkennungspeptidsequenzen zu binden.

Von Coyle et al. wurde gezeigt, dass ein dem $\gamma 2$ -Loop (394-411) des GABA_A-Rezeptor entsprechendes Peptid mit einer Bindungsstärke (K_D) von 1 μ M an GABARAP binden kann (Coyle et al. 2002), was in anderen Studien allerdings nicht bestätigt werden konnte (Knight et al. 2002). Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Phagendisplay-Selektion wurde kein Peptid mit signifikanter Ähnlichkeit zu einem Teil des $\gamma 2$ -Loops des GABA_A-Rezeptors selektiert.

5.2.2 Die synthetischen Peptide fN1, fN2, fN3 und N1 interagieren mit GABARAP

Die Bindungsaffinität der Peptide fN1, fN2 und fN3 (Tabelle 4.1) zu GABARAP wurde mittels Fluoreszenztitration ermittelt (Abb. 4.6). Die resultierenden K_D -Werte von 0,7 μ M für fN1 und 1 μ M für fN2 lagen dabei ca. um den Faktor zehn unter dem K_D -Wert für fN3 mit einem K_D von ca. 12 μ M. Die Kontrollmessung, bei der die Bindungsaffinität von FITC zu GABARAP untersucht wurde, ergab einen K_D -Wert von ca. 61 μ M, der damit ca. um den Faktor fünf höher liegt, als der K_D -Wert von fN3 zu GABARAP.

Da die Ergebnisse der Fluoreszenztitration darauf hindeuten, dass der an die Peptide synthetisierte Fluorescein-Label die Bindungsaffinität zu GABARAP beeinflussen könnte, wurde beispielhaft die Dissoziationskonstante von N1-Peptid ohne Fluorescein-Label mittels Oberflächenplasmonenresonanz bestimmt (Abb. 4.7). Der resultierende K_D -Wert von 8,6 μ M liegt ca. 10-fach über dem per Fluoreszenztitration gemessenen Wert für die fN1-GABARAP-Bindung. Dieses Phänomen kann einerseits durch das Fehlen des Fluorescein-Labels erklärt werden, andererseits können SPR-spezifische Effekte, wie z.B. eine eingeschränkte Ligandenzugänglichkeit und/oder konformationelle Veränderungen aufgrund der

Immobilisierung einer Komponente auf der Chipoberfläche, eine Rolle spielen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiteres Kontrollexperiment gemacht, bei dem die Bindungsaffinität von N1 zu GABARAP mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht wurde (Daten nicht gezeigt). Der resultierende K_D -Wert von ca. 2 μM liegt ungefähr mit einem Faktor vier unter dem per SPR ermittelten und mit einem Faktor drei über dem per Fluoreszenztitration ermittelten Wert. Dies lässt darauf schließen, dass sich der tatsächliche K_D -Wert der GABARAP-N1-Interaktion im niedrigen einstelligen, mikromolaren Bereich befindet.

Knight et al. haben die Interaktion von einer kleinen Anzahl an Peptiden zu GABARAP genauer untersucht (Knight et al. 2002). Dabei handelte es sich um das Peptid $\gamma 2\text{L}$ (394-411), welches einem Teil der γ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors entspricht, sowie Teile des Carboxyterminus von Tubulin, aber auch zufällig ausgewählte Peptide, für welche keine Interaktion mit GABARAP bekannt ist. Diese Peptide unterschieden sich in ihrer Sequenz und ihren Ladungseigenschaften. Die Bindungsaffinität (K_D) aller Peptide betrug, sofern bestimmbar, über 100 μM . Knight et al. schlussfolgerten, dass die Ladungskomplementarität der Peptide keine grundlegende Rolle für die Bindung an GABARAP spielt und GABARAP offensichtlich eine schwache, unspezifische Affinität für Peptide hat (Knight et al. 2002). In einer Studie von Coyle et al. wurde die Dissoziationskonstante des $\gamma 2\text{L}$ (394-411) Peptides mittels Fluoreszenztitration auf 1 μM bestimmt (Coyle et al. 2002), was den von Knight et al. gemessenen Ergebnissen widerspricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die von Coyle et al. beschriebenen Experimente wiederholt, das Ergebnis der Bestimmung der Dissoziationskonstante der $\gamma 2\text{L}$ (394-411)-GABARAP Bindung konnte jedoch nicht reproduziert werden. Stattdessen ergab sich ein K_D -Wert von ca. 20 μM (Daten nicht gezeigt).

Mit K_D -Werten im einstelligen bis niedrigen zweistelligen mikromolaren Bereich gehören die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten trotzdem zu den affinsten aller bisher untersuchten Peptid-GABARAP Interaktionen (Tab. 5.1).

5.2.3 Kartierung der N1-Bindestelle von GABARAP

Die Änderung der chemischen Umgebung einer Amidgruppe, z.B. durch Bindung eines Liganden kann im (^1H - ^{15}N)-HSQC Experiment direkt als eine Änderung der chemischen Verschiebung der Korrelationssignale beobachtet werden.

Im Rahmen von (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experimenten sind nach der Zugabe von N1-Peptid für die meisten (ca. 90 %) GABARAP-Amidgruppen-Resonanzsignale eine Änderung der chemischen Verschiebung und/oder eine Signalverbreiterung zu beobachten (Abb. 4.8). Dabei können pH-Effekte ausgeschlossen werden, da die pH-Werte der GABARAP- und der

Peptidlösung vor den Messungen genau eingestellt wurden. Bei der Bindung von N1, einem 12mer Peptid, an GABARAP ist es unwahrscheinlich, dass so viele GABARAP-Reste direkt an der Interaktion beteiligt sind. Daher ist es nicht sinnvoll, alle betroffenen Resonanzsignale bei der Kartierung der N1-Bindestelle an GABARAP mit einzubeziehen und es wurden nur diejenigen Signale berücksichtigt, die nach dem letzten Titrationsschritt durch Signalverbreiterung nicht mehr detektierbar und somit am stärksten betroffen sind. So wurden 17 Reste ausgewählt, die in mehreren benachbarten Regionen der GABARAP-Oberfläche (Abb. 4.10) liegen, in erster Linie im Bereich der Sekundärstrukturelemente $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 2$ (Abb. 4.9).

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Titration von GABARAP mit N1-Peptid lassen eine genaue Kartierung der N1-Bindungsstelle an GABARAP nicht zu, da die Zahl der betroffenen GABARAP-Resonanzsignale bei der Bindung von N1-Peptid höher ist als zu erwarten wäre, wenn nur die direkt an der Peptidbindung beteiligten GABARAP-Aminosäurereste eine Änderung ihres Amidgruppen Resonanzsignals im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experiment zeigen würden. Betrachtet man jedoch nur die von der N1-Peptidbindung am stärksten betroffenen Resonanzsignale, kann der mögliche Bereich der Peptidbindung weiter eingegrenzt werden. Dabei wird die Annahme zugrunde gelegt, dass die stärker betroffenen Resonanzsignale näher an der N1-Bindungsstelle lokalisiert sind, als weniger stark betroffene. Die Definition der am stärksten betroffenen Reste erfolgte über den Detektionsverlust des entsprechenden Resonanzsignals im (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektrums. Dies ist streng genommen nur dann zulässig, wenn die Signalintensitäten der Resonanzsignale im GABARAP-Ausgangsspektrum bekannt und gleich groß sind. Die Interpretation der (^1H - ^{15}N)-HSQC Daten ist somit doppelt vereinfacht.

Anhand eines (^1H - ^{15}N)-HSQC Titrationsexperimentes kann eine Bindungsstelle prinzipiell nur indirekt bestimmt werden, da die Änderung der chemischen Verschiebung eines Resonanzsignals nicht zwangsläufig auf die direkte Interaktion mit einem Liganden zurückzuführen sein muss, sondern z.B. durch konformationelle Änderungen des Proteins nach Ligandenbindung verursacht werden kann.

Knight et al. untersuchten die Interaktion von unterschiedlichen Peptiden ($\gamma 2\text{L}[394-411]$, Teile des Carboxyterminus von Tubulin und zufällig ausgewählte Peptide, für welche keine Interaktion mit GABARAP bekannt ist) zu GABARAP (Tab. 5.1). Diese Peptide unterschieden sich in ihrer Sequenz und ihren Ladungseigenschaften (Knight et al. 2002). Knight et al. konnten in ihren 2D (^1H - ^{15}N)-HSQC-Experimenten strukturell spezifische Effekte aller untersuchten Peptidbindungen auf die Sekundärstrukturbereiche $\beta 2$ und $\alpha 3$ von GABARAP beobachten, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der N1-Titration zu GABARAP ist. Es wird deutlich, dass verschiedene bisher untersuchte Peptide an die gleiche Region der GABARAP-Oberfläche binden.

Interessanterweise überlappt diese Region mit homologen Resten des Hefeproteins Atg8, die für eine funktionelle Autophagozytose in Hefe wichtig sind (Nakatogawa et al. 2007). Diese Reste sind in MAP-LC3 und GABARAP konserviert. Es kann daher vermutet werden, dass die Interaktion von physiologischen Liganden an die hier vorgeschlagene Region der GABARAP-Oberfläche ebenfalls essentiell für seine zelluläre Funktion (z.B. Beteiligung an Autophagozytose, Rezeptortransport) ist.

Ist die Austauschrate zwischen freiem und gebundenem Zustand des zu untersuchenden Proteins im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experiment „schnell“ im Vergleich zu der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Resonanzfrequenzen der beobachteten H^{N} - und N-Kerne im freien und gebundenen Zustand, so ist nur ein NMR-Signal zu beobachten, wobei die Lage seiner chemischen Verschiebung abhängig von dem Bindungsstatus ist. Dabei bleibt die Signalintensität konstant. Sind die Austauschraten dagegen eher klein (langsamer Austausch), so werden gleichzeitig Resonanzen des freien und des gebundenen Zustandes detektiert. Die Abnahme der Signalintensität durch Signalverbreiterung der betroffenen GABARAP-Resonanzen, sowie das Auftreten eines doppelten Signalsatzes bei manchen Resonanzsignalen lassen bei der GABARAP-N1 Titration auf einen intermediären bis langsamen Austausch schließen (Abb. 4.8, Pfeile). Die Änderung der chemischen Verschiebung einzelner Resonanzen mit nur leichter Veränderung ihrer Linienbreite weist dagegen auf einen eher intermediären Austausch hin. Interaktionen mit einer Bindungsstärke unter $10\ \mu\text{M}$ zeigen in der Regel langsamen Austausch. Liegt die Dissoziationskonstante über $10\ \mu\text{M}$, ist oft ein intermediärer bis schneller Austausch zu beobachten (Zuiderweg 2002). Die Bindungsstärke der N1-GABARAP Interaktion kann anhand der (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experimente auf einen K_{D} im einstellig mikromolaren Bereich abgeschätzt werden, was mit den Ergebnissen der Fluoreszenzspektroskopie und der SPR-Messungen übereinstimmt.

5.3 Identifizierung von physiologischen GABARAP-bindenden Proteinen mit Hilfe der Phagendisplay-selektierten Peptidsequenzen

5.3.1 Generierung von Konsensusmotiven anhand der Phagendisplay-selektierten Peptidsequenzen

Bei der Durchführung der Phagendisplay-Selektion wurde keine einzelne, dominierende Peptidsequenz selektiert (Abb. 4.5). Die stattdessen vorhandene Sequenzdiversität wurde daher zur Generierung eines gewichteten Konsensusmotivs genutzt, welches die Eigenschaften von mehreren Sequenzen in sich vereint und so einen besseren Einblick in die GABARAP Bindungsspezifität gibt, als eine einzelne Peptidsequenz. Die „*position-specific scoring matrix*“ (PSSM) repräsentiert die erwartete Häufigkeit, mit der jede Aminosäure an den einzelnen Positionen eines Konsensusmotivs vorkommt (Schneider and Stephens 1990). Bei der Generierung der PSSMs im Rahmen dieser Arbeit wurden diejenigen Peptidsequenzen berücksichtigt, welche bei der Erstellung eines Phylograms mit Hilfe des *Multiple Alignment Tools* „ClustalW“ um die Sequenz des N1-Peptids (Sequenz 8 und 60) *clustern* (Abb. 4.5, B). Dabei wurde der Sequenzbereich eingeschränkt (Abb. 4.11 und 4.12, Kasten), um die Signifikanz der entsprechenden Motive nicht zu reduzieren. Das resultierende fünf- bzw. sechsstellige Konsensusmotiv zeigt den höchsten Konservierungsgrad für die Sequenzpositionen +1 (Tryptophan) und +4 (Leucin). Auch den restlichen Sequenzpositionen lassen sich definierte Eigenschaften zuordnen, da die Sequenzidentität (75 %) und Sequenzähnlichkeit (83 %) der zugrunde liegenden Sequenzabschnitte entsprechend groß ist. So ist an Sequenzposition -1 vorrangig die saure Aminosäure Aspartat vorhanden, während an Position +2 hydrophobe und ungeladene Reste (Valin, Isoleucin und Threonin) zu finden sind. An Sequenzposition +3 liegen bevorzugt aromatische Reste (Phenylalanin, Tyrosin) und an Position +5 (nur bei Konsensusmotiv 2 vorhanden) ist meist ein Prolin vorhanden.

5.3.2 Die Datenbanksuche mit Hilfe der erstellten Konsensusmotive identifizierte Calretikulin und Clathrin als physiologische, potentiell GABARAP-bindende Proteine

Eine BLAST Suche mit den erstellten PSSMs gegen die Proteindatenbanken SwissProt und NCBI identifizierte die humanen Proteine CHC1 und 2 und CRT als potentiell GABARAP-bindende Proteine (Tab. 4.2 und 4.3). Dabei wurde das *Motif Alignment and Search Tool* (MAST) benutzt, welches jedem Treffer einen E-Wert zuordnet. Dieser gibt die erwartete Anzahl an Sequenzen in einer Zufallsdatenbank der gleichen Größe an, die mit dem verwendeten Suchmotiv in dem gleichen Maß übereinstimmen, wie der jeweilige Treffer. Somit ist der E-Wert ein Maß für die Signifikanz des Treffers. Für CHC1 und 2 betrug der E-Wert 140 und für CRT 72, was eine niedrige Signifikanz dieser Treffer widerspiegelt. Jedoch befand sich CHC unter den besten zehn und CRT unter den besten 5 Hits aller humanen Proteine auf der MAST-Hitliste.

CHC1 und CHC2 sind Isoformen des CHC Proteins, die 85 % Sequenzidentität aufweisen. Während CHC1 ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird, ist CHC2 in der Skelettmuskulatur vorhanden. Es wird vermutet, dass CHC1 und CHC2 unterschiedliche physiologische Funktionen haben (89). Das zelluläre Protein Clathrin besteht aus drei schweren Ketten (~190 kDa), jede mit einer leichten Kette (~25 kDa) assoziiert (Kirchhausen and Harrison 1981; Ungewickell and Branton 1981), die zusammen das so genannte *Triskelion* bilden. Clathrin weist eine spezielle Winklung der schweren Kette auf, die die Unterscheidung in ein „proximales Segment“, ein „Knie“, ein „distales Segment“, einen „Linker“ und eine „terminale Domäne“ relativ zur Trimerisierungsdomäne möglich macht (Wilbur et al. 2005). Strukturelle Untersuchungen der CHC ergaben eine globulär gefaltete aminotermine Domäne mit einem sieben-strängigen β -Faltblatt (ter Haar et al. 1998). Der restliche, vorwiegend lineare Teil des Proteins ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine Superhelix, bestehend aus α -*zigzag* Elementen (Ybe et al. 1999) (Abb. 4.13). Die Betrachtung der CHC Struktur zeigt, dass die putative GABARAP-Bindestelle (Aminosäurereste 512 bis 516) sich im *Linker*-Bereich der schweren Kette befindet und für eine mögliche Interaktion mit GABARAP zugänglich wäre. Basierend auf den Ergebnissen einer analytischen Proteolyse wird die Region, in der sich die Aminosäurereste 512 bis 516 befinden, als „flexible Linker Region“ bezeichnet (Kirchhausen et al. 1987). Dies lässt auf die Möglichkeit einer konformationellen Änderung dieses CHC Sequenzbereiches bei der Bindung an GABARAP schließen, was die Zugänglichkeit der putativen GABARAP-Bindestelle möglicherweise erhöht.

Diese unterscheidet sich von bisher bekannten Bindestellen von weiteren CHC Liganden. Es ist bekannt, dass die globuläre aminotermine Domäne von CHC Proteine mit Clathrin-*box* Motiv

(LΦXΦ[DE]) bindet (Φ steht für große, hydrophobe und X für jede beliebige Aminosäure, die eckigen Klammern schließen zwei alternativ vorkommende Aminosäuren ein), welches in den Clathrin Adapterproteinen AP-1, AP-2 und β-Arrestin vorhanden ist (ter Haar et al. 2000). Die aminoterminal Domäne hat zusätzlich eine weitere bekannte Bindungssequenz, das W-box Motiv (PWXXW), welches in Amphiphysin zu finden ist (Miele et al. 2004). Aminosäurereste 512 bis 516 befinden sich außerhalb der globulären, N-terminalen Domäne in der *Linker*-Region von Clathrin, von der bisher keine Beteiligung an Protein-Interaktionen bekannt ist.

Die CRT Sequenz wird in drei Abschnitte unterteilt: Die N-Domäne (Aminosäure 1 bis 170), die Prolin-reiche P-Domäne (171-285) und die saure C-Domäne (286-400). Neben der Lösungsstruktur eines CRT-Teilkonstruktes, der P-Domäne (Ellgaard et al. 2001), ist bis heute keine NMR- oder Röntgenstruktur von CRT in voller Länge vorhanden. Dagegen konnte die Struktur der zu CRT (6 bis 332) entsprechende Sequenz des homologen Proteins Calnexin (CNX) per Röntgenkristallographie gelöst werden (Schrage et al. 2001). Basierend auf diesen Daten geht man davon aus, dass CRT eine globuläre, lektin-artige Domäne aufweist, die die N- und C-Domäne einschließt, während die dazwischen befindliche P-Domäne eine doppelstränge *hairpin-like* Faltung aufweist, die eine herausragende, armartige Form zeigt. Das Phagendisplay-basierte GABARAP-Bindungsmotiv von CRT befindet sich in einem Lösungsmittel-exponierten Bereich am Übergang von der P- zur C-Domäne. Der dem CRT (182-187) entsprechende Sequenzbereich von Calnexin ist in der Röntgenstruktur nur partiell vorhanden (Schrage et al. 2001) (Abb. 4.14). Es ist jedoch anzunehmen, dass die putative GABARAP-Bindestelle von CRT (Aminosäurereste 182-187) für eine mögliche Protein-Interaktion mit GABARAP zugänglich ist.

Die hier vorgestellte GABARAP-Bindestelle von CRT überlappt nicht mit bekannten Bindestellen von anderen CRT Liganden. Die ER-ständige Thiol-Disulfid Oxidoreduktase ERp57 interagiert mit der äußersten Spitze der P-Domäne (Frickel et al. 2002), die Carbohydrat-Bindungsregion liegt in der N-Domäne (Kapoor et al. 2004; Schrage et al. 2001). Beide Interaktionen sind von großer Wichtigkeit für die ER-assoziierte Funktion von CRT. Für das zytosolische CRT wahrscheinlich irrelevant. Die Bindungsstellen der zytosolischen Interaktionspartner von CRT, wie z.B. Integrine oder Glukokortikoid Rezeptor, sind bisher unbekannt.

5.4 Klonierung, Expression und Reinigung von CRT

5.4.1 Die Klonierung, Expression und Reinigung von CRT verliefen erfolgreich

Humanes CRT konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich kloniert, exprimiert und gereinigt werden (Kap. 3.2.2). Es wurde in löslicher Form in *E. coli* exprimiert und konnte unter nativen Bedingungen durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden (Abb. 4.17). Dabei konnte im SDS-PAGE regelmäßig ein Schmier unter der Bande des CRT Proteins beobachtet werden. Dies könnte durch proteolytischen Abbau von CRT während der Reinigungsprozedur zustande kommen, konnte jedoch nicht durch Zugabe eines Protease-Inhibitor-Gemisches verhindert werden, welches vor allem Serin-, Metallo- und Cysteinproteasen hemmt. Die durchschnittlichen Ausbeuten lagen dabei zwischen 2 und 3 mg Fusionsprotein pro g Nasszellgewicht. Der His-tag wurde in später entwickelten Reinigungsschritten anschließend proteolytisch mit Thrombin abgespalten und die entstehenden Spaltprodukte mittels Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt (Daten nicht gezeigt). Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente fanden jedoch ausschließlich mit His-CRT Fusionsprotein statt.

Der Faltungszustand des rekombinanten His-CRTs wurde mittels Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht. Das resultierende Spektrum (Abb. 4.18) zeigt mit einem Minimum bei 208 nm und einer deutlichen Schulter bei ca. 229 nm eine große Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Bouvier and Stafford 2000; Ostwald et al. 1974). Die Auswertung des Ergebnisses mit Hilfe des CD-Analysetools CD-Pro lieferte Informationen zu den prozentualen Anteilen der vorhandenen Sekundärstrukturelemente. Die in Tabelle 4.4 aufgeführten CD-Pro Ergebnisse stimmen ebenfalls mit den per CD-Spektroskopie ermittelten Literaturwerten (Guo et al. 2003) überein. Dabei können kleinere Unterschiede auf Puffereffekte und/oder das Vorhandensein des His-tags zurückgeführt werden. Die Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie lässt zusammenfassend darauf schließen, dass nach der in dieser Arbeit durchgeführten Reinigungsprozedur nativ gefaltetes CRT vorlag. Beim Vergleich des CD-Spektrums von frisch gereinigtem CRT mit dem Spektrums der identischen Probe nach einer Woche zeigt, dass das CD-Spektrum nach einer Woche die gleiche Form aufweist, die Gesamtsignalstärke jedoch leicht herabgesetzt ist (Abb. 4.18, gestrichelte Linie). Dies könnte z.B. durch einen Proteinverlust aufgrund hydrophober Wechselwirkung von CRT an das aus Plastik bestehende Lagerungsgefäß oder durch partielle Degradation des Proteins zustande gekommen sein. Das noch vorhandene Protein weist jedoch noch die gleichen Spektren-Charakteristika auf, wie frisch gereinigtes CRT.

Dies lässt darauf schließen, dass CRT in 50 mM Natriumphosphat pH 8,0 bei 4 °C innerhalb von einer Woche konformationell stabil ist.

5.5 CRT interagiert mit GABARAP

Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte BLAST-Suche mit einer Phagendisplay-basierten *position-specific scoring matrix* (PSSM) gegen die Proteindatenbank NCBI identifizierte humanes CRT als potentiell GABARAP-bindendes Protein (Kap. 4.2). Die anschließend durchgeführten SPR Messungen, NMR-spektroskopischen Methoden und *Pulldown* Analysen dienten zur Verifizierung dieser Interaktion.

5.5.1 CRT bindet direkt und hochaffin an GABARAP

Die ersten SPR-Messungen wurden mit kommerziell erhältlichem Kaninchen-CRT (Abcam, Cambridge) durchgeführt.

Bei Betrachtung der Sensorgramme wird deutlich, dass CRT nur sehr langsam von der GABARAP-gekoppelten CM5-Chip Oberfläche dissoziiert (Abb. 4.15). Die Basislinie wird auch nach verschiedenen Regenerationsschritten nicht wieder vollständig erreicht und steigt nach jeder Injektion proportional zur Signalstärke der CRT-Bindungskurve an (Daten nicht gezeigt). Wenn die Injektion einer bestimmten CRT-Konzentration wiederholt wurde, konnte reproduzierbar eine Reduktion der Differenz zwischen Basislinie und Maximalsignal bei der jeweils späteren Injektion beobachtet werden (Abb. 4.15, *). Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des gebundenen CRT so langsam von der GABARAP-gekoppelten Chipoberfläche dissoziiert, dass zum Zeitpunkt des folgenden Injektionsstarts die Basislinie noch nicht wieder erreicht war und somit die Basislinie mit jeder Injektion immer weiter ansteigt. Eine andere Ursache könnte sein, daß ein Teil des gebundenen GABARAPs nach jeder CRT-Injektion konformationell verändert vorliegt und keine Bindung von CRT mehr zulässt.

Bei der Ermittlung der kinetischen Parameter wurde daher die Dissoziations- und Assoziationsrate global gefittet, jedoch für jede Bindungskurve ein separater $R_{\max}$ -Wert angenommen. Die kinetischen Raten der GABARAP-CRT Interaktion ergeben mit $k_{\text{on}} = 1,3 \times 10^4 / \text{M s}$ und $k_{\text{off}} = 8,3 \times 10^{-4} / \text{s}$ einen K_D -Wert von 64 nM. Der χ^2 -Wert des Fits beträgt 62 und gibt damit eine relativ große mittlere Abweichung aller Fit-Datenpunkte zu den entsprechenden Messwerten an. Dies kann z.B. durch den Datenbereich des jeweiligen Injektionsendes zustande kommen, da hier die Fit- und Originalwerte die größten Abweichungen zueinander zeigen. In den

Zeitbereichen vorher und danach gibt es dagegen eine gute Übereinstimmung der Fit- und Messdatenwerte, was auf eine gute Zuverlässigkeit der Fit-Parameter schließen lässt. Die k_{off} Rate lässt auf einen hochstabilen Komplex mit einer Halbwertszeit von 20 min schließen. Damit weist die CRT-GABARAP-Bindung die größte bisher ermittelte Affinität für jede der beiden Komponenten zu einem anderen Protein oder Peptid auf. Die Bindungsaffinität von N1 zu GABARAP ist mit 740 nM signifikant schwächer, als die Bindungsaffinität von CRT zu GABARAP (64 nM). Dies kann entweder auf die vorhandenen Sequenzunterschiede von N1-Peptid und CRT (178-188), oder aber auf tertiäre CRT-Interaktionen mit GABARAP zurückzuführen sein. Die von Frickel et al. ermittelte Bindungsaffinität von CRT zu ERp57 zeigt mit einem K_D -Wert zwischen 9 und 18 μM und einem $k_{\text{off}} > 1000/\text{s}$ (Frickel et al. 2002) eine signifikant schwächere Interaktion. Auch die Bindungsaffinität von CRT zu Glykanen liegt mit einem K_D -Wert von 435 nM und einem $k_{\text{off}} = 0,1/\text{s}$ (Kapoor et al. 2003) deutlich unter derjenigen zu GABARAP. Beide Interaktionen sind mit der Chaperon-Funktion von CRT assoziiert. Es konnte des weiteren gezeigt werden, dass CRT an nicht-glykolysierte Peptide und ungefaltete oder konformationell zerstörte Proteine bindet, während die entsprechende Interaktion des jeweilig nativen Proteins an CRT nicht mehr stattfindet (Saito et al. 1999; Steino et al. 2004). Im Gegensatz dazu findet die Interaktion von CRT und GABARAP mit nativ gefaltetem GABARAP Protein statt. Dies wird bei Betrachtung der entsprechenden NMR-Spektren (Abb. 4.19) deutlich.

Vergleicht man die (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektren von GABARAP vor und nach Zugabe von N1-Peptid (Abb. 4.19, A), so verändert sich die Lage vieler GABARAP-Resonanzsignale nach der Bindung des N1-Peptides, jedoch ist die Signaldispersion beider Spektren typisch für gefaltete Proteine (Dobson and Hore 1998). Im (^1H - ^{15}N)-Spektrum von GABARAP sind in Anwesenheit von CRT die meisten H^{N} - und N-GABARAP-Resonanzen durch eine drastische Signalverbreiterung nicht mehr detektierbar (Abb. 4.19, B, rote Signale). Die Signalverbreiterungen sind erklärbar durch eine Erhöhung des Molekulargewichtes von GABARAP durch CRT-Bindung, was zu einer geringeren Beweglichkeit des Proteins führt, eventuell auch in Kombination mit einer ungünstigen Dynamik der GABARAP-CRT-Interaktion. Die Signalverbreiterung der Amidgruppen-Resonanzen zeigt aber, dass eine Bindung von CRT an GABARAP stattgefunden hat. Lediglich schwache Signale der Amidgruppen-Signale der Gln/Asn Seitenketten und der carboxyterminalen Aminosäure Leu117 konnten weiterhin detektiert werden, vermutlich weil diese ihre relativ hohe intrinsische Flexibilität im CRT-GABARAP Komplex zum Teil behalten. Möglich wäre auch, dass der Komplex deutlich größer ist, als angenommen. Oligomerisierung von CRT wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Jorgensen et al. 2003; Rizvi et al. 2004). Andererseits wurden konformationelle

Austauschphänomene und Linienverbreiterung ebenfalls bei NMR-Spektren der freien CRT-P-Domäne dokumentiert (Ellgaard et al. 2001). Es ist daher möglich, dass die Linienverbreiterung der GABARAP-Resonanzen auch durch konformationelle Austauschphänomene des CRT-gebundenen GABARAPs zustande kommt. Das Ergebnis dieser NMR-spektroskopischen Untersuchung beweist, dass GABARAP und CRT in Lösung direkt aneinander binden.

5.5.2 Rekombinantes CRT bindet an endogenes GABARAP

Die Bindung von endogenem GABARAP an rekombinantes CRT wurde mit Hilfe eines *Pulldown*-Versuches nachgewiesen. Während keine Bindung von endogenem GABARAP an die ungekoppelte Kontrollsepharose beobachtet werden kann (Abb. 4.20, Spur 2), lässt die Immunoreaktivität für GABARAP nach der Verwendung von CRT-gekoppelter Sepharose jedoch auf die Bindung von endogenem GABARAP an rekombinantes CRT schließen (Abb. 4.20, Spur 3). Im Western Blot werden dabei zwei Banden mit GABARAP-Immunoreaktivität detektiert. Es ist daher anzunehmen, dass der im Western-Blot verwendete polyklonale GABARAP-Antikörper neben GABARAP ein weiteres, zu GABARAP ähnliches, Protein mit einer anderen Größe bindet. Hierbei kann es sich z.B. um die lipidierte Form von GABARAP (Tanida et al. 2003; Tanida et al. 2006 Oct) handeln. Eine unspezifische Bindung des Antikörpers an andere Proteine ist unwahrscheinlich, da dieser affinitätsgereinigt war.

5.5.3 Rekombinantes GABARAP bindet an endogenes CRT

Die Bindung von endogenem CRT an rekombinantes GABARAP wurde mit Hilfe eines *Pulldown*-Versuches nachgewiesen. Während keine Bindung von endogenem CRT an die nicht GABARAP-gekoppelte Kontrollsepharose beobachtet werden kann (Abb. 4.21, Spur 2), lässt die Immunoreaktivität für CRT nach der Verwendung von GABARAP-gekoppelter Sepharose jedoch auf die Bindung von endogenem CRT an rekombinantes GABARAP schließen (Abb. 4.21, Spur 3).

5.5.4 CRT bindet an nativ gefaltetes GABARAP und kann durch N1-Peptid von GABARAP verdrängt werden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde CRT mit Hilfe eines Phagendisplay-basierten Konsensusmotivs als putativ GABARAP-bindendes Protein identifiziert. Definiert dieses kontinuierliche Sequenzmotiv, welches eine große Ähnlichkeit zu CRT (178-188) aufweist, die Hauptbindestelle von CRT an GABARAP, könnte die CRT-GABARAP Interaktion durch die Zugabe von N1-Peptid kompetiert werden, da dieses ebenfalls eine große Ähnlichkeit zu dem Sequenzmotiv besitzt. Dies wird durch die Ergebnisse des (^1H - ^{15}N)-HSQC-Experiments und der *Pulldown*-Analyse bestätigt:

Während die meisten GABARAP-Amidgruppenresonanzen im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Experiment bei Anwesenheit von CRT eine drastische Signalverbreiterung zeigen und somit nicht mehr detektierbar sind (Abb. 4.19, B, rote Signale), führt die Zugabe von N1-Peptid dazu, dass die GABARAP-Resonanzen wieder an Intensität gewinnen, obwohl die Konzentration von GABARAP bei diesem Schritt weiter sinkt (16 μM). Die resultierenden Signale zeigen das für den aus GABARAP und N1-Peptid bestehenden Komplex typische HSQC-Spektrum (Abb. 4.19, B, schwarze Signale). Es ist daher anzunehmen, dass CRT an nativ gefaltetes GABARAP bindet und durch N1-Peptid von GABARAP verdrängt werden kann. Analog dazu kann auch im *Pulldown* Experiment die Bindung von endogenem CRT an rekombinantes GABARAP durch die Zugabe von N1-Peptid kompetiert werden. Dies lässt sich durch eine signifikante Reduktion der CRT-Immunoreaktivität in Anwesenheit des N1-Peptids erkennen (Abb. 4.21, Spur 4).

Obwohl allosterische Effekte nicht ausgeschlossen werden können, ist es wahrscheinlich, dass sich die CRT-Bindungsstelle partiell oder komplett mit der N1-Bindungsstelle von GABARAP überlagert.

5.5.5 Die GABARAP-CRT Interaktion ist nicht kalziumabhängig

Ca^{2+} fungiert als zelluläres Signalmolekül, welches Einfluss auf zahlreiche Prozesse, wie z.B. Sekretion, Kontraktion/Relaxation, Motilität, Stoffwechsel, Proteinsynthese, -modifikation und -faltung, Genexpression, Zellzyklus und Apoptose hat (Michalak et al. 1999). CRT ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein, dessen Konformation und Temperaturstabilität Ca^{2+} -abhängig ist (Gelebart et al. 2005; Li et al. 2001; Nakamura et al. 2001; Rizvi et al. 2004). Holaska et al. zeigten, dass CRT-vermittelter nuklearer Export des Glukokortikoid Rezeptors (GR) Ca^{2+} -abhängig ist und konnten so eine funktionelle Bedeutung der CRT- Ca^{2+} Bindung nachweisen (Holaska et al. 2002). Über

eine mögliche Funktion der Ca^{2+} -CRT Interaktion bei der Phagozytose wird spekuliert (Muller-Taubenberger et al. 2001). GABARAP interagiert mit PRIP (phospholipase C-related inactive protein), einem Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) assoziierten Protein, welches in die IP3-vermittelte Ca^{2+} -Signaltransduktion der Zelle involviert ist (Harada et al. 2005; Kanematsu et al. 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die Ca^{2+} -Abhängigkeit der CRT-GABARAP Interaktion mittels SPR-Messungen überprüft (Abb. 4.22, Tab. 4.5). Die Bindungsstärke des CRT-GABARAP Komplexes in Anwesenheit von 10 mM EDTA ($K_D = 29 \text{ nM}$) und in Anwesenheit von 5 mM CaCl_2 ($K_D = 23 \text{ nM}$) unterscheidet sich mit einem Faktor von 1,2 kaum. Daher ist es unwahrscheinlich, dass Ca^{2+} eine physiologische Relevanz für die CRT-GABARAP Interaktion hat.

Der hier ermittelte K_D -Wert der CRT-GABARAP-Interaktion in Anwesenheit von 10 mM EDTA (29 nM) sollte dem in Kapitel 5.5.2 diskutierten K_D -Wert (64 nM) entsprechen. Beide Werte unterscheiden sich um den Faktor zwei, was keinen signifikanten Unterschied der Bindungsaffinität darstellt, da z.B. Fehler bei der Proteinkonzentrationsbestimmung das Ergebnis beeinflussen können. Zudem handelt es sich hierbei um das rekombinante, humane CRT, welches sich z.B. durch die Lokalisation des His-Tags von dem Kaninchen-CRT unterscheidet. Mit einem K_D -Wert im zweistelligen nanomolaren Bereich kann hier das Ergebnis der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Messreihe bestätigt werden.

5.5.6 CRT (178-188) bindet direkt an GABARAP

Zunächst wurde die Bindungsaffinität des 11mer Peptides CRT (178-188) an GABARAP mittels SPR bestimmt. Die Sensorgramme der entsprechenden Messreihe zeigen eine gute Reproduzierbarkeit und keine Störanfälligkeit durch Artefakte (Abb. 4.23). Die kinetischen Parameter für Assoziations- und Dissoziationsphase ließen sich aufgrund von ungünstigen Kinetiken nicht quantitativ bestimmen. Daher wurde die Bindungskurve der CRT (178-188)-GABARAP Interaktion anhand der gemittelten Signalintensitäten der „*steady state*“ Phase der einzelnen Injektionen erstellt. Es resultiert eine Dissoziationskonstante von $12 \mu\text{M}$ für die CRT (178-188)-GABARAP Interaktion, die sich somit nicht signifikant zu der Bindungsstärke von N1-Peptid an GABARAP ($K_D = 8,6 \mu\text{M}$) unterscheidet. Dies ist nicht erstaunlich, wenn man die hohe Sequenzidentität von N1-Peptid und CRT (178-188) von ca. 50 % betrachtet (Abb. 5.1).

N1-Peptid	SHKSDWIF FL PNA
CRT (178-188)	SLEDDWDF FL PP

Abbildung 5.1: Die Aminosäuresequenzen der Peptide N1 und CRT (178-188) zeigen 50 % Sequenzidentität. In beiden Peptiden identische Aminosäuren sind fettgedruckt hervorgehoben.

Weiter kann geschlussfolgert werden, dass die hohe Bindungsaffinität von CRT (volle Länge) an GABARAP im Vergleich zu der CRT (178-188)-GABARAP Bindungsaffinität durch zusätzliche Kontakte von CRT zurückzuführen sein muss, die ausserhalb des CRT (178-188)-Peptidbereiches liegen. Wie bereits in Kapitel 4.1.4 ausgeführt, gehören die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Peptid-GABARAP-Interaktionen mit K_D -Werten im einstelligen bis niedrigen zweistelligen mikromolaren Bereich zu den affinsten aller bisher untersuchten Peptid-GABARAP-Interaktionen (Tab. 5.1).

5.5.7 Kartierung der CRT (178-188)-Bindestelle von GABARAP

Die CRT (178-188)-GABARAP-Interaktion wurde weiterhin mittels (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experiment untersucht, um die Bindung beider Komponenten in Lösung nachzuweisen und eine Kartierung der CRT (178-188) Bindungsstelle an GABARAP zu ermöglichen (Abb. 4.24). Dies stellt eine praktikable Alternative zu NMR-spektroskopischen Untersuchung des Gesamtproteins CRT dar, nach dessen Bindung an GABARAP keine Amidgruppenresonanzen im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Experiment mehr detektierbar sind (Abb. 4.24, B, rote Signale).

Nach der Zugabe von CRT (178-188) sind für die meisten GABARAP-Amidgruppen-Resonanzen (ca. 90 %) Änderungen der chemischen Verschiebungen und/oder Signalverbreiterungen zu beobachten. Dabei können pH-Effekte ausgeschlossen werden, da die pH-Werte der GABARAP- und der Peptidlösung vor den Messungen genau eingestellt wurden. Bei der Bindung des 11mer Peptids CRT (178-188) an GABARAP ist es unwahrscheinlich, dass so viele GABARAP-Reste direkt an der Interaktion beteiligt sind. Es ist daher nicht sinnvoll, alle betroffenen Resonanzsignale bei der Kartierung der CRT (178-188) Bindestelle an GABARAP mit einzubeziehen. So wurden nur diejenigen ausgewählt, die nach dem letzten Titrationsschritt durch Signalverbreiterung nicht mehr detektierbar und somit am stärksten betroffen sind. Dabei wurden 19 Reste berücksichtigt, die in mehreren benachbarten Regionen der GABARAP-Oberfläche liegen (Abb. 4.26). Diese liegen analog zu der in Kapitel 4.17 dargestellten GABARAP-N1 Peptid Interaktion vorrangig im Bereich der GABARAP-Sekundärstrukturelemente $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 2$ (Abb. 4.25).

Basierend auf den Ergebnissen der GABARAP-Titration mit CRT (178-188) Peptid kann keine exakte Kartierung der CRT (178-188)-Bindungsstelle an GABARAP vorgenommen werden, da die Zahl der betroffenen GABARAP-Resonanzsignale bei der Bindung von CRT (178-188) höher ist als zu erwarten wäre, wenn nur die direkt an der Peptidbindung beteiligten GABARAP-Aminosäurereste eine Änderung ihres Amidgruppen Resonanzsignals im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experiment zeigen würden. Der mögliche Bereich der Peptidbindung kann jedoch eingeschränkt werden, indem nur die von der Bindung am stärksten betroffenen GABARAP-Resonanzsignale berücksichtigt werden. Die Definition der am stärksten betroffenen Reste erfolgte über den Detektionsverlust des entsprechenden Resonanzsignals im (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektrums.

Die Ergebnisse der CRT (178-188)-GABARAP (^1H - ^{15}N)-HSQC Titration werden bei einem Vergleich mit den Resultaten der GABARAP-Titration mit N1-Peptid (Kap. 4.1.5) unterstützt, da eine große Übereinstimmung mit der hier vorgeschlagenen GABARAP-Bindungsregion für CRT

(178-188) zu sehen ist. Dies kann z.B. auf die hohe Sequenzidentität von N1-Peptid und CRT (178-188) von ca. 50 % zurückzuführen sein (Abb. 5.1). Knight et al. untersuchten die Interaktion verschiedener Peptide (γ 2L[394-411], Teile des Carboxyterminus von Tubulin und zufällig ausgewählte Peptide, für welche keine Interaktion mit GABARAP bekannt ist) zu GABARAP. Diese unterschieden sich in ihrer Sequenz und ihren Ladungseigenschaften. Bei der Bindung aller Peptide an GABARAP konnten auch hier strukturell spezifische Effekte auf die GABARAP-Sekundärstrukturelemente β 2 und α 3 beobachtet werden (Knight et al. 2002), was die Ergebnisse der GABARAP-Titration mit N1-Peptid ebenfalls unterstützt. Alle bisher untersuchten Peptide binden damit an einen ähnlichen Bereich der GABARAP-Oberfläche.

Interessanter Weise überlappt diese Region mit homologen Resten des Hefeproteins Atg8, die für eine funktionelle Autophagozytose in Hefe wichtig sind (Nakatogawa et al. 2007). Diese Reste sind in MAP-LC3 und GABARAP konserviert. Es kann daher vermutet werden, dass die Interaktion von physiologischen Liganden an die hier vorgeschlagene Region der GABARAP-Oberfläche ebenfalls essentiell für seine zelluläre Funktion (z.B. Beteiligung an Autophagozytose, Endozytose, Rezeptortransport) ist.

Die Austauschrate zwischen freiem und gebundenem Zustand eines zu untersuchenden Proteins im HSQC-Experiments im Vergleich zu der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Resonanz-Frequenzen des zu beobachteten Kerns gibt Auskunft über die Bindungsstärke der untersuchten Interaktion. Die Bindungsstärke der CRT (178-188)-GABARAP-Interaktion kann anhand der (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experimente auf einen K_D im einstellig mikromolaren Bereich abgeschätzt werden, was mit den Ergebnissen der SPR-Messung (Kap. 4.3.7) übereinstimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit unterschiedlichen Methoden gezeigt werden, dass GABARAP eine hohe Bindungsaffinität (29 bis 64 nM) zu CRT besitzt.

5.5.8 Mögliche Relevanz der GABARAP-CRT-Interaktion

CRT ist ein multifunktionales, Lektin-artiges 46 kDa Protein, welches am besten als Ca^{2+} -abhängiges Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bekannt ist (Michalak et al. 1999). Es ist Regulator des Ca^{2+} Haushalts und hat eine wichtige Funktion bei der Regulierung von Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktionswegen. Eine große Zahl an physiologischen und pathologischen Effekten ist mit CRT assoziiert, manche davon auch außerhalb des ERs (Dedhar 1994; Johnson et al. 2001). CRT bindet an ein konserviertes Sequenzmotiv in der zytoplasmatischen Domäne der α -Untereinheit von Integrinen (Rojiani et al. 1991) und zeigt Effekte auf Zelladhäsion (Coppolino et al. 1997). Es ist ein Rezeptor für nuklearen Export (Holaska et al. 2001) und moduliert Genexpression (Dedhar 1994). Kürzlich konnte die Retrotranslokation von CRT vom ER in das Zytosol nachgewiesen werden (Afshar et al. 2005). Dies zeigt, dass CRT in der Lage ist, zelluläre Kompartimente zu wechseln und dass das zytosolische CRT aus dem ER-ständigen *Pool* entsteht. Diese Retrotranslokation findet nicht über den für ungefaltete Proteine üblichen „ER-Associated Degradation“ (ERAD)-Weg (Tsai 2002) statt. GABARAP ist Teil einer Proteinfamilie, die in vesikuläre Transportprozesse, z.B. Transport des GABA_A-Rezeptors, involviert ist. Obwohl bisher keine experimentellen Daten vorliegen, die den Effekt der GABARAP-CRT Interaktion auf den Transport und die Oberflächen-Expression des GABA_A-Rezeptors demonstrieren, lässt die hohe Bindungsaffinität des GABARAP-CRT Komplexes einen funktionellen Zusammenhang zwischen CRT und dem GABA_A-Rezeptortransport oder -lokalisierung vermuten. In der Tat interagieren beide Proteine mit Integrinen. Dies sind heterodimere Transmembranproteine, die Zelladhäsion vermitteln. Sie sind wichtig bei der Synaptogenese und bei der Modulierung der synaptischen Plastizität (Clegg et al. 2003). Alle bekannten α -Untereinheiten der Integrin Proteinfamilie weisen ein stark konserviertes Sequenzmotiv (KxGFFKR) auf, welches benachbart zur Transmembrandomäne im Zytosol liegt. CRT bindet an das entsprechende Peptidfragment (Rojiani et al. 1991), wird mit $\alpha 3\beta 1$ -Integrinen zusammen gereinigt (Leung-Hagesteijn et al. 1994) und ist ein essentieller Modulator von Zelladhäsion (Coppolino et al. 1997). $\alpha 3\beta 1$ -Integrine kolokalisieren mit GABA_A-Rezeptoren und unterdrücken Langzeit-Potenzierung von GABA_A-Rezeptor Empfindlichkeit an inhibitorischen Synapsen auf zerebellaren Purkinje-Neuronen (Kawaguchi and Hirano 2006).

Neben dem Kontext der Integrine gibt es weitere Hinweise auf eine Beteiligung von CRT an der synaptischen Plastizität. Langzeit Sensibilisierungstraining in *Aplysia* hatte eine erhöhte Expressionsrate von CRT zur Folge (Kennedy et al. 1992). CRT ist ein vorgeschalteter Regulator der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Protein Phosphatase Calcineurin (CaN) (Lynch and Michalak 2003). Diese ist ein Regulator von neuronaler Plastizität und hat Einfluss auf Kurz- und

Langzeiteffekte von neuronaler Reizbarkeit und Funktion (Groth et al. 2003; Mansuy 2003). Langzeit Depression (LTD) von GABA_A-Rezeptor Abschwächung wird durch CaN vermittelt (Gaiarsa et al. 2002; Lu et al. 2000; Wang and Stelzer 1996). CaN interagiert direkt mit GABA_A-Rezeptoren und ist in die Vermittlung von Langzeit Depression an CA1 inhibierenden Synapsen involviert (Wang et al. 2003). Diese Interaktion findet mit den Resten 317-332 des zytoplasmatischen TM3/TM4 *Loops* der GABA_A-Rezeptor $\gamma 2$ Untereinheit statt. GABARAP bindet gleichfalls an die $\gamma 2$ Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, jedoch an die Reste 389-411 des zytoplasmatischen *Loops*. Es kann daher spekuliert werden, dass GABARAP zytosolisches CRT in räumliche Nähe von CaN bringen könnte.

CRT ist in zytosolische Ca^{2+} -Signalwege involviert. CRT-defiziente Zellen haben einen gestörten Integrin-vermittelten Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} (Coppolino et al. 1997). Eine weitere Studie zeigte, dass der Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Ausstrom in CRT-defizienten Zellen inhibiert ist, obwohl die direkte Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren mittels IP_3 immer noch funktional ist (Nakamura et al. 2001). Die Beteiligung von CRT an IP_3 -abhängigem Ca^{2+} -Ausstrom wurde seiner Chaperonfunktion bei der Bradykininrezeptorfaltung zugeschrieben, da bekanntlich die Abwesenheit von CRT die generelle Qualitätskontrolle des sekretorischen Wegs beeinträchtigt (Knee et al. 2003). Das GABARAP-assoziierte Protein PRIP-1 (Kanematsu et al. 2002) ist ein IP_3 -bindendes Protein. Es wird vermutet, dass es IP_3 gegen ansonsten schnell stattfindende Hydrolyse schützt und so an der Regulierung IP_3 -vermittelter Ca^{2+} -Signaltransduktion beteiligt ist (Harada et al. 2005). Daher könnte GABARAP das zytosolische CRT in PRIP-1-modulierte IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Signaltransduktion einbinden.

Die wahrscheinlich offensichtlichste Interpretation der physiologischen Relevanz der GABARAP-CRT-Interaktion ist mit den Ubiquitin-ähnlichen Eigenschaften von GABARAP assoziiert. Wie SUMO oder Ubiquitin gehört GABARAP zu den ubiquitin-*like* modifiers (UBL), die als Sortierungssignale bei Transportprozessen bekannt sind. Sie verändern die Bindungseigenschaften ihres Zielproteins und können somit deren subzelluläre Lokalisierung beeinflussen (Seeler and Dejean 2001), oder ermöglichen die Interaktion des Zielproteins an Transportproteine (Schwartz and Hochstrasser 2003). Während SUMO und Ubiquitin ausnahmslos an Proteine binden, sind die Zielmoleküle von GABARAP Lipide. Dies spiegelt sich auch in der subzellulären Verteilung von GABARAP wieder, welches in der Zelle an membranösen Strukturen lokalisiert vorliegt und so als vesikuläres Transportsignal fungieren könnte. Es könnte als Vesikel-assoziiertes Protein die Rekrutierung von weiteren Faktoren ermöglichen, die für die entsprechenden Transportvorgänge notwendig sind, z.B. zytosolisches CRT.

Des Weiteren bleibt die Frage zu beantworten, ob CRT simultan oder kompetitiv mit der Reihe von bekannten GABARAP-bindenden Proteinen, z.B. PRIP-1, NSF oder dem GABA_A-Rezeptor an GABARAP bindet. Auch wenn die Interaktion von GABARAP zu CRT nicht Ca²⁺-abhängig ist, bleibt außerdem zu bedenken, dass mit der Rekrutierung von CRT ein Ca²⁺-bindendes und -sensitives Protein in vesikuläre Transportvorgänge mit einbezogen wird und dieses somit als potentieller Effektor bei Ca²⁺-Signalgebung in GABARAP-vermitteltem vesikulärem Transport fungieren kann. CRT hat eine Ca²⁺-Bindestelle mit einer Bindungsaffinität (K_D) von 6 µM (Martin et al. 2006), die damit in einem Bereich liegt, der ggf. die Regulierung durch physiologisch relevante Konzentrationen von zytosolischem, freiem Ca²⁺ möglich macht, die üblicherweise zwischen 0,1 und 10 µM liegt. Die Ca²⁺-abhängigkeit der CRT-Bindung zu anderen ER-Proteinen wird in der Literatur beschrieben (Corbett et al. 1999). CRT interagiert direkt mit dem Glukokortikoid-Rezeptor und der CRT-vermittelte nukleare Export des Glukokortikoid-Rezeptors ist in der Tat Ca²⁺-abhängig (Holaska et al. 2002).

Der GABARAP-vermittelte Einbezug von zytosolischem CRT bei Vorgängen, die sich auf die synaptische Plastizität auswirken, PRIP-1-modulierte IP₃-vermittelte Ca²⁺-Signaltransduktion und vesikuläre Transportvorgänge ist zurzeit spekulativ, stellt aber eine Grundlage dar, die die Entwicklung experimenteller Strategien zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung dieser Interaktion möglich macht.

5.6 Untersuchung der MAP-LC3b – CRT Interaktion

CRT wurde im Rahmen dieser Arbeit als GABARAP-bindendes Protein identifiziert. Mittels SPR Analyse sollte getestet werden, ob CRT neben GABARAP auch andere Proteine der MAP-LC3 Proteinfamilie bindet. Diese besteht neben GABARAP aus sechs Proteinen, deren Sequenzidentitäten zu GABARAP zwischen 30% und 87% liegen. Obwohl die Sequenzidentität von MAP-LC3b zu GABARAP nur bei ca. 31% liegt, wurde zunächst dieses stellvertretend für die MAP-LC3 Proteinfamilie ausgewählt, um eine mögliche Bindung zu CRT zu testen, da es in die Autophagozytose involviert (Kabeya et al. 2004) und funktionell gut untersucht ist.

5.6.1 Die Klonierung, Expression und Reinigung von MAP-LC3b verliefen erfolgreich

Nach der erfolgreichen Klonierung von *MAP-LC3b* in den eukaryotischen Expressionsvektor pET15b_kombi, konnte das MAP-LC3b Protein mit einem aminoterminalen His-tag in löslicher Form in *E.coli* exprimiert werden. Der erste Reinigungsschritt fand über Ni-NTA-Agarose statt, wobei MAP-LC3b bei ca. 50-100 mM Imidazol eluierte (Abb. 4.28). Die Spaltprodukte des anschließend stattfindenden proteolytischen Verdaus und Thrombin wurden im zweiten Reinigungsschritt über Größenausschlusschromatographie erfolgreich voneinander getrennt, so dass MAP-LC3b anschließend in einer Reinheit von >95% vorlag (Abb. 4.29). Die Proteinausbeuten lagen mit ca. 4 mg pro g Nasszellgewicht in einem Mengenbereich, der die Durchführung aller im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Experimente ermöglichte. Mittels NMR-Spektroskopie wurde die Proteinfaltung von MAP-LC3b nach dieser Reinigungsstrategie überprüft. Das resultierende (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum zeigt eine für das gefaltete MAP-LC3 Protein typische Dispersion der H^{N} und N-chemischen Verschiebung (Abb. 4.30) (Kap. 7.4) (Kouno et al. 2004).

5.6.2 CRT bindet nicht an MAP-LC3b

Die SPR-Bindungsexperimente mit MAP-LC3b und CRT wurden analog zu den Messungen mit GABARAP und CRT (Kap. 4.3.1) durchgeführt. Dabei konnten die Kopplungs- und Messbedingungen übernommen werden. Die CRT-MAP-LC3b Bindung ist im SPR-Experiment bis zu einer CRT-Konzentration von 7,5 μM nicht sättigbar (Abb. 4.31). Dies lässt auf eine

Dissoziationskonstante von über 3 μM schließen, falls überhaupt eine Bindung stattfindet. Bei der Kopplung von ca. 2000 RU MAP-LC3b auf den CM5-Chip liegt das theoretische Maximalsignal der CRT-Bindung - ausgehend von einer bimolekularen Interaktion - bei ca. 6000 RU. Bei der vorliegenden Messreihe entspricht das Signal der höchsten CRT-Konzentration (7,5 μM) ca. 20 RU und liegt somit weit unter dem erwarteten Maximalwert. Auch im Vergleich zu der in Kapitel 4.3.1 gezeigten GABARAP-CRT Messreihe sind die Signale der MAP-LC3b-CRT Interaktion signifikant kleiner. Dies kann durch Inhomogenität des auf den CM5-Chip gekoppelten MAP-LC3b zustande kommen, wenn z.B. nicht alle Moleküle für die Bindung von CRT zugänglich sind oder ein Teil des gekoppelten Proteins konformationell verändert vorliegt. Andererseits kann spekuliert werden, dass CRT nicht oder nur sehr schwach an MAP-LC3b bindet.

5.6.3 CRT (178-188) bindet nicht an MAP-LC3b

Die SPR-Bindungsexperimente wurden mit einem MAP-LC3-gekoppelten CM5-Chip und CRT (178-188) durchgeführt, da CRT (178-188) im Gegensatz zu CRT in höheren Konzentrationen löslich ist. Es wurden maximal 100 μM CRT (178-188) verwendet, wobei das resultierende Bindungssignal einen Ausschlag von ca. 20 RU zeigte (Abb. 4.32, A). Die Bindungskurve zeigt bis zu dieser Konzentration keine vollständige Sättigung der Bindung (Abb. 4.32, B). Der entsprechende K_D -Wert liegt folglich bei über 40 μM , falls überhaupt eine Bindung stattfindet. Bei der Kopplung von ca. 2000 RU MAP-LC3b auf den CM5-Chip kann (unter Annahme einer bimolekularen Interaktion von CRT (178-188) mit MAP-LC3b) theoretisch ein Maximalsignal von ca. 200 RU erreicht werden. Auch hier liegt das Signal weit unter dem theoretischen Maximalwert. Bei der SPR-Messreihe von CRT (178-188) mit einem GABARAP-gekoppelten CM5-Chip konnte dagegen mit 70 RU bei 100 μM CRT (178-188) ein deutlich höherer Wert erreicht werden. Wie bereits in Kapitel 5.6.2 ausgeführt, kann dies durch Inhomogenität des auf den CM5-Chip gekoppelten MAP-LC3b zustande kommen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass keine oder eine nur sehr schwache Bindung von CRT (178-188) an MAP-LC3b stattfindet.

Dies macht deutlich, dass CRT nicht an alle Proteine der MAP-LC3 Familie bindet, sondern eine spezifische Interaktion zu GABARAP zeigt. Die Untersuchung der Bindung von CRT an weitere GABARAP-homologe Proteine kann weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion der GABARAP-CRT Interaktion liefern muß in Zukunft noch verifiziert werden.

5.7 CHC interagiert mit GABARAP

Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte BLAST-Suche mit einer Phagendisplay-basierten *position-specific scoring matrix* (PSSM) gegen die Proteindatenbank SwissProt identifizierte humanes CHC als potentiell GABARAP-bindendes Protein (Kap. 4.2). Die anschließend durchgeführten *Pulldown*-Analysen und NMR-spektroskopischen Messungen dienten zur Verifizierung dieser Interaktion.

5.7.1 Rekombinantes GABARAP bindet an endogenes CHC

Zunächst wurde die Bindung von rekombinantem GABARAP an endogenes CHC mittels *Pulldown*-Analyse untersucht. Bei der Bindung von endogenem CHC an die nicht GABARAP-gekoppelte Kontrollsepharose konnte ein schwaches Signal beobachtet werden (Abb. 4.33, Spur 2). Dies kann auf eine unspezifische Wechselwirkung von CHC mit dem Säulenmaterial zurückzuführen sein. Dagegen lässt eine signifikant stärkere Immunoreaktivität für CHC nach der Verwendung von GABARAP-gekoppelter Sepharose auf die Bindung von endogenem CHC an rekombinantes GABARAP schließen (Abb. 4.33, Spur 3).

5.7.2 Die GABARAP- CHC Bindung lässt sich im *Pulldown*-Experiment durch CRT kompetieren

Die Bindung von endogenem CHC an rekombinantes GABARAP kann im *Pulldown*-Versuch durch die Zugabe von CRT kompetiert werden. Dies zeigt sich in einer drastischen Abnahme der CHC Immunoreaktivität, wenn dem Versuchsansatz CRT zugegeben wird (Abb. 4.33, Spur 4). Es wird deutlich, dass CRT und CHC um die Bindung zu GABARAP konkurrieren und nicht gleichzeitig mit GABARAP interagieren können. Dies unterstützt die Ergebnisse der Phagendisplay-basierten Konsensusmotiverstellung und BLAST-Suche, da die dort vorhergesagten, putativen GABARAP-Bindungsstellen von CRT und CHC eine große Ähnlichkeit zueinander zeigen (Abb. 5.2) und somit eine Bindung an die gleiche Region der GABARAP-Oberfläche wahrscheinlich ist.

CRT (178-188)	SLEDDWDFLPP
Clathrin (510-522)	TPDWIFLLRNVMR

Abbildung 5.2: Die Aminosäuresequenzen der Peptide CRT (178-188) und CHC (510-522) zeigen eine Sequenzidentität von über 30 %. In beiden Peptiden identische Aminosäuren sind fettgedruckt hervorgehoben.

Die Signalstärke der CHC-Immunoreaktivität wird bei diesem Versuch sogar noch unter diejenigen der Negativkontrolle reduziert (Abb. 4.33, Spur 2 und 4). Es kann daher spekuliert werden, dass weniger CHC durch unspezifische Bindung an das Säulenmaterial gebunden werden kann, da die verwendete Säule GABARAP-gekoppelt ist und somit weniger Säulenmaterial zugänglich ist.

5.7.3 Kartierung der CHC (510-522)-Bindestelle von GABARAP

Um die Bindung von CHC (510-522) und GABARAP in Lösung nachzuweisen und eine Kartierung der CHC (510-522)-Bindestelle an GABARAP zu ermöglichen, wurden (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experimente durchgeführt. Nach der Zugabe von CHC (510-522) sind für die meisten GABARAP-Resonanzen eine Änderung der chemischen Verschiebung und/oder eine Signalverbreiterung zu beobachten (Abb. 4.34). Dabei können pH-Effekte ausgeschlossen werden, da die pH-Werte der GABARAP- und der Peptidlösung vor den Messungen genau eingestellt wurden. Bei der Bindung des 13mer Peptids CHC (510-522) an GABARAP ist es unwahrscheinlich, dass so viele GABARAP-Reste direkt an der Interaktion beteiligt sind. Daher wäre es nicht sinnvoll, alle betroffenen Resonanzsignale bei der Kartierung der CHC (510-522) Bindungsstelle an GABARAP mit einzubeziehen. Es wurden nur diejenigen ausgewählt, die nach dem letzten Titrationsschritt durch Signalverbreiterung nicht mehr detektierbar und somit am stärksten betroffen sind. Dabei handelte es sich um 17 Reste, die in mehreren benachbarten Regionen der GABARAP-Oberfläche liegen (Abb. 4.36). Diese liegen analog zu der GABARAP-N1-(Kap. 4.1.5) und GABARAP-CRT-(178-188) (Kap. 4.3.8) Peptid-Interaktionen vor allem im Bereich der GABARAP-Sekundärstrukturelemente $\beta 2$ und $\alpha 3$ (Abb. 4.35).

Anhand der NMR-Titration von GABARAP mit CHC (510-522) kann die GABARAP-Bindungsstelle von CHC (510-522) nicht eindeutig kartiert werden, da die Zahl der betroffenen GABARAP-Resonanzsignale bei der Bindung von CHC (510-522) höher ist als zu erwarten wäre, wenn nur die direkt an der Peptidbindung beteiligten GABARAP-Aminosäurereste eine Änderung ihres Amidgruppen Resonanzsignals im (^1H - ^{15}N)-HSQC-Titrations-Experiment zeigen würden. Der mögliche Bereich der Peptidbindung kann jedoch eingeschränkt werden, indem nur

die von der Bindung am stärksten betroffenen GABARAP-Amidgruppen-Resonanzen berücksichtigt werden. Dabei wird die Annahme zugrunde gelegt, dass die stärker betroffenen Resonanzen näher an der CHC (510-522) Bindungsstelle lokalisiert sind, als weniger stark betroffene. Die Definition der am stärksten betroffenen Reste erfolgte über den Detektionsverlust des entsprechenden Resonanzsignals im (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektrums.

Die Ergebnisse der CHC (510-522)-GABARAP (^1H - ^{15}N)-HSQC Titration werden von den Ergebnissen der GABARAP-Titration mit N1-Peptid (Kap. 4.1.5) und GABARAP-CRT (178-188) Peptid (Kap. 4.3.8) unterstützt, da eine große Übereinstimmung mit der hier vorgeschlagenen GABARAP-Bindungsregion für CHC (510-522) Peptid zu sehen ist. Wie in Kapitel 4.1.5 bereits erwähnt, untersuchten Knight et al. die Interaktion verschiedener Peptide (γ 2L [394-411], Teile des Carboxyterminus von Tubulin und zufällig ausgewählte Peptide, für welche keine Interaktion mit GABARAP bekannt ist) zu GABARAP, welche sich in ihren Sequenzen und ihren Ladungseigenschaften unterschieden. Auch hier konnten bei der Bindung aller Peptide an GABARAP strukturell spezifische Effekte auf die GABARAP-Sekundärstrukturelemente β 2 und α 3 beobachtet werden (Knight et al. 2002). Damit binden alle bisher untersuchten Peptide an einen ähnlichen Bereich der GABARAP-Oberfläche.

Interessanterweise überlappt diese Region mit homologen Resten des Hefeproteins Atg8, die für eine funktionelle Autophagozytose in Hefe wichtig sind (Nakatogawa et al. 2007). Diese Reste sind in MAP-LC3 und GABARAP konserviert. Es kann daher vermutet werden, dass die Interaktion von physiologischen Liganden an die hier vorgeschlagene Region der GABARAP-Oberfläche ebenfalls essentiell für seine zelluläre Funktion (z.B. Beteiligung an Prozessen der Autophagozytose, Endozytose, Rezeptortransportvorgänge) ist. Abbildung 5.3 zeigt zusammenfassend die von der jeweiligen Peptidbindung am stärksten beeinflussten Regionen der GABARAP-Oberfläche für alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide.

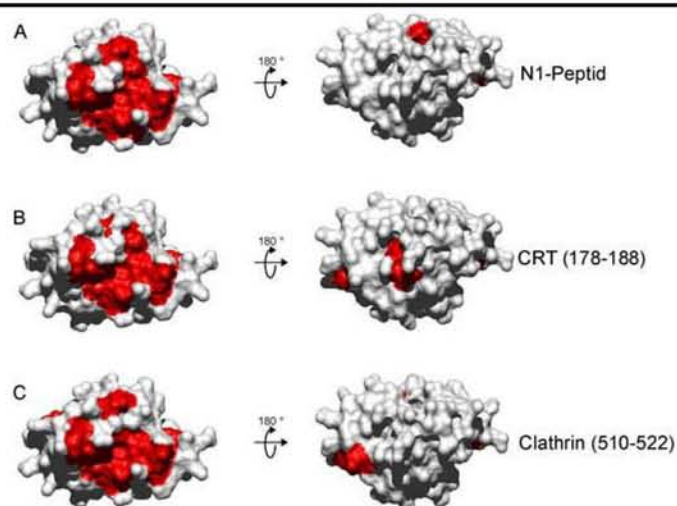


Abbildung 5.3: Die drei Peptide N1, CRT (178-188) und CHC (510-522) binden an die gleiche Region der GABARAP-Oberfläche. Oberflächendarstellung von GABARAP (PDB Code 1kot). Aminosäurereste, deren Amidgruppen-Resonanzen im $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Experiment von der Bindung des N1-Peptides (A), CRT (178-188) (B) oder des CHC (510-522)-Peptides am stärksten betroffen waren, sind rot eingefärbt. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software „MOLEcule analysis and MOLEcule display“ (MOLMOL) erstellt.

Die Austauschrate zwischen freiem und gebundenem Zustand eines zu untersuchenden Proteins im $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Experiments im Vergleich zu der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Resonanzfrequenzen der zu beobachteten H^{N} und N-Kerne im freien zum gebundenen Zustand gibt Auskunft über die Bindungsstärke der untersuchten Interaktion. Die Bindungsstärke der CHC (510-522)-GABARAP-Interaktion kann anhand der $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC-Titrations-Experimente auf einen K_D im einstellig mikromolaren Bereich abgeschätzt werden. Dies konnte bisher aufgrund der schlechten Peptidlöslichkeit nicht mit anderen Methoden verifiziert werden.

Wie bereits in Kapitel 4.1.4 ausgeführt, gehören die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Peptid-GABARAP-Interaktionen mit K_D -Werten im einstelligen bis niedrigen zweistelligen mikromolaren Bereich zu den affinsten aller bisher untersuchten Peptid-GABARAP-Interaktionen (Tab. 5.1)

Tabelle 5.1: Übersicht über Bindungsaffinitäten verschiedener GABARAP-Peptid-Interaktionen

Peptid	Sequenz/Quelle	Dissoziations- konstante	Untersucht von
1	RHGRIHIRIAKMD, human, γ 2L	>100-200 μ M	(Knight et al. 2002)
2	RTGAWRHGRIHIRIAKMD, human, γ 2L	>100-200 μ M	(Knight et al. 2002)
3	EGEGEEEEEGEEY, Schwein, α -Tubulin	100-200 μ M	(Knight et al. 2002)
4	EQGEFEEEGEEDEA, Schwein, β -Tubulin	100-200 μ M	(Knight et al. 2002)
5	DVRxVNAFKFM (x=Phosphotyrosin), Quelle irrelevant	>100-200 μ M	(Knight et al. 2002)
6	SRRRAGQKKL, Quelle irrelevant	>100-200 μ M	(Knight et al. 2002)
7	RTGAWRHGRIHIRIAKMD human, γ 2L	1,3 μ M	(Coyle et al. 2002)
8	RTGAWRHGRIHIR human, γ 2L	3,3 μ M	(Coyle et al. 2002)
9	GAWRHGRIHIR human, γ 2L	5,5 μ M	(Coyle et al. 2002)
fN1	SHKSDWIFLPNA- Lys(5,(6)Carboxyfluorescein)	0,7 μ M	diese Arbeit
fN2	SHFQSWELVSTP- Lys(5,(6)Carboxyfluorescein)	0,9 μ M	diese Arbeit
fN3	NHRTPELGHYEW- Lys(5,(6)Carboxyfluorescein)	12 μ M	diese Arbeit
N1	SHKSDWIFLPNA	8,6 μ M	diese Arbeit
CRT(178-188)	SLEDDWDFLPP	11,5 μ M	diese Arbeit
CHC(510-522)	TPDWIFLLRNVMR	~1 bis 10 μ M	diese Arbeit

5.7.4 Mögliche Relevanz der GABARAP-CHC Interaktion

Vesikelabschnürung, -sortierung und -transport sind essentielle Mechanismen für die Funktion jeder Zelle. CHC ist ein 190 kDa Protein, welches als *coat*-bildendes Protein bei Vesikelabschnürungsprozessen von der Membran zu Endosomen und beim sekretorischen Transport zwischen dem trans-Golgi Netzwerk und den Endosomen eine zentrale Rolle spielt (Brodsky et al. 2001; Kirchhausen 2000). Clathrin ist zudem an dem *Recycling* synaptischer Vesikel beteiligt (Sudhof 2004). Die konstitutive Endozytose des GABA_A-Rezeptors ist Clathrin-vermittelt (Connolly et al. 1999; Kittler et al. 2000; Tehrani and Barnes

1997; van Rijnsoever et al. 2005). Über eine mögliche Funktion von Clathrin bei mitotischen Prozessen wird diskutiert (Mack and Compton 2001; Okamoto et al. 2000; Royle 2006). Der Prozessverlauf von Clathrin-vermittelter Endozytose umfasst verschiedene Stadien: Keimbildung des Clathrin-gecoateten pits inklusive Erfassung der zu internalisierenden Proteine und Multimerisierung von Clathrin, Ausbreitung der Membraneinschnürung, Knospung bzw. Abschnürung des Clathrin-gecoateten Vesikels durch fortschreitende Anlagerung weiterer Clathrin-Moleküle und die Aktivität von Dynamin und letztlich ATP-abhängige, Auxilin-vermittelte Disassemblierung des Clathrin-Coats gefolgt von dem Vesikeltransport zu dessen Zielmembran (Brodsky et al. 2001; Kirchhausen 2000; Royle 2006; Ungewickell et al. 1995) (Abb. 5.4). Während der Coat-Bildung interagieren die Clathrin-Triskelions mittels ihrer proximalen und distalen Segmente miteinander und formen so einen polyhedralen äußeren Käfig, während die aminoterminalen globulären Domänen zur Vesikelmembran ausgerichtet sind (Musacchio et al. 1999; Smith et al. 1998; Vigers et al. 1986). Dabei sind verschiedene Clathrin-Käfigformen bekannt (Fotin et al. 2004; Fotin et al. 2004). Clathrin



Abbildung 5.4:
Schematische Darstellung
einer Clathrin-vermittelten
Vesikelabschnürung.
Editiert aus (Royle 2006)

bindet nicht direkt an die Membran, sondern wird mit Hilfe von Adapterproteinen an das Membranlipid Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) und an Sortierungssignale von Frachtproteinen gekoppelt (Maldonado-Baez and Wendland 2006). Die zwei Hauptklassen von endozytotischen Adapterproteinen, die die Bildung von Clathrin-gecoateten Vesikeln vermitteln sind die multimeren Adapterproteine (AP-1-3) und monomerische Adapterproteine (*clathrin-associated sorting protein*; CLASP) (Maldonado-Baez and Wendland 2006; Owen et al. 2004; Robinson 2004; Traub 2005; Traub 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die direkte Interaktion von GABARAP und CHC nachgewiesen. Die potentielle Bedeutung dieser Interaktion wird im Folgenden diskutiert. Sowohl CHC, als auch GABARAP assoziieren mit Phosphoinositid-bindenden Proteinen. AP180 (Ford et al. 2001; Stahelin et al. 2003), OCRL (Lowe and Kreis 1995) und EpsinR (Stahelin et al. 2003) repräsentieren dabei entsprechende Beispiele für CHC, während GABARAP mit dem Inositol-1,4,5 Trisphosphat (IP3)-bindenden Protein „*Phospholipase C-related inactive protein 1*“ (PRIP-1) interagiert (Harada et al. 2005; Kanematsu et al. 2002), welches weiterhin mit der β und der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors assoziiert (Chen and Olsen 2007; Kanematsu et al. 2002; Mizokami et al. 2007). PRIP-1 kompetiert mit der $\gamma 2$ -Untereinheit um die Bindung zu GABARAP (Kanematsu et al. 2002). Es wird spekuliert, dass PRIP-1 IP3 gegen die ansonsten schnell stattfindende Hydrolyse schützt und somit in die Regulation der IP3-vermittelten Ca^{2+} -Signaltransduktion involviert ist (Harada et al. 2005). Ca^{2+} fördert Clathrin-Polymersierung (Nandi et al. 1981). Zudem wird Clathrin-vermittelte Endozytose in motorischen Endplatten der Schnecke durch Anwesenheit von Ca^{2+} direkt erleichtert (Teng and Wilkinson 2005). Weiterhin inhibiert die Maskierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) mittels PH-Domäne der Phospholipase C δ (PLC δ) frühe Schritte der Clathrin-vermittelten Endozytose (Jost et al. 1998). CHC und GABARAP sind somit beide mit Ca^{2+} -Signalwegen assoziiert.

Die GABARAP-bindende AAA-ATPase N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) (Kittler et al. 2001) ist in eine Reihe verschiedener Vesikeltransportprozesse involviert, wie z.B. der Transport des AMPA Typ Glutamat- (Hanley 2007; Song et al. 1998) und des $\beta 2$ Adrenergen-Rezeptors (Cong et al. 2001; Nishimune et al. 1998). NSF bindet direkt an die Aminosäurereste 395-415 der $\beta 3$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors in hippokampalen Neuronen und wirkt an der Regulierung der GABA_A-Rezeptor Oberflächenexpression mit (Goto et al. 2005). NSF assoziiert mit Clathrin-*gecoateten* Vesikelmembranen (Steel and Woodman 1995) und interagiert mit β -Arrestin 1, einem Clathrin-bindenden Protein (McDonald et al. 1999).

GABARAP bindet an Tubulin und Mikrotubuli (Wang and Olsen 2000) und fördert Tubulinpolymerisierung (Coyle et al. 2002). Mikrotubuli sind Hauptbestandteile des Zytoskeletts und als solches in viele zelluläre Prozesse, wie Mitose, Zytokinese und vesikulären Transport, eingebunden (Valiron et al. 2001). Die Interaktion von Mikrotubuli mit dem neuronalen Ca^{2+} -sensor Protein Neurocalcin δ wurde berichtet, welches außerdem an Clathrin bindet (Ivings et al. 2002).

Die wahrscheinlich offensichtlichste funktionelle Verbindung von GABARAP und CHC ist ihre Beteiligung bei zellulären Transportvorgängen des GABA_A-Rezeptors. Clathrin ist essentiell für die Formierung der so genannten *clathrin-coated pits* und damit für die Fähigkeit der Neuronen zur Regulierung der postsynaptischen Rezeptorzahl. GABA_A-Rezeptoren werden konstitutiv in

Clathrin-gecoateten Vesikeln internalisiert (Kittler et al. 2000; Tehrani et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass ein Dileucin AP2 Adaptin-Bindemotiv der $\beta 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors essentiell für die konstitutive Endozytose des GABA_A-Rezeptors ist (Herring et al. 2003). Die GABA_A-Rezeptorzahl kann durch phosphorylierungsabhängige Interaktion des Clathrin AP2 Adapter-Komplexes mit der β -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors reguliert werden (Kittler et al. 2005).

GABARAP gehört zur Superfamilie der ubiquitin-*like* Proteine, deren Mitglieder als Sortierungssignale bei Transportprozessen bekannt sind. SUMO z.B. verändert die Bindungseigenschaften seiner Zielproteine und kann somit deren subzelluläre Lokalisierung beeinflussen (Seeler and Dejean 2001). Ubiquitylierung ermöglicht die Interaktion des Zielproteins zu weiteren Transportproteinen (Schwartz and Hochstrasser 2003). Die Zielmoleküle von GABARAP sind Lipide. Dies ist in Übereinstimmung mit der subzellulären Verteilung von GABARAP, welches in der Zelle an membranösen Strukturen lokalisiert vorliegt und so als vesikuläres Transportsignal fungieren könnte.

Neben der Interaktion von GABARAP mit der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Wang et al. 1999) konnte ein funktioneller Effekt von GABARAP auf den Transport des GABA_A-Rezeptors, auf dessen Kinetik und Ionenleitfähigkeit nachgewiesen werden (Chen et al. 2000; Leil et al. 2004; Luu et al. 2006). Das *Clustering* von GABARAP mit dem GABA_A-Rezeptor konnte durch Zerstörung von Mikrotubuli verhindert werden (Chen et al. 2000; Wang and Olsen 2000). Die aminoterminal Mikrotubuli-Bindedomäne von GABARAP (Reste 1 bis 22) und die γ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors sind für das *Clustering* beider Proteine notwendig (Chen et al. 2000). Es wird spekuliert, dass GABARAP die Rezeptorkinetik des GABA_A-Rezeptors nicht direkt, sondern indirekt über die Förderung des Rezeptortransportes an die Zelloberfläche beeinflusst (Boileau et al. 2005).

Die Beteiligung beider Proteine, CHC und GABARAP, an Transportvorgängen des GABA_A-Rezeptors ist ein deutlicher Hinweis auf die physiologische Relevanz ihrer Interaktion, wobei die genaue Funktion dieser Bindung in Zukunft noch weiter konkretisiert werden muss.

5.7.5 Funktionale Zusammenhänge der beiden GABARAP-bindenden Proteine CRT und CHC

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das GABARAP-bindende Protein CRT in der Lage ist, endogenes CHC von Sepharose-gekoppeltem, rekombinantem GABARAP zu verdrängen (Abb. 4.27). Dies lässt auf eine gemeinsame GABARAP-Bindungsstelle schließen, obwohl allosterische Effekte von CRT auf die CHC-GABARAP-Interaktion nicht völlig ausgeschlossen werden können. Da zu diesem Zeitpunkt die physiologische Relevanz der Interaktion von CRT und CHC mit GABARAP noch nicht geklärt ist, bleibt auch die Interpretation des kompetitiven Bindungsmodus von CHC-CRT an GABARAP zunächst spekulativ.

Sowohl CRT als auch Clathrin spielen bei mitotischen Prozessen eine Rolle. Während Clathrin an Spindelfasern bindet (Royle 2006), interagiert CRT an Chromatinfasern und bindet an Histon H2A/H2B Dimere und Histon A3/A4 Tetramere, was auf eine Beteiligung von CRT an Chromatindynamiken auf der Oberfläche von mitotischen Chromosomen schließen lässt (Kobayashi et al. 2006).

Vigneswara et al. fanden, dass Clathrin leichte Kette und CRT, sowie eine Reihe weiterer Proteine, Substrate der L-isoaspartat O-methyltransferase (PIMT) sind, welche Reparaturmechanismen von Isoaspartylresten in alternden oder stressgeschädigten Proteinen *in vivo* initiiert (Vigneswara et al. 2006).

Da CRT neben dem Lumen des ER auch in anderen subzellulären Kompartimenten, wie z.B. dem Zytosol (Afshar et al. 2005), vorhanden ist und die Dissoziationskonstante zu GABARAP im nanomolaren Bereich (zwischen 29 und 64 nM) liegt, könnte CRT als Ca^{2+} -bindendes Protein eine wichtige Rolle zur Regulation der GABARAP-CHC-Interaktion spielen.

5.8 Tryptophan als Bindungs determinante für die Interaktion eines Liganden zu GABARAP

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mittels Phagendisplay synthetische, GABARAP-bindende Peptide selektiert werden. Diese weisen keine dominierende Aminosäuresequenz auf. Bis auf eine Ausnahme enthalten jedoch alle Sequenzen einen oder mehrere aromatische Reste, meist ein Tryptophan was vermuten lässt, dass das Vorhandensein einer aromatischen Aminosäure, bevorzugt Tryptophan, für die Bindung eines Liganden an GABARAP eine grundlegende Rolle spielt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Einzelphagen-ELISAs, bei dem vier von fünf Peptiden ohne Tryptophan im Vergleich zu denjenigen mit Tryptophan eine signifikant geringere Bindungsaffinität zu GABARAP zeigen (Abb. 4.4).

Darüber hinaus kann spekuliert werden, dass auch physiologische Liganden von GABARAP ein konserviertes Tryptophan in ihrer jeweiligen GABARAP-Bindungssequenz aufweisen. In der Tat kann dies für CRT, CHC und den $\gamma 2$ -Loop des GABA_A-Rezeptors beobachtet werden, deren GABARAP-Bindungsstellen bereits bekannt sind. Ein multiples Sequenzalignment von humanem CRT (SwissProt Nr. P27797) mit 24 orthologen Proteinen aus anderen Eukaryoten ergibt, dass W183 aus humanem CRT in allen bekannten Sequenzen konserviert ist. Eine begrenzte Auswahl dieser Sequenzen ist in Abbildung 5.5, A zu sehen. Eine für die GABARAP-Interaktion ausreichende Sequenz der $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (SwissProt Nr. P18507) wurde von Coyle et al. identifiziert (Coyle et al. 2002) und ist in Abbildung 5.5, B unterstrichen dargestellt. Auch hier ist ein Tryptophan vorhanden, welches in allen bekannten $\gamma 2$ -Sequenzen konserviert ist. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte GABARAP-Bindungsstelle der humanen Proteine CHC1 und 2 (Aminosäuren 510-522) (SwissProt Nr. Q00610 und P53675) ist in Abbildung 5.5, C zu sehen. Es zeigt sich, dass Trp514 des humanen Proteins nur in vier von den sieben Sequenzen bekannter Homologe konserviert ist. Die Proteine aus Hefe, *Drosophila Melanogaster* und *Dictyostelium Discoideum* weisen an der entsprechenden Sequenzposition eine andere aromatische Aminosäure auf. Bei diesen drei Organismen ist im Gegensatz zu den vier anderen die Existenz eines GABARAP Proteins nicht bekannt. In Hefe ist lediglich das GABARAP-homologe Protein Atg8 vorhanden, welches ca. 55% Sequenzidentität zu GABARAP aufweist. In *Drosophila Melanogaster* und *Dictyostelium Discoideum* ist dagegen bisher keine Existenz von GABARAP-homologen Proteinen bekannt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Phagendisplay-Selektion und des Einzelphagen-ELISAs, da diese die Rolle von Tryptophan als zentrale Bindungs determinante eines Liganden für die Interaktion mit GABARAP ebenfalls unterstützen.

A		
CALR_HUMAN	LEDDWDFLPPKKIKDPDA	213
CALR_MOUSE	LEDDWDFLPPKKIKDPDA	213
CALR_RAT	LEDDWDFLPPKKIKDPDA	213
CALR_DROME	LEDDWDFLAPKKIKDPTA	213
CALR_CAEL	LEEDWDLPAKKIKDPDA	208
CALR_DICDI	LADDWELLPSKQIKDPKQ	213
B		
GBRG2_HUMAN	RTGAWRHGRIHIRIAKMD	442
GBRG2_PONPY	RTGAWRHGRIHIRIAKMD	442
GBRG2_MOUSE	RTGAWRHGRIHIRIAKMD	449
GBRG2_RAT	RTGAWRHGRIHIRIAKMD	441
GBRG2_BOVIN	RTGAWRHGRIHIRIAKMD	450
GBRG2_CHICK	RTGAWRHGRIHIRIAKMD	449
C		
CLH1_HUMAN	YTPDWIFLLRNVMRISPD	527
CLH2_HUMAN	YTPDWIFLLRGVMKISPE	527
CLH_MOUSE	YTPDWIFLLRNVMRISPD	527
CLH_RAT	YTPDWIFLLRNVMRISPD	527
CLH_YEAST	YQPNFLVLISSLRSSPD	531
CLH_DROME	YTPDYVFLRSVMRSNPE	528
CLH_DICDI	YKPDFMFLLQRMANANPM	526

Abbildung 5.5: Ein Sequenzalignment der drei Proteine CRT, γ 2-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und CHC mit Sequenzen aus orthologen Proteinen zeigt je ein konserviertes Tryptophan. **A:** Alignment der Aminosäuren 196-213 aus humanem CRT (SwissProt Nr. P27797) mit homologen Proteinen aus fünf weiteren Organismen zeigt eine Konservierung von Trp 200 des humanen Proteins. Es sind sechs zufällig gewählte Beispiele aus 25, augenblicklich in der SwissProt Datenbank vorhandenen, CRT-Sequenzen aufgeführt, von denen alle das konservierte Tryptophan aufweisen. **B:** Alignment der Aminosäuren 425-442 aus der humanen γ 2-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (SwissProt Nr. P18507) mit den Sequenzen von allen fünf in der SwissProt Datenbank aufgeführten Orthologen zeigt 100% Konservierung von Trp429 des humanen Proteins. Unterstrichen sind die Aminosäuren 422 bis 432 der humanen γ 2-Untereinheit, die für die Bindung an GABARAP als ausreichend identifiziert wurden (Coyle et al. 2002). **C:** Alignment der Aminosäuren 510-527 aus der schweren Kette von humanem Clathrin Protein 1 und 2 (SwissProt Nr. Q00610 und P53675) mit den Sequenzen aller fünf, in der SwissProt Datenbank vorhandenen, homologen Proteine zeigt eine Konservierung von Trp514 aus humanem Clathrin in vier von sieben Fällen. Die Sequenzalignments wurden mit Hilfe der Software ClustalW (Thompson et al. 1994) erstellt.

5.9 Zusammenfassung

γ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren des Types A (GABA_A-Rezeptoren) vermitteln schnelle synaptische Inhibition im zentralen Nervensystem. Sie sind von speziellem pharmazeutischen Interesse und Ziel verschiedener Wirkstoffe, die zur Behandlung von mentalen Störungen oder zur Regulierung von Schlaf und Stimmung eingesetzt werden. Sortierungsvorgänge, Transport- und Abbauprozesse von Neurotransmitter-Rezeptoren sind wichtig zur Bildung und Aufrechterhaltung von funktionellen Synapsen und sind Grundlage bei der Modulation von synaptischer Plastizität. Das GABA_A-Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP) gehört zu der MAP-LC3 Proteinfamilie, deren Mitglieder in intrazelluläre, vesikuläre Transportprozesse, wie Autophagozytose und intra-Golgi-Transport, involviert sind. GABARAP bindet an eine Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, und ist an dessen Transportvorgängen beteiligt. Die genauen Abläufe und die Funktion dieser Interaktion sind bisher nicht bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von artifiziellen Peptid- und physiologischen Proteinliganden von GABARAP und die Charakterisierung der resultierenden Interaktionen. Dies erweitert einerseits das Verständnis der Bindungsmechanismen beliebiger Liganden zu GABARAP und kann andererseits als Basis für die Entwicklung neuer Medikamente dienen, um die Funktion von GABARAP bzw. des GABA_A-Rezeptors zu modulieren. Die Kenntnis neuer GABARAP-Interaktionspartner trägt zudem zu einem besseren Verständnis der zellulären Funktion von GABARAP und den Vorgängen an der postsynaptischen Membran bei.

Mittels Phagendisplay-Selektion ist es erstmals gelungen, hochaffine, artifizielle Peptidliganden für GABARAP zu identifizieren. Die resultierenden Interaktionen konnten mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Fluoreszenztitration, Oberflächenplasmonenresonanz und Kernresonanz-Spektroskopie genauer charakterisiert werden. Aus den Peptidsequenzen wurde ein Konsensusmotiv erstellt, welches Grundlage für eine Proteindatenbanksuche war. Die zellulären humanen Proteine Calretikulin (CRT) und die schwere Kette von Clathrin (clathrin heavy chain, CHC) konnten auf diesem Wege erstmalig als GABARAP-bindend identifiziert werden. Die entsprechenden Interaktionen wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanz, *Pulldown*-Analysen und Kernresonanzspektroskopie charakterisiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag für ein fortgeschrittenes Verständnis der GABARAP Bindungsspezifität und seiner zellulären Funktion.

5.10 Summary

γ -aminobutyric acid (GABA) receptors (type A) (GABA_A receptors) mediate fast synaptic inhibition in the central nervous system. They are of particular pharmacological importance and are targets for drugs used to treat mental disorders or to modulate sleep and mood.

Sorting, transport and degradation of neurotransmitter receptors are important for the construction and maintenance of functional synapses and are fundamental processes to modulate synaptic plasticity. The GABA_A receptor-associated protein (GABARAP) belongs to the MAP-LC3 protein family which is involved in vesicular transport processes, like autophagocytosis and intra-golgi transport. GABARAP binds to a GABA_A receptor subunit and participates in its transport events. The exact mechanisms and the function of this interaction are not yet known.

The objective of the present work was the identification of artificial peptide and physiological protein ligands of GABARAP and the characterisation of the resulting interactions. This enhances on the one hand the understanding of the binding mechanisms of any ligand to GABARAP and on the other hand, can facilitate the design of new drugs capable of modulating the function of GABARAP or the GABA_A receptor. The knowledge of new GABARAP interaction partners additionally contributes to a better understanding of the cellular functions of GABARAP and the procedures at the postsynaptic membrane.

By employing a phage display selection procedure, artificial high-affinity peptide ligands of GABARAP could successfully be identified. The resulting interactions could be characterised via enzyme-linked immunosorbent assay, fluorescence titration, surface-plasmon resonance and nuclear magnetic resonance spectroscopy.

A consensus motif was derived from the GABARAP-binding peptide sequences. It was used to search protein databases to identify putative GABARAP-binding proteins. For the first time, the human cellular proteins calreticulin (CRT) and clathrin heavy chain (CHC) were identified to bind GABARAP. The corresponding interactions could be characterised via surface plasmon resonance, pulldown analysis and nuclear magnetic resonance spectroscopy.

The results of the present work make a substantial contribution to an enhanced understanding of the GABARAP binding specificity and its cellular function.

5.11 Ausblick

Mittels Phagendisplay Screening konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit artifizielle Peptidliganden von GABARAP selektiert werden. Über 95% dieser Peptide enthalten einen oder mehrere aromatische Aminosäurereste, meist Tryptophan. Es kann daher spekuliert werden, dass Trp eine zentrale Rolle bei der Bindung eines Liganden an GABARAP einnimmt, was von den Ergebnissen des Einzelphagen-ELISAs ebenfalls bestätigt wird. Um die Bindungsspezifität beliebiger Liganden an GABARAP weiter zu charakterisieren, könnte die Dissoziationskonstante von Tryptophan und seiner Derivate zu GABARAP mittels NMR ermittelt und verglichen, und Bindungsexperimente von GABARAP an Pepsotmembranen durchgeführt werden. Darüber hinaus ist es sinnvoll, das Potential kleiner organischer Moleküle oder artifizieller, hoch-affiner Peptide zu untersuchen, die zelluläre Funktion von GABARAP zu beeinflussen. Dies könnte mit Hilfe von Neuro-Chips oder geeigneten zellbiologischen Experimenten überprüft werden.

Die Bindungsaffinität einzelner Phagendisplay selektierter Peptide zu GABARAP wurde mittels Fluoreszenztitration und SPR-Analysen quantifiziert. Die resultierenden K_D -Werte lagen im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich. Strukturelle Untersuchung eines Peptid-GABARAP Komplexes, z.B. die Bestimmung der Lösungsstruktur via NMR oder Röntgenkristallographie, würden zu einem erweiterten Verständnis der Bindungsmechanismen bzw. den Bindungsdeterminanten einer GABARAP-Ligand Interaktion führen. Dies wäre die erste GABARAP-Peptid Komplexstruktur.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnten die zellulären Proteine CRT und CHC als GABARAP-Liganden identifiziert und deren Interaktion zu GABARAP mit verschiedenen molekularbiologischen, biochemischen und biophysikalischen Methoden charakterisiert werden. Die direkte Interaktion von CHC (volle Länge) mit GABARAP könnte in Zukunft z.B. mit geeigneten *Pulldown*-Versuchen nachgewiesen werden. Dabei wird endogenes CHC Protein via NHS-aktivierter, Sepharose-gekoppelte Antikörper an Säulenmaterial immobilisiert und die Bindung von rekombinantem GABARAP Protein an CHC mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. Eine strukturelle Charakterisierung der CHC und CRT Komplexe mit GABARAP mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie wäre sinnvoll, da funktionelle Zusammenhänge und Mechanismen an der postsynaptischen Membran weiter aufgeklärt werden könnten. Dies umfasst z.B. die Möglichkeit einer simultanen oder kompetitiven Bindung mehrerer GABARAP-Liganden, sowie konformationelle Veränderungen, die GABARAP im Komplex mit einem Liganden zeigen könnte. Des Weiteren könnte im Rahmen von

Medikamenten-Entwicklung die Suche nach Substanzen, die die zelluläre Funktion von GABARAP manipulieren, gezielt eingeschränkt werden.

Die besonders wichtige Frage nach der physiologischen Relevanz der Interaktion von CRT und CHC mit GABARAP bleibt im Rahmen dieser Arbeit unbeantwortet. Um dies zu untersuchen, könnten zunächst geeignete zellbiologische Experimente durchgeführt werden, um die subzelluläre Lokalisierung von CRT, CHC und GABARAP und ggf. deren Koloalisation nachzuweisen. Darüber hinaus könnte die Identifizierung weiterer physiologischer GABARAP-Liganden zu einem besseren Verständnis der zellulären GABARAP-assoziierten Vorgänge beitragen und so die Rolle der CRT und CHC Interaktion mit GABARAP weiter aufklären. Unter Zuhilfenahme eines Modellorganismus (z.B. *S. cerevisiae* oder *C. elegans*) könnten *knockout* bzw. *knockin* Experimente einen zusätzlichen Beitrag zu einem fortgeschrittenen Verständnis der zellulären Funktion von GABARAP leisten.

Des Weiteren könnte untersucht werden, ob CRT und CHC neben GABARAP auch andere Proteine der MAP-LC3 Familie binden. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur für das Protein MAP-LC3b ausgeschlossen werden. Da CRT neben Ca^{2+} auch Mg^{2+} und Zn^{2+} bindet, sollte außerdem überprüft werden, ob die Bindung von CRT zu GABARAP bzw. GABARAP-homologen Proteinen eine entsprechende Ionenabhängigkeit zeigt. Dies könnte im Rahmen von SPR-Bindungsstudien verifiziert werden.

Erste Schritte der hier aufgeführten Arbeiten wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt und werden in Zukunft zu einem fortgeschrittenen Verständnis der Mechanismen an der postsynaptischen Membran und den Möglichkeiten deren Manipulation beitragen.

6 Literatur

- Afshar, N., B. E. Black, et al. (2005). "Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol." *Mol Cell Biol* 25(20): 8844-53.
- Angelotti, T. P. and R. L. Macdonald (1993). "Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties." *J Neurosci* 13(4): 1429-40.
- Bailey, T. L. and M. Gribskov (1998). "Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches." *Bioinformatics* 14(1): 48-54.
- Barnes, E. M., Jr. (2001). "Assembly and intracellular trafficking of GABAA receptors." *Int Rev Neurobiol* 48: 1-29.
- Bavro, V. N., M. Sola, et al. (2002). "Crystal structure of the GABA(A)-receptor-associated protein, GABARAP." *EMBO Rep* 3(2): 183-9.
- Boileau, A. J., R. A. Pearce, et al. (2005). "Tandem subunits effectively constrain GABAA receptor stoichiometry and recapitulate receptor kinetics but are insensitive to GABAA receptor-associated protein." *J Neurosci* 25(49): 11219-30.
- Bouvier, M. and W. F. Stafford (2000). "Probing the three-dimensional structure of human calreticulin." *Biochemistry* 39(48): 14950-9.
- Brodsky, F. M., C. Y. Chen, et al. (2001). "Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 517-68.
- Brunger, A. T. (2001). "Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 157-71.
- Chan, E. Y., S. Kir, et al. (2007). "siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy." *J Biol Chem* 282(35): 25464-74.
- Chen, C., J. Li, et al. (2006). "GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor." *J Biol Chem*.
- Chen, L., H. Wang, et al. (2000). "The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11557-62.
- Chen, Z. W. and R. W. Olsen (2007). "GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function." *J Neurochem* 100(2): 279-94.
- Clegg, D. O., K. L. Wingerd, et al. (2003). "Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system." *Front Biosci* 8: d723-50.
- Cong, M., S. J. Perry, et al. (2001). "Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling." *J Biol Chem* 276(48): 45145-52.
- Connolly, C. N., J. M. Uren, et al. (1999). "Subcellular localization and endocytosis of homomeric gamma2 subunit splice variants of gamma-aminobutyric acid type A receptors." *Mol Cell Neurosci* 13(4): 259-71.
- Coppolino, M. G., M. J. Woodside, et al. (1997). "Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion." *Nature* 386(6627): 843-7.

- Corbett, E. F., K. Oikawa, et al. (1999). "Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones." *J Biol Chem* 274(10): 6203-11.
- Coyle, J. E. and D. B. Nikolov (2003). "GABARAP: lessons for synaptogenesis." *Neuroscientist* 9(3): 205-16.
- Coyle, J. E., S. Qamar, et al. (2002). "Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding." *Neuron* 33(1): 63-74.
- De Blas, A. L. (1996). "Brain GABAA receptors studied with subunit-specific antibodies." *Mol Neurobiol* 12(1): 55-71.
- Dechwer, W., D. A. Pühler, et al. (1999). "Römp Lexikon Biotechnologie und Gentechnik." Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2. Auflage.
- Dedhar, S. (1994). "Novel functions for calreticulin: interaction with integrins and modulation of gene expression?" *Trends Biochem Sci* 19(7): 269-71.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, et al. (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." *J Biomol NMR* 6(3): 277-93.
- Dobson, C. M. and P. J. Hore (1998). "Kinetic studies of protein folding using NMR spectroscopy." *Nat Struct Biol* 5 Suppl: 504-7.
- Ellgaard, L., R. Riek, et al. (2001). "NMR structure of the calreticulin P-domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3133-8.
- Essrich, C., M. Lorez, et al. (1998). "Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin." *Nat Neurosci* 1(7): 563-71.
- Ford, M. G., B. M. Pearce, et al. (2001). "Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes." *Science* 291(5506): 1051-5.
- Fotin, A., Y. Cheng, et al. (2004). "Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating." *Nature* 432(7017): 649-53.
- Fotin, A., Y. Cheng, et al. (2004). "Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy." *Nature* 432(7017): 573-9.
- Frickel, E.-M., R. Riek, et al. (2002). "TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4): 1954-9.
- Gaiarsa, J.-L., O. Caillard, et al. (2002). "Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance." *Trends Neurosci* 25(11): 564-70.
- Gelebart, P., M. Opas, et al. (2005). "Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum." *Int J Biochem Cell Biol* 37(2): 260-6.
- Gill, S. C. and P. H. von Hippel (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." *Anal Biochem* 182(2): 319-26.
- Goto, H., M. Terunuma, et al. (2005). "Direct interaction of N-ethylmaleimide-sensitive factor with GABA(A) receptor beta subunits." *Mol Cell Neurosci* 30(2): 197-206.
- Green, F., T. O'Hare, et al. (2002). "Association of human transferrin receptor with GABARAP." *FEBS Lett* 518(1-3): 101-6.
- Gribskov, M., R. Luthy, et al. (1990). "Profile analysis." *Methods Enzymol* 183: 146-59.
- Groth, R. D., R. L. Dunbar, et al. (2003). "Calcineurin regulation of neuronal plasticity." *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 1159-71.
- Guo, L., J. Groenendyk, et al. (2003). "Identification of an N-domain histidine essential for chaperone function in calreticulin." *J Biol Chem* 278(50): 50645-53.
- Hanley, J. G. (2007). "NSF binds calcium to regulate its interaction with AMPA receptor subunit GluR2." *J Neurochem* 101(6): 1644-50.

- Harada, K., H. Takeuchi, et al. (2005). "Role of PRIP-1, a novel Ins(1,4,5)P₃ binding protein, in Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺ signaling." *J Cell Physiol* 202(2): 422-33.
- Herring, D., R. Huang, et al. (2003). "Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor." *J Biol Chem* 278(26): 24046-52.
- Holaska, J. M., B. E. Black, et al. (2001). "Calreticulin Is a receptor for nuclear export." *J Cell Biol* 152(1): 127-40.
- Holaska, J. M., B. E. Black, et al. (2002). "Ca²⁺-dependent nuclear export mediated by calreticulin." *Mol Cell Biol* 22(17): 6286-97.
- Ichimura, Y., T. Kirisako, et al. (2000). "A ubiquitin-like system mediates protein lipidation." *Nature* 408(6811): 488-92.
- Ish-Horowicz, D. and J. F. Burke (1981). "Rapid and efficient cosmid cloning." *Nucleic Acids Res* 9(13): 2989-98.
- Ivings, L., S. R. Pennington, et al. (2002). "Identification of Ca²⁺-dependent binding partners for the neuronal calcium sensor protein neurocalcin delta: interaction with actin, clathrin and tubulin." *Biochem J* 363(Pt 3): 599-608.
- Johnson, B. and R. Blevins (1994). "NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data." *J Biomol NMR* 4(5): 603-614.
- Johnson, S., M. Michalak, et al. (2001). "The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space." *Trends Cell Biol* 11(3): 122-9.
- Jorgensen, C. S., L. R. Ryder, et al. (2003). "Dimerization and oligomerization of the chaperone calreticulin." *Eur J Biochem* 270(20): 4140-8.
- Jost, M., F. Simpson, et al. (1998). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation." *Curr Biol* 8(25): 1399-402.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, et al. (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." *Embo J* 19(21): 5720-8.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, et al. (2004). "LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2805-12.
- Kanematsu, T., I.-S. Jang, et al. (2002). "Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA(A) receptor function." *EMBO J* 21(5): 1004-11.
- Kapoor, M., L. Ellgaard, et al. (2004). "Mutational analysis provides molecular insight into the carbohydrate-binding region of calreticulin: pivotal roles of tyrosine-109 and aspartate-135 in carbohydrate recognition." *Biochemistry* 43(1): 97-106.
- Kapoor, M., H. Srinivas, et al. (2003). "Interactions of substrate with calreticulin, an endoplasmic reticulum chaperone." *J Biol Chem* 278(8): 6194-200.
- Kawaguchi, S.-y. and T. Hirano (2006). "Integrin alpha3beta1 suppresses long-term potentiation at inhibitory synapses on the cerebellar Purkinje neuron." *Mol Cell Neurosci* 31(3): 416-26.
- Kay, B. K., A. V. Kurakin, et al. (1998). "From peptides to drugs via phage display." *DTT* 3: 370-378.
- Kennedy, T. E., D. Kuhl, et al. (1992). "Long-term sensitization training in Aplysia leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein." *Neuron* 9(6): 1013-24.
- Kirchhausen, T. (2000). "Clathrin." *Annu Rev Biochem* 69: 699-727.

- Kirchhausen, T. and S. C. Harrison (1981). "Protein organization in clathrin trimers." *Cell* 23(3): 755-61.
- Kirchhausen, T., S. C. Harrison, et al. (1987). "Clathrin heavy chain: molecular cloning and complete primary structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 8805-9.
- Kirisako, T., M. Baba, et al. (1999). "Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast." *J Cell Biol* 147(2): 435-46.
- Kirisako, T., Y. Ichimura, et al. (2000). "The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway." *J Cell Biol* 151(2): 263-76.
- Kittler, J. T., I. L. Arancibia-Carcamo, et al. (2004). "Association of GRIP1 with a GABA(A) receptor associated protein suggests a role for GRIP1 at inhibitory synapses." *Biochem Pharmacol* 68(8): 1649-54.
- Kittler, J. T., G. Chen, et al. (2005). "Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(41): 14871-6.
- Kittler, J. T., P. Delmas, et al. (2000). "Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons." *J Neurosci* 20(21): 7972-7.
- Kittler, J. T., P. Rostaing, et al. (2001). "The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors." *Mol Cell Neurosci* 18(1): 13-25.
- Klebig, C., S. Seitz, et al. (2005). "Characterization of {gamma}-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer." *Cancer Res* 65(2): 394-400.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." *Science* 290(5497): 1717-21.
- Knee, R., I. Ahsan, et al. (2003). "Compromised calnexin function in calreticulin-deficient cells." *Biochem Biophys Res Commun* 304(4): 661-6.
- Kneussel, M. (2002). "Dynamic regulation of GABA(A) receptors at synaptic sites." *Brain Res Brain Res Rev* 39(1): 74-83.
- Kneussel, M., S. Haverkamp, et al. (2000). "The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15): 8594-9.
- Kneussel, M., S. Haverkamp, et al. (2000). "The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15): 8594-9.
- Knight, D., R. Harris, et al. (2002). "The X-ray crystal structure and putative ligand-derived peptide binding properties of gamma-aminobutyric acid receptor type A receptor-associated protein." *J Biol Chem* 277(7): 5556-61.
- Kobayashi, S., S. Uchiyama, et al. (2006). "Calreticulin as a new histone binding protein in mitotic chromosomes." *Cytogenet Genome Res* 115(1): 10-5.
- Kouno, T., M. Mizuguchi, et al. (2005). "Solution structure of microtubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains." *J Biol Chem* 280(26): 24610-7.
- Kouno, T., M. Mizuguchi, et al. (2004). "1H, 13C, and 15N resonance assignments of human microtubule-associated protein light chain-3." *J Biomol NMR* 29(3): 415-6.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Lee, J. H., S. B. Rho, et al. (2005). "GABAA receptor-associated protein (GABARAP) induces apoptosis by interacting with DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 47 (DDX 47)." *Biotechnol Lett* 27(9): 623-8.
- Legesse-Miller, A., Y. Sagiv, et al. (1998). "Isolation and characterization of a novel low molecular weight protein involved in intra-Golgi traffic." *J Biol Chem* 273(5): 3105-9.
- Leil, T. A., Z.-W. Chen, et al. (2004). "GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons." *J Neurosci* 24(50): 11429-38.
- Leung-Hagsteijn, C. Y., K. Milankov, et al. (1994). "Cell attachment to extracellular matrix substrates is inhibited upon downregulation of expression of calreticulin, an intracellular integrin alpha-subunit-binding protein." *J Cell Sci* 107 (Pt 3): 589-600.
- Li, Z., W. F. Stafford, et al. (2001). "The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability." *Biochemistry* 40(37): 11193-201.
- Lowe, M. and T. E. Kreis (1995). "In vitro assembly and disassembly of coatomer." *J Biol Chem* 270(52): 31364-71.
- Lu, Y. M., I. M. Mansuy, et al. (2000). "Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP." *Neuron* 26(1): 197-205.
- Luu, T., P. Gage, et al. (2006). "GABA increases both the conductance and mean open time of recombinant GABAA channels co-expressed with GABARAP." *J Biol Chem*.
- Lynch, J. and M. Michalak (2003). "Calreticulin is an upstream regulator of calcineurin." *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 1173-9.
- Macdonald, R. L. and R. W. Olsen (1994). "GABAA receptor channels." *Annu Rev Neurosci* 17: 569-602.
- Mack, G. J. and D. A. Compton (2001). "Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14434-9.
- Maldonado-Baez, L. and B. Wendland (2006). "Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators." *Trends Cell Biol* 16(10): 505-13.
- Maltese, W. A., G. Soule, et al. (2002). "Mutant Rab24 GTPase is targeted to nuclear inclusions." *BMC Cell Biol* 3: 25.
- Manavalan, P. and W. C. Johnson, Jr. (1987). "Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra." *Anal Biochem* 167(1): 76-85.
- Mann, S. S. and J. A. Hammarback (1994). "Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B." *J Biol Chem* 269(15): 11492-7.
- Mansuy, I. M. (2003). "Calcineurin in memory and bidirectional plasticity." *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 1195-208.
- Mansuy, V., W. Boireau, et al. (2004). "GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 325(2): 639-48.
- Marino, G. and C. Lopez-Otin (2004). "Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology." *Cell Mol Life Sci* 61(12): 1439-54.
- Martin, V., J. Groenendyk, et al. (2006). "Identification by mutational analysis of amino acid residues essential in the chaperone function of calreticulin." *J Biol Chem* 281(4): 2338-46.

- McDonald, P. H., N. I. Cote, et al. (1999). "Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation." *J Biol Chem* 274(16): 10677-80.
- Meyer, C., D. Zizioli, et al. (2000). "mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors." *Embo J* 19(10): 2193-203.
- Michalak, M., E. F. Corbett, et al. (1999). "Calreticulin: one protein, one gene, many functions." *Biochem J* 344 Pt 2: 281-92.
- Miele, A. E., P. J. Watson, et al. (2004). "Two distinct interaction motifs in amphiphysin bind two independent sites on the clathrin terminal domain beta-propeller." *Nat Struct Mol Biol* 11(3): 242-8.
- Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." *J Mol Biol* 260(3): 289-98.
- Mizokami, A., T. Kanematsu, et al. (2007). "Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA(A) receptors to the cell surface." *J Neurosci* 27(7): 1692-701.
- Mizushima, N. (2004). "Methods for monitoring autophagy." *Int J Biochem Cell Biol* 36(12): 2491-502.
- Moss, S. J. and T. G. Smart (2001). "Constructing inhibitory synapses." *Nat Rev Neurosci* 2(4): 240-50.
- Muller-Taubenberger, A., A. N. Lupas, et al. (2001). "Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis." *EMBO J* 20(23): 6772-82.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Musacchio, A., C. J. Smith, et al. (1999). "Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography." *Mol Cell* 3(6): 761-70.
- Myszka, D. G. (1999). "Improving biosensor analysis." *J Mol Recognit* 12(5): 279-84.
- Myszka, D. G. and R. L. Rich (2000). "Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery." *Pharm Sci Technol Today* 3(9): 310-317.
- Nakamura, K., A. Zuppini, et al. (2001). "Functional specialization of calreticulin domains." *J Cell Biol* 154(5): 961-72.
- Nakatogawa, H., Y. Ichimura, et al. (2007). "Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion." *Cell* 130(1): 165-78.
- Nandi, P. K., P. P. Van Jaarsveld, et al. (1981). "Effect of basic compounds on the polymerization of clathrin." *Biochemistry* 20(23): 6706-10.
- Nemos, C., V. Mansuy, et al. (2003). "Expression of gec1/GABARAPL1 versus GABARAP mRNAs in human: predominance of gec1/GABARAPL1 in the central nervous system." *Brain Res Mol Brain Res* 119(2): 216-9.
- Nishimune, A., J. T. Isaac, et al. (1998). "NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission." *Neuron* 21(1): 87-97.
- Nymann-Andersen, J., G. W. Sawyer, et al. (2002). "Interaction between GABAA receptor subunit intracellular loops: implications for higher order complex formation." *J Neurochem* 83(5): 1164-71.

- Nymann-Andersen, J., H. Wang, et al. (2002). "Subunit specificity and interaction domain between GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) and GABA(A) receptors." *J Neurochem* 80(5): 815-23.
- Okamoto, C. T., J. McKinney, et al. (2000). "Clathrin in mitotic spindles." *Am J Physiol Cell Physiol* 279(2): C369-74.
- Okazaki, N., J. Yan, et al. (2000). "Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation." *Brain Res Mol Brain Res* 85(1-2): 1-12.
- Ostwald, T. J., D. H. MacLennan, et al. (1974). "Effects of cation binding on the conformation of calsequestrin and the high affinity calcium-binding protein of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 249(18): 5867-71.
- O'Sullivan, G. A., M. Kneussel, et al. (2005). "GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse." *Eur J Neurosci* 22(10): 2644-8.
- Otting, G. and K. Wuthrich (1990). "Heteronuclear filters in two-dimensional [¹H,¹H]-NMR spectroscopy: combined use with isotope labelling for studies of macromolecular conformation and intermolecular interactions." *Q Rev Biophys* 23(1): 39-96.
- Owen, D. J., B. M. Collins, et al. (2004). "Adaptors for clathrin coats: structure and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 153-91.
- Paz, Y., Z. Elazar, et al. (2000). "Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p." *J Biol Chem* 275(33): 25445-50.
- Pritchett, D. B., H. Sontheimer, et al. (1989). "Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology." *Nature* 338(6216): 582-5.
- Provencher, S. W. and J. Glockner (1981). "Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism." *Biochemistry* 20(1): 33-7.
- Rizvi, S. M., L. Mancino, et al. (2004). "A polypeptide binding conformation of calreticulin is induced by heat shock, calcium depletion, or by deletion of the C-terminal acidic region." *Mol Cell* 15(6): 913-23.
- Robinson, M. S. (2004). "Adaptable adaptors for coated vesicles." *Trends Cell Biol* 14(4): 167-74.
- Rojiani, M. V., B. B. Finlay, et al. (1991). "In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits." *Biochemistry* 30(41): 9859-66.
- Royle, S. J. (2006). "The cellular functions of clathrin." *Cell Mol Life Sci* 63(16): 1823-32.
- Sagiv, Y., A. Legesse-Miller, et al. (2000). "GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28." *EMBO J* 19(7): 1494-504.
- Saito, Y., Y. Ihara, et al. (1999). "Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins." *EMBO J* 18(23): 6718-29.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). "Molecular Cloning. A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schneider, T. D. and R. M. Stephens (1990). "Sequence logos: a new way to display consensus sequences." *Nucleic Acids Res* 18(20): 6097-100.
- Schrag, J. D., J. J. Bergeron, et al. (2001). "The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding." *Mol Cell* 8(3): 633-44.
- Schwartz, D. C. and M. Hochstrasser (2003). "A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers." *Trends Biochem Sci* 28(6): 321-8.

- Seeler, J. S. and A. Dejean (2001). "SUMO: of branched proteins and nuclear bodies." *Oncogene* 20(49): 7243-9.
- Sine, S. M. and A. G. Engel (2006). "Recent advances in Cys-loop receptor structure and function." *Nature* 440(7083): 448-55.
- Smith, C. J., N. Grigorieff, et al. (1998). "Clathrin coats at 21 Å resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors." *Embo J* 17(17): 4943-53.
- Smothers, J. F. and S. Henikoff (2001). "Predicting in vivo protein peptide interactions with random phage display." *Comb Chem High Throughput Screen* 4(7): 585-91.
- Smothers, J. F., S. Henikoff, et al. (2002). "Tech.Sight. Phage display. Affinity selection from biological libraries." *Science* 298(5593): 621-2.
- Sollner, T., M. K. Bennett, et al. (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." *Cell* 75(3): 409-18.
- Song, I., S. Kamboj, et al. (1998). "Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors." *Neuron* 21(2): 393-400.
- Sou, Y.-S., I. Tanida, et al. (2006). "Phosphatidylserine in Addition to Phosphatidylethanolamine Is an in Vitro Target of the Mammalian Atg8 Modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16." *J Biol Chem* 281(6): 3017-24.
- Sparks, A. B., N. B. Adey, et al. (1995). "Screening phage-displayed random peptide libraries for SH3 ligands." *Methods Enzymol* 255: 498-509.
- Sreerama, N., S. Y. Venyaminov, et al. (1999). "Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy." *Protein Sci* 8(2): 370-80.
- Sreerama, N. and R. W. Woody (1993). "A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism." *Anal Biochem* 209(1): 32-44.
- Sreerama, N. and R. W. Woody (2000). "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set." *Anal Biochem* 287(2): 252-60.
- Sreerama, N. and R. W. Woody (2004). "Computation and analysis of protein circular dichroism spectra." *Methods Enzymol* 383: 318-51.
- Stahelin, R. V., F. Long, et al. (2003). "Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains." *J Biol Chem* 278(31): 28993-9.
- Stangler, T., R. Hartmann, et al. (2006). "Modern High Resolution NMR for the Study of Structure, Dynamics and Interactions of Biological Macromolecules." *Z. Phys. Chem.* 220: 567-613.
- Stangler, T., L. M. Mayr, et al. (2001). "Sequence-specific ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of human GABA receptor associated protein." *J Biomol NMR* 21(2): 183-4.
- Stangler, T., L. M. Mayr, et al. (2002). "Solution structure of human GABA(A) receptor-associated protein GABARAP: implications for biological function and its regulation." *J Biol Chem* 277(16): 13363-6.
- Steel, G. J. and P. G. Woodman (1995). "Investigation of fusion complex assembly from placental clathrin coated vesicle membranes." *Biochem Soc Trans* 23(4): 555S.
- Steino, A., C. S. Jorgensen, et al. (2004). "Interaction of C1q with the receptor calreticulin requires a conformational change in C1q." *Scand J Immunol* 59(5): 485-95.
- Sudhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." *Annu Rev Neurosci* 27: 509-47.

- Sugawara, K., N. N. Suzuki, et al. (2004). "The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8." *Genes Cells* 9(7): 611-8.
- Tanida, I., M. Komatsu, et al. (2003). "GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3." *Biochem Biophys Res Commun* 300(3): 637-44.
- Tanida, I., N. Mizushima, et al. (1999). "Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy." *Mol Biol Cell* 10(5): 1367-79.
- Tanida, I., Y.-s. Sou, et al. (2004). "HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates." *J Biol Chem* 279(35): 36268-76.
- Tanida, I., E. Tanida-Miyake, et al. (2002). "Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p." *J Biol Chem* 277(16): 13739-44.
- Tanida, I., M. Wakabayashi, et al. (2006). "Lysosomal turnover of GABARAP-phospholipid conjugate is activated during differentiation of C2C12 cells to myotubes without inactivation of the mTor kinase-signaling pathway." *Autophagy* 2(4): 264-71.
- Tehrani, M. H. and E. M. Barnes, Jr. (1997). "Sequestration of gamma-aminobutyric acidA receptors on clathrin-coated vesicles during chronic benzodiazepine administration in vivo." *J Pharmacol Exp Ther* 283(1): 384-90.
- Tehrani, M. H., B. J. Baumgartner, et al. (1997). "Clathrin-coated vesicles from bovine brain contain uncoupled GABAA receptors." *Brain Res* 776(1-2): 195-203.
- Teng, H. and R. S. Wilkinson (2005). "Clathrin-mediated endocytosis in snake motor terminals is directly facilitated by intracellular Ca²⁺." *J Physiol* 565(Pt 3): 743-50.
- ter Haar, E., S. C. Harrison, et al. (2000). "Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1096-100.
- ter Haar, E., A. Musacchio, et al. (1998). "Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker." *Cell* 95(4): 563-73.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-80.
- Tran, T. (2005). "Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifiziereller und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3 Domänen."
- Traub, L. M. (2003). "Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection." *J Cell Biol* 163(2): 203-8.
- Traub, L. M. (2005). "Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane." *Biochim Biophys Acta* 1744(3): 415-37.
- Ungewickell, E. and D. Branton (1981). "Assembly units of clathrin coats." *Nature* 289(5796): 420-2.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, et al. (1995). "Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles." *Nature* 378(6557): 632-5.
- Valiron, O., N. Caudron, et al. (2001). "Microtubule dynamics." *Cell Mol Life Sci* 58(14): 2069-84.

- van Rijnsoever, C., C. Sidler, et al. (2005). "Internalized GABA-receptor subunits are transferred to an intracellular pool associated with the postsynaptic density." *Eur J Neurosci* 21(2): 327-38.
- van Stokkum, I. H., H. J. Spoelder, et al. (1990). "Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra." *Anal Biochem* 191(1): 110-8.
- Vernier-Magnin, S., S. Muller, et al. (2001). "A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP." *Biochem Biophys Res Commun* 284(1): 118-25.
- Vigers, G. P., R. A. Crowther, et al. (1986). "Three-dimensional structure of clathrin cages in ice." *Embo J* 5(3): 529-34.
- Vigneswara, V., J. Lowenson, et al. (2006). "Proteomic identification of novel substrates of a protein isoaspartyl methyltransferase repair enzyme." *J Biol Chem*.
- Wang, H., F. K. Bedford, et al. (1999). "GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton." *Nature* 397(6714): 69-72.
- Wang, H. and R. W. Olsen (2000). "Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction." *J Neurochem* 75(2): 644-55.
- Wang, J., S. Liu, et al. (2003). "Interaction of calcineurin and type-A GABA receptor gamma 2 subunits produces long-term depression at CA1 inhibitory synapses." *J Neurosci* 23(3): 826-36.
- Wang, J. H. and A. Stelzer (1996). "Shared calcium signaling pathways in the induction of long-term potentiation and synaptic disinhibition in CA1 pyramidal cell dendrites." *J Neurophysiol* 75(4): 1687-702.
- Whiting, P. J. (1999). "The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention." *Neurochem Int* 34(5): 387-90.
- Wilbur, J. D., P. K. Hwang, et al. (2005). "New faces of the familiar clathrin lattice." *Traffic* 6(4): 346-50.
- Wu, M., G. Yin, et al. (2006). "Human RAB24, interestingly and predominantly distributed in the nuclei of COS-7 cells, is colocalized with cyclophilin A and GABARAP." *Int J Mol Med* 17(5): 749-54.
- Ybe, J. A., F. M. Brodsky, et al. (1999). "Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix." *Nature* 399(6734): 371-5.
- Yoshimori, T. (2004). "Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells." *Biochem Biophys Res Commun* 313(2): 453-8.
- Zhou, B., N. Boudreau, et al. (1997). "Microtubule-associated protein 1 light chain 3 is a fibronectin mRNA-binding protein linked to mRNA translation in lamb vascular smooth muscle cells." *J Clin Invest* 100(12): 3070-82.
- Zuiderweg, E. R. (2002). "Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy." *Biochemistry* 41(1): 1-7.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A_{xxx}	Extinktion bei xxx nm
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
Apg/Atg	Autophagy-related protein
AP	Adaptor protein
ATP	Adenosintriphosphat
β -ME	β -Mercaptoethanol
BIS-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)methan
Ca^{2+}	Calcium
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
CHC	Clathrin heavy chain
CRT	CRT
d	Durchmesser
D ₂ O	Deuteriumoxid; 2H_2O
Da	Dalton; Molekulargewichtsangabe für Biopolymere
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum

et al.	und andere („et alis“)
EtBr	Ethidiumbromid
FC	Flusszelle
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A -Rezeptor	Rezeptor für γ -Aminobuttersäure vom Typ A
GABARAP	GABA _A -Rezeptor-assoziiertes Protein
GATE-16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa
GEC	Glandular epithelial cell protein (GABARAPL1)
GRIP1	Glutamate receptor interacting protein 1
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSQC	Heteronukleare Einquantenkohärenz („heteronuclear single quantum coherence“)
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kap	Kapitel
kb	Kilobasen
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
MAP-LC	Mikrotubuli-assoziiertes Protein, leichte Kette
M	molar [Mol/Liter]
μ M	Mikromolar [Mikromol/Liter]
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter

mM	Millimolar [Millimol/Liter]
M9-Medium	künstliches Minimalmedium (zur Isotopenmarkierung)
MOI.MOL	„molecule analysis and molecule display“, Computerprogramm zur Darstellung und Analyse von 3D Molekülkoordinaten
mRNA	Messenger-RNA
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze für die Passage durch Membranen („molecular weight cut-off“)
NHS	N-hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz („nuclear magnetic resonance“)
NMRPipe	Computerprogramm zur Prozessierung von NMR-Spektren
NOE	Kern-Overhauser-Effekt („nuclear Overhauser effect (enhancement)“)
NOESY	NOE-Spektroskopie („NOE spectroscopy“)
NSF	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor
nt	Nukleotide
OD _{xxx}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xxx nm
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PDB	„Protein Data Bank“
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	„parts per million“, hier für die Angabe der NMR-chemische Verschiebung
PRIP	phospholipase C-related inactive protein
PSSM	Position-specific scoring matrix
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („rotations per minute“)
RT	Raumtemperatur
RU	Response Units

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecylsulfate“)
SNAP	soluble NSF-attachment protein
SNARE	[NSF]-attachment protein receptor
SPR	Surface plasmon resonance, Oberflächenplasmonen Resonanz
SP-20	Surfactant P20 (Polyoxyethylensorbitan)
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
Tab	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TfR	Transferrin Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ULK	Unc-51-like Kinase
µl	Mikroliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Einbuchstaben-Aminosäure-Code

A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Aspartat	L	Leucin	T	Threonin
E	Gluatamat	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	Y	Tyrosin
H	Histidin	Q	Glutamin		

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Membrantopologie der GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten und deren Assemblierung im Rezeptor	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der zellulären GABA _A -Rezeptor Transportwege	4
Abbildung 1.3: Ribbondarstellung der Lösungsstruktur des humanen GABARAP-Proteins	5
Abbildung 1.4: Ubiquitylierungs-ähnliche Prozessierung von GABARAP	6
Abbildung 2.1: DNS-Sequenzabschnitt der verwendeten Phagenbibliothek	21
Abbildung 2.2: DNS-Sequenz der multiplen Klonierungsstelle von pET15b_kombi	22
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung einer Phagendisplay-Selektion	40
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines SPR-Experimentes	47
Abbildung 4.1: 15% SDS-PAGE zur Analyse der Expression und Reinigung von rekombinantem GABARAP	56
Abbildung 4.2: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie der Spaltprodukte nach Thrombinverdau des GST-GABARAP-Fusionsproteins	56
Abbildung 4.3: Anreicherungs-ELISA: Signal-quantifizierung über die Absorption bei 450 nm	58
Abbildung 4.4: Einzelphagen-ELISA: Quantifizierung der Absorption bei 450 nm	58
Abbildung 4.5: Analyse der Phagen Display selektierten Peptidsequenzen 1 bis 70	60
Abbildung 4.6: Fluoreszenztitration von GABARAP zu fN1 (A), fN2 (B), fN3 (C) und FITC (D)	62
Abbildung 4.7: Bindungsstudie von GABARAP und N1-Peptid mit Oberflächenplasmonenresonanz	63
Abbildung 4.8: Überlagerung der (¹ H- ¹⁵ N)-HSQC-Spektren von GABARAP im freien Zustand und bei Bindung an das N1-Peptid	64
Abbildung 4.9: Lokalisierung der N1-Peptid Bindestelle von GABARAP	65
Abbildung 4.10: Visualisierung der N1-Peptid Bindestelle an GABARAP	66
Abbildung 4.11: Erstellung eines „position-specific scoring matrix“ (PSSM) basierten, fünfstelligen Konsensusmotivs (Motiv 1) aus GABARAP-bindenden Peptidsequenzen	68
Abbildung 4.12: Erstellung eines „position-specific scoring matrix“ (PSSM) basierten, sechsstelligen Konsensusmotivs (Motiv 2) aus GABARAP-bindenden Peptidsequenzen	69
Abbildung 4.13: Lage der putativen GABARAP-Bindestelle (Aminosäurereste 512-516) in der Clathrin heavy chain (CHC) Struktur	71
Abbildung 4.14: Visualisierung der putativen GABARAP-Bindestelle in CRT anhand der Kristallstruktur von humanem Calnexin	72

Abbildung 4.15: Kinetische Analyse der CRT-GABARAP-Interaktion mittels Oberflächenplasmonenresonanz.	74
Abbildung 4.16: Aminosäuresequenz des verwendeten humanen CRT Konstruktes	75
Abbildung 4.17: 15% SDS-PAGE zur Analyse der Expression und Reinigung von rekombinatem CRT	76
Abbildung 4.18: Untersuchung der CRT-Faltung und -stabilität über die Zeit mittels Fern-UV-CD	77
Abbildung 4.19: (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektren von GABARAP in An- und Abwesenheit von Liganden	78
Abbildung 4.20: Endogenes GABARAP bindet an immobilisiertes CRT	80
Abbildung 4.21: Endogenes CRT bindet an immobilisiertes GABARAP	81
Abbildung 4.22: Kinetische Analyse der Kalziumabhängigkeit der GABARAP-CRT-Bindung mittels SPR	82
Abbildung 4.23: Bindungsstudie von GABARAP und CRT (178-188) mit Oberflächenplasmonenresonanz	83
Abbildung 4.24: (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektren von GABARAP in Ab- und Anwesenheit von CRT (178-188)	84
Abbildung 4.25: Lokalisierung der CRT (178-188) Bindestelle von GABARAP	85
Abbildung 4.26: Visualisierung der CRT (178-188) Bindestelle an GABARAP	86
Abbildung 4.27: Aminosäuresequenz des verwendeten humanen MAP-LC3b Konstruktes	88
Abbildung 4.28: Reinigung und Proteaseverdau von rekombinatem MAP-LC3b	89
Abbildung 4.29: Analyse der größenausschlusschromatographischen Reinigung der His-MAP-LC3b Spaltprodukte	90
Abbildung 4.30: (^1H - ^{15}N)-HSQC-Spektrum von MAP-LC3b	91
Abbildung 4.31: Bindungsstudie von MAP-LC3b und CRT mittels Oberflächenplasmonenresonanz Analyse	92
Abbildung 4.32: Bindungsstudie von MAP-LC3b und CRT (178-188) mit Oberflächenplasmonenresonanz	93
Abbildung 4.33: Endogenes Protein CHC bindet an immobilisiertes, rekombinantes GABARAP	95
Abbildung 4.34: (^1H - ^{15}N)-HSQC Spektren von GABARAP in Ab- und Anwesenheit von CHC (510-522)	96
Abbildung 4.35: Lokalisierung der CHC (510-522) Bindestelle von GABARAP	97
Abbildung 4.36: Visualisierung der CHC (510-522) Bindestelle an GABARAP	98
Abbildung 5.1: Die Aminosäuresequenzen der Peptide N1 und CRT (178-188) zeigen 50 % Sequenzidentität	115
Abbildung 5.2: Die Aminosäuresequenzen der Peptide CRT (178-188) und CHC (510-522) zeigen eine Sequenzidentität von über 30 %	124

Abbildung 5.3:	Die drei Peptide N1, CRT (178-188) und Clathrin (510-522) binden an die gleiche Region der GABARAP-Oberfläche	126
Abbildung 5.4:	Schematische Darstellung einer Clathrin-vermittelten Vesikelabschnürung	128
Abbildung 5.5:	Ein Sequenzalignment der drei Proteine CRT, $\gamma 2$ -Untereinheit des GABA _A -Rezeptors und CHC mit Sequenzen aus orthologen Proteinen zeigt je ein konserviertes Tryptophan	133

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Bindungspartner von GABARAP	11
Tabelle 2.1:	Enzyme, Proteine und Antikörper	16
Tabelle 2.2:	Name, Genotyp und Referenz der Bakterienstämme	16
Tabelle 2.3:	Name und Herkunft der Biochemikalien, Chemikalien und Kits	17
Tabelle 2.4:	In dieser Arbeit verwendete Software zur Analyse der Phage Display Sequenzen	18
Tabelle 2.5:	Name und DNS-Sequenz der verwendeten Oligonukleotide	20
Tabelle 2.6:	Name, Aminosäuresequenz und Fluoreszenzmarkierung der verwendeten Peptide	20
Tabelle 2.7:	Sonstige Materialien	23
Tabelle 4.1:	Dissoziationskonstanten der Interaktion von GABARAP mit fN1, fN2, fN3 und FITC	62
Tabelle 4.2:	Die MAST-Datenbanksuche mit dem 5-stelligen Konsensusmotiv identifiziert unter anderem humanes Clathrin heavy chain-1 und -2 als putativ GABARAP-bindende Proteine.	70
Tabelle 4.3:	Die MAST-Datenbanksuche mit dem 6-stelligen Konsensusmotiv identifiziert unter anderem humanes CRT als putativ GABARAP-bindendes Protein.	71
Tabelle 4.4:	CDpro Sekundärstrukturanalyse von CRT	77
Tabelle 4.5:	Aus SPR-Daten ermittelte Fitparameter der GABARAP-CRT-Bindung in Abhängigkeit der Kalziumkonzentration.	82
Tabelle 5.1:	Übersicht über Bindungsaffinitäten verschiedener GABARAP-Peptid-Interaktionen	127

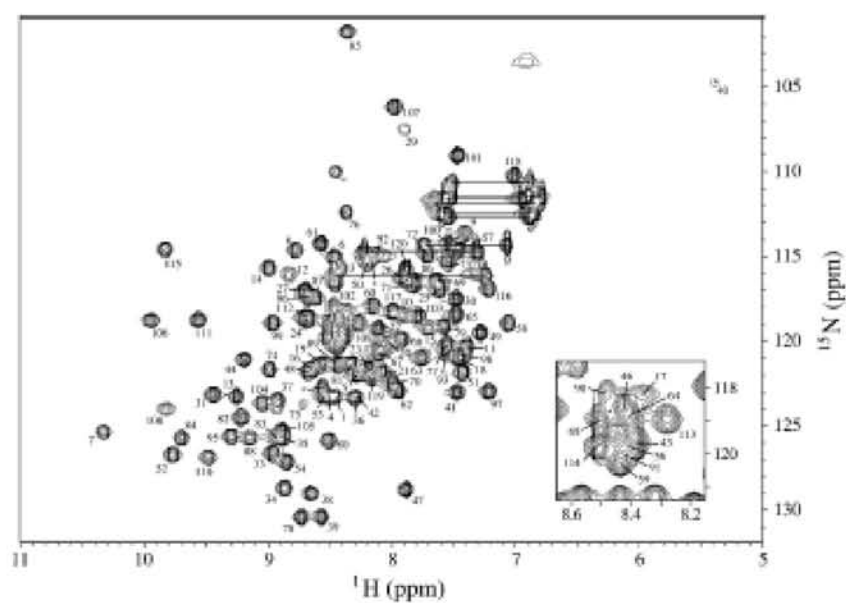
7.4 $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC Spektrum von MAP-LC3 (Kouno et al. 2004)

Abbildung aus (Kouno et al. 2004): $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -HSQC Spektrum von MAP-LC3. Die Assignments sind dem jeweiligen Resonanzsignal zugeordnet. Manche Signale sind durch horizontale Linien miteinander verbunden und korrespondieren zu den Amidgruppen der Asn und Gln Seitenketten. Die mit einem Stern gekennzeichneten Resonanzsignale sind dem aminoterminalen Tag von MAP-LC3 zuzuordnen.

7.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zu dem Zustandekommen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold** für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die Leitung der Arbeit und seinen Optimismus bedanken. Weiterhin sei ihm gedankt für sein allzeit offenes Ohr bei allen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Ein großer Dank gilt **Herrn Dr. Thomas Stangler** für die Betreuung des GABARAP-Projektes und für viele, wissenschaftlich sehr hilfreiche, Diskussionen und Anregungen. Außerdem danke ich ihm für seine Unterstützung bei den NMR-Messungen.

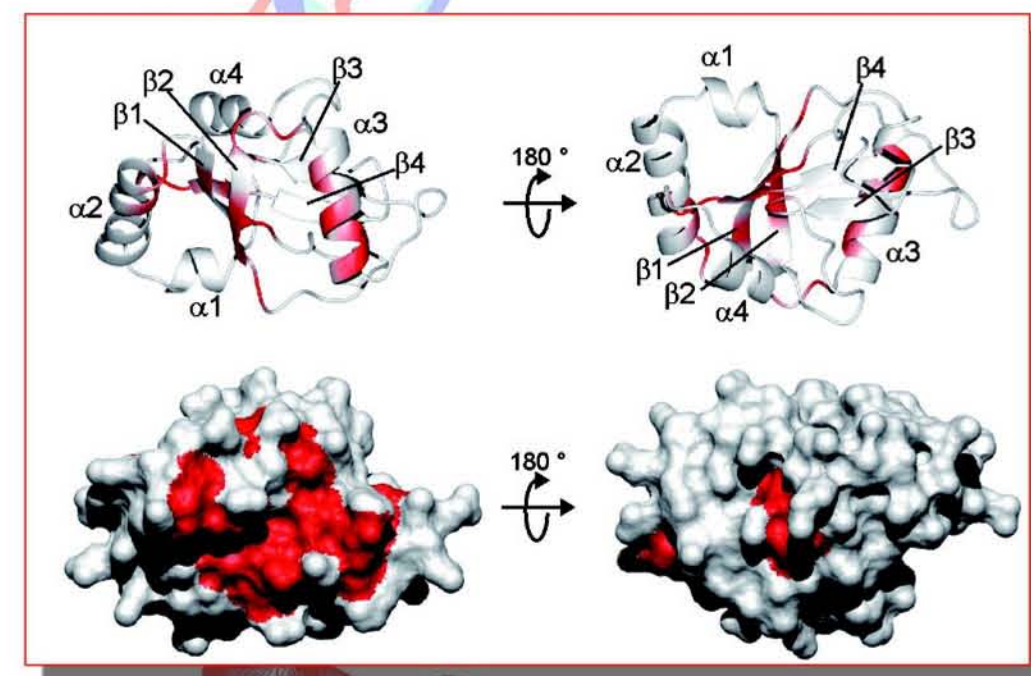
Frau Dr. Katja Wiesehan möchte ich für ihren Rat und ihre Unterstützung bei der Durchführung der Phagendisplay-Selektion danken. **Herrn Dr. Holger Schmidt** danke ich für die immer sehr geduldige Beantwortung aller NMR-assoziierten Fragen während seiner Zeit in Jülich und auch darüber hinaus. **Frau Olga Dietz** danke ich für die Unterstützung bei der Präparation sämtlicher Proteine. **Frau Esther Jonas** möchte ich für ihr unbeugsames Bestreben nach Laborordnung und -sauberkeit und so manch netten Grillabend danken.

Herrn Marc Wittlich danke ich für regelmäßige Diskussionen am Mittagstisch und die gemeinsame Promotionszeit mit vielen wissenschaftlichen Tiefen und Höhen. Ein besonderer Dank gilt „meinen Büromädels“ **Frau Dr. Thi Tuyen Tran**, **Frau Dr. Karen Hänel** und **Frau Amine Aladag** für die unermüdliche Unterstützung während meiner Promotionszeit, viele wissenschaftliche und viele unwissenschaftliche Diskussionen und besonders viel Spaß. Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das gute Klima, die nette und entspannte Arbeitsatmosphäre und für die vielen Abende beim Bowlen, Grillen oder im Kino.

Ein großes Dankeschön gilt meiner **Familie**, speziell meiner **Oma Linda** und meinen **Eltern** für die uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Lebensweges und ihr Vertrauen.

Ebenso danke ich **Herrn Heiko Plickert** für sein Verständnis, seine Ablenkungen und sein Interesse an meinen wissenschaftlichen Problemstellungen.

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**
von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
ISBN: 978-3-89336-506-7
2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
von M. Wittlich (2008), VIII, 185 Seiten
ISBN: 978-3-89336-510-4
3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**
von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten
ISBN: 978-3-89336-511-1



Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen

Jeannine Mohrlüder