

**Strukturelle Charakterisierung  
des Autophagie-assoziierten Proteins  
ATG101**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Max Michel**

aus Taldy-Kurgan, Kasachstan

Jülich, Januar 2015

aus dem Institut für Physikalische Biologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Oliver H. Weiergräber

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2015

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	6
Abkürzungen.....	7
1. Einleitung .....	8
1.1 Die Autophagie .....	9
1.2 Molekulare Mechanismen der Autophagie .....	10
1.3 Das Autophagie-assoziierte Protein ATG101.....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden .....	14
2.1 Material .....	14
2.1.1 Bakterien.....	14
2.1.2 Oligonukleotide .....	14
2.1.3 Plasmide .....	15
2.1.4 Antikörper .....	15
2.1.5 Kits und Screens.....	16
2.1.6 Puffer und Lösungen .....	16
2.1.7 Chemikalien .....	19
2.1.8 Software.....	20
2.1.9 Geräte .....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Klonierung der Vektoren.....	22
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	22
2.2.3 Gelelektrophorese .....	23
2.2.4 Sequenzierung von DNS .....	23
2.2.5 Transformation von Bakterien .....	24
2.2.6 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.2.7 Western-Blot.....	25
2.2.8 Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie .....	26
2.2.9 In-Gel-Verdau von ATG101 .....	26
2.2.10 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie .....	27
2.2.11 Expression von nativem ATG101 .....	28
2.2.12 Reinigung von nativem ATG101.....	29
2.2.13 Expression von ATG101 in Einschlusskörperchen .....	29
2.2.14 Reinigung von rückgefaltetem ATG101 .....	30
2.2.15 Expression und Reinigung von SeMet-ATG101.....	31
2.2.16 Expression und Reinigung von GABARAP .....	31
2.2.17 CD-Spektroskopie.....	32

2.2.18	Dynamische Lichtstreuung .....	33
2.2.19	Expression und Reinigung von ATG13 .....	33
2.2.20	NMR-Spektroskopie von ATG101 .....	34
2.2.21	Kristallisation von ATG101 .....	37
2.2.22	Datensammlung, Phasen- und Strukturbestimmung.....	39
3.	Ergebnisse .....	42
3.1	Expression und Reinigung von nativem ATG101.....	43
3.2	Expression und Reinigung von rückgefaltetem ATG101.....	44
3.3	Reinigung von GST-ATG101.....	48
3.4	Biophysikalische Charakterisierung von ATG101 .....	48
3.5	Kristallisation von ATG101 .....	52
3.6	Datensammlung und -prozessierung.....	54
3.7	Phasenbestimmung, Modellbau und Verfeinerung .....	58
3.8	Struktur von ATG101 .....	59
3.9	Expression und Reinigung von Vollängen-ATG13 und ATG13(1-198).....	64
3.10	Komplexformation von ATG101 mit ATG13 .....	65
3.11	Interaktion von ATG101 mit GABARAP .....	67
4.	Diskussion.....	70
4.1	Expression und Reinigung von ATG101 .....	70
4.2	Nativ exprimiertes <i>versus</i> rückgefaltetes ATG101 .....	71
4.3	Kristallisation von ATG101 .....	73
4.4	Analyse von ATG101-Diffraktionsdaten .....	74
4.5	ATG101 ist in der offenen Konformation fixiert .....	75
4.6	Interaktion von ATG101 mit ATG13 .....	78
4.7	Interaktion von ATG101 mit GABARAP .....	79
4.8	NMR-Untersuchungen an ATG101 .....	80
5.	Zusammenfassung .....	82
	Literaturverzeichnis .....	84
	Danksagung.....	90
	Eidesstattliche Erklärung .....	91

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verschiedene lysosomale Degradationsmechanismen .....	10
Abb. 2: Sekundärstruktur-Vorhersagen .....	42
Abb. 3: Überexpression von nativ exprimiertem ATG101 .....	43
Abb. 4: Reinigung des nativ exprimierten ATG101 .....	44
Abb. 5: Anreicherung und denaturierende Reinigung von ATG101 .....	46
Abb. 6: Ionenaustausch- und Größenausschluss-Chromatographie von ATG101 .....	47
Abb. 7: Reinigung von GST-ATG101 .....	48
Abb. 8: Dynamische Lichtstreuung und CD-Spektroskopie .....	49
Abb. 9: Langzeit-Untersuchung von ATG101 mittels CD-Spektroskopie .....	50
Abb. 10: Zweidimensionales BEST-TROSY-Spektrum von nativem und rückgefaltetem ATG101 .....	51
Abb. 11: Kristallisation von ATG101 .....	53
Abb. 12: Zweidimensionale BEST-TROSY-Spektren von ATG101 und SeMet-ATG101 .....	55
Abb. 13: Röntgenfluoreszenzscan von SeMet-ATG101 .....	56
Abb. 14: Massenspektrometrie von ATG101 und SeMet-ATG101 .....	57
Abb. 15: Topologie-Diagramme von offenen und geschlossenen Konformationen .....	61
Abb. 16: Kristallstruktur von ATG101 .....	62
Abb. 17: Durch PISA vorhergesagte Dimer-Anordnungen von ATG101 in Lösung .....	63
Abb. 18: B-Faktor-Verteilung von ATG101 .....	64
Abb. 19: Expression von ATG13(1-198) .....	65
Abb. 20: Interaktion von ATG101 und ATG13 .....	66
Abb. 21: Untersuchung der Interaktion von ATG13 mit <sup>15</sup> N-ATG101 mittels NMR .....	67
Abb. 22: Interaktion von ATG101 und GABARAP .....	68
Abb. 23: Titration von ATG101 mit GABARAP .....	69
Abb. 24: Superposition von Mad2 mit ATG101 .....	80

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bakterien-Stämme.....	14
Tab. 2: Oligonukleotide.....	14
Tab. 3: Plasmide.....	15
Tab. 4: Antikörper .....	15
Tab. 5: Kits.....	16
Tab. 6: Kristallisationsscreens.....	16
Tab. 7: Puffer zur Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie .....	17
Tab. 8: Nährlösungen .....	17
Tab. 9: Puffer für die Reinigung von ATG101 .....	18
Tab. 10: Puffer für die Reinigung von GABARAP .....	18
Tab. 11: Puffer für die Reinigung von GST-Fusionproteinen .....	18
Tab. 12: Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot.....	19
Tab. 13: Chemikalien.....	19
Tab. 14: Software .....	20
Tab. 15: Geräte .....	21
Tab. 16: Datenacquisitions- und -prozessierungsparameter .....	35
Tab. 17: Auswertung der CD-Daten mittels DicroWeb.....	50
Tab. 18: Tabellarische Auflistung einiger Selen-modifizierbarer Peptide und ihrer m/z Werte.....	57
Tab. 19: Statistik der Datenauswertung und Verfeinerung .....	60

## Abkürzungen

Amp	Ampicilin
AMPK	<i>AMP dependend protein kinase</i>
AS	Aminosäure
ATG	<i>Autophagy related genes</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CD	<i>circular dichroism</i>
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamo Säure
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNS	Desoxy-Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FIP200	<i>focal adhesion kinase (FAK) family interacting protein of 200 kDa</i>
GST	Glutathion-S-transferase
HORMA	Hop/Rev/Mad
Hsc70	<i>Heat shock cognate 70</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
LAMP2a	<i>Lysosome-associated membrane protein 2a</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MAD	<i>Multiple wavelength anomalous dispersion</i>
MES	Morpholinoethansulfonsäure
NMR	<i>nuklear magnetic resonance</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (24°C)
SAD	<i>single wavelength anomalous dispersion</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TCEP	Tricarboxyethylphosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TORC1	<i>target of rapamycin complex 1</i>
TROSY	<i>Transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
ULK1	<i>Uncoordinated-51-like kinase 1</i>
UV	Ultraviolett
$\beta$ ME	$\beta$ -Mercaptoethanol

## 1. Einleitung

Jedliches Leben auf der Erde wird durch die kleinste Einheit, die Zelle, aufgebaut. In jeder Zelle laufen in verschiedenen Zellkompartimenten und Zellorganellen, im Falle der Eukaryoten, komplexe biochemische Vorgänge ab, die von Makromolekülen, den Proteinen, der Desoxy-Ribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäuren (RNS) ausgeführt werden. Diese Vorgänge können im Wesentlichen durch Synthese und Degradation von Mikro- und Makromolekülen und deren Interaktion beschrieben werden. Während manche Makromoleküle, wie die Ribosomen, Proteine aus Aminosäuren herstellen, stellen andere Makromoleküle energietragende Mikromoleküle, wie das Adenosintriphosphat (ATP) her. Letzteres wird durch die ATP-Synthase an der Membran eines Zellorganells, des Mitochondriums, hergestellt. Sowohl Proteine als auch ganze Zellorganellen verlieren ihre Funktionalität durch unterschiedlich schnell ablaufende Alterungsvorgänge, wie oxidativer Stress, Strahlenschäden und intrinsische Instabilität, die zur Umfaltung oder Fehlfaltung von Proteinen führen können. Manche Proteine sind regulatorische Bestandteile von Signalkaskaden. Damit zelluläre Vorgänge nicht gestört werden, müssen diese nicht mehr benötigten Makromoleküle und Zellorganellen wieder abgebaut werden.

Dieser grundlegende zelluläre Degradationsprozess ist in zwei unterschiedliche Mechanismen unterteilt. Ein Mechanismus ist sowohl bei Eukaryoten als auch bei vielen Prokaryoten durch die proteasomale Degradation gekennzeichnet und wird vom namensgebenden Proteasom durchgeführt. Das Proteasom stellt dabei eine Faserstruktur mit einem nach Innen liegenden katalytischen Zentrum mit Threonin-Protease-Aktivität dar und ist für die Degradation von toxischen, fehlgefalteten oder nicht mehr benötigten Proteinen in Peptide verantwortlich (Goldberg et al., 2002). Diese Peptide können in höheren Eukaryoten zur Immunabwehr eingesetzt werden oder allgemein nach weiterer Degradation durch Peptidasen dem Organismus Energie und Synthesebausteine in Form von Aminosäuren bereitstellen. In eukaryotischen Lebewesen werden Proteine, über einen enzymatischen Prozess mit Ubiquitin markiert. Diese markierten Proteine werden vom eukaryotischen Proteasom erkannt und im Inneren degradiert, wodurch dieser Prozess selektiv wird. Bei Eukaryoten findet sich ein zusätzlicher Mechanismus für die Degradation von langlebigen Makromolekülen, die Autophagie. Eine Fehlregulation der Autophagie kann zu Störungen der Immunantwort, vorzeitigem Altern und neurodegenerativen Krankheiten beitragen (Vlada et al., 2015, Tan et al., 2014). So sind weit verbreitete Krankheiten, wie beispielsweise Morbus

Alzheimer, durch die extrazelluläre Anhäufung des Amyloid- $\beta$  Peptides gekennzeichnet (Sosa et al., 2014), bei Chorea Huntington sammelt sich Huntingtin an (Martin et al., 2015). Autophagie hat auch eine wesentliche Funktion in der Pathogenese von Krebs (Sosa et al., 2014). Ansätze, den Autophagieflux, zu beeinflussen, um die Therapie von Tumorerkrankungen zu unterstützen, sind Gegenstand aktueller Forschung (Duffy et al., 2014) Einige grundlegende Mechanismen der Autophagie sind inzwischen verstanden, doch viele Aspekte sind noch unklar.

## 1.1 Die Autophagie

Die Autophagie oder Autophagozytose (griechisch auto für „selbst“ und phagien für „essen“) ist in allen eukaryotischen Zellen, von einzelligen Hefen über Pflanzen bis hin zu Säugetieren, nachweisbar und wurde erstmals 1963 beschrieben (Klionsky, 2008, De Duve, 1963). Zentral ist dabei die Funktion des Lysosoms, eines Zellorganells, das diverse Proteasen, Nukleasen und Lipasen enthält und für die Hydrolyse der zugeführten Makromoleküle verantwortlich ist (Saftig and Klumperman, 2009). Das Lysosom ist dabei an Autophagieprozessen beteiligt (Abb. 1), die im Wesentlichen in drei Hauptkategorien unterteilt werden: Makro-, Mikro- und Chaperon-vermittelte Autophagie.

In der Chaperon-vermittelten Autophagie erkennen Chaperone wie das *Heat shock cognate 70* (Hsc70) ein exponiertes Pentapeptid-Motiv (KFERQ) von Proteinen. Der Komplex wird zur Oberfläche von Lysosomen gebracht und führt dort zur Multimerisierung des Oberflächen-exponierten Transmembranproteins *Lysosome-associated membrane protein 2a* (LAMP2a). Dieses Multimer wird dann zu einem Translokationskomplex für die Fracht von Hsc70, welche anschließend in das Lumen des Lysosom übergeben und dort vollständig degradiert wird (Cuervo and Wong, 2014).

Eine Invagination der lysosomalen Membran um die abzubauenen Bestandteile ist ein charakteristisches Merkmal der Mikroautophagie. Diese Invagination wird zu einer autophagischen Röhre verlängert. Am Ende dieser Röhre wird ein Vesikel abgeschnúrt und im Lysosom inklusive Inhalt degradiert (Li et al., 2012).

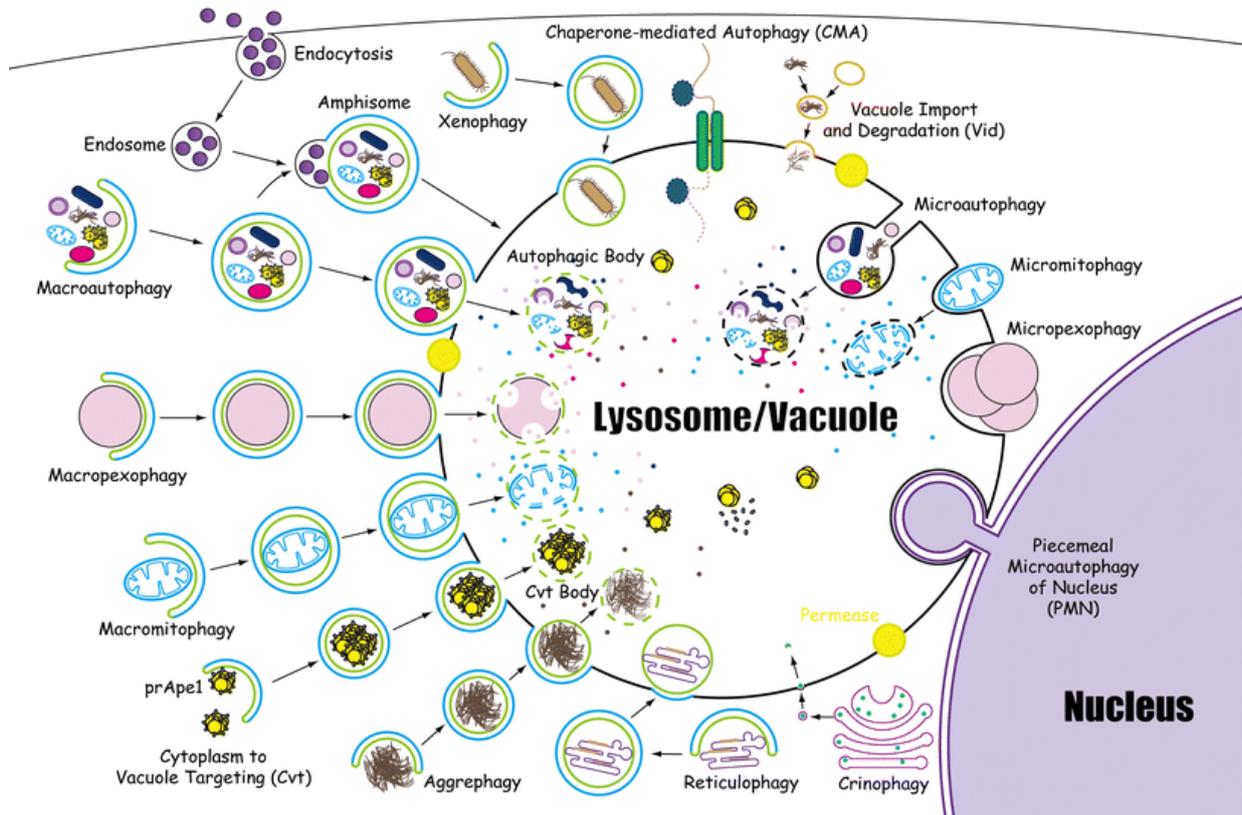


Abb. 1: Verschiedene lysosomale Degradationsmechanismen (Li et al., 2012)

Bei der Makroautophagie formt sich ein Doppelmembran-Vesikel, das Autophagosom, um zytoplasmatische Komponenten. Eine Fusion der äußeren Membran des Autophagosoms mit einem Lysosom bewirkt die Entstehung eines Autophagolysosoms. Dabei wird die innere Membran des ehemaligen Autophagosoms abgebaut und die darin enthaltenen Bestandteile von den Enzymen des Lysosoms hydrolysiert. Die Makroautophagie ist der dominierende Prozess, da sie neben der proteasomalen Degradation den größten Beitrag zum Abbau von biologischen Makromolekülen und Organellen leistet (Klionsky and Codogno, 2013, Kroemer et al., 2010) und soll daher vereinfacht als Autophagie bezeichnet werden.

## 1.2 Molekulare Mechanismen der Autophagie

Autophagie wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert und es wurden 31 *Autophagy related genes* (ATG's) identifiziert. Autophagie findet in Zellen stets auf einem basalen Niveau statt und kann durch oxidativen Stress (Filomeni et al.,

2014 ), Proteinaggregat-Akkumulation (Lamark and Johansen, 2012), erhöhten Energiebedarf und Hunger (Levine and Klionsky, 2004, Mizushima and Klionsky, 2007) drastisch verstärkt werden. Eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Autophagie spielt dabei die Aktivität eines Komplexes mit *Uncoordinated-51-like-kinase-1* (ULK1) in höheren Eukaryoten und in dem zu ULK1 homologen ATG1 in niederen Eukaryoten (Yan et al., 1998). Die Aktivität von ULK1/ATG1 wird durch mehrere Phosphorylierungen eines Serin- und Prolin-reichen Bereiches durch *target of rapamycin complex1* (TORC1) und *AMP activated protein kinase* (AMPK) reguliert. Weitere funktionelle Bereiche von ULK1 sind eine N-terminale Kinase-Domäne und eine C-terminale Protein-Protein-Interaktions-Domäne. An dieser Interaktions-Domäne sind in höheren Eukaryoten unabhängig vom Nahrungsangebot die Proteine *focal adhesion kinase (FAK) family interacting protein of 200 kDa* (FIP200), ATG13 und ATG101 assoziiert. Demgegenüber steht in niederen Eukaryoten, wie *S. cerevisiae*, zuerst ein Komplex aus ATG17, ATG29 und ATG31 (Kabeya et al., 2009) entsteht, der dann abhängig von Nahrungsangebot mit dem ULK1 Homolog ATG1 und ATG13 assoziiert (Mizushima et al., 2011). FIP200 wird als das funktionelle Analog von ATG17 angesehen (Hara and Mizushima, 2009). Ein Homolog für ATG101 ist bislang in *S. cerevisiae* nicht gefunden worden. Diese Komplexe aus niederen und höheren Eukaryoten weisen ähnliche Funktionen auf, sie initiieren die Bildung einer Isolationsmembran, der Phagophore, so dass ein Autophagosom entsteht.

Was die Funktion der Komponenten des ULK1 Komplexes betrifft, ist bislang ein vom zellulären Nahrungsangebot und Energiestatus abhängiges Phosphorylierungsmuster bekannt, doch die exakte Bedeutung der beteiligten Proteine ist Gegenstand aktueller Forschung. So wurde erst vor Kurzem die Struktur der Kinasedomäne von ULK1 gelöst (Lazarus et al., 2014), und die Struktur der N-terminalen globulären Domäne von ATG13 aus einer Hefe (Jao et al., 2013) könnte Rückschlüsse auf die Funktion des Säuger-ATG13-Proteins erlauben. Insbesondere die Funktion des ATG101-Proteins, welches ausschließlich in höheren Eukaryoten am autophagosomalen ULK1-Initiationskomplex teilnimmt, bleibt jedoch rätselhaft. Da ATG101 für die Funktionalität der Autophagie essentiell ist (Liang et al., 2012), ist eine genauere Betrachtung dieses Proteins notwendig.

### 1.3 Das Autophagie-assoziierte Protein ATG101

ATG101 wurde nahezu zeitgleich in zwei Publikationen erstmals beschrieben. In der einen wurde es durch bioinformatische Analysen von Interaktionsdaten in *D. melanogaster* (Mercer et al., 2009) und in der anderen durch Flüssigkeitschromatographiegekoppelte Massenspektrometrie (Hosokawa et al., 2009) gefunden. In beiden Fällen wurde das hypothetische humane Protein Fij11773 als direkter Interaktionspartner des ULK1 Komplexes, insbesondere von ATG13, identifiziert. Fij11773 wurde daher zu ATG101 umbenannt. Es findet sich ausschließlich in höheren Eukaryoten und hat keine Sequenzähnlichkeit zu einem Protein im ATG1-Komplex in *S. cerevisiae*. In höheren Eukaryoten schützt es ATG13 vor Ubiquitinierung und stabilisiert es dadurch. Eine essentielle Rolle von ATG101 für die Autophagie wurde durch siRNA-Experimente bestätigt. Die Inhibition der Expression von ATG101, wie auch die von ATG13, führte zu einer substantiellen Inhibition der Autophagie-Prozesse.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Autophagie ist ein essentieller Adaptionsmechanismus jeder eukaryotischen Zelle. Im Falle einer Fehlfunktion kann er dementsprechend zu einer breiten Palette von Krankheiten führen oder diese begünstigen. Ein fundamentales Verständnis der einzelnen daran beteiligten Makromoleküle kann Ansatzpunkte für die Therapie von z.B. neurodegenerativen Krankheiten oder Krebs liefern.

Viele der an Autophagie beteiligten Makromoleküle wurden bereits in Hefe identifiziert und charakterisiert. In höheren Eukaryoten, wozu auch der Mensch zählt, haben sich einige dieser Proteine evolutionsbedingt verändert oder wurden neu in das Autophagie-System aufgenommen, wo sie essentielle Aufgaben übernehmen. Für ein fundamentales Verständnis der Makromoleküle ist das Wissen um deren dreidimensionale Struktur unabdingbar. Dieses Wissen kann derzeit auf atomarer Ebene mittels Röntgenkristallographie und Kernmagnetischer Resonanz (NMR)-Spektroskopie erlangt werden. Eine ganze Reihe von Autophagie-assoziierten Polypeptiden konnte bereits strukturell untersucht werden, sei es in voller Länge oder in Form von Fragmenten. In anderen Fällen jedoch liegen bislang keinerlei Strukturinformationen vor. In die letzte Gruppe fällt auch ATG101.

Ziel dieser Arbeit ist daher die strukturelle Charakterisierung des humanen ATG101. Dazu sollte dieses Protein in größt möglicher Reinheit und Homogenität hergestellt, die Struktur mittels Röntgenkristallographie gelöst, die native Faltung mittels NMR-Spektroskopie überprüft und Interaktionen mit weiteren Autophagie-assoziierten Proteinen charakterisiert werden.

Das Wissen um die Struktur von ATG101 kann einen Beitrag leisten um die Mechanismen der Autophagie höherer Eukaryoten aufzuklären. Dadurch, dass ATG101 keinerlei Sequenzähnlichkeit zu anderen humanen Proteinen aufweist, stellt es ein potentielles Ziel pharmakologischer Therapien dar.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterien

Bakterien, die zur Klonierung und Amplifikation von DNS und Expression von Protein benutzt wurden sind in Tab. 1 aufgelistet.

**Tab. 1: Bakterien-Stämme**

BakterienStamm	Genotyp
E.coli BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3( λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5)</i>
E.coli B834(DE3)	<i>F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm met λ DE3( λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5)</i>
E.coli Omnimax2 T1	<i>F' proAB lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR ) Δ(ccdAB) mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC) Φ 80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD</i>

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Für die Klonierung von Konstrukten wurden die Oligonukleotide in Tab. 2 mit Clone-Manager erstellt und von der Firma Biotex (Berlin, Deutschland) produziert.

**Tab. 2: Oligonukleotide**

Oligonukleotide für GST-ATG101	Sequenz
>GEXATG_fw	GGGGGGGATCCATGAACTGTCGCTCGGAGG
>GEXATGPET_rev	GGGGGGCTCGAGTTATTATCAGAGGGCAAGGG
Oligonukleotide für ATG13 (1-198)	Sequenz
>atg13_1_ndeI_fw	CCCCCCCCCATATGGAACTGATCTCAATTCCC
>atg13_198_bamHI_rev	AAAAAAGGATCCTTAGGTAGACATGAATGCCAA

### 2.1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind mit Resistenz, dem exprimiertem Proteinprodukt und ihrem Bezug in Tab. 3 aufgeführt.

**Tab. 3: Plasmide**

Plasmid	Resistenz	Exprimiertes Proteinprodukt	Quelle
pET11a ATG101	Ampicillin	ATG101	ICS-6, FZ-Jülich, Deutschland
pGEX 6P2 ATG101	Ampicillin	GST-ATG101 mit Prescission-Erkennungsmotiv	Selbst hergestellt
pET15b ATG13	Ampicillin	HIS-ATG13 mit Thrombin-Erkennungsmotiv	Inst. f. Mol Medizin, Uniklinik Düsseldorf, Deutschland
pet15b ATG13 1-198	Ampicillin	HIS-ATG13 AS1-198 mit Thrombin-Erkennungsmotiv	Selbst hergestellt
pGEX 3x ATG13	Ampicillin	GST-ATG13 mit Faktor-Xa-Erkennungsmotiv	Inst. f. Mol Medizin, Uniklinik Düsseldorf, Deutschland
pET11a GABARAP	Ampicillin	GABARAP	ICS-6, FZ-Jülich, Deutschland
pGEX 4T3 Prescission	Ampicillin	GST-Prescission mit Thrombin-Erkennungsmotiv	ICS-6, FZ-Jülich, Deutschland

### 2.1.4 Antikörper

Zur Identifizierung der verwendeten Proteine mittels Western-Blot wurden die in Tab. 4 aufgeführten Antikörper benutzt.

**Tab. 4: Antikörper**

Antikörper	Quelle
Rabbit Anti-KIA00652 (ATG13) ab105392	AbCam, Cambridge, UK
Rabbit Anti ATG101 ab157611	AbCam, Cambridge, UK
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate 31460	Thermo Fischer, Rockford, USA

## 2.1.5 Kits und Screens

Für die Reinigung von DNS für Klonierungszwecke und Präparation von Plasmid-DNS wurden die in Tab. 5 aufgeführten kommerziell erhältlichen Kits verwendet.

**Tab. 5: Kits**

Kits	Quelle
DNA Miniprep	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA MidiPrep	Qiagen, Hilden, Deutschland
Gel extraction und PCR Purification	Qiagen, Hilden, Deutschland

Für die Kristallisation von ATG101 wurden die in Tab. 6 aufgeführten kommerziell erhältlichen Pufferraster bzw Kristallisations-screens verwendet.

**Tab. 6: Kristallisationsscreens**

Kristallisationsscreens	Quelle
Crystal Screen I / II	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Wizard Screen I / II	Rigaku, Bainbridge Island, USA
PEGs I/II Suite	Qiagen, Hilden, Deutschland
JCSG Core 1-4, PLUS	Qiagen, Hilden, Deutschland
Low Ionic Strength Kit	Sigma, Buchs, Schweiz
Anions Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Cations Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

## 2.1.6 Puffer und Lösungen

Die Puffer für die Herstellung der Proben während eines In-Gel-Verdaus und für die Reinigung der entstehenden Peptide sind in Tab. 7 aufgeführt.

**Tab. 7: Puffer zur Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie**

Puffer für Massenspectrometrie	
Spaltpuffer	50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
Waschpuffer	50 % Spaltpuffer, 50 % EtOH
Trypsin	12.5 ng/μl Trypsin in Spaltpuffer
Iodoacetamid	55 mM Iodoacetamid in Spaltpuffer
DTT	10 mM DTT in H <sub>2</sub> O
Extraktionspuffer A	0.5 % Essigsäure
Extraktionspuffer B	30 % Acetonitril, 0.5 % Essigsäure
Extraktionspuffer C	100 % Acetonitril

Für die Kultivierung von Bakterienzellen wurden die in Tab. 8 aufgeführten Nährlösungen verwendet.

**Tab. 8: Nährlösungen**

Nährlösung	Zusammensetzung
Lysogeny Broth Lennox (LB) -Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
Lysogeny Broth Lennox (LB) -Festmedium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 1.5 % Agar
Terrific Broth (TB) -Medium	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 17 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 72 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Minimal-Medium M9	8.3 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 500 mg/l NaCl 5 mg/l Thiaminhydrochlorid, je 1 mg/l d-Biotin, Cholinchlorid, Folsäure, Nicotinamid, Natrium-D-panthothenat, Pyridoxalhydrochlorid, 100 μg/l Riboflavin 200 μM MgSO <sub>4</sub> , 100 μM CaCl <sub>2</sub> , 0.4 % D-Glucose, 10 μM Fe(III)-Citrat, 1 g/l NH <sub>4</sub> Cl 100 μg/l ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 30 μg/l MnCl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O, 300 μg/l H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> , 200 μg/l CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O, 20 μg/l NiCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O, 10μg/l CuCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O, 20 μg/l Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
SOB-Medium	20 g/l Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl
SeMet-M9-Medium	M9-Medium mit 50 mg/l Seleno-L-Methionin
Met-M9-Medium	M9-Medium mit 50 mg/l L-Methionin
<sup>15</sup> N-M9-Medium	M9-Medium mit 1 g/l <sup>15</sup> N <sub>4</sub> Cl statt NH <sub>4</sub> Cl
<sup>15</sup> N- <sup>13</sup> C-M9-Medium	<sup>15</sup> N-M9-Medium mit 2 g/l <sup>13</sup> C-D-Glucose statt Glucose
<sup>15</sup> N-SeMet-M9-Medium	<sup>15</sup> N-M9-Medium mit 50 mg/l Seleno-L-Methionin

Für die Reinigung von ATG101 und SeMet-ATG101 wurden die in Tab. 9 aufgeführten Puffer benutzt.

**Tab. 9: Puffer für die Reinigung von ATG101**

Puffer für die Reinigung von ATG101	Zusammensetzung
Lyse nativ	20 mM Tris pH 8.8, 50 mM NaCl, 10 mM $\beta$ ME, Protease-Inhibitor
Puffer A	20 mM Tris pH 8.8, 50 mM NaCl, 10 mM $\beta$ ME
Puffer B	20 mM Tris pH 8.8, 1000 mM NaCl, 10 mM $\beta$ ME
Puffer D	50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 8, 8 M Harnstoff, 10 mM $\beta$ ME
PBS	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4, 137 mM NaCl
Puffer-NMR	150 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6.98, 10 mM $\beta$ ME

Für die Reinigung von GABARAP wurden die in Tab. 10 aufgeführten Puffer benutzt.

**Tab. 10: Puffer für die Reinigung von GABARAP**

Puffer für die Reinigung von GABARAP	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6.5, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, Protease Inhibitor, Dnase 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Puffer A	25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6.5, 50mM KCl, 0.1 mM EDTA
Puffer B	25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6.5, 1000 mM KCl, 0.1 mM EDTA

Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurden die in Tab. 11 aufgeführten Puffer benutzt.

**Tab. 11: Puffer für die Reinigung von GST-Fusionproteinen**

Puffer für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen	Zusammensetzung
Lyse	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM $\beta$ ME, Protease-Inhibitor
Wasch-Puffer	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM $\beta$ ME
Elution	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.4, 137 mM NaCl, 10 mM $\beta$ ME, 10 mM reduziertes L-Glutathion

Lösungen und Puffer, die zur Herstellung einer SDS-PAGE und zum Färben dieser verwendet wurden, sind in Tab. 12 aufgeführt. Auch sind Puffer dargestellt, die während eines Western-Blots benutzt wurden.

**Tab. 12: Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot**

SDS PAGE und Western-Blot Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Sammelgel	5 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 % (v/v) APS, 0.04 % TEMED
12 % Trenngel	12 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 % (v/v) APS, 0.04 % TEMED
15 % Trenngel	15 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 % (v/v) APS, 0.04 % TEMED
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.3, 385 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS
Coomassie Färbe Lösung	30 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 2.5 g/l Coomassie Brilliant Blau R250
Entfärbe Lösung	1 % Isopropanol, 1 % Essigsäure
Towbin-Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, 20 % Methanol, pH wird nicht eingestellt.
PBS-T	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.05 % Tween-20

## 2.1.7 Chemikalien

Die Chemikalien, die nicht in Tab. 13 deklariert sind, wurden mindestens in dem Reinheitsgrad *pro analysi* von den Herstellern Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

**Tab. 13: Chemikalien**

Chemikalien	Bezugsquelle
D <sub>2</sub> O [99,990 %]	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
<sup>13</sup> C-Glucose [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , 99 %]	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
<sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid [ <sup>15</sup> N, 99 %]	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
Seleno-L-Methionin	Affymetrix, High Wycombe, UK

## 2.1.8 Software

Für die Generierung, Bearbeitung und Darstellung der erzeugten Daten wurde die in Tab. 14 aufgeführte Software verwendet.

**Tab. 14: Software**

Datenbank/Programm	Verwendungszweck
Diffraktion Anisotropy server (Strong et al., 2006)	Anisotrope Beschneidung von Diffraktionsdaten
CCP4 programm suite (Winn et al. 2011)	Makromolekulare Kristallographie
CcpNmr analysis (Vranken et al. 2005)	Visualisierung, Zuordnung von NMR-Spektren
Chimera (Pettersen et al., 2004)	Rendern von 3D-Strukturdaten
Clonemanager (Version 9, SciEd Software)	Bearbeitung von Sequenzdaten
ExPASy-ProtParam ( <a href="http://web.expasy.org">http://web.expasy.org</a> )	Analyse von Proteinsequenzen
I-Tasser (Zhang, 2008)	Modellierung von Strukturen von biol. Makromolekülen mittels <i>threading</i>
Jpred (Cole et al., 2008)	Sekundärstrukturvorhersage
KDSSP (Joosten et al., 2011)	Sekundärstrukturbestimmung aus Strukturdaten
nmrDraw (Delaglio et al. 1995)	Visualisierung von NMR-Spektren
nmrPipe (Delaglio et al. 1995)	Prozessierung von NMR-Daten
PDB-Datenbank ( <a href="http://rcsb.org">http://rcsb.org</a> )	Datenbank makromolekularer Strukturen
Phenix (Adams et al. 2010)	Makromolekulare Kristallographie
Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009)	Modellierung von Strukturen von biol. Makromolekülen mittels <i>threading</i>
PISA (Krissinel and Henrick, 2007)	Extraktion von Bindungsflächen in Makromolekülen
Psi-BLAST(Altschul et al., 1997)	Identifikation entfernter Sequenzähnlichkeiten
Pymol (Schrödinger 2010)	Visualisierung von Proteinstrukturen
Uniprot-Datenbank ( <a href="http://uniprot.org">http://uniprot.org</a> )	Informationen zu Proteinsequenzen und -funktionen
XDS (Kabsch, 2010b)	Prozessierung von Diffraktionsdaten

## 2.1.9 Geräte

Für die Durchführung der Experimente benutzen Geräte sind in Tab.15 aufgeführt.

**Tab. 15: Geräte**

Gerät	Typ	Bezugsquelle
24 Loch Platten	Kristallisationsplatten	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
5417R und 5804R	Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Äkta Pure M	Chromatographie-System	GE Healthcare, München, Deutschland
Äkta Purifier 10	Chromatographie-System	GE Healthcare, München, Deutschland
Biacore T200	Oberflächenplasmonresonanz	GE Healthcare, München, Deutschland
Branson sonifier 250	Ultraschal- Anlage	Branson Ultrasonics, Danbury, USA
crystal quick plate 96 wells square, U-bottom, low profile	Kristallisationsplatten	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
Freedom evo	Pipettierroboter	Tecan, Männedorf, Schweiz
GelDoc MP	Geldokumentations Gerät	BioRad, München, Deutschland
Hiload 16/600 Superdex 200	Chromatographiesäule	GE Healthcare, München, Deutschland
Hiload 16/600 Superdex 75	Chromatographiesäule	GE Healthcare, München, Deutschland
Hoefer TE22 Mini Tank Blotting Unit	Western-Blot-Transfer-System	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Kryoschleifen 0.025 mm -1 mm	Kristallhalterung	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Mighty small SE 260	Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
HORIBA M-110P	Zellaufschlussgerät	Microfluidics, Westwood, USA
Milli-Q-Biocell system	Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Schwalbach, Deutschland
MP220 pH-Meter und pH-Elektrode	pH-System	Mettler Toledo, Steinbach, Deutschland
Nanophotometer P300	Spektralphotometer	Implen, München, Deutschland
Octet RED96	Biolayer-Interferometer	Pall, FortéBio, Menlo Park, USA
Power supply EPS 1001	Netzgerät	Amersham, San Francisco, USA
Q-sepharose HP 16/10	Chromatographiesäule	GE Healthcare, München, Deutschland
Semi-mirco balance CP225D	Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Shigemi 5 mm symmetric NMR micro tubes	NMR-Messröhrchen	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Silikonisierte 18mm Object-träger	Kristallisationszubehör	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Thermocycler iCycler	PCR-Anlage	Biorad, München, Deutschland
Unitron / Multitron	Inkubationsschüttler	Infors-HT, Einsbach, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20XP mit JA25.50 und JA 8.1000 Rotor	Zentrifuge	Beckmann-Coulter, Palo Alto, USA
SpectroSize 300	DLS-Analysator	Xtal Concepts GmbH, Hamburg, Deutschland
Dounce tissue Grinder	Homogenisator	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Freeze Dryer Alpha 1.4	Lyophilisator	Christ, Osterode, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Klonierung der Vektoren

Die Klonierung der Konstrukte pGEX-ATG101 und pET15b-ATG13(1-198) geschah durch eine Vermehrung des DNS-Einschubes mittels jeweils einer *polymerase chain reaction* (PCR) mit den Plasmiden pET11a-ATG101 und pET15b-ATG13 als *template* und den jeweiligen Oligonukleotiden, die in Tab. 2 aufgeführt sind. Nach der PCR wurde die DNS von den sonstigen Reaktionsbestandteilen durch Gelelektrophorese und Gelelution gereinigt. Danach wurde die DNS aus der PCR und die Plasmid-DNS pGEX-6P2 für ATG101 und pET15b für ATG13 mit den Restriktionsenzymen BamHI/Xho1 für das ATG101-Konstrukt und Nde1/BamH1 für ATG13 entsprechend den Herstellerangaben geschnitten und erneut nach Gelelektrophorese und Gelelution mit einem Kit gereinigt. Die geschnittene DNS aus der PCR wurde mit dem geschnittenen Plasmid und einer T4-Ligase, Teil eines kommerziell erhältlichen Kits (*T4 Rapid ligation Kit*) entsprechend den Herstellerangaben zusammengefügt und in kompetente *E. coli* Omnimax-Zellen transformiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen, d.h. ca. 18 h später, wurden mehrere Klone gepickt und in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNS aus den Zellen mit einem DNA-Mini-Kit (Miniprep, Quiagen) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Das korrekte Vorhandensein des DNS-Einschubes in dem Plasmid wurde mit einem Testverdau und einer anschließenden Gelelektrophorese überprüft. Positive Klone wurden zusätzlich sequenziert und ein Klon wurde für einen DNA-Midi-Prep (Midiprep, Quiagen) gewählt. Die Plasmid-DNS wurde dann bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der PCR wird durch zyklisch alternierende Temperaturwechsel mit einer optimierten Dauer die DNS spezifisch vermehrt. Die verwendeten Chemikalien waren die Phusion-Polymerase, ein Arbeitspuffer für die Phusion-Polymerase, Oligonukleotide, Nukleotide und eine Start-DNS. Für die Vermehrung der DNS wird diese über eine längere Zeit bei 95-98 °C komplett aufgeschmolzen. Die Oligonukleotide binden bei einer er-

niedrigsten Temperatur. Dazu wurde hier der Schmelzpunkt  $T_m$ , bei dem die Hälfte der DNS-Moleküle im Einzelstrangzustand vorliegt, minus 5 °C gewählt. Die Verlängerung der DNS-Kette erfolgt anschließend mittels einer Polymerase bei erhöhter Temperatur für eine Dauer, die von der DNS-Länge abhängig ist. Hierfür wurde die temperaturstabile Phusion-Polymerase, die ihre optimale Arbeitstemperatur bei 68 °C aufweist und pro Sekunde 2000 Basen verlängert, verwendet. Danach wird die DNS wieder für einige Sekunden aufgeschmolzen. Dieser Vorgang wird 25 bis 35-Mal wiederholt und schlussendlich wird die DNS nochmals bei 68 °C für mehrere Minuten verlängert.

### **2.2.3 Gelelektrophorese**

Hierzu wurde Agarose entsprechend der erwarteten DNS-Fragmente (0,5-0,8 % für Plasmide und 0,8-2,0 % für PCR-Produkte) für 50 ml TAE-Puffer eingewogen und 5 min in einem Mikrowellenherd aufgeköcht. Nachdem die Flüssigkeit nicht mehr dampfte, wurden 3 µl EtBr hinzugegeben. Die Agarose wurde in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gel in die mit TBS-Puffer gefüllte Laufkammer überführt. Nachdem der Kamm entfernt wurde, wurden die Taschen mit DNS in DNS-Ladepuffer befüllt und das Gel wurde bei 180 V für 20 bis 50 min bei RT laufen gelassen. Die DNS-Längen wurden durch einen mitlaufenden DNS-Größenstandard abgeschätzt. Für Gelelutionen wurde ein kleiner Gelblock auf der erwarteten Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNS aus dem Gel extrahiert (Gelextraction-Kit, Quiagen).

### **2.2.4 Sequenzierung von DNS**

Aufgrund der Möglichkeit von Mutationen, die während einer PCR durch fehlerhaften Einbau von Nukleotiden stattfinden können, ist es notwendig, die Sequenz zu überprüfen. Diese Überprüfung der Sequenz geschieht durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Dabei wird mit nur einem Primer-Oligonukleotid eine PCR durchgeführt, die zusätzlich zu den Desoxy-Nukleotiden einen geringen Anteil an Didesoxy-Nukleotiden enthält. Nach Einbau eines Desoxy-Nukleotids ist eine

weitere Verlängerung der DNS nicht mehr möglich, wodurch es zum Abbruch dieser Synthese kommt. Dadurch entstehen unterschiedlich lange Teilfragmente der DNS. Ursprünglich waren die Didesoxy-Nukleotide radioaktiv markiert, sodass die PCR jeweils viermal durchgeführt wurde. Durch eine Gelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie konnte die Sequenz direkt aus der Abfolge der Banden abgelesen werden. Heutzutage werden die Didesoxy-Nukleotide mit jeweils verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert, was eine PCR mit nur einem Ansatz möglich macht. Durch eine Kapillarelektrophorese mit einem Fluoreszenzdetektor lässt sich die Abfolge der Basen aus der Abfolge an Farbmustern, dem Elektropherogramm, ablesen.

## **2.2.5 Transformation von Bakterien**

Für optimale Transformationseffizienzen eignete sich für die verwendeten Zellen die Herstellung kompetenter Bakterien nach der Inoue-Methode (Sambrook and Russell, 2006) Hierzu wurden 1-2 µl Bakterien aus einem Hersteller-Stock, verwendet um 25 ml SOB-Medium anzupflanzen. Eventuelle Antibiotika, abhängig vom Stamm, wurden zugesetzt. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Jeweils 2, 7 und 14 ml Vorkultur wurden verwendet, um 250 ml SOB-Medium anzupflanzen. Die Hauptkultur wurde über Nacht bei 18 °C inkubiert. Nachdem eine der drei Hauptkulturen eine OD600 von 0,55 erreicht hatte, wurde sie bei 4000 g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem Inoue-Puffer (55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 10 mM PIPES pH 6.7) aufgenommen und bei 4000 g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem Inoue-Puffer aufgenommen und zusätzlich wurden 1,5 ml DMSO zugesetzt. Die Suspension wurde in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen zu jeweils 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Bei einer Transformation wurde ein Aliquot mit ca. 100 ng Plasmid-DNS versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend auf für 45 min 42 °C aufgeheizt und sogleich wieder für 3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium und 30 min Inkubation wurden 100 µl auf LB-Agar-Platten mit den vorgeschriebenen Antibiotika ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

## 2.2.6 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS bindet wegen der lipophilen Eigenschaft des Dodecyl-Schwanzes mit 1,4 g zu 1,0 g Protein an das Peptidrückgrad. Dadurch werden intramolekulare Wechselwirkungen aufgehoben und das Protein wird denaturiert. Gleichzeitig enthält SDS aufgrund seiner Sulfatgruppe zwei negative Ladungen, sodass durch die Anlagerung von SDS das Protein eine gleichmäßig verteilte Ladung erhält. Beide Eigenschaften dienen der Auftrennung des Proteins in einem Polyacrylamid (PAA)-Gel. Acrylamid und Bisacrylamid reagieren in der Polymerisation kovalent miteinander, wodurch ein molekulares Netz entsteht. Dessen Porengröße hängt zum einen von dem Verhältnis der beiden Reaktionspartner und zum anderen von der Konzentration dieser im Puffer ab. Dadurch ist es möglich, Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Durch den Abgleich mit einem mitlaufenden Proteinstandard ist es möglich, die Größe des Proteins zu bestimmen. In dieser Arbeit wurden 12 % und 15 % SDS-PAA-Gele verwendet, die Zusammensetzung findet sich in Tab. 12.

## 2.2.7 Western-Blot

Zur immunologischen Identifizierung von Proteinen wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. Ein Sandwich aus Puffer-getränktem Whatman-Papier, Methanol-aktivierter Polyvinyl-difluorid (PVDF)- Membran, dem Gel aus der SDS-PAGE und Puffer-getränktem Whatman-Papier wurde in einer Kassette aufgebaut. Als Puffer wurde der Transferpuffer verwendet. In einer Transferkammer (TE 22 Mini Tank Transfer Gel Electrophoresis Unit, Hoefer), die mit Transfer-Puffer gefüllt war, wurde im Wetblot-Verfahren das Protein in einer Stunde bei 400 mA auf die PVDF Membran transferiert. Dabei war die Membran zur Kathode orientiert.

Die Membran wurde sodann zur Blockierung unspezifischer Reaktionen der Antikörper in PBS-T mit 5 % Milchpulver in ein 50 ml Falcon-Gefäß eingerollt gelegt und rollend für eine Stunde bei RT inkubiert. Die primären Antikörper (Tab. 4) wurden entsprechend dem Protein ausgewählt und nach der Empfehlung des Herstellers in einer

1:5000 Verdünnung für eine Stunde eingesetzt; danach wurde dreimal mit PBS-T für je 5 min gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in einer 1:20000 Verdünnung in PBS-T wurde die Membran abermals dreimal mit PBS-T für je 5 min gewaschen. Die Detektion der immunologisch identifizierten Banden erfolgte über Chemolumineszenz mit Hilfe des *supersignal west pico chemiluminescent substrate kit* photometrisch in einer GelDoc MP Anlage.

## 2.2.8 Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie

Die Absorption der Proteinlösungen wurde im Nanophotometer P300 bei 280 nm gemessen. Als Referenz wurde derselbe Puffer verwendet, in dem das Protein gelöst war. Hierbei wird hauptsächlich die Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan gemessen. Die Absorption wird dann mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes in die Konzentration umgerechnet.

## 2.2.9 In-Gel-Verdau von ATG101

Eine SDS-PAGE von den zu untersuchenden ATG101- Varianten wurde durchgeführt, wobei zwei Spuren nebeneinander mit jeweils 40 µg Protein pro Spur beladen wurden. Sämtliche weiteren Schritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt, die dabei verwendeten Puffer sind in Tab. 7 aufgeführt. Hierzu wurde nach der Gelelektrophorese das Gel mittig zwischen den beiden Spuren durchgeschnitten, die eine Hälfte wurde zügig mit Coomassie gefärbt und zum anderen Gel dazugelegt. Auf dem anderen Gel wurde anschließend ein Gelfragment auf Höhe des gefärbten Proteins mit einer Skalpell-Klinge ausgeschnitten, in 1 mm große Fragmente zerkleinert und in ein sauberes 1.5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Fragmente wurden zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und mit 100 % Ethanol für 10 min entwässert, um eine vollständige Aufnahme von DTT-Lösung zu gewährleisten. Durch die darauf folgende Inkubation mit DTT-Lösung für 45 min wurden Thiolgruppen reduziert und sodann mit

Iodacetamid für 30 min durch Amidierung vor Oxidation geschützt. Die Gelfragmente wurden mit Spaltpuffer für 20 min gewaschen und danach erneut mit 100 % Ethanol für 10 min entwässert. Die letzten beiden Schritte des Waschens und Entwässerns wurden wiederholt und verbliebenes Ethanol wurde durch Vakuum-Zentrifugation bei 60 °C für 10 min abgedampft. Die Gelfragmente wurden dann mit Trypsin-Lösung überschichtet (ca. 40 µL) und über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Am darauf folgenden Morgen wurden dann 2 µl Essigsäure zum Ansatz zugegeben und kurz geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und verwahrt. Die Peptide wurden durch Inkubation mit 100 µl einmal Extraktions-Puffer A und jeweils zweimal Extraktions-Puffer B und C aus den Gelfragmenten gelöst. Sämtliche Überstände wurden mit dem Überstand nach der Spaltung zusammengeführt. Durch Vakuumzentrifugation bei 60 °C wurde die organische Phase abgedampft. Dies sollte bei 40 µl verbleibender Flüssigkeit gewährleistet sein.

## 2.2.10 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die Peptide aus dem In-Gel-Verdau wurden mit 1 % Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert, auf C18 tips (ZipTip, Millipore) entsalzt, in 10 µl 80 % Acetonitril (ACN), 0.1 % TFA eluiert und mit dem gleichen Volumen an 5 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamoyl Säure (CHCA) in 50 % ACN, 0.1 % TFA vermischt. Dieses Gemisch wurde auf eine Edelstahlplatte punktuell aufgebracht (Thermo Scientific) und mit einem linearen Ionenfallen Orbitrap-hybrid-Massenspektrometer (LTq-Orbitrap XL, Thermo Scientific), das mit einer MALDI-Quelle (Thermo Scientific) ausgestattet war, analysiert. Die Spektren wurden in einem m/z-Bereich 700 oder 900 bis 4000 bei einer Auflösung von 60000 Thomson (Th) aufgezeichnet.

Die erwarteten Peptidgrößenladungsverhältnisse, die nach einem tryptischen Verdau entstehen, wurden mit dem MS-Digest Internet-Interface (UCSF Mass Spectrometry Facility) ermittelt. Die erwarteten Peptidgrößen für Seleno-L-Methionin derivatisiertes ATG101 wurden durch manuellen Austausch des Schwefels gegen das häufigste Isotop von Selen (Massendifferenz +47.9444 Da) bestimmt. Peptide wurden als identifiziert aufgezeichnet, wenn eine Differenz zum theoretischen m/z von maximal 5 ppm vorlag.

## 2.2.11 Expression von nativem ATG101

Die Herstellung, d.h. die rekombinante Überexpression, von Proteinen erfolgte mit dem pET-Expressions-System (*plasmid for expression by T7 Phage polymerase*). Dabei wird ein Gen erst in mRNA umgeschrieben, sobald eine T7-Polymerase vorhanden ist und an den T7-Promotor bindet. Die T7-Polymerase kann entweder durch eine Infektion mit T7-Phagen in die Bakterienzellen eingebracht werden oder durch die Benutzung eines Bakterienstammes, der genomisch eine T7-Polymerase kodiert, die unter der Kontrolle des induzierbaren lacUV5-Promotors steht.

Das Vorhandensein von Lactose oder eines metabolisch nicht verwertbaren Derivates wie Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) führt zur Abdissoziation des Lactose-Repressor-Proteins vom lacUV5-Promotor und damit zur Expression der T7-Polymerase, die sodann an den T7-Promotor auf dem pET-Expressions-Plasmid bindet und die mRNA für eine Expression durch die Ribosomen transkribiert (Studier and Moffatt, 1986).

Für die Expression von nativ gefalteteM ATG101 wurden kompetente *E. coli* BL21(DE3) mit dem Expressionsplasmid pET11a-ATG101 transformiert, auf LB-Agar-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie verwendet, um eine 200-ml-Vorkultur in einem 1-l-Erlenmeyerkolben anzuimpfen. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet und zum Impfen von 6 l LB-Medium in einem Fermenter mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin benutzt. Die Kultur wurde bei 500 rpm und einer Luftzufuhr von 8 l/min bei 30 °C umgewälzt. Bei Erreichen einer OD600 von 0.3 wurde die Temperatur auf 15 °C reduziert. Bei einer OD600 von 0.6 und einer durchschnittlichen Temperatur der Kultur von 22 °C wurde die Expression von ATG101 für 24 h mit 50  $\mu$ M IPTG induziert. Nach der Ernte der Kultur wurden die Pellets bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

Die Expression von  $^{15}$ N-markiertem ATG101 fand in Minimalmedium (M9) statt. Hierfür wurde eine Kolonie in 200 ml M9-Medium mit 1 g/l  $^{14}$ NH<sub>3</sub>Cl überführt und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Diese Vorkultur wurde benutzt, um 8x500 ml M9-Medium mit 1 g/l  $^{14}$ NH<sub>3</sub>Cl in 2-l-Erlenmeyerkolben mit Schikane anzuimpfen. Nachdem die Kultur bei 130 rpm eine OD600 von 0.3 erreicht hatte, wurde sie geerntet und in 12x500 ml M9-Medium mit 1 g/l  $^{15}$ NH<sub>3</sub>Cl resuspendiert. Danach wurde sie nach Erreichen einer OD600 von 0.3 bei 30 °C auf 15 °C herabgekühlt, wobei die Expression bei einer OD600 von 0.6 mit 50  $\mu$ M IPTG induziert wurde. Die Kultur wurde dann für 48 h bei

130 Upm und 15 °C bebrütet. Nach der Ernte der Kultur wurden die Pellets bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

### **2.2.12 Reinigung von nativem ATG101**

Für die Reinigung von ATG101 wurden die in Tab. 9 aufgeführten Puffer verwendet. Aus der nativen Expression von ATG101 wurden 18 g Zellpaste in 300 ml Lyse-Puffer mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators resuspendiert und mit einem Mikrofluidisier-Gerät bei 25000 bar lysiert. Das Lysat wurde dann 1 h lang bei 50000 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wurde in sechs separaten Reinigungen a 50 ml bei 2 mL/min mit Hilfe einer ÄKTA-Anlage über einen Superloop auf eine mit Puffer A äquilibrierte 16/10 HP Q-Sepharose-Säule, einem Anionentauscher, gegeben. Im ersten Reinigungsschritt wurden erste Unreinheiten durch einen linearen Gradient von zwei Säulenvolumina auf 12,5 % Puffer B von der Matrix eluiert, das ATG101-Protein wurde dann innerhalb von 3 weiteren Säulenvolumina mit einem Gradienten auf 16.5 % Puffer B eluiert. Die Matrix wurde für die darauf folgenden Reinigungen mit 100 % Puffer B und anschließend 6 M Gdn-HCl gereinigt und mit Puffer A reäquilibriert. ATG101 enthaltende Fraktionen wurden gesammelt, auf bis zu 5 mg/ml konzentriert und einer Größenausschluss-Chromatographie auf einer Superdex 75 16/600 unterzogen. Die Säule wurde zuvor in Puffer A für Kristallisationsexperimente oder in NMR-Puffer äquilibriert.

### **2.2.13 Expression von ATG101 in Einschlusskörperchen**

Für die Expression von ATG101 Einschlusskörperchen wurde eine Kolonie von einer LB-Agar-Platte, wie für die Expression von nativem ATG101 beschrieben, zum Impfen von 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin genutzt. Nachdem die Vorkultur über Nacht bei 37 °C bei 130 Upm geschüttelt wurde, wurde sie zum Impfen von 8x 500 ml TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gebraucht. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD600 von 0.6 geschüttelt und die Expression von ATG101 wurde mit 1 mM IPTG

induziert. Nach vier Stunden wurde die Kultur bei 4000 g für 10 min geerntet und bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert.

Für das Markieren mit  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}$  oder Seleno-L-Methionin wurde ATG101 auch als Einschlusskörper exprimiert. Hierfür wurde eine Kolonie von einer LB-Agar-Platte, wie in der Expression von nativem ATG101 beschrieben, zum Impfen von 100 ml Minimal-Medium(M9) mit 100 µg/ml Ampicillin genutzt. Diese Vorkultur wurde benutzt, um 4x500 ml M9-Medium mit 1 g/l  $^{14}\text{NH}_3\text{Cl}$  in 2-l-Erlenmeyerkolben mit Schikane anzupflegen. Nachdem die Kultur bei 37 °C bei 130 Upm eine OD600 von 0.3 erreicht hatte, wurde sie geerntet und in 12x500 ml M9-Medium mit 1 g/l  $^{15}\text{NH}_3\text{Cl}$  und wahlweise 2 g/l  $^{13}\text{C}$ -D-Glucose resuspendiert. Danach wurde sie nach Erreichen einer OD600 von 0.6 bei 37 °C mit 1 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde dann für 24 h bei 130 Upm und 37 °C bebrütet. Nach der Ernte der Kultur wurden die Pellets bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

## 2.2.14 Reinigung von rückgefaltetem ATG101

Das Reinigen der ATG101 Einschlusskörperchen startete mit dem Resuspendieren eines Expressionspellets aus 2 l Medium in PBS mithilfe eines Dounce-Homogenisators. Die Zellen wurden mit einem Mikrofluidisier-Gerät lysiert und bei 10000 g für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Wasser mithilfe einer Ultraschallbehandlung resuspendiert und für 10 min bei 10000 g abzentrifugiert, dies wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die so vorgereinigten ATG101-Einschlusskörperchen wurden daraufhin in 5 ml Wasser resuspendiert. Durch Addition von 5 g Gdn-HCl, 10 mM βME und 50 mM Natriumphosphat-Puffer wurden die Einschlusskörperchen solubilisiert und nach 1h Zentrifugation bei 20000 g einer denaturierenden Größen-Ausschluss-Chromatographie auf einer Supedex200 16/600 Säule in denaturierendem Puffer D unterzogen. ATG101 enthaltende Fraktionen wurden gesammelt und auf eine Konzentration von 1 mg mit Puffer D eingestellt. Bei der Rückfaltung von ATG101 wurde das Protein in das zehnfache Volumen an eiskaltem Puffer A eingerührt und auf eine 16/10 HP Q-Sepharose-Säule gegeben. Das so rückgefaltete ATG101-Protein wurde durch einen Gradienten von 6 Säulenvolumina auf 25 % Puffer B eluiert. Fehl-

gefaltetes und aggregiertes ATG101 wurde von der Säule mit 6 M Gdn-HCl eluiert und nach Umpuffern auf einer Desalting 26/10 Säule in Puffer C wurde das Protein einer erneuten Rückfaltung zugeführt. Nach dem Eluieren des rückgefalteten ATG101 wurden die entsprechenden Fraktionen gesammelt und wie auch das nativ gefaltete ATG101 über eine Superdex 75 16/600 weiter gereinigt. Die Säule wurde zuvor in Puffer A für Kristallisationsexperimente oder in NMR-Puffer äquilibriert.

### **2.2.15 Expression und Reinigung von SeMet-ATG101**

Für die Markierung mit Selen wurde der Methionin auxotrophe Stamm B834(DE3) benutzt. Dabei wurde L-Methionin mit 50 mg/l bis zur Expression von ATG101 dem M9-Medium zugesetzt. Für die Expression von Seleno-L-Methionin derivatisiertem ATG101 wurden die Zellen final in M9-Medium mit 50 mg/l Seleno-L-Methionin und wahlweise auch mit 1 g/l  $^{15}\text{NH}_3\text{Cl}$  für die Überprüfung des Faltungszustandes mittels NMR resuspendiert. Danach wurde Expression und Reinigung von dem markierten Varianten von ATG101 wie für das unmarkierte Protein durchgeführt.

### **2.2.16 Expression und Reinigung von GABARAP**

Expression und Reinigung von GABARAP wurde analog zu (Coyle et al., 2002) durchgeführt. Hierzu wurde der Expressionsstamm BL21(DE3) mit pET11a GABARAP transformiert, auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde benutzt, um 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin anzupflanzen. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und am darauf folgenden Tag zum Impfen von 4L LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin benutzt. Die Kultur wurde auf 8x2 Liter-Erlenmeyerkolben mit Schikane zu je 500 ml aliquotiert und auf eine OD600 von 0.6 bei 130 Upm und 37 °C bebrütet. Die Expression von GABARAP wurde mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 20 °C durchgeführt. Die Zellen wurden bei 5000 g für 20 min abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwertung bei -20 °C gelagert. Für die Reinigung von GABARAP wurde die in Tab. 10

aufgeführten Puffer verwendet. Hierzu wurde das Pellet der GABARAP Expression pro Gramm Nassgewicht in 5 ml eiskaltem Lyse-Puffer in einem Dounce-Homogenisator resuspendiert, bei 25000 bar mit einem Mikrofluidisiergerät lysiert und bei 50000 g für eine Stunde und 4 °C abzentrifugiert. Pro Reinigungszyklus wurden 15 ml des Überstandes auf eine SP-Sepharose-HP aufgetragen. GABARAP wurde dann mit einem Gradient auf 100 % Puffer B über 7 Säulenvolumen (140 mL) eluiert. Die Fraktionen des Hauptpeaks bei ca. 30 %-35 % Puffer B wurden gesammelt und auf eine Superdex75-16/600-Säule aufgetragen. Diese Säule wurde zuvor in Puffer A äquilibriert. Die Fraktionen im Hauptpeak wurden abermals gesammelt und gegen Wasser dialysiert. Nach einer vollständigen Lyophilisierung wurde GABARAP in dem ATG101 NMR Puffer Tab. 9 aufgenommen.

## 2.2.17 CD-Spektroskopie

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie nutzt die optische Aktivität chiraler Moleküle. Diese optische Aktivität äußert sich z.B. darin dass die Schwingungsebene von polarisiertem Licht, abhängig vom verwendeten Enantiomer, nach links oder rechts gedreht wird. In der Umgebung von Absorptionsbanden wird ansonsten links oder rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert, wodurch linear polarisiertes Licht zu elliptisch polarisiertem Licht wird. Abhängig von der Zugehörigkeit einzelner Aminosäuren zu Sekundärstrukturelementen wie  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt verändert sich die Wellenlängenabhängigkeit der Elliptizität, des CD-Spektrum. Durch Abgleich mit bekannten Strukturen lässt sich so der Gehalt an Sekundärstrukturelementen bestimmen. Die hier dargestellten Spektren wurden auf einem JASCO-1100-Spektrometer aufgezeichnet, mit der Herstellersoftware (Jasco Spektra Manager V 2.10.05 B8) verarbeitet und dem Internettool DICHROWEB (Whitmore and Wallace, 2008, Whitmore and Wallace, 2004) analysiert. Das Protein wurde für Kurzzeitmessungen bei 2 mg/ml in einer 0.1-mm-Messzelle in 150 mM Na-Phosphat pH 7.0, 2 mM Tri-carboxy-ethyl-phosphin (TCEP) bei 20 °C untersucht. Die Langzeitmessung erfolgte in einer geschlossenen 5-mm-Messzelle bei 0.1 mg/ml und 30 °C.

## 2.2.18 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung misst die Fluktuation der gestreuten Lichtintensität mithilfe eines schnellen Photonendetektors und eines nachgeschalteten Autokorrelators. Diese Fluktuationen rühren von der konstruktiven und destruktiven Interferenz einzelner an Molekülen durch Rayleigh-Streuung gestreuter monochromatischer Wellen her. Damit sind die Fluktuationen abhängig vom Diffusionskoeffizienten der gelösten Moleküle. Diese steht unmittelbar in Bezug zur Molekülgröße und Viskosität der Lösung. Wenn die Viskosität der Lösung bekannt ist, lässt sich der hydrodynamische Radius über die Stokes-Einstein Gleichung errechnen. ATG101 wurde in einem Spectrosizer 300 DLS-Analysator von *molekular dimensions* in einer Küvette mit einem 90° Fenster gemessen. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit der Herstellersoftware.

## 2.2.19 Expression und Reinigung von ATG13

Für die Charakterisierung des Proteinkomplexes aus ATG13 und ATG101 (Hosokawa et al., 2009, Mercer et al., 2009) sollte ATG13 exprimiert, gereinigt und kristallisiert werden. Hierfür wurde der Vektor pET15b-ATG13 freundlicherweise von Björn Storck bereitgestellt. Dieser Vektor wurde in kompetente BL21(DE3) pRARE2 transformiert. Die Transformation wurde auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am darauf folgenden Tag wurde eine 100 ml Vorkultur mit 100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium geimpft und abermals über Nacht bei 37 °C bei 130 UpM geschüttelt. Diese Vorkultur wurde zum Impfen von 12x0.5 l mit je 15 ml Vorkultur / l LB-Medium benutzt. Dies entsprach einer OD600 von 0.05-0.1. Nachdem die Kultur bei 30 °C und 130 UpM auf eine OD600 von 0.4 anwuchs, wurde die Temperatur auf 15 °C reduziert. Die Expression von ATG13 wurde in der Abkühlphase mit 50 µM IPTG bei ca. 22 °C und einer OD600 von 0.7 über Nacht induziert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen bei 4000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

Für die Reinigung von ATG13 wurden die Zellen in 5 ml ATG13-Lyse-Puffer pro g Zellpaste resuspendiert und bei 25000 bar in einem Mikrofluidisier-Gerät lysiert. Nach einer Zentrifugation bei 50000 g für 1 h bei 4 °C wurde der lösliche Überstand abge-

nommen und erneut bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Pellets wurden verworfen und der lösliche Überstand wurde nacheinander durch einen 0.45 µm und einen 0.22 µm PVDF-Filter passiert und einer immobilisierten-Metall-Affinitätschromatographie auf einer NiNTA-Agarose-Matrix zugeführt (Porath et al., 1975). Auf dieser Matrix sind Nickelionen durch Nitrilo-tri-essigsäure (NTA) immobilisiert. Die Nickelionen werden von Histidinen auf einer Proteinoberfläche komplexiert. Damit die Bindung verstärkt wird, werden Proteine mit einem Poly-Histidin-Tag fusioniert. ATG13 wurde daher in einen pET15b-Vektor mit einem N-terminalen 6 x Histidin und einer Thrombin Verdau-Seite inkloniert.

Die Nickel-NTA Matrix war zuvor mit ATG13-Wasch-Puffer A äquilibriert worden. Die Matrix wurde darauf folgend mit den Puffer B und C gewaschen. ATG13 wurde mit ATG13-Elutionspuffer eluiert. Fraktionen, die ATG13 enthielten, wurden mit einer mit Coomasie gefärbten SDS-PAGE identifiziert. Diese Fraktionen wurden dann einer Größenausschluss-Chromatographie auf einer Superdex200-16/600-Säule unterzogen, die zuvor in ATG101 Reinigungspuffer A äquilibriert worden war.

## 2.2.20 NMR-Spektroskopie von ATG101

Die NMR-Spektren wurden an Bruker Spektrometern mit 14.1 T und an Varian VNMRS-NMR Spektrometern mit 18.8 T und 21.2 T aufgenommen. Dabei wurden bei den Bruker-Spektrometern die 5 mm CPTCI  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$  Z-GRD bzw. CPQCI  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$  Z-GRD Probenköpfe und an den Varian Spektrometern cryogen gekühlte 5 mm Z-PFG  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Probenköpfe eingesetzt. ATG101 wurde  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  für 3D-Experimente isotopisch markiert und auf durchschnittlich 700 µM in ATG101-NMR-Puffer (Tab. 9) konzentriert. Nach Zugabe von 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  wurde das Protein in ein 5 mM Shigemi-Röhrchen überführt. NMR-Spektren für die jeweiligen Experimente wurden entsprechend in Tab. 16 aufgenommen und prozessiert.

Tab. 16: Datenacquisitions- und -prozessierungsparameter

ATG101	sw <sub>1</sub>	t <sub>1</sub>	sw <sub>2</sub>	t <sub>2</sub>	sw <sub>3</sub>	t <sub>3</sub>	nt	d1	mix	<sup>13</sup> C	<sup>15</sup> N	ω <sub>1</sub>	ω <sub>2</sub>	ω <sub>2</sub>
	[ppm]	[Pkt.]	[ppm]	[Pkt.]	[ppm]	[Pkt.]		[s]	[ns]	[ppm]	[ppm]	[Pkt]	[Pkt]	[Pkt]
[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] BT	6.005	982	27.414	150			32	0.2			118.94	4096	1024	
[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C] BT-HNCA	6.005	983	27.414	118	34.024	100	16	0.35		55.657	119.285	4096	512	512
[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C] BT-HNCO	5.741	511	35.996	80	14.997	100	16	0.2		176.16	118.03	2048	512	512
[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C] BT-HNcoCA	6.009	511	35.996	35	29.997	67	64	0.2		56.69	118.036	2048	256	256
[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C] BT-HNcaCO	5.723	509	36.004	38	19.994	88	64	0.2		41.686	118.032	2048	512	512
[ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N] NOESY-HSQC	6.005	1197	12.335	146	27.414	38	8	1.2	0.12		119.27	2048	512	512

sw<sub>1,3</sub>: aufgenommene spektrale Weite in ppm in der jeweiligen Dimension, t<sub>1,3</sub>: aufgenommene komplexe Punkte in der jeweiligen Dimension, nt: Anzahl der Wiederholungsexperimente je Zeitinkrement, d1: Wartezeit in Sekunden zwischen zwei Einzelexperimenten, mix: NOESY-Mischzeit in Millisekunden. <sup>15</sup>N-, <sup>13</sup>C- : <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-Trägerfrequenz in ppm, ω<sub>1,3</sub> : Anzahl der realen Punkte in der jeweiligen Dimension nach Fourier-Transformation.

Das zweidimensionale [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-Korrelationsspektrum zählt zu den wichtigsten Standard NMR-Experimenten, um von einem Protein ein zweidimensionales Spektrum zu erhalten. Die zwei Dimensionen stellen dabei die chemischen Verschiebungen der <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-Kerne dar, die in direktem Zusammenhang zur chemischen Umgebung der jeweiligen Aminosäure als auch deren Bindungswinkel und Länge zu anderen Aminosäuren stehen. Hierbei wird die Aufnahme invers durchgeführt, es werden durch komplexe Pulsfolgen bestehend aus 90° und 180° Impulsen im <sup>15</sup>N-Kern Kohärenzen erzeugt, die auf das Proton übertragen werden. Die Resonanz des Protons wird dann gemessen und mit den Resonanzen des Amid-Stickstoffs korreliert. (Norwood et al., 1989). In Standard *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC)-Experimenten führt die J-Kopplung dazu, dass die einzelnen Signale als Multiplets mit unterschiedlichen Signalbreiten erscheinen. Bei kleinen, globulären, und intrinsisch geordneten Proteinen stellt dies keine besonderen Schwierigkeiten an die Interpretation der Signale dar.

Mit zunehmender Größe der untersuchten Proteine führt aufgrund von längeren Rotations-Korrelations-Zeiten und damit kürzeren transversalen Relaxionszeiten eine Linien-Verbreiterung und damit ein Verlust von Auflösung statt. Diese kürzeren transversalen Relaxionszeiten werden bei größeren Molekülen durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung und chemischer Verschiebungs-Anisotropie stärker bestimmt. Um dem entgegenzuwirken, wird durch gezieltes Einstrahlen bestimmter Radiofrequenzen eine konstruktive Interferenz in der Dipol-Dipol-Kopplung und Chemischer Verschiebungs-Anisotropie bewirkt, was zu einzelnen scharfen Linien und höherer Sensitivität führt. Diese Technik wird auch als Transversale relaxions optimierte Spektroskopie bezeichnet (TROSY), die mit deuterierten Proteinen am besten funktioniert,

aber auch für nicht deuterierte Proteine eine Steigerung der Auflösung bewirkt (Pervushin et al., 1997). Eine weitere Verbesserung hinsichtlich zeiteffizienter drei dimensionaler-Datenaufnahme wird mit der BEST-TROSY-(BT-) Technik erzielt (Solyom et al., 2013). Sämtliche hier aufgenommenen TROSY-Spektren (bis auf das  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC) basieren auf der BEST-TROSY-Technik.

Für eine Zuordnung der Resonanzen die im 2D- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ - BT-Korrelationsspektrum zu sehen sind, ist die Identifikation der dazugehörenden Aminosäuren notwendig. Dies geschah hier durch vier Experimente (BT-HNCO, BT-HNcaCO, BT-HNCA, BT-HNcoCA), die eine Korrelation über die chemische Bindung ermöglichen und einem  $^{15}\text{N}$ -NOESY-Experiment, das eine Korrelation von Resonanzen im Raum ermöglicht. Bei einem 3D- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -BT-HNCO wird Amidstickstoff und -Proton in Korrelation mit dem Carbonyl-Kohlenstoff der Vorgänger-Aminosäure via J-Kopplung gesetzt (Loria et al., 1999).

Im 3D- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -BT-HNcaCO wird die Magnetisierung vom Amidproton über das Amidstickstoff an die  $\alpha$ -Kohlenstoffe und dann auf das benachbarte Carbonyl-Kohlenstoff zur Anregung und den gleichen Weg zurück zur Detektion übertragen. Aufgrund der stärkeren Kopplung von  $^{15}\text{N}$  zum  $^{13}\text{C}_{\alpha i}$  als zum  $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$  erscheinen die Signale des eigenen Carbonyl-Kohlenstoffs stärker als die der Vorgänger-Aminosäure (Loria et al., 1999).

Bei dem 3D- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -BT-HNCA wird durch das Übertragen der Magnetisierung vom Amidproton über den Stickstoff an die  $\alpha$ -Kohlenstoffe eine Korrelation zwischen Amidproton und Amid an die  $\alpha$ -Kohlenstoffe der eigenen und Vorgänger-Aminosäure geschaffen. Da die Kopplung auch hier zum eigenen  $^{13}\text{C}_{\alpha i}$  stärker als die zum  $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$  ist, ist das Signal des eigenen  $^{13}\text{C}_{\alpha i}$  höher als die des Vorgängers (Salzmann et al., 1999).

Im 3D- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -BT-HNcoCA wird die Magnetisierung vom Amidproton über den Amidstickstoff auf das Carbonyl-Kohlenstoff  $^{13}\text{CO}_{i-1}$  und dann auf das benachbarte  $\alpha$ -Kohlenstoff  $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$  übertragen. Es wird damit eine Korrelation zwischen  $^1\text{H}_i$ ,  $^{15}\text{N}_i$  und  $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$  sichtbar (Salzmann et al., 1999).

Bei dem  $^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC wird die Magnetisierung aller Protonen auf räumlich benachbarte (i. d. R. 6 Å) Protonen, die kovalent an  $^{15}\text{N}$  Kern gebunden sind, und zurück übertragen. Die Intensität der Linien steht damit in direktem Bezug zur Entfernung benachbarter Protonen, was bei einer vollständigen Zuweisung der Resonanzen zu den

einzelnen Atomen des Proteins zur 3D-Struktur-Berechnung herangezogen werden kann, aber auch der Identifikation benachbarter Amidprotonen dient.

### 2.2.21 Kristallisation von ATG101

Bei der Kristallisation eines Proteins nimmt es, ausgehen von einer übersättigten Lösung, einen hochgeordneten Zustand an. Ein alternativ weniger geordneter Zustand kann ein Präzipitat darstellen, worin das Protein häufig partiell entfaltet ist. Die Kristallisation eines Proteins ist deshalb abhängig von diversen Parametern. Diese Parameter müssen zum Einen regelmäßige Protein-Protein-Kontakte begünstigen, und gleichzeitig dem Protein das Lösungsmittel entziehen.

Der folgende Überblick über die bestimmenden Parameter einer Kristallisation zeigt, dass eine Aufzählung dieser endlos lang gestaltet werden kann: Stabilität und Flexibilität des Proteins, Proteinkonzentration, Lösungsmittel des Proteins und Präzipitationsmittel und -konzentration, Inkubationstemperatur, pH-Wert, Additive wie Salze, Zucker, Alkohole oder Interaktionspartner, die Wahl der eingesetzten Volumina von Protein, Präzipitationsmittel, des Inkubationsraums und der Kristallisationsmethode (Dampfdiffusion oder Dialyse). Um Startbedingungen zu finden, wurden kommerziell hergestellte Pufferraster benutzt, die bereits erfolgreich bei der Kristallisation von Proteinen waren (z.B. Tab. 6). Hierbei wird das Protein auf eine Konzentration von 1-10 mg/ml gebracht. Im Kristallisationsverfahren der Dampfdiffusion wird das Protein mit der Reservoir bzw. Kristallisationslösung vermischt und in einem gasdichten Behälter in Gaskontakt zur Kristallisationslösung gebracht. Dabei wird abhängig von Zeit, Temperatur und Kristallisationslösung durch Austausch von Wasser oder anderen flüchtigen Bestandteilen ein Gleichgewicht zwischen Kristallisationsansatz und dem Reservoir, welches die Kristallisationslösung enthält, eingestellt. Dabei durchläuft das System im Allgemeinen mehrere Phasen. Zunächst ist das Protein in dem Gemisch aus Kristallisationslösung und Proteinlösungsmittel gelöst. Bei Inkubation gleicht sich die Konzentration aller Bestandteile des Kristallisationstropfens in aller Regel den Konzentrationen der Kristallisationslösung im Reservoir an. Dabei steigen Protein- und Präzipitationmittelkonzentration an und das System gelangt in eine energiehöhere, metastabile Phase. Steigen die Konzentrationen noch weiter, gelangt der Ansatz in eine Nukleations-

phase. Hier entstehen erstmalig geordnete Strukturen, die einen energieärmeren Zustand, einen Nukleationskeim, ermöglichen. Dadurch senkt sich die Konzentration des Proteins und im weiteren Verlauf der Inkubation kann das System wieder in die metastabile Phase gelangen, in der der Kristall weiter wächst. Steigt die Übersättigung zu schnell an, kann das Protein in eine ungeordnete Präzipitationsphase gelangen und kann damit für die Kristallisation nicht mehr zugänglich sein. Manchmal kann die Kristallisationslösung aber auch die Löslichkeit des Proteins erhöhen, wodurch es dann nicht zu einer Kristallisation des Proteins kommt.

Die ersten Versuche, ATG101 zu kristallisieren, wurden mit zufälligen Pufferrastern, die von kommerziellen Herstellern erworben wurden, durchgeführt. Da zu diesem Zeitpunkt ATG101 nur limitiert zur Verfügung stand, wurde darauf verzichtet, verschiedene Konzentrationen zu testen, weshalb eine für Kristallisationsversuche mittlere Konzentration von ca. 5 mg/ml gewählt wurde. Dabei wurden 0.4 µl der Proteinlösung mit 0.4 µl Kristallisationslösung vermischt und auf einer 96-Loch-Greiner-Kristallisationsplatte für das *Sitting-drop*-Verfahren mit einem TECAN-Kristallisationsroboter für eine verbesserte Reproduzierbarkeit aufpipettiert. Jedes Loch enthielt zusätzlich 70 µl der Kristallisationslösung im Reservoir. Die Kristallisationslösungen sind in Tab. 6 aufgeführt. Die Platten wurden luftdicht mit UV-transparentem Klebefilm versiegelt und bei 20 °C bis zum Erscheinen von Kristallen inkubiert. Die Platten wurden mit einem Auflichtmikroskop auf Kristallbefund, in sich jeweils verdoppelnden zeitlichen Abständen, untersucht. Dafür wurde mit dem Absuchen der Platten nach Kristallen schon nach einem Tag Inkubationszeit begonnen: Hier erschienen bereits die ersten Kristalle im *Low-Ionic-Strength-Kit* (Sigma) an Position 26 (12 % PEG3350, 50 mM BisTris pH 6.5). Diese Bedingung wurde gewählt, um eine Optimierung mit feineren Abstufungen von pH-Werten, und Konzentrationen von Präzipitationsmittel und Zusätzen durchzuführen. Diese Optimierungen wurden auf 24-Loch-Zellkulturschalen durchgeführt. Dabei wurden 700 µl an Kristallisationslösung in die Zellkulturschale und 1.5 µl auf ein silikonisiertes 18-mm-Deckglaschen aufgebracht. Zur Kristallisationslösung wurden dann 1.5 µl ATG101 in einer Konzentration von 1-5 mg/ml in 0.2 mg/ml Abständen hinzupipetiert. Der Rand jedes Loches der Zellkulturschale war mit Silikonfett bestrichen, sodass sich beim Verschließen des Loches mit dem Deckglaschen ein „*hanging drop*“-Setup ergab. Ferner wurden verschiedene Puffer für den pH-Bereich von 6.0-7.0 in Abständen von 0.2 pH-Einheiten, Präzipitationsmittel (PEG400 – PEG20000) Konzentrationen von 1-12 % in 0.5 % Schritten

getestet. Diese Optimierungen wurden konsekutiv durchgeführt. Die Kristallisation von Seleno-L-Methionin-derivatisiertem ATG101 wurde angelehnt an die Initialkristallisationsbedingung von nicht-derivatisiertem ATG101 durchgeführt.

Lichtmikroskopisch einkristallin erscheinende Kristalle wurden zum Verbessern der Cryokompatibilität unterschiedlich lang in verschiedenen Frostschutzpuffern inkubiert, mithilfe einer auf einem Metallstift montierten Cryoschleife aus der Lösung gefischt und bei 100 K in einem Stickstoffstrom schockgefroren. Die Cryoschleifen mit den Kristallen wurden zum Schutz vor mechanischen Schäden mit einem Plastikhütchen, in dem Magnete eingelassen waren, versehen und bis zur Datensammlung in flüssigem Stickstoff bei 77 K aufbewahrt.

## 2.2.22 Datensammlung, Phasen- und Strukturbestimmung

Die Kristalle aus Seleno-L-Methionin-derivatisiertem ATG101 und underivatisiertem ATG101 wurden an den Beamlines ID29, ID23-1 und ID23-2 an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) untersucht. Dabei wurden Datensätze auf einem Flächendetektor mithilfe eines Goniometers in der Rotationstechnik aufgezeichnet. Die Entstehung des Diffraktionsbildes lässt sich erklären, indem man annimmt, dass die Beugungssignale ein Abbild der Schnittmenge aus der Ewald-Kugel (Radius  $\frac{1}{\lambda}$ ) und dem reziproken Gitter darstellen. Durch Drehen des Kristalls rotiert das reziproke Gitter mit und es kommt zur Abbildung anderer Punkte. Die Datensätze wurden mit XDS (Kabsch, 2010a) prozessiert und mit dem *UCLA MBI Diffraction Anisotropy Server* (Strong et al., 2006) anisotrop beschnitten.

Das Problem der Phasenbestimmung ist in der Kristallographie fundamental.

In dem von Bragg eingeführten Modell wird monochromatische Röntgenstrahlung innerhalb von Kristallen an einzelnen Gitterebenen reflektiert. Diesem Effekt liegt physikalisch die elastische Streuung an Elektronen, die Thomson-Streuung, zugrunde. Dabei strahlen alle Atome gleichzeitig die eingestrahlte Welle ab. Auf dem Detektor wird dann die Intensität der reflektierten Wellen gemessen. Die Intensität steht dabei in Zusammenhang mit der Anzahl der Elektronen, die auf einer Gitterebenschar liegen, und ist proportional zum Quadrat der Amplitude  $|F_{hkl}|$  der Welle.

$$\text{Formel 1 : } \rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Nach Formel 1 ergibt sich die Elektronendichte an einem Punkt (xyz) in der Einheitszelle als Fourier-Sumation über alle Strukturaktoren mit den Amplituden  $|F_{hkl}|$  und den Phasenwinkeln  $\alpha_{hkl}$ . Dadurch, dass nur die Amplituden gemessen werden können, geht die Information über die Phase verloren. Das ist das Phasenproblem. Um die Phaseninformation wieder herzustellen, gibt es mehrere Möglichkeiten, (1) mittels Direktmethoden, (2) durch molekularen Ersatz oder (3) experimentell durch isomorphen Ersatz bzw. (4) Ausnutzung der anomale Streuung. Die Direktmethode funktioniert nur bis zu einer Molekülgröße von rund 100 Atomen. Molekularer Ersatz benötigt ein Vergleichs- oder Suchmodell mit mindestens 25 % Aminosäureidentität und einer maximalen durchschnittlichen Abweichung der Atompositionen von 2 Å. Isomorpher Ersatz benötigt eine Inkorporation von Schwermetallatomen an spezifischen Positionen.

Zur Phasenbestimmung mittels molekularen Ersatzes wurden Modelle mit Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009), RaptorX (Kallberg et al., 2012) und LOMETS (Wu and Zhang, 2007) generiert. Diese Modelle wurden für molekularen Ersatz mit MOLREP aus dem CCP4-Paket (Winn et al., 2011) eingesetzt. Keines der Modelle lieferte eine brauchbare Strukturlösung. Kristalle mit spezifisch inkorporierten Schwermetallatomen konnten nicht generiert werden, deren Diffraktionsqualität war allerdings stark eingeschränkt.

Im Falle anomaler Streuung kommt zu den atomaren Streufaktoren eine weitere wellenlängenabhängige Komponente. Diese Komponente beruht auf der absorptiven Eigenschaft von gebundenen Elektronen nahe ihrer Absorptionswellenlänge, was bei einem Teil der abgestrahlten Wellenpakete eine Phasenverschiebung hervorruft. Der atomare Streufaktor besteht somit aus drei Komponenten, aus dem Braggwinkel-abhängigen Streufaktorterm ( $f_0$ ), und den Wellenlängen-abhängigen Streufaktortermen aus dem dispersiven Teil ( $f'$ ) und dem um 90° verschobenen absorptiven Teil ( $f''$ ) aus Formel 2 (Hendrickson, 1991).

$$\text{Formel 2 : } f_{(S,\lambda)} = f_{(S)}^0 + f'_{(\lambda)} + if''_{(\lambda)}$$

Im Argand-Diagramm wird der anomale Streuteil  $if''$  an der imaginären Achse gespiegelt und der „normale“ Streuteil  $f^0 + f'$  an der realen Achse. Durch die Summe der Faktoren wird das Friedel'sche Gesetz ( $|F_{hkl}| = |F_{-h-k-l}|$ ) durchbrochen und es gilt  $|F_{hkl}| \neq |F_{-h-k-l}|$ . Damit ist auch, die Intensität der Bijvoet-Paare nicht mehr gleich. Aus den anomalen Differenzen lassen sich, z.B. mittels Patterson-Methoden, die Positionen der anomal streuenden Atome bestimmen. Damit sind die Strukturfaktoren dieser Atome zu berechnen (mit Amplitude und Phase). Aus diesen Strukturfaktoren und den gemessenen Amplituden der beiden Friedel-Partner lassen sich erste Phasenwinkel für alle reflexe bestimmen. Wird dabei nur eine Wellenlänge verwendet, spricht man von SAD (*single wavelength anomalous dispersion*). Davon wurde in der vorliegenden Arbeit gebrauch gemacht. Für die Röntgenstruktur Analyse von Proteinen kann der Schwefel in der Aminosäure Methionin gegen Selen ausgetauscht werden, wodurch dessen K-Absorptionskante bei 0.9795 Å günstig in dem Emissionsbereichs eines Synchrotrons liegt. Zur Lösung der Phasenproblematik mittels SAD wurde das Programm phenix.autosol aus dem Phenix-Paket (Adams et al., 2010) verwendet. Eine Verbesserung der Phasen wurde durch Dichtemodifikation und iterativen Aufbau des Modells durchgeführt. Die finale Verfeinerung wurde iterativ durch manuellen Umbau im Realraum in COOT(CCP4) und Verfeinerung im reziproken Raum mit phenix.refine durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Ziel der Versuche war es, nativ gefaltetes ATG101 zu exprimieren, aufzureinigen und mit biophysikalischen Methoden zu charakterisieren. Für die Strukturbestimmung mittels Röntgendiffraktion musste ATG101 zudem kristallisiert werden. Hierfür stand der Expressionsvektor pET11a-ATG101 zur Verfügung.

Die Interaktion von ATG101 mit seinem Hauptinteraktionspartner ATG13 und dem Autophagie-assoziierten Protein GABARAP sollte mittels SPR und BLI gemessen werden. Für diese Versuche wurde freundlicherweise pET15b-ATG13 von Björn Stork, (HHU Düsseldorf), und pET11a-GABARAP von Christina Möller, (ICS-6 FZ Juelich), bereitgestellt. Aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen der einzelnen Proteine mit der Matrix lieferten SPR und BLI keine brauchbaren Daten. Daher sollten zumindest die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren von ATG101 gefunden werden. Hierfür wurde ATG101 mit NMR-Methoden untersucht und dabei sein *backbone assignment* durchgeführt. Die erste strukturelle Charakterisierung von ATG101 wurde mittels einer Sekundärstrukturvorhersage mittels Jpred und psipred durchgeführt (Abb.2). und zeigt deutliche Ähnlichkeiten zu der gelösten Struktur von ATG101

```

ATG101      MNCRSEVLEVSVEGRQVEEAMLAVLHTVLLHRSTGKLFHYKKEGTYSIGTVGTQDVCDFI
Jpred       -----EEEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHH---E---EEE---EEEEEE---
Psipred     -----EEEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHH---EE-----
Struktur    ---EEEEEEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHH---EE---EEE-HHH-EEE---EEEE---

ATG101      DFTYVRVSSEELDRALRKVVGEFKDALRNSGGDGLGQMSLEFYQKKSRWPFSDCIPWE
Jpred       --EEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEEEEEE---EEEE
Psipred     EEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEEEE---EE
Struktur    --EEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEEEEEE---EEEE

ATG101      VWTVKVHVVALATEQERQICREKVGEKLCEKIINIVEVMNRHEYLPKMPTQSEVDNVFDT
Jpred       EEEEEEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---E
Psipred     EEEEEEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---
Struktur    EEEEEEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH---HHHHH---

ATG101      GLRDVQPYLYKISFQITDALGTSVTTTMRRLIKDTLAL
Jpred       E-----EEEE---HHHHHHHHHHHH---
Psipred     -----EEEE---HHHHHHHHHHHH---
Struktur    -----EE---EEEEEE---EEEEEE-----

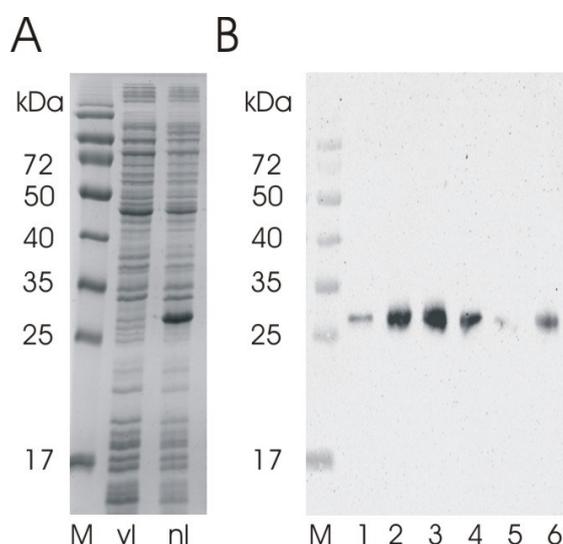
```

**Abb. 2: Sekundärstruktur-Vorhersagen**

Die Sekundärstruktur wurde mit Jpred und PsiPred vorhergesagt und in Bezug zur experimentell bestimmten ATG101-Sekundärstruktur gesetzt.

### 3.1 Expression und Reinigung von nativem ATG101

Das Protein ATG101 wurde entsprechend 2.2.11 exprimiert. Ein Protein einer Größe zwischen 25 kDa und 35 kDa wurde von *E.coli* BL21(DE3) exprimiert (Abb. 3A) Nativ produziertes ATG101 wurde bei Expression mit reduzierter Temperatur und einer Induktion mit 1 mM IPTG in geringer Menge mittels Western-Blot nachgewiesen. Die Expression wurde in 2 L-Kolben mit 500 ml LB-Medium bei 14 °C optimiert, unter Variation der Induktionsstärke zwischen basaler Expression und 1 mM IPTG (Abb. 3B). Hierbei erwies sich eine Expression mit einer Induktionsstärke von 50  $\mu$ M IPTG über Nacht als optimal.

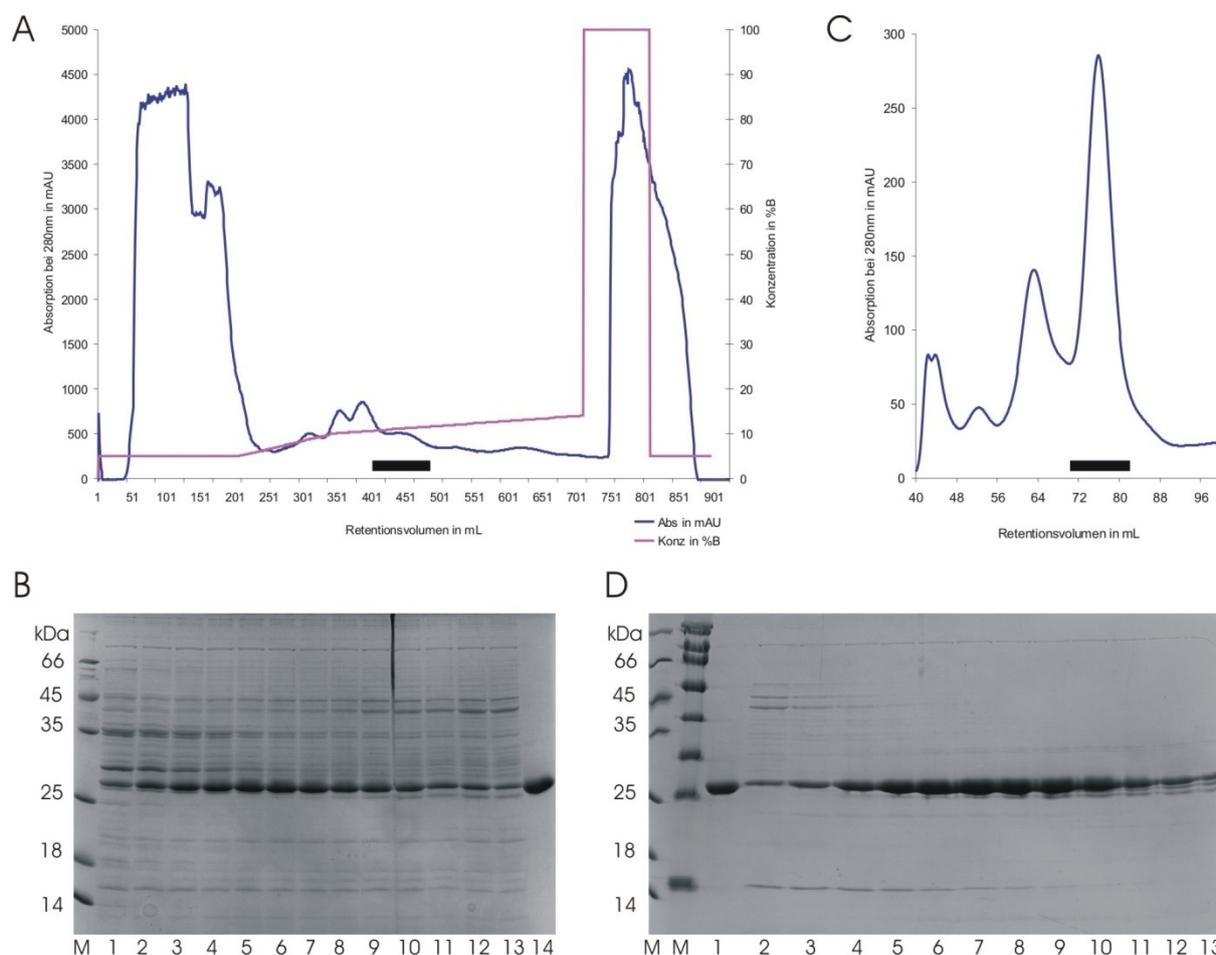


**Abb. 3: Überexpression von nativ exprimiertem ATG101**

- A) Induktion der Expression von ATG101 (Coomassiefärbung) : M: Proteinstandard, vl: Expression vor Induktion, nl: Expression nach Induktion mit 1 mM IPTG
- B) Anti-ATG101-Western-Blot von Lysatüberständen aus einer Über-Nacht-Expression (14 °C) : M: Proteinstandard, 1: 0  $\mu$ M, 2: 25  $\mu$ M, 3: 50  $\mu$ M, 4: 100  $\mu$ M, 5: 1 mM IPTG, 6: 1 mM IPTG Gesamtlysat 1:100 verdünnt

Für die native Expression von ATG101 im präparativen Maßstab wurden die Bakterien in einem 10 l Fermenter mit 6 l LB-Medium bei 30 °C auf eine OD600 von 0.35 bebrütet. Beim Abkühlen der Expression auf 14 °C wurde die Expression nach zwei bis drei Stunden (d.h. bei ca. 22 °C und einer OD600 von 0.7) mit 50  $\mu$ M IPTG induziert. Durch diese Optimierung wurden nach dem ersten Reinigungsschritt einer Ionenaustauschchromatographie (Abb. 4A) aus 6 Litern Medium 8 mg ca. 40 % reines ATG101 als Pool aus den Fraktionen 4-10 extrahiert (Abb. 4B). Nach einem weiteren Reini-

gungsschritt, einer Größenausschluss-Chromatographie (Abb. 4C) wurde die Reinheit von ATG101 als Pool aus den Fraktionen 5-9 auf ca. 80 % gesteigert (Abb. 4D). Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit Imagelab ermittelt, wobei die Reinheit durch das Verhältnis der Intensität der ATG101 Banden zur Gesamtintensität aller Banden berechnet wurde. Vorversuche haben gezeigt, dass die Reinheit nicht durch hydrophobe Interaktionchromatographie weiter gesteigert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

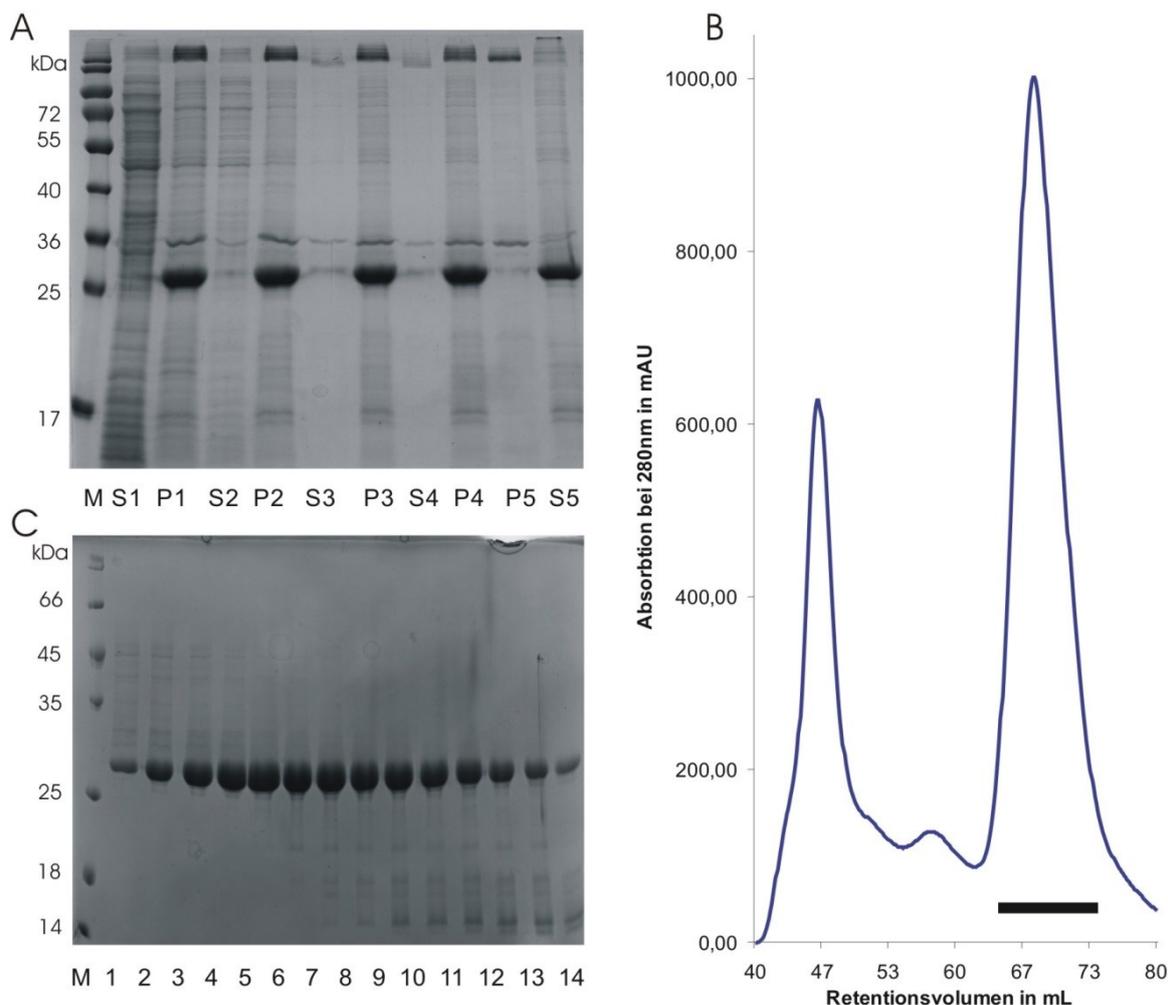


**Abb. 4: Reinigung des nativ exprimierten ATG101**

- A) Ionenaustauschchromatographie mit Elutionspeaks (Balken) von ATG101
- B) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel des Elutionspeaks aus A
- C) Größenausschluss-Chromatographie (Superdex75 16/600) des Elutionspeaks (Balken) aus A
- D) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel des Elutionspeaks (Balken) aus C

### 3.2 Expression und Reinigung von rückgefaltetem ATG101

Die Expression von ATG101 Einschlusskörpern wurde bei 37 °C bei einer OD600 von 0.7 mit einer Induktionsstärke von 1 mM IPTG für 4 h in LB- oder 18 h in M9-Medium durchgeführt. Ein Protein einer Größe zwischen 25 kDa und 36 kDa wurde von *E.coli* BL21(DE3) exprimiert (Abb. 3A). Eine Rückfaltung durch direkte Dialyse mit 6 M Gdn-HCl denaturierte Einschlusskörperchen in einen nativen Puffer oder schrittweise gegen geringere Konzentrationen an Denaturierungsagens war zunächst nicht erfolgreich, ebenso wenig konnte das ATG101-Protein nicht durch schnelles Verdünnen rückgefaltet werden. Die Rückfaltung gelang erst, nachdem die Reinheit der Einschlusskörperchen gesteigert wurde, indem das Pellet aus 4 l Bakterienkultur aufeinanderfolgend testweise mit 2 M Harnstoff, 1 M NaCl und final mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Die Schritte mit Harnstoff und NaCl brachten keine erfassbare Erhöhung der Reinheit, daher wurde das Pellet in späteren Reinigungen nur noch mit Wasser gewaschen. Das ATG101-Protein in den Einschlusskörperchen wurde für die denaturierende Größenausschluss-chromatographie mit 6 M Gdn-HCl denaturiert. Für die SDS-PAGE in Abb. 5A wurde ein kleiner Teil zweimal 1:1000 gegen Wasser dialysiert. Durch die denaturierende Größenausschluss-Chromatographie (Abb. 5B) wurde die Reinheit von ATG101 weiter gesteigert. So wurden ca. 70-90 mg ATG101-Protein für die anschließende Rückfaltung hergestellt.



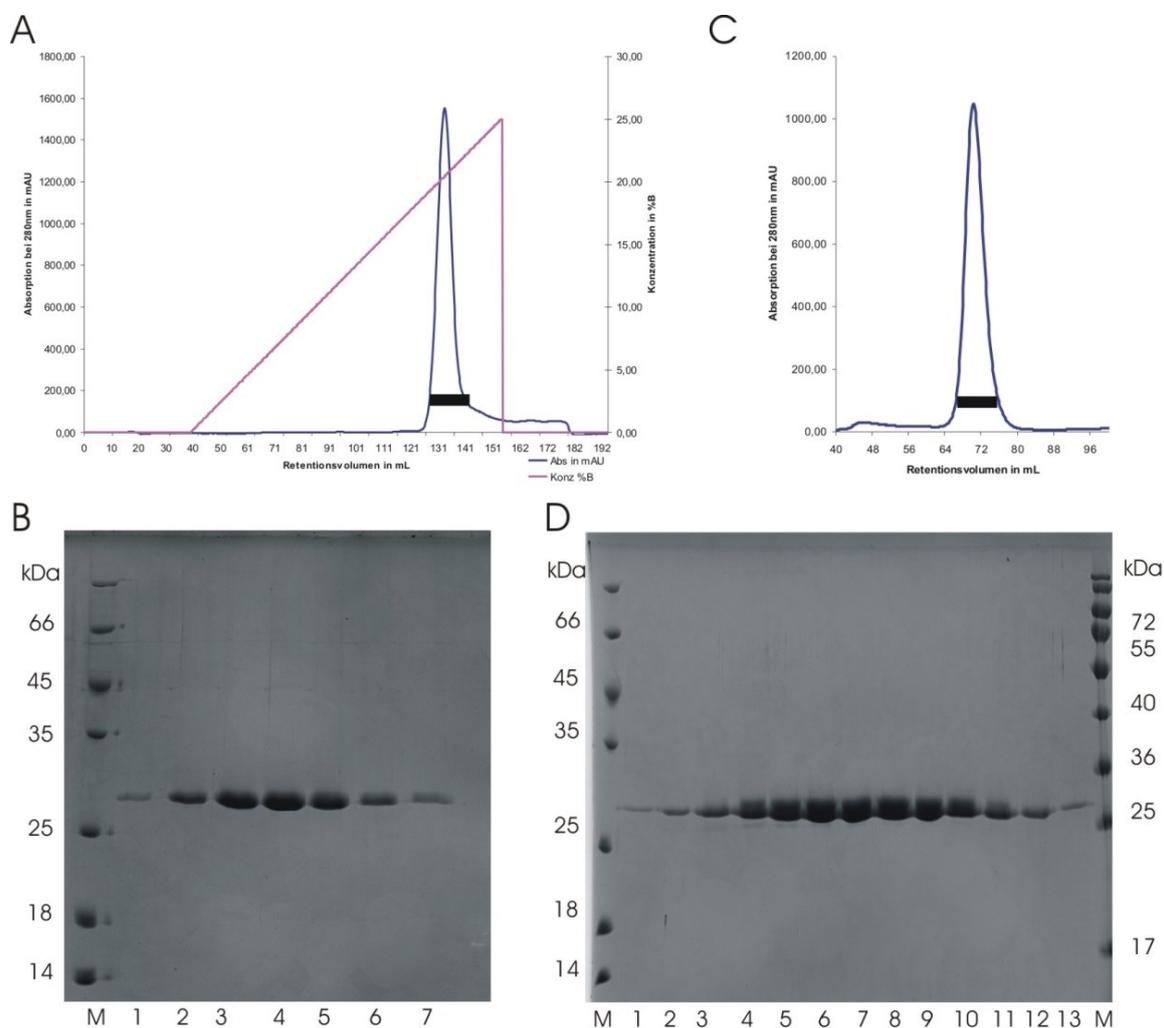
**Abb. 5: Anreicherung und denaturierende Reinigung von ATG101**

- A) Anreicherung von ATG101-Einschlusskörpern: M: Proteinstandard, S1: Löslicher Überstand nach Lyse, P1: Pellet nach Lyse, S2: Waschschrift (2 M Harnstoff) Löslicher Überstand, P2: Waschschrift (2 M Harnstoff) Pellet, S3: Waschschrift (1 M NaCl) Löslicher Überstand, P3: Waschschrift (1 M NaCl) Pellet, S4: Waschschrift (Wasser) Löslicher Überstand Pellet, P5: Pellet nach 6 M Gdn-HCl und gegen Wasser dialysiert, S5: löslicher Überstand in 6 M Gdn-HCl gegen Wasser dialysiert
- B) Denaturierende Grössenausschluss-Chromatographie von S5 aus A in 8 M Harnstoff auf Superdex 200 16/600 Säule: Balken: Fraktionen für C
- C) Denaturierende Grössenausschluss-Chromatographie in 8 M Harnstoff auf Superdex 200 16/600 Säule: Coomassie-Färbung der Fraktionen aus B

Die Rückfaltung durch schnelles Verdünnen und Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie (Abb. 6A) erzielte eine Reinheit des ATG101-Proteins von nahezu 100 % mit einer Ausbeute von 10-14 mg (Abb. 6B). In der nachfolgenden Größenausschlusschromatographie über eine Superdex75 16/ 600 (Abb. 6C) wurde dann 8-12

mg monodisperses und hochreines ATG101 eluiert. Das Retentionsvolumen lag dabei bei 68 ml (Abb. 6D).

Bei dem Peptidmassenfingerprint von ATG101 konnten die für ATG101 charakteristischen Peptide  $m/z$ -Maxima im Spektrum gefunden werden. Dies wurde auch für das Seleno-L-Methionin-Derivat von ATG101 bestätigt (Abb. 14, Tab.18), wobei die  $m/z$ -Maxima für die Peptide mit Seleno-L-Methionin für die unmarkierten Peptide verschwanden und neue Peaks an den berechneten Positionen wieder erschienen. Auch wurde eine Aufspaltung der  $m/z$ -Maxima in jeweils sechs bis sieben Seleno-L-Methionin-markierte Peptide entsprechend der Isotopenverteilung von Selen beobachtet.

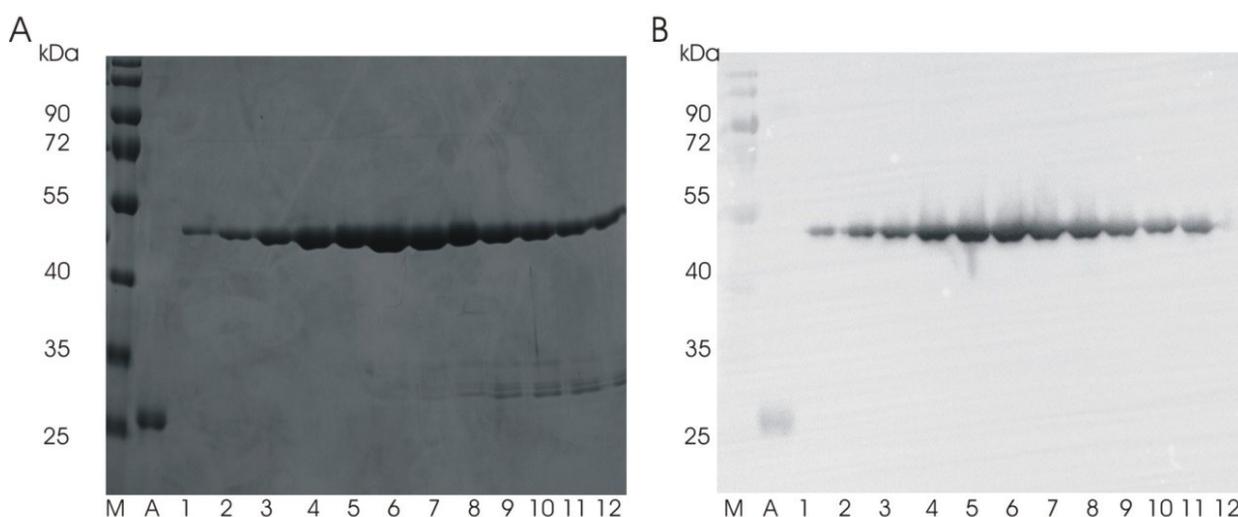


**Abb. 6: Ionenaustausch- und Größenausschluss-Chromatographie von ATG101**

- A) Ionenaustausch-Chromatogramm mit Elutionspeaks (Balken) von ATG101
- B) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel des Elutionspeaks aus A
- C) Größenausschluss-Chromatogramm (Superdex75 16/600) mit Elutionspeaks (Balken)
- D) Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel des Elutionspeaks (Balken) aus C

### 3.3 Reinigung von GST-ATG101

Um die Reinheit von nativ exprimiertem ATG101 zu steigern, wurde es N-terminal mit GST auf DNS-Ebene fusioniert und in *E.coli* BL21(DE3) exprimiert. Eine Induktionsbande wurde auf der erwarteten Größe von ca. 50 kDa in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE nachgewiesen. Die Reinigung des GST-ATG101-Proteins aus 4 l LB Kultur erzielte 4 mg an löslichem Protein. Die Identifikation des GST-ATG101 fand durch einen Western-Blot statt (Abb. 7). Auch konnte durch die Prescission-Protease von einer GSH-Sepharosesäule, die mit dem Überstand von lysierten Bakterienzellen aus einer GST-ATG101-Expression beladen wurde, ein 25 kDa großes Fragment abgeschnitten werden. Dieses Fragment zeigte allerdings Degradation.



**Abb. 7: Reinigung von GST-ATG101**

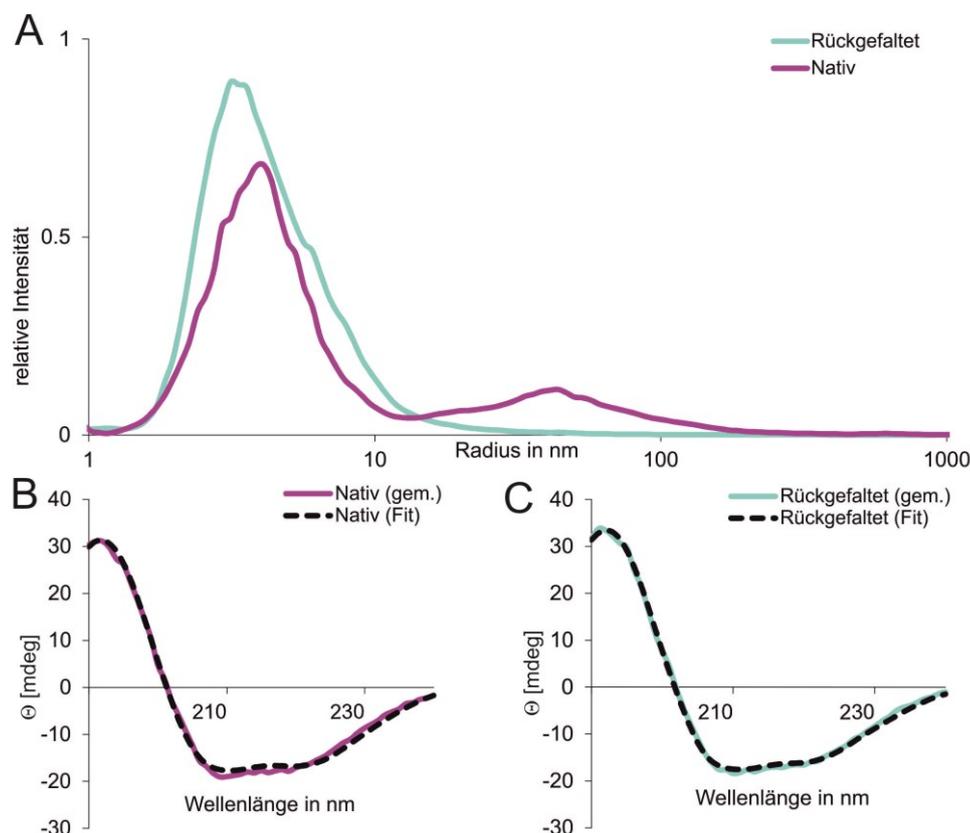
- A) Coomassie-Färbung von GST-ATG101 aus Gelfiltration (Superdex200 16/600) A: ATG101 ohne Tag als Positivkontrolle, 1-12: Fraktionsnummern  
 B) Western-Blot (anti-ATG101) der Fraktionen aus A

### 3.4 Biophysikalische Charakterisierung von ATG101

Um zu überprüfen, ob das native und das rückgefaltete ATG101 die gleiche Faltung aufweisen, wurden beide Präparationen einerseits einer CD-Spektroskopie unterzogen und andererseits wurde bezüglich ihrer hydrodynamischen Eigenschaften untersucht. Die dekonvolution des CD-Spektrums im fernen UV ergab, dass die Sekundärstruktur des nativ gefalteten ATG101 aus 26,6 %  $\alpha$ -Helix, 24,7 %  $\beta$ -Faltblatt, 19,5 % Schleifen und 29,2 % ungeordneten Bereichen besteht. Für das rückgefaltete

ATG101 fanden sich Werte von 27,1 %  $\alpha$ -Helix, 24,9 %  $\beta$ -Faltblatt, 18,9 % Schleifen und 29,1 % ungeordnet Bereichen (Abb. 8, Tab. 17). Diese Sekundärstrukturanteile sind innerhalb der Signifikanz der Methode als identisch zu betrachten. Eine CD-Langzeituntersuchung zeigt, dass rückgefaltetes ATG101 über einen Zeitraum von 24h bei 30°C konformationell stabil ist (Abb. 9). In der dynamischen Lichtstreuung wurde bei dem Nativ gefalteten ATG101 Partikel mit mittleren Radien Größe von 3.8 nm und 41 nm nachgewiesen, während bei dem rückgefalteten ATG101 nur Partikel mit einem hydrodynamischen Radius von 3.4 nm nachgewiesen wurden. Bis auf das Vorhandensein von Aggregaten in der nativ präparierten Probe zeigt sich wiederum ein sehr ähnliches Verhalten.

Schlussendlich wurde ATG101 mit  $^{15}\text{N}$  markiert, in sowohl nativer als auch denaturierender Form gereinigt und in einem 2D-BEST-TROSY NMR-Experiment der Faltungszustand beider Proteine überprüft. Das Spektrum vom nativen gereinigtem ATG101 konnte vollständig mit dem Spektrum vom denaturierend gereinigten und rückgefalteten ATG101 zur Deckung gebracht werden. (Abb. 10).



**Abb. 8: Dynamische Lichtstreuung und CD-Spektroskopie**

Natives (rot) und rückgefaltetes (blau) ATG101 wurde einer dynamischen Lichtstreuung (A) und einer CD-Spektroskopie (B) unterzogen. A) Verteilung hydrodynamischer Radien basierend auf der Autokorrelationsfunktion. In B) wurde jeweils ein Fit (DicroWeb) als schwarz gepunktete Kurve ergänzt.

Tab. 17: Auswertung der CD-Daten mittels DicroWeb

	Helix [%]	Strang [%]	Turns [%]	Ungeordnet [%]	NRMSD [%]
Nativ	26,6	24,7	20	29,2	5,2
Rückgefaltet	27,1	25,1	19	29,1	3,6

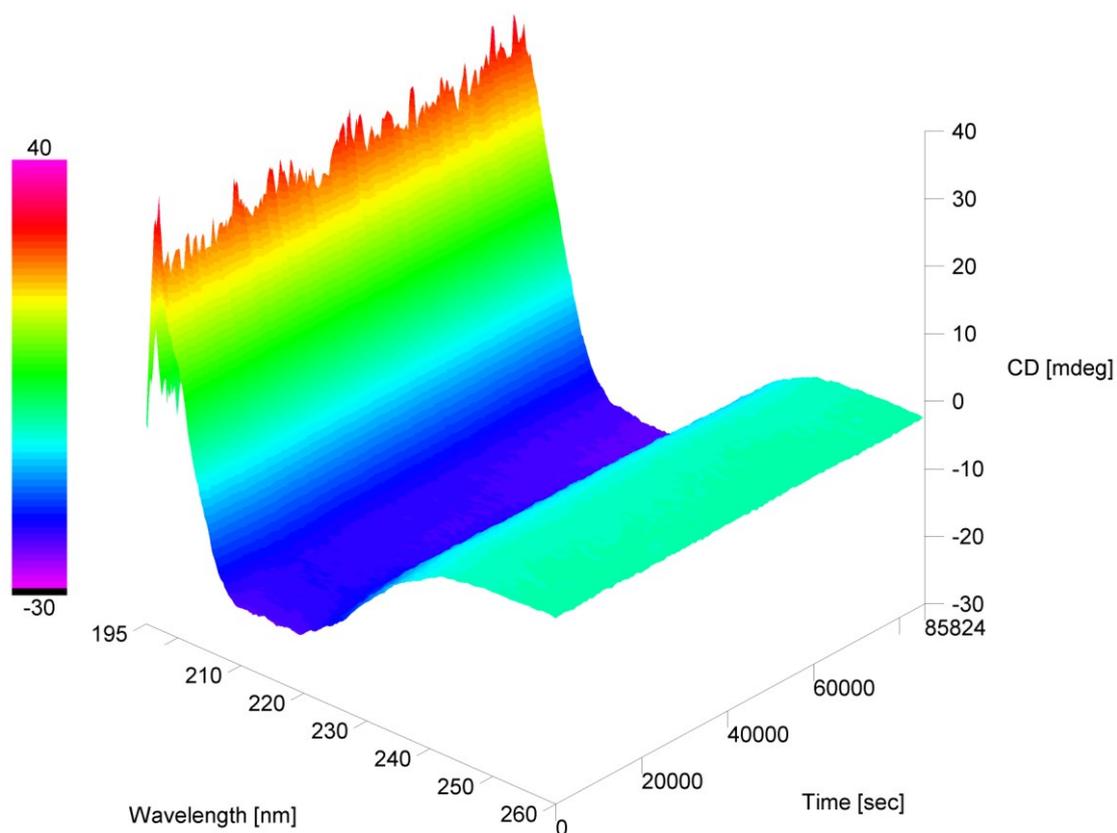
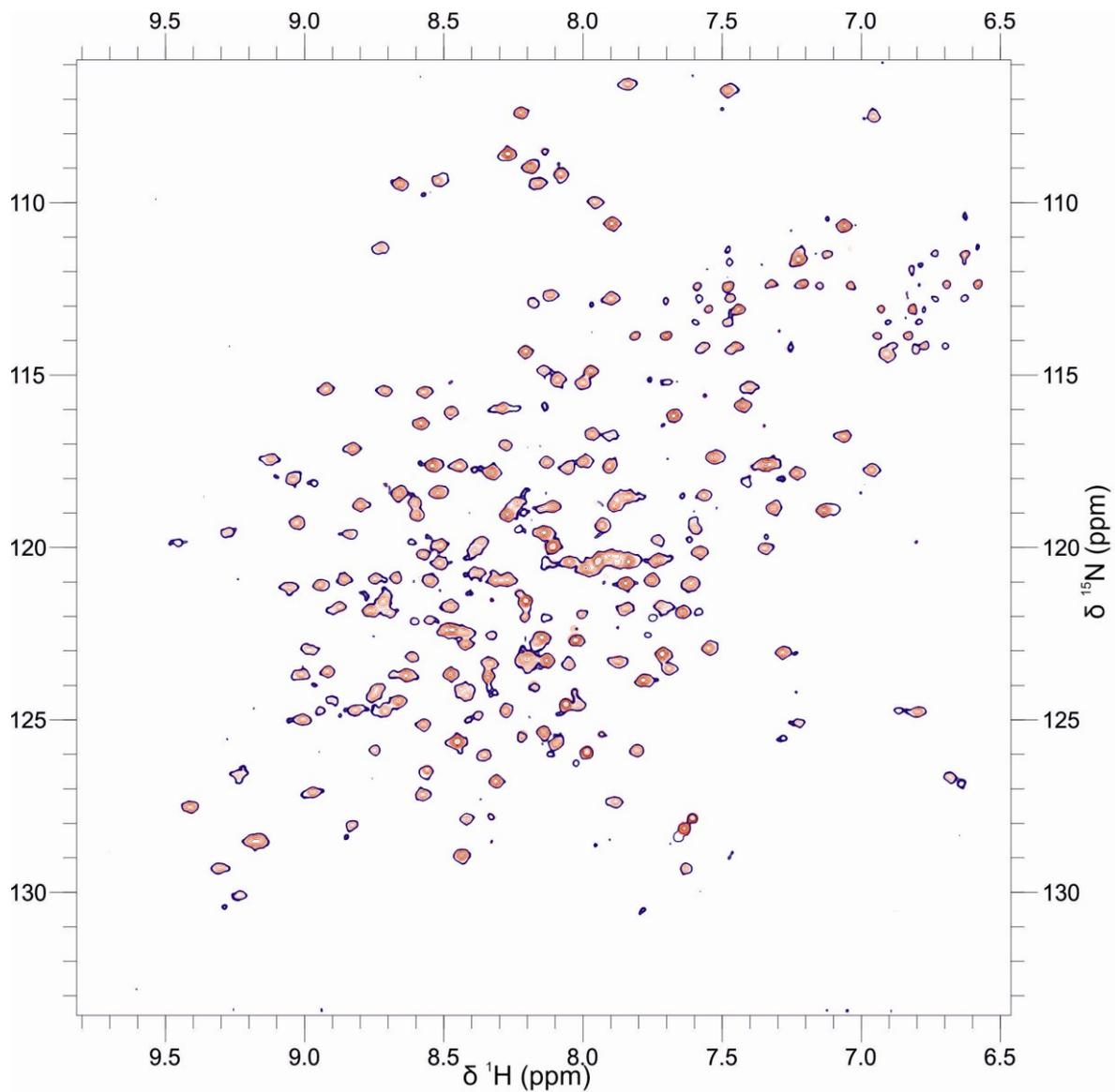


Abb. 9: Langzeit-Untersuchung von ATG101 mittels CD-Spektroskopie.

Rückgefaltetes ATG101 wurde bei 30 °C über 24 h inkubiert, alle 10 min wurde ein CD-Spektrum von 195 nm bis 260 nm aufgezeichnet.

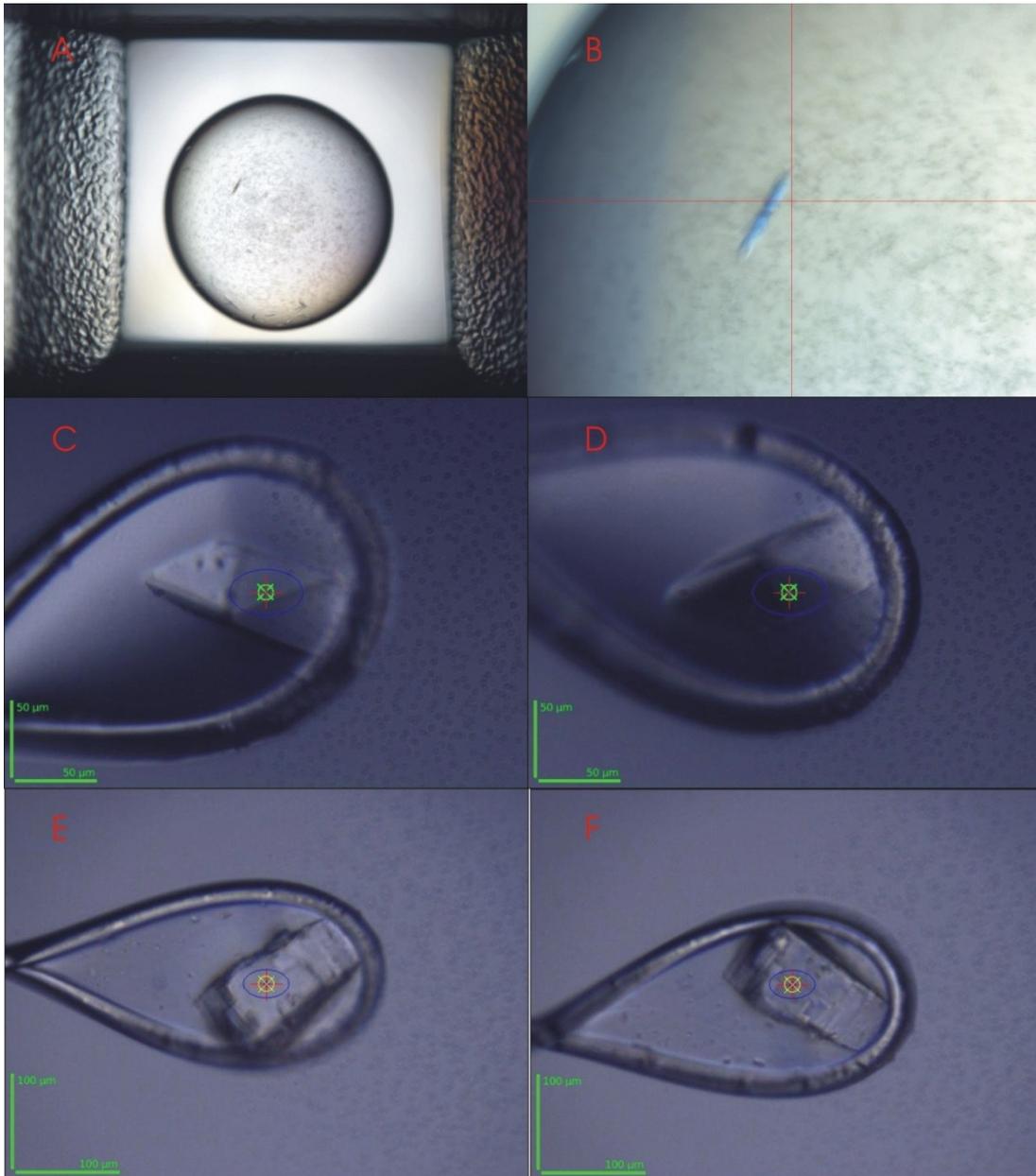


**Abb. 10: Zweidimensionales BEST-TROSY-Spektrum von nativem und rückgefaltetem ATG101**

ATG101 wurde in M9-Medium als  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein exprimiert und sowohl nativ (rot) als auch rückgefaltet (blau) gereinigt. Zweidimensionale BEST-TROSY-Spektren der Proteine aus beiden Reinigungen wurden aufgenommen und superpositioniert. Die Konturlevels betragen für natives ATG101 0.5 bei 20 Abstufungen (rot) und rückgefaltetes ATG101 0.01 bei 20 Abstufungen (blau), was eine Umrandung der Signale bewirkt.

### 3.5 Kristallisation von ATG101

Nativ exprimiertes und zu 80 % reines ATG101 wurde in den ersten Kristallisationsrunden bei einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt. Erste 20 µm große Kristallbündel bildeten sich bereits nach 24 h im Low-Ionic Screen von Sigma-Aldrich mit der Lösung 50 mM Bis-tris pH 6.5, 12 % PEG 3350 (Abb. 11A-B). Bei der Optimierung der Kristallisation wurde zum Einen die Reinheit des eingesetzten Proteins durch eine Umstellung von nativer auf denaturierende Reinigung erhöht und zum Anderen konnte die anfängliche Präzipitationsneigung von dem Seleno-L-Methionin-Derivates von ATG101 durch Zugabe von βME reduziert werden. Es zeigte sich, dass auch für die Kristallisation des nicht derivatisierten ATG101-Proteins die Zugabe von βME positiv ausgewirkt hat. Des Weiteren wurde die Geschwindigkeit der Kristallisation durch Reduktion der Protein- und Fällungsmittelkonzentration von zwei bis drei Stunden auf fünf bis sechs Tage erhöht, wodurch größere Kristalle mit höheren Einkristallanteilen gezüchtet wurden. Entscheidend wirkte sich der pH-Wert auf die Morphologie der Kristalle aus. Bei einem pH-Wert von 7.0 wurden hauptsächlich Stäbchen mit ausfransenden Enden gezüchtet. Durch schrittweise Reduktion des pH-Wertes auf 6.0 konnte die Kristallform in eine kompaktere Plättchenform gebracht werden, eine weitere Reduktion des pH-Wertes auf 5.6 und eine Zugabe von 50 mM NaCl führte zwar erneut zu länglicheren, dafür aber dickeren Plättchen. Als beste reproduzierbare Bedingung erwies sich ein 1:1-Gemisch aus 50 mM MES pH 6.0, 8 % PEG3350, 50 mM NaCl, 10 mM βME als Kristallisationslösung und 2,2 mg/ml ATG101 in 50 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.8 und 10 mM βME als Proteinlösung. Nach fünf bis sechs Tagen wuchsen zwei bis drei bis zu 0,2 µm große Einkristalle in dem Tropfen heran. Seleno-L-Methionin-derivatisiertes ATG101 kristallisierte bei ansonsten gleichen Bedingungen schon bei 4-6 % PEG3350.



**Abb. 11: Kristallisation von ATG101**

A) - B) native ATG101-Initialkristalle, C) - D) Optimierte Kristallisationsbedingung für ATG101-Kristalle  
 E) - F) Optimierte Kristallisationsbedingung für SeMet-ATG101-Kristalle

Versuche, die Kristallisationsbedingungen durch Variation von Präzipitationsmittel und -konzentration und cryofähig zu machen, führten ebenfalls zu Kristallen. Diese Kristalle wiesen jedoch keine vergleichbare Diffraktionsqualität als auf. Für die Cryokonservierung stellte sich ein schnelles Umsetzen aus dem Kristallisationsansatz in 50 mM MES pH 6.0, 12 % PEG3350, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 6 % Glycerin und daraufhin 50 mM MES pH 6.0, 12 % PEG3350, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 12 % Glycerin geeignet.

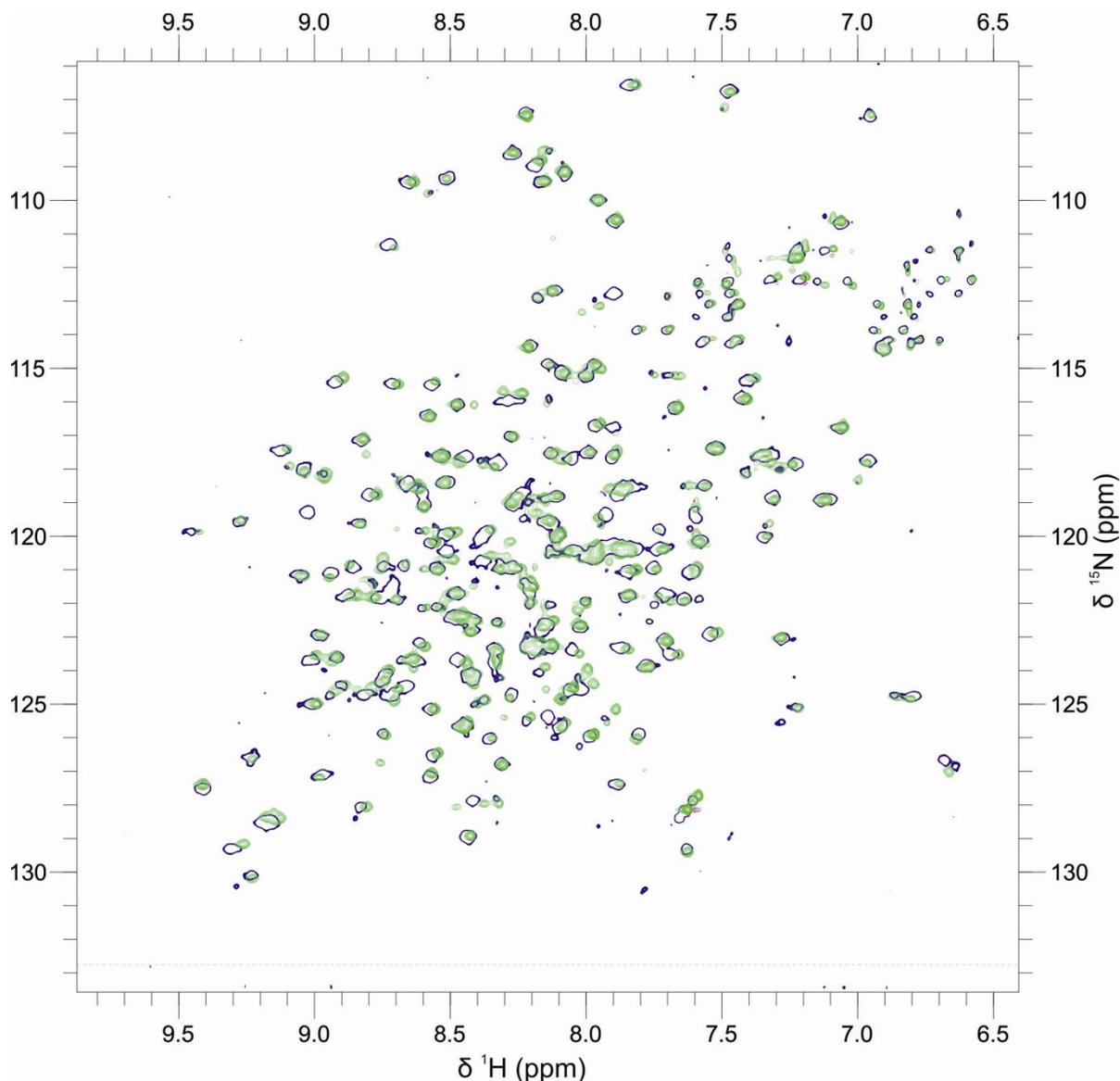
### 3.6 Datensammlung und -prozessierung

Bei den ersten Messungen an der Beamline ID29 am ESRF (Grenoble) beugten die Kristalle bis auf eine Auflösung von 2.1 Å. Da ATG101 keinerlei offensichtliche Sequenzähnlichkeit zu Proteinen mit bekannter Struktur aufweist, war eine Lösung des Phasenproblems durch molekularen Ersatz nicht ohne weiteres möglich.

Zwar deuten profilbasierte Suchmethoden (*Threading*), z.B durch den *proteinthreading* server Phyre2 (protein homology/analogy recognition Engine), eine Verwandtschaft zu HORMA Proteinen an (Hegedus et al., 2014), doch daran abgeleitete Modelle (Poly-Ala- oder auch vollständige Homologie-Modelle) erwiesen sich als wenig hilfreich für die Strukturlösung

Daher wurden die Kristalle mit Schwermetallsalzen von Uran, Quecksilber, Platin und Iod für verschiedene Zeiten- und in unterschiedlicher Konzentration, um experimentelle Phaseninformationen zu erhalten, behandelt. Eine allgemeine Reduktion der Datenqualität, eine geringe isomorphe und anomale Differenz führte zu keiner brauchbaren Phaseninformation.

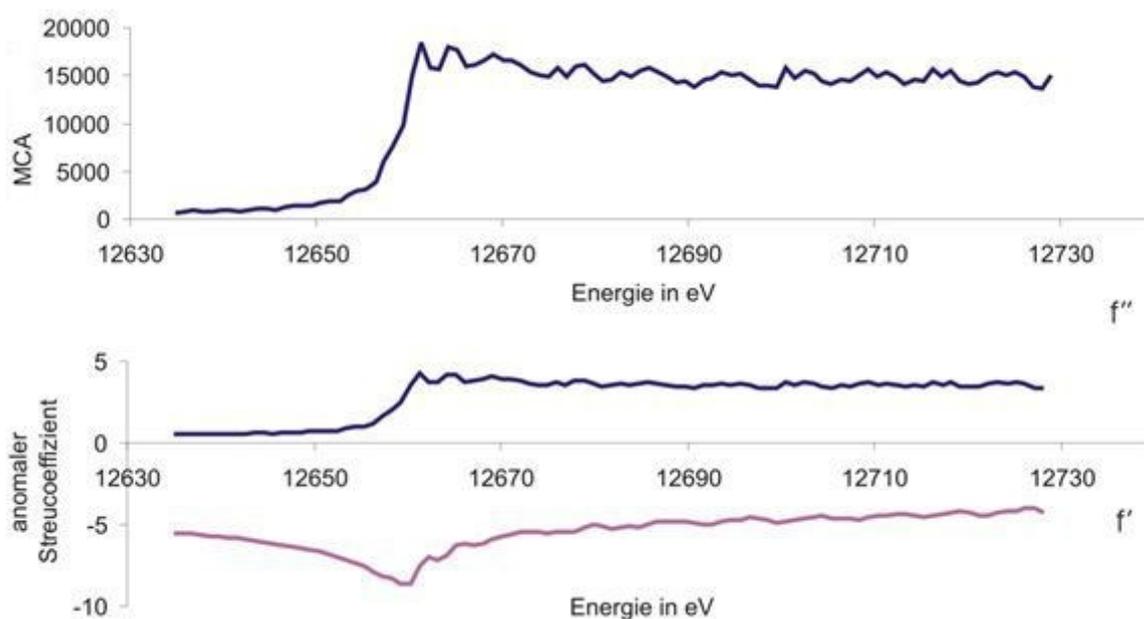
Durch die Inkorporation von Seleno-L-Methionin lassen sich anomal streuende Atome (Selen) in ein Protein einbringen. Dies führt zu der Möglichkeit experimentelle Phaseninformationen mittels *single wavelength anomalous dispersion* (SAD) oder *multiple wavelength anomalous dispersion* (MAD) zu erhalten. Um die Konformation von rückgefaltetem Seleno-L-Methionin derivatisiertem ATG101 zu überprüfen wurde es als <sup>15</sup>N- Seleno-L-Methionin Derivat erzeugt und mittels NMR-Spektroskopie wurde sichergestellt, dass die Faltung grundsätzlich dem nicht derivatisierten ATG101 entsprach (Abb. 12).



**Abb. 12: Zweidimensionale BEST-TROSY-Spektren von ATG101 und SeMet-ATG101**

ATG101 wurde in M9-Medium als  $^{15}\text{N}$ -markiertes unterderivatisiertes (blau) und  $^{15}\text{N}$ -Seleno-L-Methionin derivatisiertes (grün) Protein exprimiert und mit Rückfaltung gereinigt. Die Spektren der Proteine wurden aufgenommen und superpositioniert.

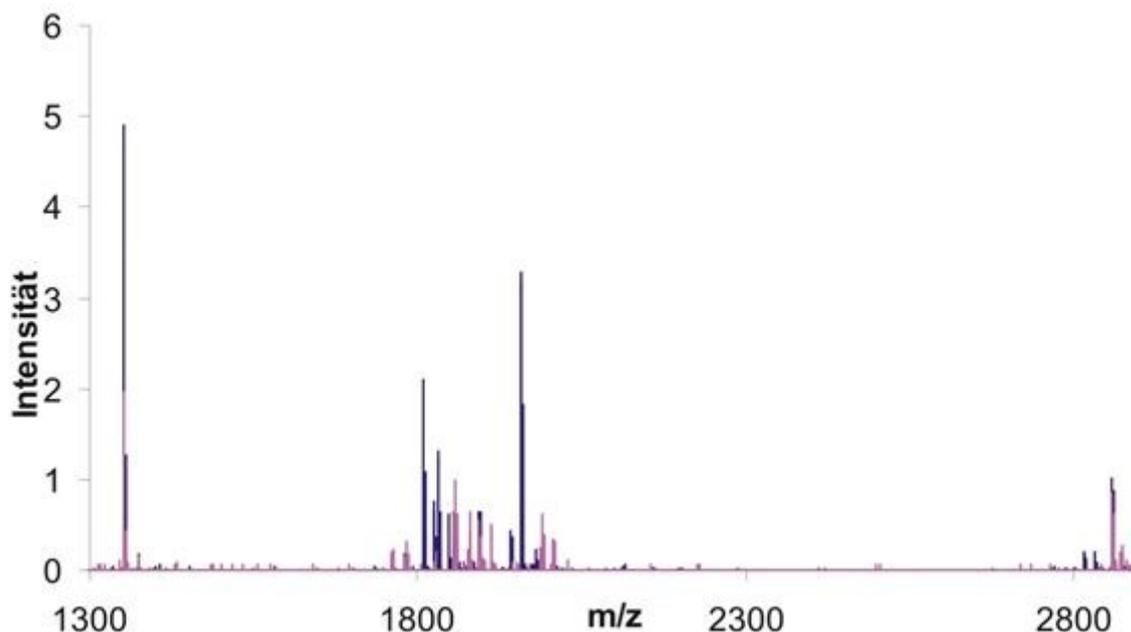
Mit Seleno-L-Methionin derivatisierte ATG101-Kristalle wurden primär für Phasenbestimmung mittels MAD erzeugt. Hierfür wurden Kristalle einem Röntgenfluoreszenzscan unterzogen, um die optimalen Wellenlängen für MAD-Experimente mit Selen zu bestimmen, welche  $\lambda_1=0.97939 \text{ \AA}$  (*inflection point*),  $\lambda_2= 0.97909 \text{ \AA}$  (*peak*) und  $\lambda_3=0.97296 \text{ \AA}$  (*high energy remote*) waren (Abb. 13). Diese Wellenlängen charakterisieren die K-Absorptionskante von Selen bei 12666 eV. Andere Kristalle wurden an der Peak-Wellenlänge gemessen, um SAD-Datensätze zu erzeugen.



**Abb. 13: Röntgenfluoreszenzscan von SeMet-ATG101**

Ein Seleno-L-Methionin-Kristall von ATG101 wurde im Bereich 12635 bis 12725 eV einem Röntgenfluoreszenzscan unterzogen. MCA: *Multi-Channel-Analyse* der Fluoreszenz

Die Phasenbestimmung aus den Datensätzen mittels MAD erwies sich als relativ schwierig, da die Kristalle zum Einen strahlensensibel waren und zum Anderen anisotrop diffraktiert haben. Die besten Phaseninformationen konnten aus einem SAD-Datensatz von einem Kristall, der ähnliche Ausdehnungen in allen Raumrichtungen aufwies (Abb. 11E und F), extrahiert werden.



**Abb. 14: Massenspektrometrie von ATG101 und SeMet-ATG101**

Nicht derivatisiertes ATG101 (blau) und SeMet-ATG101 (rot) wurden einem In-Gel-Verdau unterzogen. Peptidgrößenladungsverhältnisse wurden per MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

**Tab. 18: Tabellarische Auflistung einiger Selen-modifizierbarer Peptide und ihrer m/z Werte**

Sequenz	Start	Ende	m/z be-rechnet	ATG101 gefunden	Abweichung [ppm]	m/z be-rechnet Se-Met	Se-Met gefunden	Abweichung [ppm]
IINIVEVMNR	152	161	1200.6769	1200.6757	-1.03	1248.6213	1248.6233	1.55
IINIVEVMNR	152	161	1216.6718	1216.6705	-1.04			
MPTQSEVDNVFDTGLR	168	183	1808.8483	1808.8471	-0.69	1856.7927	1856.7985	3.08
MPTQSEVDNVFDTGLR	168	183	1824.8433	1824.8412	-1.16			
NSGGDGLGQMSLEFYQK	89	105	1830.8327	1830.8302	-1.37	1878.7771	1878.7821	2.64
NSGGDGLGQMSLEFYQK	89	105	1846.8276	1846.8254	-1.17			
ISFQITDALGTSVTTTMR	192	209	1941.995	1941.9941	-0.44	1989.9394	1989.9451	2.82
ISFQITDALGTSVTTTMR	192	209	1957.9899	1957.9888	-0.58			
QVEEAMLAVLHTVLLHR	16	32	1959.0844	Überdeckt		2007.0288	2007.0363	3.69
QVEEAMLAVLHTVLLHR	16	32	1975.0793	1975.0764	-1.46			

Die Auswertung dieses SAD-Datensatzes wurde mit XDS vollautomatisch bis auf eine Auflösung von 2.5 Å durchgeführt. Eine monokline Elementarzelle mit (Raumgruppe P2;  $a = 39.5 \text{ \AA}$ ,  $b = 42.5 \text{ \AA}$ ,  $c = 66.6 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 96.6^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ) mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit wurde gefunden. Dies entspricht einem Matthews-Koeffizienten von  $2.22 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  und 44.6 % Lösungsmittelgehalt. Mit POINTLESS (CCP4) wurde zudem die durch XDS gefundene Symmetrie bestätigt.

### 3.7 Phasenbestimmung, Modellbau und Verfeinerung

Mit dem Programm phenix.autosol wurde der Datensatz für die Verarbeitung analysiert und skaliert. Die Positionen anomal streuender Atome konnten ermittelt werden. Durch Vergleich mit der finalen Struktur in Coot lassen sich diese den Positionen Se-Met21, Se-Met98, Se-Met159, Se-Met168 zuordnen. Die Selen-Atome von SeMet1 und 208 konnten dagegen nicht sicher identifiziert werden. Nach Phasenbestimmung und Dichtemodifikation wurde ein vorläufiges Modell ( $R_{\text{work}}$  42.07 % und  $R_{\text{free}}$  47.73 %) generiert bestehend aus 108 Aminosäuren, die teilweise korrekt in der Sequenz platziert waren. Dieses Modell wurde als Startmodell für die weitere Verbesserung in phenix.autobuild eingesetzt. Dabei wurde durch iterative Zyklen von RESOLVE und phenix.refine das Modell auf bis zu 146 Aminosäuren erweitert ( $R_{\text{work}}$  30.8 % und  $R_{\text{free}}$  35.03 %) d.h. auf 67% Vollständigkeit. Durch manuelle Interpretation der Dichte mit Coot und Verfeinern des Modells mit phenix.refine wurde das Modell des Seleno-L-Methionin-derivatisierten ATG101 zu durchgehenden 204 Aminosäuren langen Sequenz ergänzt ( $R_{\text{work}}$  24.7 % und  $R_{\text{free}}$  29.6 %).

Für die weitere Verfeinerung des Modells stand ein Datensatz eines Kristalls mit sehr schwacher Seleninkorporation der allerdings bis 1.9 Å beugte zur Verfügung. Dieser Kristall war ein Ergebnis der Herstellung von Seleno-L-Methionin-derivatisiertem ATG101. Im vollständig mit Seleno-L-Methionin besetzten ATG101-Kristall wurde eine maximale Röntgen-Fluoreszenz von 18394 MCA-Counts bei 12.660 keV (Hintergrund bei 12.640 keV mit 984 MCA-Counts). Bei dem weniger besetzten Kristall wurden 1400 MCA Counts bei 12.660 keV und 370 MCA-Counts bei 12.640 keV festgestellt. Unter der idealisierten Annahme, dass das durchstrahlte Volumen der Kristalle identisch war, ergibt sich daraus eine theoretische Besetzung von ca. 6 % ((1400-370)/(18394-984)). Dieser Wert ist so gering, dass der betreffende Kristall in guter Näherung als nativ betrachtet werden kann, auch konnte keine anomale Streuung bei der Auswertung nachgewiesen werden. Von dem hochreduzanten Datensatz wurde die Hälfte, entsprechend einer Gesamtrotation von 360°, ausgewertet. Allerdings zeigte sich wiederum eine signifikante Anisotropie in der Diffraktion, welche zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Modellverfeinerung führte. Daher wurde der Datensatz erst bei 1.9 Å isotrop und danach anisotrop (2.6 Å, 1.9 Å, 1.9 Å im reziproken Raum) beschnitten (*UCLA MBI – Diffraction Anisotropy Server XDS*). Dabei wurde ein neuer  $R_{\text{Free}}$ -Set generiert und zur Vermeidung von Bias-Effekten im Seleno-L-Methionin-Modell jede Atomposition im Mittel um 0.3 Å verschoben. Mit diesem Startmodell wurde dann ein

automatisches Neubauen in der Dichte erfolgreich durchgeführt. Nach weiteren Iterationen von Verfeinerung und manuellen Korrekturen und durch Hinzufügen von TLS-Parametern wurde letztlich ein Modell mit einem R-Wert von 19.8 % und einem freien R-Wert von 22.0 % erzeugt (Abb. 16). Dieses Modell enthält Aminosäuren 1-210, die C-terminalen 8 Reste ließen sich in der Elektronendichte nicht verfolgen und sind vermutlich sehr flexibel. In der Validierung zeigten sich keine Ramachandran-Ausreißer und keine ungewöhnlichen Seitenkettenkonformationen. Die Struktur hat in der PDB-Datenbank die Identifikationsnummer 4WZG erhalten.

### 3.8 Struktur von ATG101

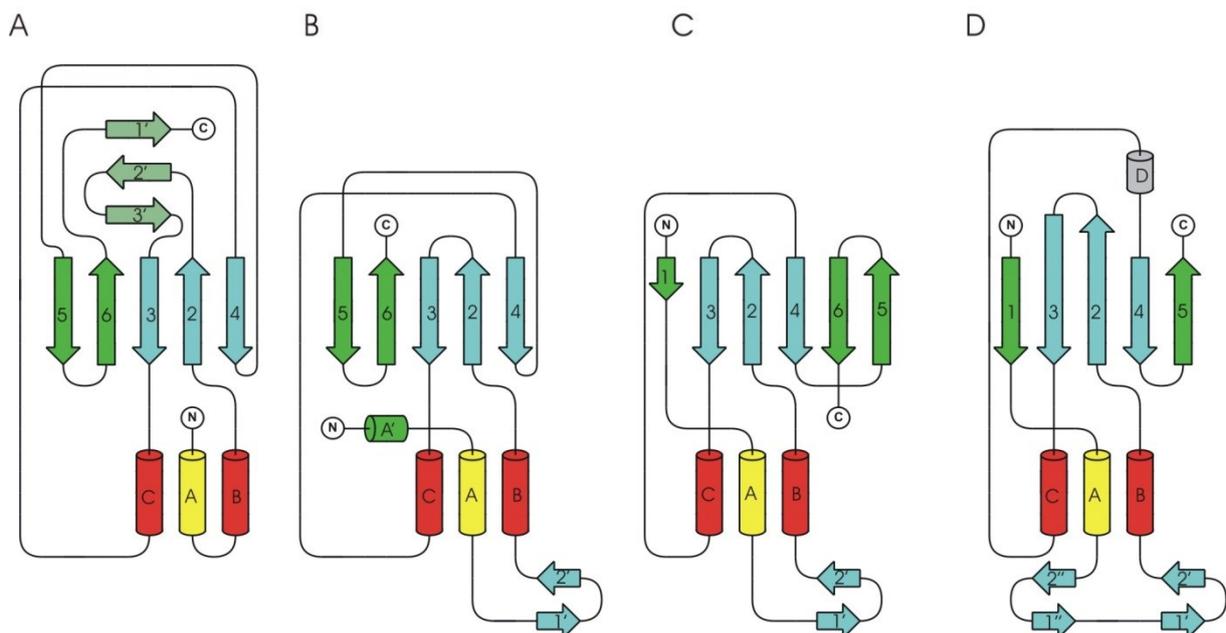
In der Sekundärstrukturanalyse durch PROMOTIF (Hutchinson and Thornton, 1996) wurden die 210 Aminosäuren von ATG101 zu (33.8 %) Strängen, (29,0 %) Helices und (4,3 %)  $3_{10}$  Helix zugeordnet, dabei wurden (32.9 %) nicht klassifiziert. Die Struktur von ATG101 umfasst drei  $\alpha$ - (A: Gly14-Leu30, B Glu70-Arg88 und C: Glu134-Arg161) und eine  $3_{10}$ -Helix (D: Gln171-Asn176). Helices A, B und C interagierten miteinander. Des Weiteren wurden neun  $\beta$ -Stränge gefunden, die sich zu drei  $\beta$ -Faltblättern (1: Arg4-Glu13, 1': Phe37-Tyr41, 2': Tyr43-Ile47, 1'': Thr52-Asp56, 2'': Thr63-Val67, 2: Leu94-Lys107, 3: Glu115-Val129, 4: Tyr190-Thr197 und 5: Thr202-Thr207) arrangieren. Diese neun Stränge bilden ein gemischtes (FB1: 1, 3, 2, 4 und 5) und zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter (FB2: 1' und 2'; FB3 1'' und 2''). Die wichtigsten Sekundärstrukturelemente und ihre Anordnung lassen sich übersichtlich als Topologie-Diagramm (Abb. 15) darstellen.

Tab. 19: Statistik der Datenauswertung und Verfeinerung

	ATG101	SeMet-ATG101
Wellenlänge (Å)	0.9	0.9705
Auflösungsbereich (Å)	42.62 - 1.902 (1.969 - 1.902)	42.55 - 2.501 (2.59 - 2.501)
Raumgruppe	P 1 2 1	P 1 2 1
Elementarzelle (Å, Å, Å, °, °, °)	40.15, 42.62, 67.21, 90, 97.31, 90	39.55, 42.55, 66.61, 90, 95.91, 90
Reflexe ( <i>total</i> )	75656 (7547)	49578 (4480)
Reflexe ( <i>unique</i> )	13299 (1788)	7675 (754)
Multiplizität	4.2 (4.2)	6.4 (5.9)
Vollständigkeit (%)	73.97 (19.70)	98.28 (87.11)
Mittleres I/sigma (I)	12.63 (1.05)	11.55 (2.58)
Wilson B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	40.65	53.47
R-merge	0.0437 (1.484)	0.0998 (0.7009)
R-meas	0.04998	0.1089
CC1/2	0.999 (0.594)	0.996 (0.869)
CC*	1 (0.863)	0.999 (0.964)
R-work	0.198	0.219
R-free	0.22	0.2643
Nicht-H-Atome	1632	1521
Protein	1597	1514
Ligand (βME)	4	
Wasser	31	7
Proteinreste	1-210	1-204
RMSD ( <i>bonds</i> ) (Å)	0.003	0.01
RMSD ( <i>angles</i> ) (°)	0.63	1.62
Ramachandran bevorzugt (%)	96	95
Ramachandran erlaubt (%)	4	4
Ramachandran Ausreißer	0	1
Mittlerer B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	59.2	62.2
Protein	59.3	62.2
Ligand (βME)	77.5	
Wasser	50.8	60.5
Phasenbestimmung		
Auflösungsbereich (Å)		42.55 - 2.88
Figure of merit (initial)		0.33
Figure of merit (nach Dichtemodifikation)		0.71

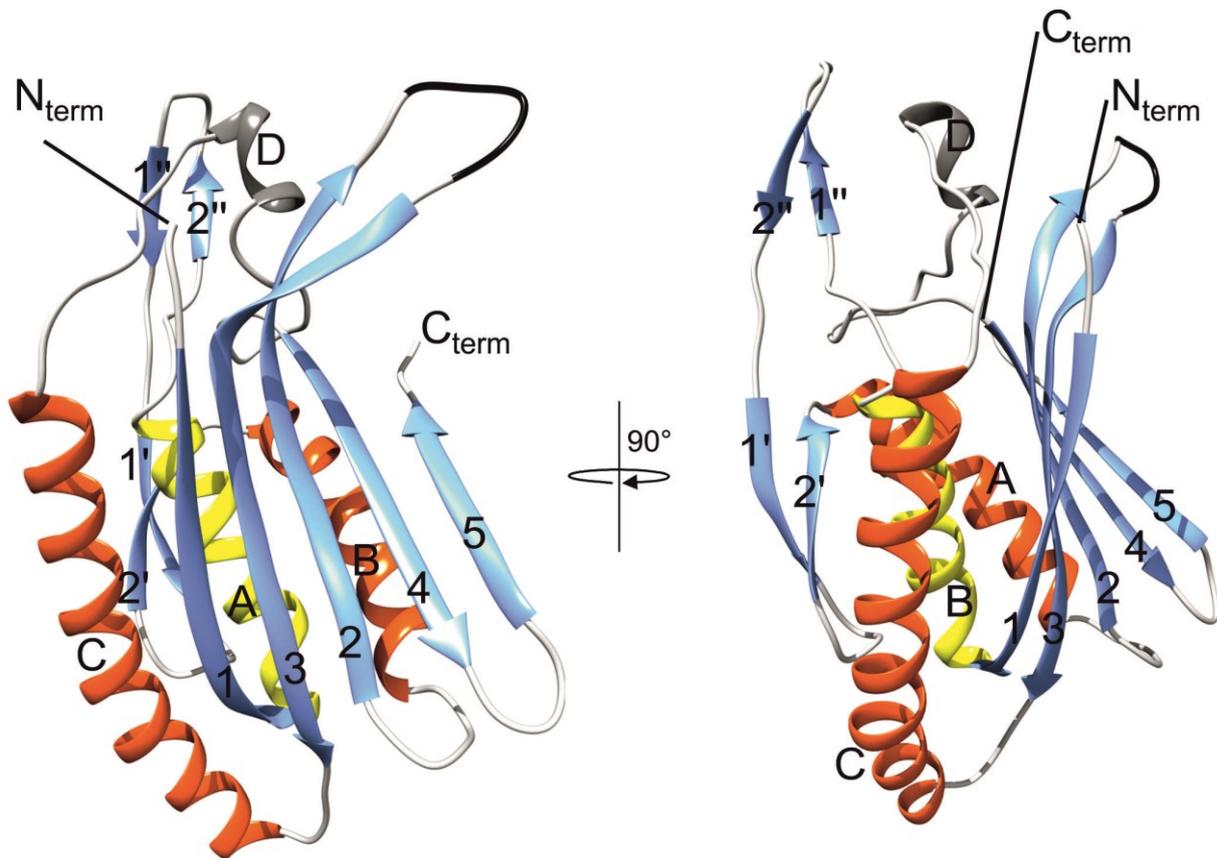
Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

Im Bereich der Schleife von Ser109-Phe112 war die Elektronendichte extrem schwach, was auf hohe Flexibilität dieses Bereiches hindeutet; erst bei einer Konturierung unter 0.7 RMSD zeigten sich Hinweise auf den Hauptkettenverlauf. Im finalen Modell lagen die verfeinerten B-Faktoren hier über  $100 \text{ \AA}^2$  (Abb. 18). Am Cys140 wurde ein kovalent gebundenes  $\beta$ ME-Molekül eingeführt. Die Struktur wurde in CATH (Sillitoe et al., 2013) der Proteinsuperfamilie 3.30.900.10 (*cell cycle, spindle assembly checkpoint protein*) zugeordnet. Diese Superfamilie enthält Proteine mit einer HORMA-Domäne (Pfam ID: PF02301). Die Anordnung der ATG101-Moleküle im Kristall kann auf eine in Lösung existierende Multimerisierung hindeuten. Dies wurde mit PISA untersucht und es ergaben sich zwei mögliche Dimer-Anordnungen, eine stabile mit einem geschätzten  $\Delta G^{\text{int}} = -17 \text{ kcal/mol}$  und  $\Delta G^{\text{diss}} = -3.8 \text{ kcal/mol}$  (Abb. 17A) und eine möglicherweise stabile mit einem  $\Delta G^{\text{int}} = -7.2 \text{ kcal/mol}$  und  $\Delta G^{\text{diss}} = -0.4 \text{ kcal/mol}$  (Abb. 17B).



**Abb. 15: Topologie-Diagramme von offenen und geschlossenen Konformationen**

Dargestellt ist jeweils ein Topologie-Diagramm von A) ItATG13, B) C-huMad2, C) O-huMad2, D) ATG101 (generiert mit TopDraw aus dem CCP4-Paket).



**Abb. 16: Kristallstruktur von ATG101**

Das Strukturmodell (vgl. PDBID: 4WZG) wurde entsprechend dem Topologie-Diagramm (Abb. 15D) farblich kodiert. Die linke Abbildung unterscheidet sich von der rechten durch eine ca. 180 °-Drehung zur besseren Visualisierung.

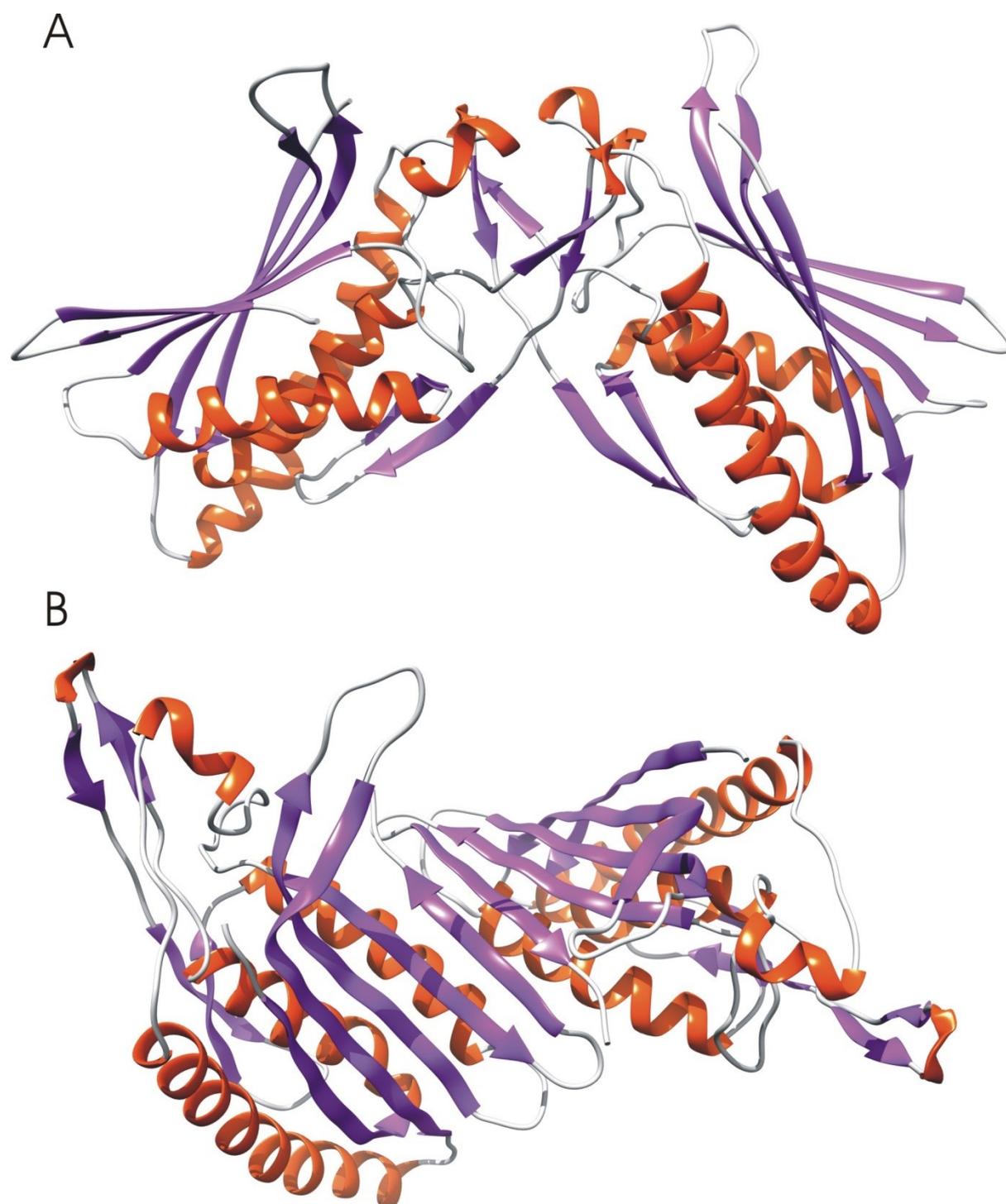
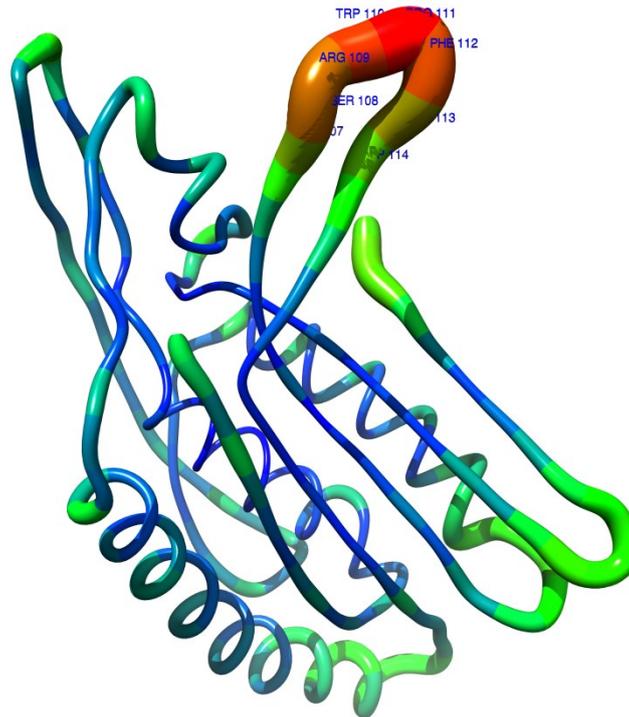


Abb. 17: Durch PISA vorhergesagte Dimer-Anordnungen von ATG101 in Lösung

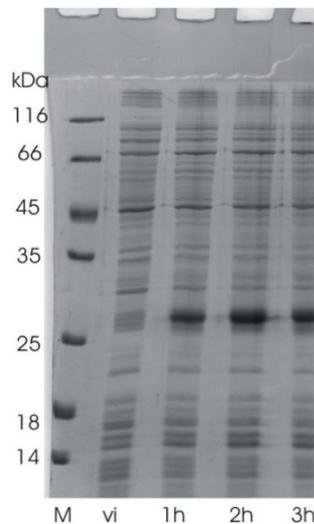


**Abb. 18: B-Faktor-Verteilung von ATG101**

Die Höhe des B-Faktors wird durch die Einfärbung und die Dicke des Hauptkettenverlaufes angedeutet.

### **3.9 Expression und Reinigung von Vollängen-ATG13 und ATG13(1-198)**

Für die Bildung des Proteinkomplexes aus ATG13 und ATG101 (Hosokawa et al., 2009, Mercer et al., 2009) sollte ATG13 exprimiert und gereinigt werden. Hierfür wurden die Vektoren pGEX-3x-ATG13 und pET15b-ATG13 verwendet. Die Expression von His<sub>6</sub>-ATG13 und GST-ATG13 wurde optimiert. Beste Ausbeuten mit 8 mg / 6 l LB für ATG13 und 10 mg / 6l LB für GST-ATG13 konnten bei der Verwendung des Stammes BL21(DE3) pRARE2 mit dem Expressionsprotokoll für natives ATG101 erzeugt werden. Nach Abschneiden des GST-Tags von GST-ATG13 mit Factor Xa präzipitierte das ATG13-Protein größtenteils. Daher wurde ATG13 in Fusion mit dem His-Tag weiterbenutzt. Weitere Ergebnisse hierzu finden sich in 3.10. Die Expression vom verkürzten ATG13(1-198) zeigte eine Induktionsbande auf der erwarteten Größe von ca. 23 kDa (Abb. 19).



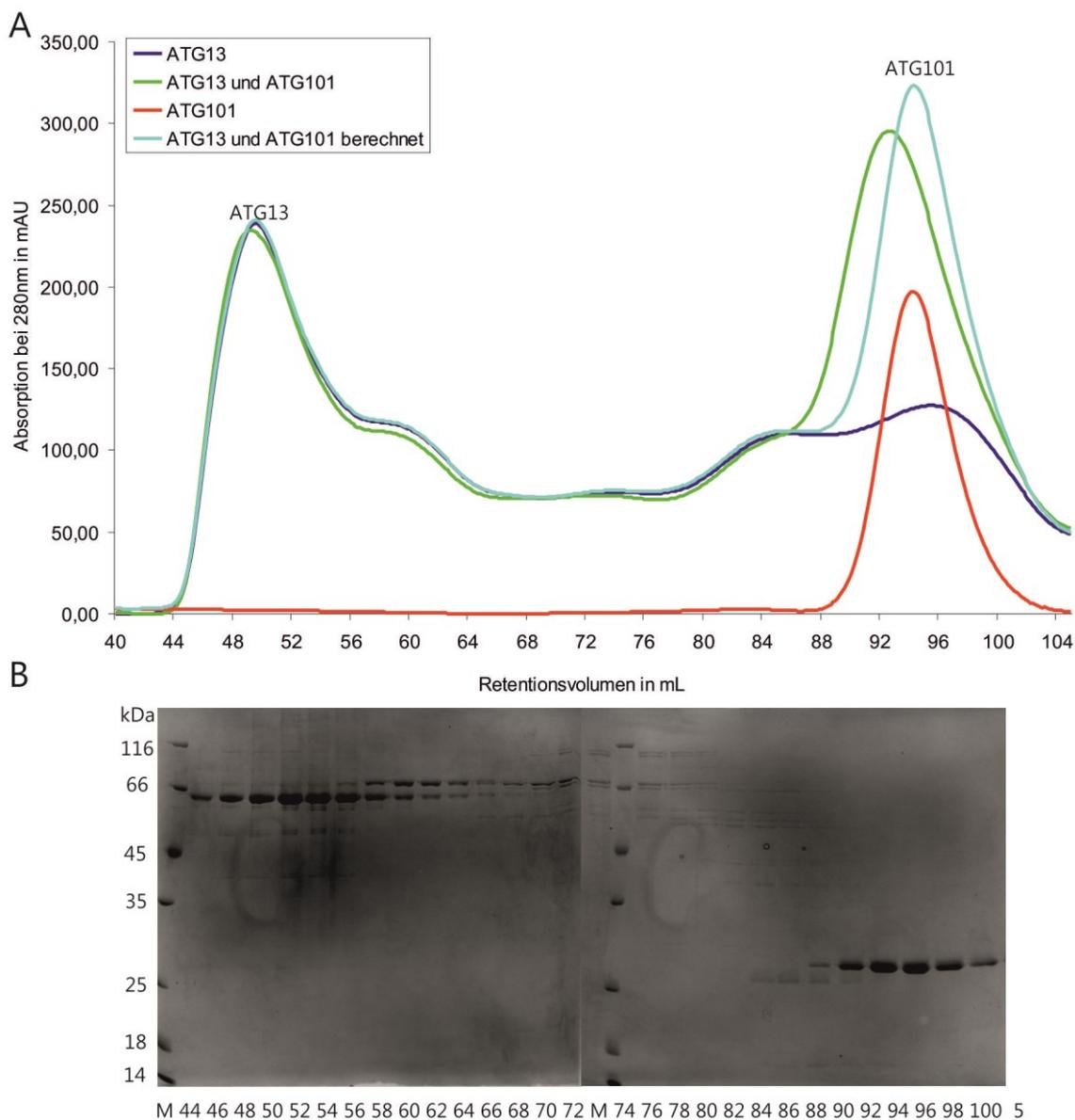
**Abb. 19: Expression von ATG13(1-198)**

Der Expressionsvektor pET15b-ATG13(1-198) wurde in kompetente BI21(DE3) pRARE2 transformiert und ATG13(1-198) wurde exprimiert. Jede Stunde nach der Induktion wurde eine Probe entnommen und auf eine identische OD600 normiert. Ein Protein entsprechend einer Größe zwischen 25 kDa und 35 kDa wurde induziert.

### 3.10 Komplexbildung von ATG101 mit ATG13

Die Interaktion von ATG101 mit ATG13 wurde mittels Koexpression und Koimmunopräzipitation bereits nachgewiesen (Behrends et al., 2010, Hosokawa et al., 2009, Mercer et al., 2009). Die molekularen Details dieser Bindung blieben allerdings unklar. Daher entstand der Ansatz, den Komplex aus ATG101 und ATG13 *in vitro* zu generieren und als Komplex zu reinigen. Hierfür wurde in 6L LB-Medium Vollängen-ATG13 (Isoform 2) als Fusionsprotein mit einem His-Tag in Bakterien löslich überexprimiert, über eine IMAC mit NiNTA zu 60 % angereichert und über Gelfiltration weiter gereinigt. Final wurden so 8 mg ATG13 gereinigt und für Interaktionsversuche mit ATG101 benutzt. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde ATG13 sowohl mit als auch ohne ATG101 einer Größenausschluss-Chromatographie in PBS auf einer Superdex200 16/600 Säule zugeführt. Während ATG13 hauptsächlich bei 49 ml eluiert wurde, war in Anwesenheit von ATG101 keine Verschiebung zu beobachten. Dagegen wurde eine Verschiebung von ATG101 in Anwesenheit von ATG13 gegenüber unkomplexierten ATG101 in Richtung eines größeren hydrodynamischen Radius ge-

sehen. Allerdings wurde in den Fraktionen, in denen ATG13 eluierte, kein ATG101 nachgewiesen (Abb. 20). Die Identität von ATG13 selbst wurde in einem Western-Blot verifiziert (Daten nicht gezeigt).

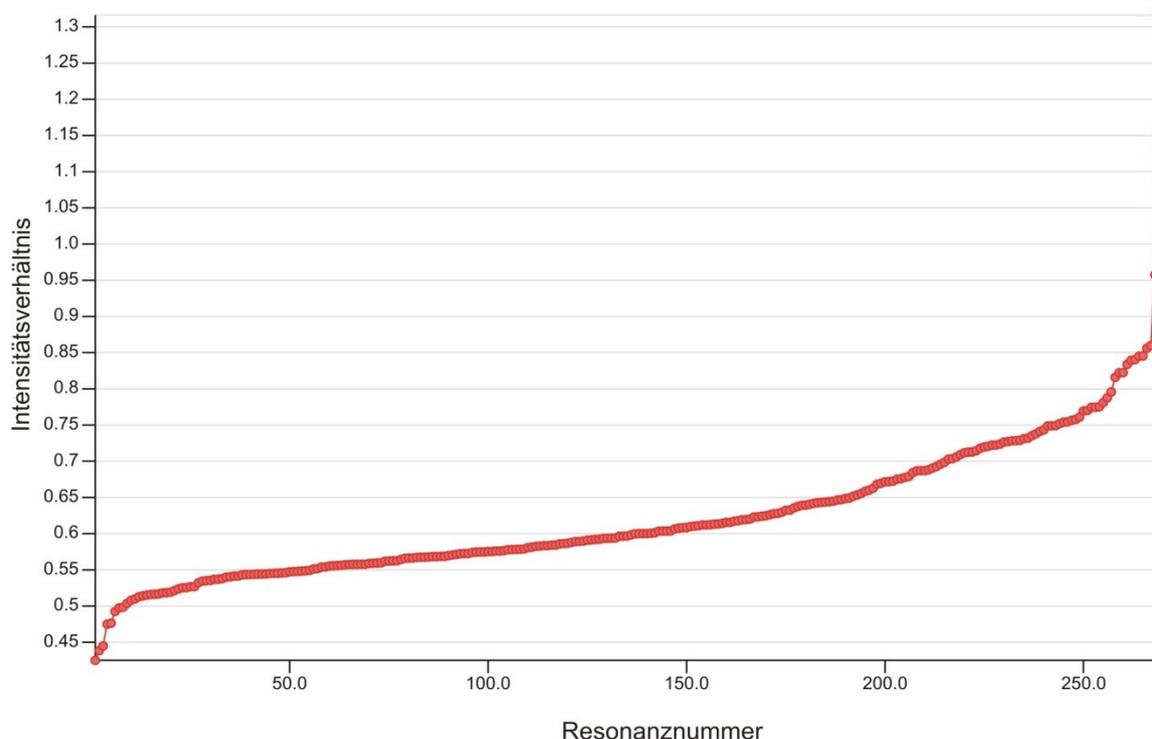


**Abb. 20: Interaktion von ATG101 und ATG13**

- A) Elutionsprofil auf Superdex200 16/600 in PBS von ATG13 allein (blau); ATG101 (rot); Gemisch aus ATG101 und ATG13 (grün); Summation der Einzelchromatogramme von ATG101 und ATG13 (türkis)
- B) Coomassie-gefärbte SDS-PAGE von Einzelfractionen aus A) (grün)

Für die Untersuchung der Interaktion von ATG101 mit ATG13 mittels NMR wurde  $^{15}\text{N}$ -ATG101 in Anwesenheit von ATG13 in einem  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  BT-Spektrum mit  $^{15}\text{N}$ -ATG101 verglichen, die Quotienten aus den einander entsprechenden Intensitäten gebildet und

der Größe nach sortiert. Dabei zeigt die Kurve deutliche Abweichungen vom horizontalen Verlauf, was auf eine schwache Interaktion hindeutet (Abb. 21).



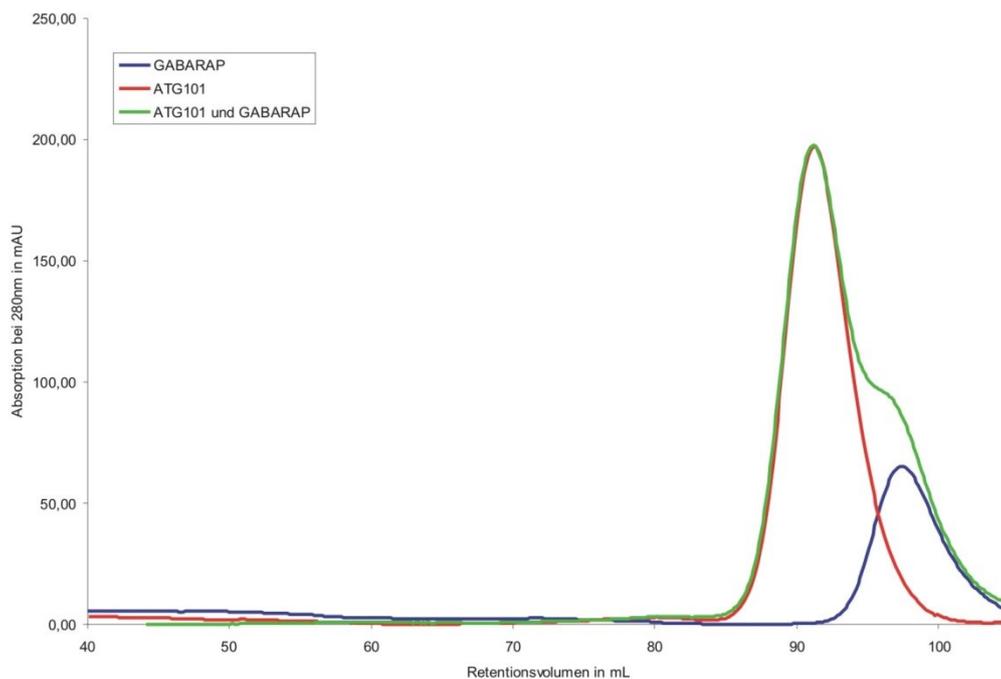
**Abb. 21: Untersuchung der Interaktion von ATG13 mit  $^{15}\text{N}$ -ATG101 mittels NMR**

Die Quotienten der Linienintensitäten einander entsprechender Linien im  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  BT-Spektrum vor und nach Zugabe von ATG13 zu  $^{15}\text{N}$ -ATG101 wurden gebildet und der Größe nach sortiert.

### 3.11 Interaktion von ATG101 mit GABARAP

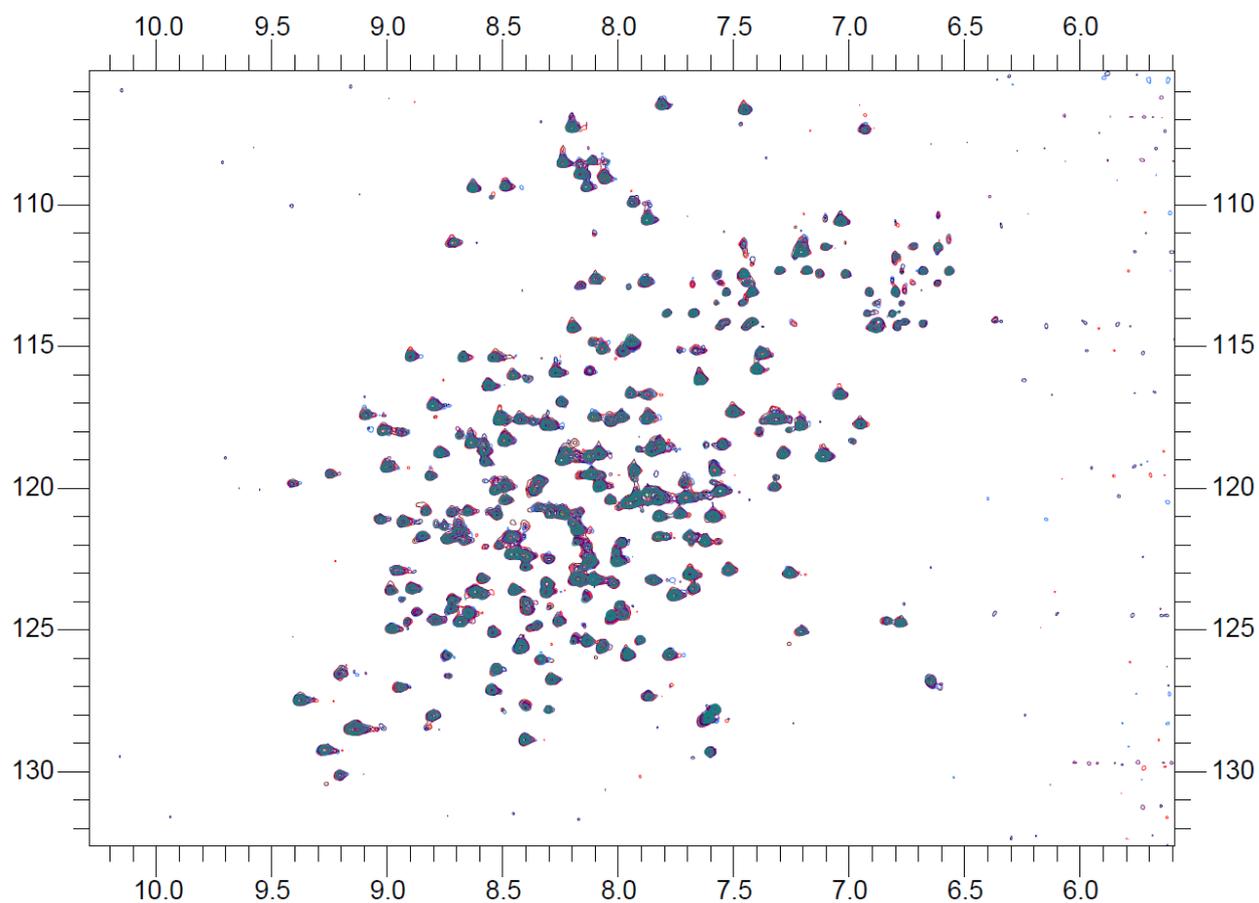
GABARAP interagiert mit einer Vielzahl von Autophagie-assoziierten Proteinen. Laut einer Analyse auf dem I-LIR-Server (Kalvari et al., 2014) enthält ATG101 ein WxxL-ähnliches Motiv in der Region Ile60-Val65. Ob ATG101 einen stabilen Komplex mit GABARAP herstellt, wurde mit Größenausschlusschromatographie überprüft. Hierfür wurde GABARAP gereinigt (Coyle et al., 2002). Wenn ATG101 und GABARAP äquimolar miteinander eine Stunde bei RT inkubiert und mit einer Größenausschlusschromatographie auf einer Superdex200 16/600 Säule untersucht wurden, eluierten beide Proteine bei dem gleichen Retentionsvolumen wie die einzelnen Proteine (Abb.

22). Da hierbei keine signifikante Verschiebung festzustellen war, wurde versucht die Stärke einer evtl. vorhandenen Bindung mit SPR zu untersuchen. Es wurde eine sehr starke Wechselwirkung mit der Matrix sowohl von GABARAP als auch von ATG101 festgestellt (Daten nicht gezeigt). Daher wurde versucht, möglicherweise interagierende Aminosäuren von ATG101 mit NMR zu identifizieren (Abb. 23). Es konnten einige konzentrationsabhängige Verschiebungen von ATG101-Resonanzen beobachtet werden.



**Abb. 22: Interaktion von ATG101 und GABARAP**

Dargestellt ist das Elutionsprofil in PBS von GABARAP allein (blau), ATG101 (rot), 1 h bei RT inkubiertem Gemisch aus ATG101 und GABARAP (grün) im kompletten Auflösungsgebiet einer Superdex200 16/600.



**Abb. 23: Titration von ATG101 mit GABARAP**

Dargestellt ist die Überlagerung von sechs  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  BT-Spektren einer Titration von  $^{15}\text{N}$ - ATG101 mit GABARAP (türkis 1:0.25, violett 1:0.5, blau 1:0.75, orange 1:1, pink 1:1.5, rot 1:2).

## 4. Diskussion

### 4.1 Expression und Reinigung von ATG101

Laut der Sekundärstrukturvorhersage (Abb.2) weist ATG101 zahlreiche Sekundärstrukturelemente und keine größeren ungeordneten Bereiche auf. Ungeordnete Bereiche sind häufig Ausgangspunkt von Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen während ihrer rekombinanten Expression (Fink, 1998). Trotz der Sekundärstrukturvorhersage, in der das Protein größtenteils gefaltet erscheint, erwies sich die Überexpression von löslichem ATG101 als eine Herausforderung, da das Protein initial nur in kleinen Mengen von 50-100 µg pro Liter Medium bei sehr langsamer Expression (18-48 h je nach Medium; 15 °C; 50 µM IPTG) löslich produziert und gereinigt werden konnte (Abb. 3A und Abb. 4). Die Identität des Tag-los exprimierten ATG101-Proteins wurde während der Optimierung der löslichen Expression mit einem Primärantikörper gegen ATG101 in einem Western-Blot (Abb. 3B) gezeigt. Als weitere Herausforderung wurde die Degradation von ATG101 über eine Zeitskala von einigen Tagen beobachtet. Solche Bedingungen sind für biophysikalische Untersuchungen ungünstig, insbesondere, wenn es die Strukturlösung mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie geht. Ein wesentlicher Faktor, der die Degradation des nativ exprimierten ATG101-Proteins erklären könnte, war die finale Reinheit von nur 70 %-80 % (Abb. 4). Die Reinheit konnte hier nicht weiter gesteigert werden, da das ATG101 nicht über Affinitäts-Tags verfügte. Die Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie versagte ebenfalls, da das Protein nur noch mit denaturierenden Agentien von der Matrix eluiert werden konnte. Dieser Charakter, mit hydrophoben Gruppen zu interagieren, zeigte sich auch, als hochauflösende Ionenaustauschmatrices verwendet wurden, wie RESOURCE Q oder MONO Q. Das Matrixmaterial besteht hier aus einer Mischung aus Polystyrol und Divinylbenzol. Der Verdacht bestand, dass möglicherweise auf der ATG101-Proteinoberfläche hydrophobe Bereiche exponiert sind, die sehr stark mit hydrophoben Gruppen oder Oberflächen unspezifisch reagieren und somit eine Reinigung über diese Methoden verhinderten.

Um Ertrag und Reinheit zu erhöhen, wurde ATG101 in N-terminaler Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert und gereinigt. Nach Abspaltung der GST konnte

zwar die Ausbeute auf 300-500 µg/l Expressionsmedium gesteigert werden, doch das Degradationsproblem bestand weiterhin. Auch die Zugabe von Proteaseinhibitoren und EDTA zeigte keinerlei Wirkung. Daher wurde ein Protokoll entwickelt, indem das ATG101 mithilfe des pET11a-Vektors Tag-los massiv in Einschlusskörperchen hergestellt und durch eine denaturierende Größenausschlusschromatographie vorgereinigt wurde. Diese Art der Vorreinigung erhöhte den darauf folgenden Rückfaltungserfolg von 1 - 2 %, wenn die 90 % reinen Einschlusskörperchen denaturiert und direkt rückgefaltet wurden, auf bis zu 20 % - 30 %, wenn das eingesetzte Material durch die denaturierende Größenausschluss-Chromatographie auf 98 % Reinheit gebracht wurde (Abb. 5A,C). Nach der Rückfaltung durch schnelle Verdünnung in das zehnfache Volumen eines nicht denaturierenden Puffers wurde eine Ionenaustauschchromatographie benutzt, um zum Einen die Konzentration von ATG101 zu erhöhen und zum Anderen die Reinheit weiter zu steigern. Eine finale Größenausschlusschromatographie stellte schließlich die monodisperse Eigenschaft des Proteins sicher. Hier wurde jeweils unabhängig von der Auftragsmenge (zwischen 1 und 14 mg) ATG101 bei einem Retentionsvolumen von 70 ml eluiert. Dieses Retentionsvolumen spricht auf einer Superdex75-Säule für ein Monomer, ein entsprechendes Dimer bei 50 kDa würde auf dieser Säule nahe dem Ausschussvolumen bei 42 ml eluieren (Abb. 6). Elutionspeaks in dem Bereich dem Ausschussvolumen konnten in keiner der wiederholt durchgeführten Reinigungen festgestellt werden.

Das Seleno-L-Methionin-derivatisierte-ATG101-Protein wurde direkt über die denaturierende Reinigung hergestellt. Der Nachweis der Inkorporation von Seleno-L-Methionin in das ATG101-Protein wurde zu allererst mit einem Peptidmassenfingerprint (Abb. 14) erbracht, hier wurde die Identität auch von dem underivatisierten ATG101 sichergestellt, das als Vergleich diente.

## 4.2 Nativ exprimiertes *versus* rückgefaltetes ATG101

Eine wesentliche Eigenschaft rückgefalteter Proteine ist, dass ihr Faltungszustand nicht immer der nativen Konformation entspricht, denn bei einer Rückfaltung unter Laborbedingungen entstehen oft verschiedene zufällig gefaltete Zustände (Priya et al., 2013). Diese Bedingungen entsprechen jedoch nicht dem Milieu, dem das Protein bei

einer Faltung in der Zelle ausgesetzt ist. Der gefaltete Zustand eines rückgefalteten Proteins kann der biologisch aktiven und nativen Konformation entsprechen, muss es aber nicht, da auch fehlgefaltetes Protein löslich vorliegen kann (Natalello et al., 2013). Um zu überprüfen, ob das vorliegende rückgefaltete ATG101 eine native Konformation aufweist, wurde das native ATG101-Protein hergestellt (Abb. 4) und mit dem rückgefalteten ATG101 zuerst mittels biophysikalischen Methoden verglichen. In der dynamischen Lichtstreuung konnte in der nativen und der rückgefalteten ATG101-Probe jeweils eine Größenspezies identifiziert werden (Abb. 8), zusätzlich wurde in der nativen ATG101-Probe eine weitere deutlich größere Spezies identifiziert. Möglicherweise sind dies die Verunreinigungen der nativen Probe, die in Abb. 4 zu sehen sind. In der DLS wird bei der Berechnung des hydrodynamischen Radius von einem Kugelmodell des Proteins ausgegangen. Auf den hydrodynamischen Radius haben jedoch Faktoren wie Form des Proteins und flexible Bereiche starken Einfluss. Je stärker ein Protein von der idealen Kugelform abweicht und je mehr und längere flexible Regionen ein Protein aufweist, desto größer kann der Hydrodynamische Radius werden. ATG101 weicht von der idealen Kugelform (Abb. 16) ab und besitzt flexible Bereiche (Abb. 18). In der Summe könnte dies den abweichenden hydrodynamischen Radius von 3.4 nm versus erwarteten 2.5 nm für ein 25 kDa Protein erklären. Mit der CD-Spektroskopie kann der Anteil an Sekundärstrukturelementen geschätzt werden. Auch hierbei verhielten sich beide Proben sehr ähnlich (Abb. 8 B und C und Tab. 17). Trotz gleicher Anteile an Sekundärstrukturelementen in nativer und rückgefalteter Version des Proteins könnte es grundlegende Anordnungsunterschiede der Sekundärstrukturelemente zueinander geben, daher wurden die ressourcenintensiveren Methoden der Magnetischen Kernresonanzspektroskopie angewendet. Die Spektren beider Proteine konnten vollständig zur Deckung gebracht werden. Bei der nativen Konformation konnten zusätzliche schwache Linien beobachtet werden, welche mit der geringeren Reinheit des nativ gereinigten ATG101 erklärt werden können. Diese Ergebnisse beweisen, dass das rückgefaltete ATG101-Protein dieselbe Konformation aufweist wie das native ATG101. Dies bezeugt auch die Tatsache, dass die initialen Kristallisationsbedingungen des nativen ATG101 verwendet werden konnten, um rückgefaltetes ATG101 zu kristallisieren. Um zu überprüfen, ob das Seleno-L-Methionin-derivatisierte-ATG101 grundsätzlich die gleiche Struktur wie das nicht derivatisierte ATG101 aufweist, wurde ebenfalls ein NMR-Experiment durchgeführt. Hier wurde während der Expression in  $^{15}\text{N}$ -haltigem M9-Medium mit dem Methionin-

auxotrophen Bakterienstamm B834 Seleno-L-Methionin hinzugegeben. Erwartungsgemäß fehlen im NMR-Spektrum die Linien für die Methionine, in und einige Linien wiesen leichte Verschiebungen gegenüber dem nicht derivatisierten ATG101 auf. Höchstwahrscheinlich gehören diese Linien zu Aminosäuren, die sich in der näheren Umgebung der Seleno-L-Methionine aufhalten (Abb. 12).

### 4.3 Kristallisation von ATG101

Die Kristallisation von ATG101 konnte bereits nach einem Tag Inkubation mit einem kommerziell erhältlichen Screen beobachtet werden. Die entstehenden Kristalle waren jedoch Bündel aus Nadeln, die für die Röntgenkristallographie nicht geeignet waren. Daher wurde die Protein- und Präzipitationsmittelkonzentration reduziert. Durch Verwendung des reineren rückgefalteten ATG101 schienen die Kristalle für Röntgendiffraktion günstigere Eigenschaften aufzuweisen. Der Wechsel aus dem kleinen *Sitting-drop*-Ansatz auf den präparativen *Hanging-drop*-Ansatz war ohne erneutes *Screening* möglich.

Die Kristallisation konnte unter einer Vielzahl von Bedingungen in einem weiten pH-Bereich (5.6–7.0) und PEG400-PEG20000 in der Kristallisationslösung erzielt werden. Das Wachstum der Kristalle ausgehend von Nadeln oder Stäbchen konnte dadurch in Richtung Plättchen optimiert werden. Diverse PEG-Varianten wurden verwendet, um eine Kristallisationslösung zu finden, die auch als Frostschutzpuffer benutzt werden konnte, was in der Regel weniger Belastung für die Kristalle und bessere Röntgendiffraktion bedeutet, wenn die Kristalle in dieser Lösung schockgekühlt werden. Hier zeigte sich allerdings, dass die Kristalle, die in solchen Kristallisationslösungen gewachsen waren, deutlich schlechtere Diffraktionseigenschaften aufwiesen. Für Kristallisationsansätze, die mit PEG-haltigen Lösungen angesetzt werden, wird mit einem Gleichgewicht des Dampfdruckes zwischen Kristallisationsansatz und Reservoir in aller Regel erst nach zwei bis drei Wochen zu rechnen sein. (Luft and DeTitta, 1995). Die Tatsache, dass die Kristalle schon nach einigen Tagen erschienen und dann im Verlauf wieder verschwanden, zeigt dass die Kristalle in einer gegenüber der Reservoir-Lösung äquilibrierten Kristallisationslösung nicht stabil waren. Dies machte das Abpassen eines geeigneten Zeitfensters zur Präparation der Kristalle notwendig. Dies

erklärt auch die Empfindlichkeit der Kristalle gegenüber der PEG-Molekülgröße, da die einzelnen PEG-Arten unterschiedlich starke Dampfdruckerniedrigung über den Lösungen vermitteln und damit unterschiedlich schnell ablaufende Kristallisationen begünstigen.

Die Kristallisation des Seleno-L-Methionin-derivatisierten-ATG101-Proteins bereitete anfangs Probleme, da das Protein eher zur Aggregation neigte. Dies konnte mit dem Einsatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol unterbunden werden. Interessanterweise konnte durch  $\beta$ -Mercaptoethanol die Kristallisation auch des underivatisierten ATG101 positiv beeinflusst werden. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte in der oberflächennahen Exposition aller Cysteine bestehen. Zum Anderen stehen sich die Schwefelatome der Methionine Met21 und Met97 innerhalb des Moleküls gegenüber; im Falle des Seleno-L-Methionin-Derivates sind an dieser Position Selenatome zu finden, die größer als Schwefelatome und anfälliger für Oxidation sind (Shepherd and Huber, 1969). Werden diese Selen-Atome oxidiert, kommt zusätzlich ein Sauerstoffatom in den begrenzten intramolekularen Raum und das ATG101 Molekül wird möglicherweise intrinsisch destabilisiert. Auch könnten die übrigen hydrophoberen Seleno-L-Methionine in ihrer oxidierten Form zu stärkeren intermolekularen Wechselwirkungen führen (Pieper et al., 1997).

#### 4.4 Analyse von ATG101-Diffraktionsdaten

Bei der Röntgenstrukturanalyse sowohl der nicht derivatisierten Kristalle als auch der Seleno-L-Methionin-Derivate hat sich herausgestellt, dass die Diffraktionsqualität in einer reziproken Raumrichtung deutlich vermindert war. Optisch zeigte sich dies durch Ausschmieren der Beugungssignale auf dem Detektor. Bei Verwendung einer isotropen Auflösungsgrenze in der Datenauswertung kann dies zur Einbeziehung vieler falsch gemessener Daten führen. Eine anisotrope Beschneidung der Daten mit dem *UCLA MBI Diffraction Anisotropy Server* führte zu einer deutlich verbesserten Integrations- und Verfeinerungsstatistik. Das resultierende ATG101 Modell zuverlässiger sein, da es nicht mehr die degenerierten Daten mit einbezieht.

Bei der profilbasierten Suche über PHYRE2 nach geeigneten Modellen für eine Strukturlösung von ATG101 mittels molekularem Ersatz wurden Ähnlichkeiten zu diversen

Modellen gefunden (PDB ID: 1GO4, 2V64, 3ABD, 4AEZ). Diese Domänen können in ihrer 3D-Struktur nahezu zur Deckung gebracht werden. Das Scheitern der Strukturlösung mittels molekularem Ersatz kann diverse Gründe haben: so erfordert diese Methode mindestens 25 % Sequenzidentität und eine maximale durchschnittliche Abweichung der Atompositionen von 2 Å. Des Weiteren kann die anisotrope Auflösung der Daten ein Problem für die Software dargestellt haben. Wie es sich später herausgestellt hat enthalten die Suchmodelle von (PDB ID: 1GO4, 2V64, 3ABD, 4AEZ) eine Konformation (s.u.) des Proteins, welche nicht dem ATG101 Modell entspricht. Auch die Summe dieser Faktoren kann das Scheitern von molekularem Ersatz bewirkt haben.

Die ATG101-Struktur wurde unabhängig davon *ab initio* mittels Selen-SAD gelöst und zeigt deutliche Ähnlichkeit mit den in PHYRE2 vorgeschlagenen Modellen. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei ATG101 um ein HORMA-Domänen-Protein handelt. Die HORMA-Domänen-3D-Struktur kann als ein Sandwich mit einem Kern von drei im Winkel nebeneinander angeordneten  $\alpha$ -Helices aufgefasst werden, die auf einer Seite von einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt aus 4-5  $\beta$ -Strängen und auf der anderen Seite aus einem Faltblatt aus 2  $\beta$ -Strängen umschlossen werden. HORMA-Domänen wurden ursprünglich in Chromatin-assoziierten Proteinen gefunden, dort fungieren sie als Adapter in der Signalkette des *spindle assembly checkpoints* der Mitose (Aravind and Koonin, 1998). Erst neuere Untersuchungen (Muniyappa et al., 2014) zeigen abweichend dazu, dass HORMA-Domänen-haltige Proteine, hier das zu dem humanen ATG13 homologe Hefeprotein aus *Lachancea thermotolerans*, als Phosphorylierungssensoren während der Autophagie dienen könnten (Jao et al., 2013). Eine Interaktion von ATG13 mit Chromatin ist dabei erwartungsgemäß nicht nachgewiesen worden.

## 4.5 ATG101 ist in der offenen Konformation fixiert

Das humane ATG13 bindet nach (Mercer et al., 2009, Hosokawa et al., 2009, Liang et al., 2012) an ATG101 und wird dadurch stabilisiert. Da sowohl ATG101 als auch ATG13 eine HORMA-Domänen-Struktur aufweisen, besteht der Verdacht, dass sich diese analog zu dem beschriebenen Mad2-Dimer verhalten.

Ein Dimer aus Mad2-Proteinen kann entweder aus einer offenen/geschlossenen Konformation (PDB ID: 2V64) (Mapelli et al., 2007) oder einer geschlossenen/geschlossenen Konformation (PDB ID: 1GO4) (Sironi et al., 2002) bestehen. Dabei ist festzuhalten, dass die offene Konformation auch als Monomer vorliegen kann (PDB ID: 1DUJ) (Luo et al., 2000, Fang et al., 1998). Der wesentliche Unterschied zwischen geschlossener und offener Konformation von Mad2 ist, dass in der offenen Konformation sich die  $\beta$ -Stränge 5 und 6 am Strang 4 anlagern, was die Flexibilität einer 20 AS langen Schleife (AS157-AS177) zwischen Strang 4 und 5 ermöglicht. In der geschlossenen Konformation wird der verkürzte N-terminale  $\beta$ -Strang 1 durch die beiden C-terminalen  $\beta$ -Stränge 5 und 6 verdrängt und die flexible Schleife überspannt wie ein Sicherheitsgurt (*safety belt*) das  $\beta$ -Faltblatt. Dabei wird ein Interaktionspartner, in z.B. Mad1, an der ehemaligen C-terminalen Position fest eingespannt. Durch eine homo-Dimerisierung des Mad1 aufgrund einer Coiled Coil Domäne mit einem anderen Mad1 Molekül, das an einem Mad2 assoziiert ist, bringt es zwei Mad2 Proteine in räumliche Nähe (Sironi et al., 2002). Bemerkenswerterweise ist bislang keine reine offene Konformation von Wildtyp-Mad2 strukturell charakterisiert worden, da sie offenbar äußerst dynamisch ist und das Protein nach bakterieller Expression als Oligomer vorliegt. Ein Monomer konnte aber durch Entfernen der 10 N- oder C-terminalen Aminosäuren begünstigt werden (Fang et al., 1998). Möglicherweise wird der am  $\beta$ -Faltblatt lokalisierte  $\beta$ -Strang 1 dadurch, dass er verkürzt ist, leichter vom den beiden längeren C-terminalen  $\beta$ -Strängen verdrängt, was eine geschlossene Konformation zur Folge hat.

Das ATG101-Protein entspricht der offenen Konformation von Mad2 (Abb. 15 und Abb. 24) und könnte sogar in dieser Position eingerastet sein. So scheint der N-Terminus ( $\beta$ -Strang 1) von Helix C fest umschlossen zu sein und interagiert mit einer Vielzahl an Wechselwirkungen an benachbarte Sekundärstrukturelemente. Analog zur Deletionsmutante von Mad2, in der die AS 109-118 durch Gly-Ser-Gly ersetzt sind, ist die  $\alpha$ -Helix C in ATG101 von sich aus mit einer gleich langen Schleife verbunden. In C-Mad2 enthält dieser Bereich eine kleine Helix C' (AS 108-112 vgl. PDB ID: 1GO4), die eine Verschiebung und Rotation der großen Helix C ermöglicht, wodurch eine hydrophobe Fläche zum Anlagern von  $\beta$ -Strang 5 und 6 geschaffen wird, und damit den relativ kurzen N-Terminus von O-Mad2 von seiner Position an  $\beta$ -Strang 3 verdrängt. (Superposition von O-Mad2 und C-Mad2 aus 2V64, nicht gezeigt). In ATG101 geht  $\beta$ -Strang 1 über einen doppelt so langen Abschnitt (10 AS vs. 5 AS in Mad2) mit  $\beta$ -

Strang 3 Wasserstoffbrücken ein, auf der anderen Seite ist er durch eine Wasserstoffbrücken der Kopfgruppen von Glu6 und Arg161 und eine Wasserstoffbrücke der Carboxylgruppe von Glu9 mit Lys151 und hydrophoben Wechselwirkungen von Leu8, Val10 und Val12, zum hydrophoben Kern hin stabilisiert. Eine Verdrängung durch C-terminale  $\beta$ -Stränge scheint hier energetisch ungünstig zu sein. Außerdem ist in ATG101 nur ein C-terminaler  $\beta$ -Strang 5 vorhanden, der mit Strang 4 durch eine kurze  $\beta$ -Schleife (AS 198-201) verbunden ist. Dies sollte eine Mobilisierung der  $\beta$ -Stränge, wie sie in Mad2 beobachtet wurde, nahezu unmöglich machen. Die Konversion der offenen in die geschlossene Konformation von Mad2 wurde bei 30 °C nach 9 h in (Luo et al., 2004) bei verschiedenen pH-Werten beschrieben. Dabei sollte der  $\alpha$ -helicale Anteil steigen und der  $\beta$ -Strang Anteil zurückgehen. Hier konnte mittels CD Spektroskopie über 24 h bei 30 °C keine derartige Konversion von ATG101 nachgewiesen werden (Abb. 9). Auch konnten keine Veränderungen in den [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] BT-Daten, die vor und nach einer 3D-Aufnahme bei 30 °C für 72 h – 96 h gemessen wurden, gesehen werden. Beide [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] BT-Spektren waren vollständig deckungsgleich. Dies spricht abermals für eine stabilisierte offene Konformation von ATG101 (Daten nicht gezeigt).

Trotz der Tatsache, dass die offene Konformation in Mad2 kein Dimer eingeht, konnte gesehen werden, dass das *C.elegans* ATG101 dimerisiert (Hegedus et al., 2014); eine Aussage, ob *C.elegans* ATG101 dabei in offener oder geschlossener Konformation vorliegt, konnte innerhalb ihrer bioinformatischen Analysen nicht getroffen werden. Ein Dimer von huATG101 in Lösung konnte innerhalb dieser Arbeit nicht beobachtet werden (Abb. 4 und Abb. 6), nichtsdestotrotz deutet die Kristallstruktur auf zwei in der Lösung bestehende Dimere hin (Abb. 17), welche unter bestimmten Bedingungen, wie im Falle von C-Mad2 durch eine Interaktion mit einem noch nicht exakt identifizierten Protein, entstehen könnten. Diese beiden Dimere werden durch PISA (Krissinel and Henrick, 2007) als ein stabiles und ein möglicherweise stabiles Dimer eingestuft. Da aber ATG101 unter verschiedenen pHs (6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 8.8) stets als Monomer von der Superdex75 Säule eluiert ist, können die relativ engen Kontakte das Ergebnis der Kristallisation sein und nicht diesen Charakter in Lösung haben. Mad2 wurde als Heterotetramer aus Mad2 und Mad1 in der geschlossenen Konformation kristallisiert. Dabei interagiert der für die geschlossene Konformation typische Bereich, in dem der *safety-belt* anzutreffen ist, mit einem gestreckten Bereich des Interaktionspartners (PDB ID 1GO4). Sobald die ATG101 Struktur in das geschlossene-Mad2 scheinbare

Dimer superpositioniert wird (Daten nicht gezeigt), zeigt sich, dass die höchst-flexible Schleife um Position 110 (Abb. 18), die die  $\beta$ -Stränge 2 und 3 miteinander verbindet, in die Nähe zur 110er-Schleife des Dimerpartners kommt. Dies kann entweder eine sterische Hinderung eines Dimers hervorrufen oder aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäuren Trp110, Pro111 und Phe112 zu einer Verstärkung führen. Für Letzteres müsste es aber einen Interaktionspartner geben, der dem Mad1 in dem geschlossenen Mad2-Heterotetramer entspricht oder eine geschlossene Konformation auf eine noch nicht beschriebene Weise in ATG101 induziert.

Sofern ein Dimer in offener Konformation von ATG101 stabilisiert wird, das dem Modell in Abb. 17A entspricht, so fällt auf, dass sich eine planare Fläche zwischen der hydrophoben und flexiblen 110er-Schleife und Cys3 beider Dimerpartner aufspannt. Dabei ist festzuhalten, dass Cys3 als palmitoylierbar vorhergesagt wird (CSS-PALM (Ren et al., 2008)). Diese Fläche könnte mit einer Membran assoziieren und dort durch die Palmitoylierung und eventuell das Eintauchen der hydrophoben 110er-Schleife in die Lipiddoppelschicht fixiert werden. Dies könnte zu einer membrangebundenen Funktion und damit zu einem funktionalen Wechsel von ATG101 führen. Ausserdem erscheint das andere Dimer-Modell (Abb. 17B), welches von PISA als nicht stabil eingestuft wurde, eine Möglichkeit darzustellen wie weitere potentielle ATG101-Dimere daran binden und so eine sich verlängernde Struktur aufbauen.

## 4.6 Interaktion von ATG101 mit ATG13

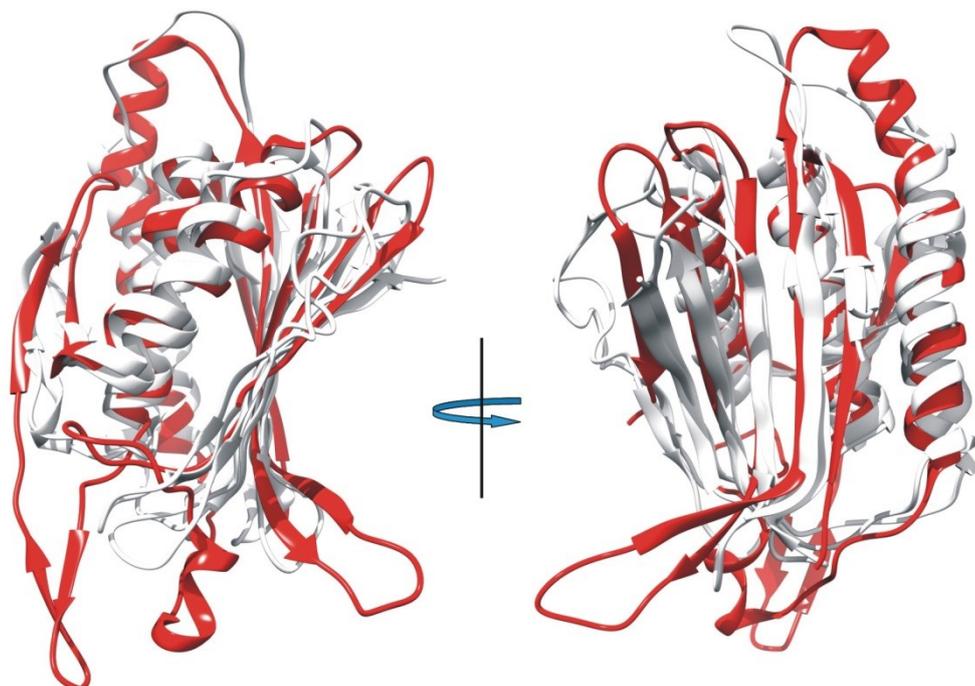
Die Tatsache, dass ATG13 in der geschlossenen Konformation (PDB ID 4J2G (Jao et al., 2013)) und ATG101 in der offenen Konformation gefaltet ist, und dass beide Proteine interagieren, (Mercer et al., 2009) führt zu der Hypothese einer Heterodimerisierung analog dem asymmetrischen Homodimer von Mad2. Um zu überprüfen, ob das humane ATG13 einen stabilen Komplex mit ATG101 generiert, wurden beide Proteine gereinigt und einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Obwohl kein stabiler Komplex erzeugt werden konnte, welcher während einer Größenausschlusschromatographie nicht dissoziiert, zeigte sich eine Verschiebung des Elutionsverhaltens von ATG101 in Anwesenheit von ATG13 (Abb. 20), das auf eine schwache Interaktion der rekombinant exprimierten Proteine hindeutet. Dies steht im Einklang mit

dem NMR-Versuch in Abb. 21. Humanes ATG13 hat aufgrund seiner globulären N-terminalen Domäne und seines 280 AS langen als ungeordnet vorhergesagten C-Terminus eine hydrodynamische Größe jenseits von 600 kDa. Dies macht NMR-Versuche damit äußerst schwierig. Falls ATG13 ATG101 bindet und damit es zu einer Linienverbreiterung kommt, wird eine Interpretation der Signale bedingt möglich. Um dem entgegenzuwirken, wurde erstmals die N-terminale globuläre Domäne von ATG13 allein exprimiert (Abb. 19). Nach einer Reinigung dieses Proteins könnte in einer NMR-Titration eine genaue Aussage über das Interaktionsverhalten gemacht werden. Auch könnte ein weiterer Versuch, um die Interaktion mittels SPR oder BLI zu charakterisieren, denn die volllängen-Proteine interagieren unspezifisch mit der Matrix. In (Hosokawa et al., 2009) wurden die beiden Proteine eukaryotisch überexprimiert und Zellextrakte einer Größenausschlusschromatographie unterzogen, dabei war ein stabiler Komplex nachweisbar. Möglicherweise sind bei der Erzeugung dieses Komplexes weitere unbekannte Faktoren/Proteine beteiligt, die nur im eukaryotischen Expressionssystem vorhanden sind. Für eine Charakterisierung dieser Bestandteile wäre eine Überexpression und Reinigung des eukaryotisch exprimierten Komplexes notwendig. Durch Massenspektrometrie könnten diese Bestandteile identifiziert und ihre biologische Bedeutung in weiteren Experimenten ergründet werden. Das Verhalten des Komplexes während und nach der Etablierung der präautophagosomalen Struktur und die kritische Bedeutung von ATG101 für die Autophagie könnte dadurch verstanden und nachvollzogen werden.

## 4.7 Interaktion von ATG101 mit GABARAP

GABARAP bindet an eine Vielzahl Autophagie assoziierter-Proteine auch mit dem ULK1 Komplex aus (ULK1(ATG1), ATG13 und FIP200, IntAct : (Kerrien et al., 2007)). Dies und die Tatsache, dass ATG101 eine potentielle LC3-interagierende Region (LIR) (AS60-AS65) aufweist (iLIR Server, (Kalvari et al., 2014)), nährt die Vermutung, dass GABARAP an der biologischen Funktion von ATG101 beteiligt sein könnte. Nachdem SPR und BLI aufgrund von unspezifischer Interaktion der Proteine mit der Matrix keine brauchbaren Ergebnisse geliefert haben, konnte in einer NMR-Titration bezüglich eine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 23). Diese muss durch weitere Titrationsreihen untersucht werden, denn bei einer ATG101:GABARAP Stöchiometrie

von 1:2 war noch keine Absättigung erkennbar, was auf eine sehr schwache Interaktion hindeutet und mit dem Ergebnis aus der Größenausschlusschromatographie (Abb. 22) und der als schwach vorhergesagten LIR korreliert. GABARAP interagiert direkt mit dem ULK1 Komplex. Eine Direkte Bindung von GABARAP an ATG101 ist möglicherweise nicht notwendig für die Funktionalität des Komplexes.



**Abb. 24: Superposition von Mad2 mit ATG101**

Dargestellt ist eine Überlagerung der offenen Konformation (weiß) von Mad2 aus PDB ID 2V64 und 1DUJ mit der Struktur von ATG101 (rot).

## 4.8 NMR-Untersuchungen an ATG101

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Zuweisung der Aminosäuren zu den jeweiligen Resonanzen im  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$  BT-Spektrum zu 70 % eindeutig durchgeführt werden. Die übrigen Resonanzen konnten zu Sequenzabschnitten zusammengeführt werden, die aber noch nicht eindeutig der Aminosäuren-Sequenz zugewiesen sind. Die Summe der Resonanzen dieser Abschnitte würde eine vollständige Zuordnung erlauben, sofern sie anhand von spezifischen Verschiebungen von  $\text{C}_\beta$  in einem Spektrum (z.B.  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$  HNcoCACB) verankert werden können. Dieses Spektrum könnte mit deuteriertem

Protein aufgenommen werden. Das Programm SPARTA versucht aufgrund bekannter Strukturen die chemischen Verschiebungen eines vorgelegten Proteins vorherzusagen. Hier wurde die Kristallstruktur von ATG101 zur Hilfe genommen, um eine Vervollständigung der Zuweisung zu erreichen, leider hatte dies keinen wesentlichen Nutzen bei der Analyse der Daten. Eine vollständige Zuweisung würde eine genauere Interpretation der Interaktion mit GABARAP oder ATG13 durch Identifikation der beteiligten Aminosäuren von ATG101 erlauben.

## 5. Zusammenfassung

Die Autophagie, im Speziellen die Makroautophagie, ist ein Adaptationsmechanismus jeder eukaryotischen Zelle und dient der Wiederverwertung von zellulären Bestandteilen, der Bereitstellung von Energie und Synthesebausteinen (z.B. Aminosäuren und Nukleinsäuren) und dem Schutz vor Pathogenen oder toxischen Makromolekülen. Viele Aspekte des Autophagie-Mechanismus sind inzwischen aufgeklärt, insbesondere dank der Studien an der Hefe *S. cerevisiae*, doch finden sich einige auffällige Unterschiede zu den Mechanismen höherer Eukaryoten wie des Menschen, insbesondere in der Initiation der Autophagie. Ein genaues Verständnis der an der Autophagie beteiligten Makromoleküle ist für die Aufklärung der Mechanismen und der damit assoziierten Krankheiten essentiell. Dieses Verständnis kann durch Erforschung der beteiligten Komponenten auf atomarer Ebene, d.h. die Bestimmung ihrer dreidimensionalen Strukturen vorangetrieben werden. Diverse Proteine der Autophagie wurden bereits strukturell untersucht. Insbesondere die für höhere Eukaryoten spezifischen Komponenten sind aber häufig unzureichend charakterisiert.

In dieser Arbeit wurde erfolgreich die Struktur von ATG101, eines essentiellen Bestandteils des für die Initiation der Autophagie verantwortlichen ULK1-Komplexes, mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt. Aus dieser Struktur lassen sich Informationen ableiten, die das Zusammenspiel einzelner Komponenten erklären und den Fortgang der Autophagie-Initiierung in höheren Eukaryoten verständlich machen. Die korrekte Konformation des rückgefalteten Proteins wurde mittels NMR-Spektroskopie validiert. Zugleich wurden bereits NMR-Daten erzeugt, die eine Strukturbestimmung in Lösung erlauben werden. Auch wurde die NMR-Spektroskopie erfolgreich eingesetzt, um Interaktionen mit ATG13 und GABARAP zu charakterisieren.

Die Einzigartigkeit der Sequenz von ATG101 im Proteom des Menschen und die Verfügbarkeit seiner 3D-Struktur machen dieses Protein zu einem attraktiven Ziel für die pharmakologische Beeinflussung der Autophagie, z.B. im Rahmen der Therapie schwerwiegender Erkrankungen wie neurodegenerativer Krankheiten und Krebs. Weitere Studien sind notwendig, um die präzise Funktion von ATG101 im ULK1-Komplex aufzuklären.

## Summary

Autophagy, in particular macroautophagy, is an adaptation mechanism of every eukaryotic cell, and serves the recycling of cellular components, the supply of energy and building blocks in the form of aminoacids or nucleotides and the protection from pathogens or toxic macromolecules. Many aspects of the autophagy mechanism are understood, mostly owing to studies in the yeast *S. cerevisiae*, but this organism differs from higher eukaryotes such as humans in various aspects, in particular in the initiation stage of autophagy. An exact understanding of the individual components involved in autophagy is essential for the clarification of the mechanisms and associated diseases. This understanding can be promoted by investigation of the respective macromolecules at atomic level, i.e. by determination of their three-dimensional structures. Various autophagy-associated proteins have been explored structurally. However, especially components specific to higher eukaryotes tend to be poorly characterized.

In this project, the structure of human ATG101, an essential autophagy component of the ULK1-complex was determined successfully by means of X-ray crystallography. From this structure, information can be derived possibly explaining the interplay of individual components and the progress of autophagy initiation in higher eukaryote. The integrity of the conformation after refolding was validated by means of 2D-NMR spectroscopy. At the same time data, was acquired which will permit structure determination in solution. In addition, NMR spectroscopy was successfully used to characterise interactions of ATG101 with ATG13 and GABARAP.

The uniqueness of the sequence of ATG101 in the human proteome and the availability of its structure make this protein an attractive target for pharmacological interference with autophagy, e.g. in the context of treatment of severe diseases like neurodegenerative illnesses and cancer. Further studies will be necessary to elucidate the precise function of ATG101 in the ULK1 complex.

## Literaturverzeichnis

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., *et al.* 2010. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**, 213-21.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-402.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. 1998. The HORMA domain: a common structural denominator in mitotic checkpoints, chromosome synapsis and DNA repair. *Trends Biochem Sci*, **23**, 284-6.
- Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P. & Harper, J. W. 2010. Network organization of the human autophagy system. *Nature*, **466**, 68-76.
- Cole, C., Barber, J. D. & Barton, G. J. 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*, **36**, W197-201.
- Coyle, J. E., Qamar, S., Rajashankar, K. R. & Nikolov, D. B. 2002. Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron*, **33**, 63-74.
- Cuervo, A. M. & Wong, E. 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*, **24**, 92-104.
- De Duve, C. 1963. The lysosome. *Sci Am*, **208**, 64-72.
- Duffy, A., Le, J., Sausville, E. & Emadi, A. 2014. Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Fang, G., Yu, H. & Kirschner, M. W. 1998. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev*, **12**, 1871-83.
- Filomeni, G., De Zio, D. & Cecconi, F. 2014 Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*.
- Fink, A. L. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des*, **3**, R9-23.

- Goldberg, A. L., Cascio, P., Saric, T. & Rock, K. L. 2002. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol*, **39**, 147-64.
- Hara, T. & Mizushima, N. 2009. Role of ULK-FIP200 complex in mammalian autophagy: FIP200, a counterpart of yeast Atg17? *Autophagy*, **5**, 85-7.
- Hegedus, K., Nagy, P., Gaspari, Z. & Juhasz, G. 2014. The putative HORMA domain protein Atg101 dimerizes and is required for starvation-induced and selective autophagy in *Drosophila*. *Biomed Res Int*, **2014**, 470482.
- Hendrickson, W. A. 1991. Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science*, **254**, 51-8.
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T. & Mizushima, N. 2009. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, **5**, 973-9.
- Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. 1996. PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci*, **5**, 212-20.
- Jao, C. C., Ragusa, M. J., Stanley, R. E. & Hurley, J. H. 2013. A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 5486-91.
- Joosten, R. P., te Beek, T. A., Krieger, E., Hekkelman, M. L., Hooft, R. W., Schneider, R., Sander, C. & Vriend, G. 2011. A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Res*, **39**, D411-9.
- Kabeya, Y., Noda, N. N., Fujioka, Y., Suzuki, K., Inagaki, F. & Ohsumi, Y. 2009. Characterization of the Atg17-Atg29-Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **389**, 612-5.
- Kabsch, W. 2010a. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**, 133-44.
- Kabsch, W. 2010b. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**, 125-32.
- Kallberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H. & Xu, J. 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc*, **7**, 1511-22.
- Kalvari, I., Tsompanis, S., Mulakkal, N. C., Osgood, R., Johansen, T., Nezis, I. P. & Promponas, V. J. 2014. iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. *Autophagy*, **10**, 913-25.

- Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, **4**, 363-71.
- Kerrien, S., Alam-Faruque, Y., Aranda, B., Bancarz, I., Bridge, A., Derow, C., Dimmer, E., Feuermann, M., Friedrichsen, A., Huntley, R., Kohler, C., Khadake, J., Leroy, C., Liban, A., Lieftink, C., Montecchi-Palazzi, L., *et al.* 2007. IntAct--open source resource for molecular interaction data. *Nucleic Acids Res*, **35**, D561-5.
- Klionsky, D. J. 2008. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*, **4**, 740-3.
- Klionsky, D. J. & Codogno, P. 2013. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun*, **5**, 427-33.
- Krissinel, E. & Henrick, K. 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol*, **372**, 774-97.
- Kroemer, G., Marino, G. & Levine, B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, **40**, 280-93.
- Lamark, T. & Johansen, T. 2012. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol*, **2012**, 736905.
- Lazarus, M. B., Novotny, C. J. & Shokat, K. M. 2014. Structure of the human autophagy initiating kinase ULK1 in complex with potent inhibitors. *ACS Chem Biol*.
- Levine, B. & Klionsky, D. J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, **6**, 463-77.
- Li, W. W., Li, J. & Bao, J. K. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, **69**, 1125-36.
- Liang, Q., Yang, P., Tian, E., Han, J. & Zhang, H. 2012. The *C. elegans* ATG101 homolog EPG-9 directly interacts with EPG-1/Atg13 and is essential for autophagy. *Autophagy*, **8**, 1426-33.
- Loria, J. P., Rance, M. & Palmer, A. G., 3rd 1999. Transverse-relaxation-optimized (TROSY) gradient-enhanced triple-resonance NMR spectroscopy. *J Magn Reson*, **141**, 180-4.
- Luft, J. R. & DeTitta, G. T. 1995. Chaperone salts, polyethylene glycol and rates of equilibration in vapor-diffusion crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **51**, 780-5.
- Luo, X., Fang, G., Coldiron, M., Lin, Y., Yu, H., Kirschner, M. W. & Wagner, G. 2000. Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat Struct Biol*, **7**, 224-9.

- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J. & Yu, H. 2004. The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 338-45.
- Mapelli, M., Massimiliano, L., Santaguida, S. & Musacchio, A. 2007. The Mad2 conformational dimer: structure and implications for the spindle assembly checkpoint. *Cell*, **131**, 730-43.
- Martin, D. D., Ladha, S., Ehrnhoefer, D. E. & Hayden, M. R. 2015. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends Neurosci*.
- Mercer, C. A., Kaliappan, A. & Dennis, P. B. 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, **5**, 649-62.
- Mizushima, N. & Klionsky, D. J. 2007. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, **27**, 19-40.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **27**, 107-32.
- Muniyappa, K., Kshirsagar, R. & Ghodke, I. 2014. The HORMA domain: an evolutionarily conserved domain discovered in chromatin-associated proteins, has unanticipated diverse functions. *Gene*, **545**, 194-7.
- Natalello, A., Mattoo, R. U., Priya, S., Sharma, S. K., Goloubinoff, P. & Doglia, S. M. 2013. Biophysical characterization of two different stable misfolded monomeric polypeptides that are chaperone-amenable substrates. *J Mol Biol*, **425**, 1158-71.
- Norwood, T. J., Boyd, J. & Campbell, I. D. 1989. Improved resolution in 1H-detected 1H-15N correlation experiments. *FEBS Lett*, **255**, 369-71.
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. & Wuthrich, K. 1997. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12366-71.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**, 1605-12.
- Pieper, M., Betz, M., Budisa, N., Gomis-Ruth, F. X., Bode, W. & Tschesche, H. 1997. Expression, purification, characterization, and X-ray analysis of selenomethionine 215 variant of leukocyte collagenase. *J Protein Chem*, **16**, 637-50.

- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-9.
- Priya, S., Sharma, S. K., Sood, V., Mattoo, R. U., Finka, A., Azem, A., De Los Rios, P. & Goloubinoff, P. 2013. GroEL and CCT are catalytic unfoldases mediating out-of-cage polypeptide refolding without ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 7199-204.
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y. & Yao, X. 2008. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel*, **21**, 639-44.
- Saftig, P. & Klumperman, J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 623-35.
- Salzmann, M., Pervushin, K., Wider, G., Senn, H. & Wuthrich, K. 1999. [13C]-constant-time [15N,1H]-TROSY-HNCA for sequential assignments of large proteins. *J Biomol NMR*, **14**, 85-8.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. 2006. The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: "ultra-competent" cells. *CSH Protoc*, **2006**.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Shepherd, L. & Huber, R. E. 1969. Some chemical and biochemical properties of selenomethionine. *Can J Biochem*, **47**, 877-81.
- Sillitoe, I., Cuff, A. L., Dessailly, B. H., Dawson, N. L., Furnham, N., Lee, D., Lees, J. G., Lewis, T. E., Studer, R. A., Rentzsch, R., Yeats, C., Thornton, J. M. & Orengo, C. A. 2013. New functional families (FunFams) in CATH to improve the mapping of conserved functional sites to 3D structures. *Nucleic Acids Res*, **41**, D490-8.
- Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De Antoni, A., Jeang, K. T. & Musacchio, A. 2002. Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *Embo J*, **21**, 2496-506.
- Solyom, Z., Schwarten, M., Geist, L., Konrat, R., Willbold, D. & Brutscher, B. 2013. BEST-TROSY experiments for time-efficient sequential resonance assignment of large disordered proteins. *J Biomol NMR*, **55**, 311-21.
- Sosa, M. S., Bragado, P. & Aguirre-Ghiso, J. A. 2014. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*, **14**, 611-22.
- Strong, M., Sawaya, M. R., Wang, S., Phillips, M., Cascio, D. & Eisenberg, D. 2006. Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8060-5.

- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-30.
- Tan, C. C., Yu, J. T., Tan, M. S., Jiang, T., Zhu, X. C. & Tan, L. 2014. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol Aging*, **35**, 941-57.
- Vlada, C. A., Kim, J. S. & Behrns, K. E. 2015. Autophagy: Self-preservation through cannibalism of proteins and organelles. *Surgery*, **157**, 1-5.
- Whitmore, L. & Wallace, B. A. 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res*, **32**, W668-73.
- Whitmore, L. & Wallace, B. A. 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, **89**, 392-400.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., *et al.* 2011. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **67**, 235-42.
- Wu, S. & Zhang, Y. 2007. LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3375-82.
- Yan, J., Kuroyanagi, H., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Tokumitsu, H., Tomoda, T., Shirasawa, T. & Muramatsu, M. 1998. Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to *C. elegans* UNC-51. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 222-7.
- Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, **9**, 40.

## Danksagung

Ich möchte in erster Linie Oliver H. Weiergräber für die Bereitstellung des Projektes, die fachliche Hilfestellung, für seine Geduld und Unterstützung danken.

Für die hervorragende Laborausstattung und seine Unterstützung möchte ich mich sehr bei Dieter Willbold bedanken.

Für die fachliche Hilfestellung und Unterstützung möchte ich mich bei Joachim Granzin bedanken.

Für die experimentelle Durchführung der NMR-Spektroskopie möchte ich mich bei Melanie Schwarten bedanken.

Daniel Frenzel möchte ich danken für seine fachliche Unterstützung und die experimentelle Hilfestellung bei den SPR- und BLI-Analysen.

Außerdem gebührt mein Dank allen Korrekturlesern meiner Arbeit: Oliver H. Weiergräber, Eleonore Michel, Katrin Steinfort, Patricia Regenhardt und Daniel Frenzel.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinen Freunden für die emotionale Unterstützung.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, diese Arbeit selbstständig angefertigt zu haben. Es wurden nur die in der Arbeit benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommene Gedanken habe ich als solche kenntlich gemacht.

Datum, Ort Unterschrift