

NMR-spektroskopische Charakterisierung der  
Dynamik des Autophagie-relevanten Proteins  
GABARAP auf verschiedenen Zeitskalen

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

vorgelegt von  
Frau Dipl.-Phys. Christina Möller  
aus  
Kamp-Lintfort

Jülich, Dezember 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: Prof. Dr. Dieter Willbold

Koreferent: Dr. Manuel Etzkorn

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Januar 2016

# Zusammenfassung

Das 117 Aminosäuren umfassende GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP) aus *H. sapiens* ist ein Schlüsselprotein in der Autophagie. Im letzten Jahrzehnt wurde eine Vielzahl von Interaktionspartnern identifiziert, welche die Relevanz von GABARAP für Vesikeltransport und Membranfusionen in der Autophagie und Apoptose verdeutlichen. Die enzymatische Lipidierung von GABARAP ermöglicht eine Verankerung an Membranen, um so Hemifusion von Membranen durch eine Oligomerisierung von GABARAP zu vermitteln. Die Strukturbestimmung von GABARAP durch NMR und Röntgenkristallographie weist auf signifikante Konformationsänderungen hin, welche in der gesamten GABARAP/MAP1LC3/Atg8 Familie konserviert sind. Interessanterweise hat die Kristallisation unter Hochsalzbedingungen zu einer offenen, oligomeren Konformation von GABARAP geführt, in der die N-terminale Region mit der hydrophoben Bindetasche des benachbarten GABARAP-Moleküls assoziiert. Es bleibt unklar, ob diese Konformation durch die Oligomerisierung tatsächlich Membranfusionen begünstigt oder ob es sich um einen Kristallisationsartefakt handelt. Strukturelle Details, die Kinetik und Thermodynamik, sowie die funktionelle Relevanz der Konformationsänderungen von GABARAP sind bisher nur wenig verstanden.

In dieser Arbeit ist die Dynamik von GABARAP durch NMR-Spektroskopie charakterisiert worden, da diese Methode die Aufklärung von Struktur und Dynamik auf allen relevanten Zeitskalen mit atomarer Auflösung ermöglicht. Insbesondere Dynamik auf der sub-Nanosekundenzeitskala beeinflusst Spinrelaxationsraten, wohingegen Dynamik auf der Mikro- bis Millisekundenzeitskala Linienverbreiterung verursacht, die durch eine Analyse der Linienform oder Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)-Relaxationsdispersion (RD) quantifiziert werden kann. Die <sup>15</sup>N-Spinrelaxationsexperimente ergeben kleine Ordnungsparameter  $S^2$  von Aminosäureresten in den Termini und in Schleifen, die auf eine erhöhte Flexibilität auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala hindeuten. Des Weiteren liefern die Spinrelaxationsexperimente Informationen über die Hydrodynamik und zeigen, dass GABARAP unter den

---

gegebenen Bedingungen überwiegend monomer vorliegt, was durch Translationsdiffusionsexperimente bestätigt wurde.

CPMG-RD-Experimente offenbaren zwei chemische Austauschprozesse auf der Millisekundenzeitskala. Resonanzen in der N-terminalen helikalen Subdomäne, der benachbarten Schleife, sowie Teile von  $\beta_1$  und  $\beta_2$  zeigen eine Aufspaltung von Resonanzen, verursacht durch einen Austausch von zwei nahezu gleichbesetzten Zuständen auf der Zeitskala einiger Millisekunden. Im Gegensatz dazu weisen Aminosäurereste der hydrophoben Bindetasche hp2 einen schnelleren Austauschprozess mit einer Population des angeregten Zustands von nur etwa 1 % auf. Der N-terminale Austauschprozess wurde zusätzlich durch ZZ-Austauschexperimente quantifiziert, was durch die eindeutige Auflösung von Resonanzen beider austauschenden Zustände bei niedrigen Temperaturen möglich war. In der offenen Konformation von GABARAP, die unter Hochsalzbedingungen kristallisiert wurde, fehlt die Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100, welche die N-terminale helikale Subdomäne und die Ubiquitin-artige Subdomäne verknüpft. Daher wurde durch Mutation eine GABARAP-Variante erstellt, in der diese Salzbrücke nicht ausgebildet wird. Die NMR-Spektren dieser Variante weisen auf signifikante Änderungen des N-terminalen Austauschprozesses hin.

Aufgrund der enzymatischen Lipidierung von GABARAP und der damit verbundenen Membranverankerung wurde Nanodisk-verankertes GABARAP hergestellt und mittels TROSY sowie TROSY-CPMG-RD charakterisiert. Die erstmals an Nanodisks durchgeführten TROSY-CPMG-RD-Experimente weisen auf die Austauschprozesse von GABARAP auch in Anwesenheit von Membranimimetika hin.

Fluoreszenzspektroskopie, die im Rahmen einer Kooperation erfolgte, offenbart zusätzliche Dynamik auf der Mikrosekundenzeitskala, die mit großen strukturellen Änderungen der N-terminalen helikalen Subdomäne von GABARAP einhergeht.

Die Tatsache, dass GABARAP auf praktisch allen Zeitskalen dynamisch ist, verdeutlicht die Relevanz der Charakterisierung konformationeller Änderungen für das Ziel ein tieferes Verständnis von GABARAP in der Autophagie zu erlangen.

# Abstract

The 117-residue GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein (GABARAP) from *H. sapiens* is a versatile key regulator in autophagy. In the last decade, a plethora of interaction partners have been identified that reveal the indispensability of GABARAP especially in vesicle transport and fusion events in autophagy and apoptosis. To this end, GABARAP is enzymatically lipid-conjugated to allow for membrane anchoring, which has been reported to facilitate hemifusion of membranes upon oligomerization. Structure determination of GABARAP by NMR and X-ray crystallography suggested significant conformational heterogeneity that appears to be a hallmark of the GABARAP/MAP1LC3/Atg8 family. Intriguingly, crystallization under high salt conditions resulted in an alternate open and oligomeric conformation, in which the N-terminal region is associated with the hydrophobic binding pockets of the neighboring molecule. Unfortunately, it remains unclear whether this alternate conformation indeed facilitates oligomerization during membrane fusion or is merely a crystallization artifact. The structural details, kinetics and thermodynamics as well as the functional relevance of the conformational heterogeneity are still poorly understood.

In this work, the dynamics of GABARAP were studied by NMR spectroscopy, which is a powerful tool for studying structure and dynamics on virtually all time-scales at atomic resolution. In particular, sub-nanosecond dynamics determine spin relaxation rates, whereas dynamics on the micro- to millisecond time-scale causes line broadening, which can be quantified by line shape analysis or Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) relaxation dispersion (RD).

The <sup>15</sup>N spin relaxation experiments reveal high flexibility on the pico- to nanosecond time-scale for residues in the termini and loop regions indicated by low order parameters  $S^2$ . Furthermore, the NMR spin relaxation data provides information on the hydrodynamics of GABARAP and show a predominantly monomeric state, corroborated by NMR translational diffusion experiments.

CPMG RD experiments reveal two distinct conformational exchange processes on the millisecond time-scale. Specifically, resonances in the N-terminal helical subdomain,

---

the adjacent loop as well as parts of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  exhibit multiple resonances as a result of exchange on a time-scale of several milliseconds between two conformations with similar equilibrium populations. By contrast, residues lining the hydrophobic binding pocket hp2 reveal a slightly faster exchange process with an excited state population of only about 1 %. The N-terminal exchange process was additionally quantified by ZZ exchange spectroscopy, which was possible due to the presence of resonances for both exchanging states being well-resolved at low temperatures. Since the open conformation of GABARAP crystallized using high salt conditions, lacks the connecting salt bridge between the N-terminal helical subdomain and the Ubiquitin-like-subdomain, a GABARAP variant lacking the salt bridge between Lys6 and Glu100 was prepared. The NMR spectra of this variant reveal distinct changes of the N-terminal exchange process.

Due to the ability of GABARAP to be enzymatically membrane-anchored, nanodisc-anchored GABARAP was prepared and characterized using TROSY and TROSY CPMG RD experiments. The TROSY CPMG RD which were recorded for the first time at nanodiscs, suggests conserved exchange processes in GABARAP even in the membrane-mimicking environment.

In addition, fluorescence spectroscopy which was performed within the scope of a collaboration, reveals dynamics on the microsecond time-scale along with large-amplitude structural rearrangements of the N-terminal helical subdomain of GABARAP.

The fact that dynamics are prominent over virtually all time-scales emphasizes the importance of characterizing conformational exchange for achieving a deeper understanding of GABARAP in autophagy.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xii
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Autophagie . . . . .	1
1.2 Das Autophagie-relevante Protein GABARAP . . . . .	2
1.3 Nanodisks . . . . .	5
1.4 NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Dynamik von Proteinen . . . . .	6
1.5 Ziele dieser Arbeit . . . . .	11
<b>2 Material</b>	<b>13</b>
2.1 Verwendete Biochemikalien, Chemikalien und Kits . . . . .	13
2.2 Bakterienstämme und Plasmide . . . . .	14
2.3 Verwendete Geräte . . . . .	15
2.4 Chromatographien . . . . .	15
2.5 Datenbanken und Software . . . . .	16
<b>3 Methoden</b>	<b>17</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden . . . . .	17
3.1.1 Transformation von <i>E. coli</i> . . . . .	17
3.1.2 Isolierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) . . . . .	17
3.1.3 Konzentrationsbestimmung der DNA . . . . .	18
3.1.4 Ortsspezifische Mutagenese . . . . .	18
3.1.5 Sequenzierung der DNA . . . . .	18
3.2 Proteinnachweis und Konzentrationsbestimmung . . . . .	19

3.2.1	SDS-PAGE nach Laemmli . . . . .	19
3.2.2	UV/Vis-Spektroskopie . . . . .	20
3.3	Expression von GABARAP und GABARAP-Varianten . . . . .	21
3.4	Reinigung von GABARAP und GABARAP-Varianten . . . . .	23
3.5	Herstellung von GABARAP-Nanodisks . . . . .	25
3.6	Kernresonanz(NMR)-Spektroskopie . . . . .	28
3.6.1	NMR-Proben . . . . .	28
3.6.2	Aufnahme der Spektren . . . . .	29
3.6.3	Prozessierung und Auswertung der Spektren . . . . .	36
3.6.4	Resonanzzuordnung des GABARAP-Wildtyps . . . . .	36
3.6.5	Translationsdiffusion zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius . . . . .	36
3.6.5.1	Bestimmung des hydrodynamischen Radius mit Dioxan als Referenz . . . . .	36
3.6.5.2	Bestimmung des hydrodynamischen Radius mit [ $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ ]- PG-SLED-Experimenten . . . . .	38
3.6.6	Piko- bis Nanosekundendynamik . . . . .	39
3.6.6.1	Experimentelle Bestimmung von $R_1$ . . . . .	43
3.6.6.2	Experimentelle Bestimmung von $R_2$ . . . . .	44
3.6.6.3	Heteronukleare NOEs . . . . .	45
3.6.7	Mikro- bis Millisekundendynamik . . . . .	45
3.6.7.1	ZZ-Austauschexperimente . . . . .	45
3.6.7.2	Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)-Experimente . . . . .	47
3.6.7.3	Vorzeichenbestimmung von Differenzen der chemischen Verschiebung . . . . .	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
4.1	Expression und Reinigung von GABARAP . . . . .	54
4.2	Resonanzzuordnung des GABARAP-Wildtyps . . . . .	57
4.3	GABARAP-Varianten für die Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	61

4.4	Translationsdiffusion . . . . .	69
4.5	Piko- bis Nanosekundendynamik . . . . .	72
4.5.1	Analyse von $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten . . . . .	72
4.5.2	Model-free-Analyse der $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten mittels relax .	78
4.6	Mikro- bis Millisekundendynamik . . . . .	84
4.6.1	ZZ-Austausch . . . . .	84
4.6.2	CPMG-RD-Experimente . . . . .	92
4.6.2.1	CPMG-RD der $^{15}\text{N}$ -Kerne . . . . .	92
4.6.2.2	CPMG-RD der $^1\text{H}^N$ -Kerne . . . . .	103
4.6.2.3	CPMG-RD der $^{13}\text{CO}$ -Kerne . . . . .	106
4.6.2.4	Vorzeichenbestimmung von Differenzen der chemischen Verschiebung . . . . .	109
4.7	Charakterisierung von GABARAP-E100A . . . . .	111
4.8	GABARAP $\Delta$ 117/GABARAP-G116C $\Delta$ 117 . . . . .	114
4.9	GABARAP an Nanodisks . . . . .	120
4.9.1	Präparation von Nanodisk-verankertem GABARAP . . . . .	120
4.9.2	NMR-Spektroskopie von Nanodisk-verankertem GABARAP . .	124
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>129</b>
5.1	Reinigung von GABARAP ohne Fusionstag . . . . .	129
5.2	Anpassung der Resonanzzuordnung des GABARAP-Wildtyps . . . . .	130
5.3	Herstellung von GABARAP-Varianten für die Fluoreszenzspektroskopie	131
5.4	Piko- bis Nanosekundendynamik von GABARAP und GABARAP- G116C $\Delta$ 117 . . . . .	132
5.5	GABARAP liegt überwiegend als Monomer vor . . . . .	137
5.6	GABARAP unterliegt zwei verschiedenen chemischen Austauschprozessen	141
5.6.1	Das ZZ-Austauschexperiment ermöglicht die Quantifizierung des langsamen Austauschprozesses im N-Terminus von GABARAP .	141
5.6.2	Funktionelle Bedeutung des langsamen Austauschprozesses im N-Terminus von GABARAP . . . . .	143

5.6.3	CPMG-RD-Experimente eignen sich insbesondere für die Charakterisierung des schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern von GABARAP . . . . .	146
5.6.3.1	CPMG-RD-Experimente des langsameren Austauschprozesses . . . . .	146
5.6.3.2	CPMG-RD-Experimente des schnelleren Austauschprozesses . . . . .	148
5.6.4	Funktionelle Bedeutung des schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern von GABARAP . . . . .	151
5.6.5	Zusammenhang des langsameren und schnelleren Austauschprozess von GABARAP . . . . .	153
5.7	Charakterisierung von GABARAP-E100A . . . . .	154
5.8	Nanodisk-verankertes GABARAP . . . . .	156
5.8.1	Assemblierung von Nanodisk-verankertem GABARAP . . . . .	156
5.8.2	CPMG-RD-Experimente von GABARAP $\Delta$ 117 zeigen die gleichen Austauschprozesse wie das wt GABARAP . . . . .	159
5.8.3	Austauschprozesse auf der Millisekundenzeitskala existieren auch in Nanodisk-verankertem GABARAP . . . . .	160
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>163</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>165</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>180</b>
	<b>Publikationen und Präsentationen</b>	<b>183</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>185</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>199</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Modelle zur Bildung des Autophagosoms mit Hilfe von Atg8 . . . . .	2
1.2	Sequenz und Struktur von GABARAP . . . . .	3
1.3	Schematische Darstellung der Lipidierung von GABARAP . . . . .	4
1.4	Schematische Darstellung einer Nanodisk . . . . .	6
1.5	NMR-Zeitskala . . . . .	8
1.6	Linienformen bei chemischen Austausch von gleichbesetzten Zuständen	9
3.1	Maleimid-Reaktion . . . . .	26
3.2	Schematische Darstellung von CPMG-RD-NMR-Spektroskopie. . . . .	49
3.3	Schematische Abbildung von Peakshifts . . . . .	53
4.1	SDS-PAGE der Expression von GABARAP . . . . .	55
4.2	Ionenaustauschchromatographie und SDS-PAGE . . . . .	56
4.3	Größenausschlusschromatographie und SDS-PAGE . . . . .	56
4.4	[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektren von GABARAP mit 119/117 Aminosäuren . .	58
4.5	[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektrum von GABARAP bei 10 °C. . . . .	59
4.6	Ausschnitt der Konnektivität in einem 3D HNCA-Spektrum . . . . .	60
4.7	Cysteinmutationen für die Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	62
4.8	[ <sup>1</sup> H <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektren von GABARAP-V4C . . . . .	63
4.9	[ <sup>1</sup> H <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektren von GABARAP-E7C . . . . .	64
4.10	[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektren von GABARAP-K13C . . . . .	65
4.11	[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektren von GABARAP-F62C . . . . .	66
4.12	[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektren von GABARAP-E7C/E73C . . . . .	67
4.13	[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektren von GABARAP-K13C/F62C . . . . .	68
4.14	Translationsdiffusionsexperimente . . . . .	70

4.15	$^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	74
4.16	Arrheniusgraph . . . . .	75
4.17	$^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten bei 600 MHz und 900 MHz . . . . .	77
4.18	Ordnungsparameter $S^2$ . . . . .	79
4.19	Strukturelle Darstellung des Ordnungsparameters . . . . .	80
4.20	Chemischer Austausch $R_{ex}$ ermittelt durch Spinrelaxation . . . . .	80
4.21	Rotationsdiffusionstensor von GABARAP . . . . .	82
4.22	Peakaufspaltung im HSQC-Spektrum . . . . .	85
4.23	Von Peakaufspaltung betroffene Resonanzen in der Struktur . . . . .	86
4.24	Resonanzen des Multipletts von Glu8 . . . . .	87
4.25	Resonanzen des Multipletts von Glu101 bei 5 °C und 10 °C . . . . .	88
4.26	Resonanzen von Multipletts in Abhängigkeit der Mischzeit . . . . .	89
4.27	Differenzen der chemischen Verschiebung: $\Delta\omega_H$ und $\Delta\omega_N$ . . . . .	90
4.28	Differenzen der chemischen Verschiebung: $\Delta\omega_{CO}$ und $\Delta\omega_{C\alpha}$ . . . . .	91
4.29	Darstellung von $\Delta\omega$ der $^1\text{H}$ -, $^{15}\text{N}$ -, $^{13}\text{CO}$ - sowie $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne in der GABARAP-Struktur . . . . .	91
4.30	$^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven bei 25 °C. . . . .	94
4.31	Austauschprozesse in der Struktur von GABARAP . . . . .	95
4.32	$^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven von GABARAP bei Temperaturen von 15 °C bis 35 °C: Langsamer Austauschprozess . . . . .	98
4.33	$\Delta\omega_N$ des langsamen Austauschprozesses von GABARAP: CPMG vs. HSQC . . . . .	99
4.34	$^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven von GABARAP bei Temperaturen von 15 °C bis 40 °C: Schneller Austauschprozess . . . . .	100
4.35	Differenzen der chemischen Verschiebung: $\Delta\omega_N$ . . . . .	102
4.36	$^1\text{H}^N$ -CPMG-RD-Kurven . . . . .	104
4.37	Differenzen der chemischen Verschiebung: $\Delta\omega_H$ . . . . .	105
4.38	$^{13}\text{CO}$ -CPMG RD Kurven . . . . .	107
4.39	Differenzen der chemischen Verschiebung $\Delta\omega_{CO}$ . . . . .	108
4.40	Peakshifts der $^{15}\text{N}$ -Kerne . . . . .	111

4.41	HSQC-Spektrum von GABARAP und GABARAP-E100A . . . . .	112
4.42	Resonanzen GABARAP/GABARAP-E100A: Vergrößerte Ansicht . . .	113
4.43	[ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektrum von GABARAP und C-terminalen Dele- tionsvarianten . . . . .	115
4.44	Relaxationsdaten von GABARAP und GABARAP-G116CΔ117 . . . .	117
4.45	<sup>15</sup> N-CPMG-RD-Kurven von GABARAPΔ117 bei Temperaturen von 15 °C bis 35 °C . . . . .	118
4.46	Δω <sub>N</sub> von GABARAPΔ117 vs. GABARAP . . . . .	120
4.47	SDS-PAGE von lipidiertem GABARAP und Nanodisks . . . . .	121
4.48	Größenausschlusschromatographie . . . . .	122
4.49	Analytische Größenausschlusschromatographie . . . . .	123
4.50	TROSY GABARAP/Nanodisks . . . . .	124
4.51	TROSY GABARAP/Nanodisks: Tyr5 und Lys13 . . . . .	125
4.52	TROSY-CPMG-RD-Kurven in Nanodisk: Langsamer Austauschprozess	127
4.53	TROSY-CPMG-RD-Kurven in Nanodisk: Schneller Austauschprozess .	128
5.1	Ordnungsparameter S <sup>2</sup> : Vergleich verschiedener Methoden . . . . .	134
5.2	Piko- bis Nanosekundendynamik von Ile41 . . . . .	135
5.3	Fluoreszenzspektroskopie offenbart Austauschzustände mit großen Kon- formationsänderungen . . . . .	145
5.4	Strukturelle Unterschiede von GABARAP in Interaktion mit einem Lig- anden . . . . .	152
5.5	Modell: GABARAP-Oligomere induzieren Membranfusionen . . . . .	153
5.6	Sequenzhomologie von GABARAP, GATE-16, ATG8 und LC3A . . . .	155
A.1	Berechnete SSP auf Grundlage der chemischen Verschiebungen von CO- und C <sup>α</sup> -Kernen . . . . .	168
A.2	Anstieg von CPMG-RD-Kurven für ν <sub>CPMG</sub> > 1000 Hz . . . . .	171
A.3	Δω <sub>N</sub> von [U- <sup>15</sup> N, <sup>2</sup> H]-GABARAP vs. [U- <sup>15</sup> N]-GABARAP . . . . .	174
A.4	Δω <sub>N</sub> von [U- <sup>15</sup> N, <sup>13</sup> C]-GABARAP vs. [U- <sup>15</sup> N]-GABARAP . . . . .	176

# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Biochemikalien, Chemikalien und Kits . . . . .	13
2.2	Genotypen und Referenzen der verwendeten Bakterienstämme . . . . .	14
2.3	Bezeichnung, Resistenz, Eigenschaft und Referenz der Plasmide . . . . .	14
2.4	Verwendete Geräte . . . . .	15
2.5	Verwendete Chromatographiesäulen . . . . .	15
2.6	Verwendete Datenbanken und Software . . . . .	16
3.1	Verwendete Gele und Puffer zur SDS-PAGE . . . . .	20
3.2	Verwendete Puffer zur Expression von GABARAP und GABARAP- Varianten . . . . .	22
3.3	Verwendete Puffer zur Reinigung von GABARAP und GABARAP- Varianten . . . . .	25
3.4	Verwendete Puffer . . . . .	27
3.5	Verwendete NMR-Spektrometer . . . . .	29
3.6	NMR-Experimente . . . . .	30
4.1	Ergebnisse der Translationsdiffusionsexperimente . . . . .	71
4.2	Hydropro Vorhersage der hydrodynamischen Parameter bei 25 °C . . . . .	72
4.3	Rotationskorrelationszeit und hydrodynamischer Radius bei verschiede- nen Temperaturen . . . . .	75
4.4	Eigenwerte des Rotationsdiffusionstensors von GABARAP . . . . .	81
4.5	Rotationskorrelationszeiten von GABARAP unter Berücksichtigung der Symmetrie . . . . .	82
4.6	Fitparameter von <sup>15</sup> N-CPMG-RD-Kurven des langsameren Austausch- prozesses bei Temperaturen von 15 °C bis 40 °C. . . . .	97

4.7	$^{15}\text{N}$ -CPMG-Fitparameter des Austauschprozesses im Proteinkern bei Temperaturen von 15 °C bis 40 °C. . . . .	101
4.8	$^1\text{H}^N$ -CPMG-Fitparameter des langsamen und des schnellen Austauschprozesses bei 25 °C . . . . .	104
4.9	$^{13}\text{CO}$ -CPMG-Fitparameter des schnellen Austauschprozesses bei 25 °C .	108
4.10	Fitparameter der $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven von GABARAP $\Delta$ 117 . . . . .	119
A.1	Erweiterte Zuordnung . . . . .	165
A.2	$\Delta\omega_N$ und $\Delta\omega_H$ des langsamen Austauschprozesses von GABARAP . .	166
A.3	$\Delta\omega_{CO}$ und $\Delta\omega_{CA}$ des langsamen Austauschprozesses von GABARAP .	167
A.4	$^{15}\text{N}$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP: Langsamer Austauschprozess	169
A.5	$^{15}\text{N}$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP: Schneller Austauschprozess	170
A.6	$^1\text{H}^N$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP: Langsamer Austauschprozess	172
A.7	$^1\text{H}^N$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP: Schneller Austauschprozess	173
A.8	$^{13}\text{CO}$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP: Schneller Austauschprozess	175
A.9	$^{15}\text{N}$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP $\Delta$ 117: Langsamer Austauschprozess . . . . .	177
A.10	$^{15}\text{N}$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP $\Delta$ 117: Schneller Austauschprozess . . . . .	178
A.11	Berechnung der erwarteten Differenzen $\sigma_N$ von chemischen Verschiebungen im H(S/S)QC . . . . .	179

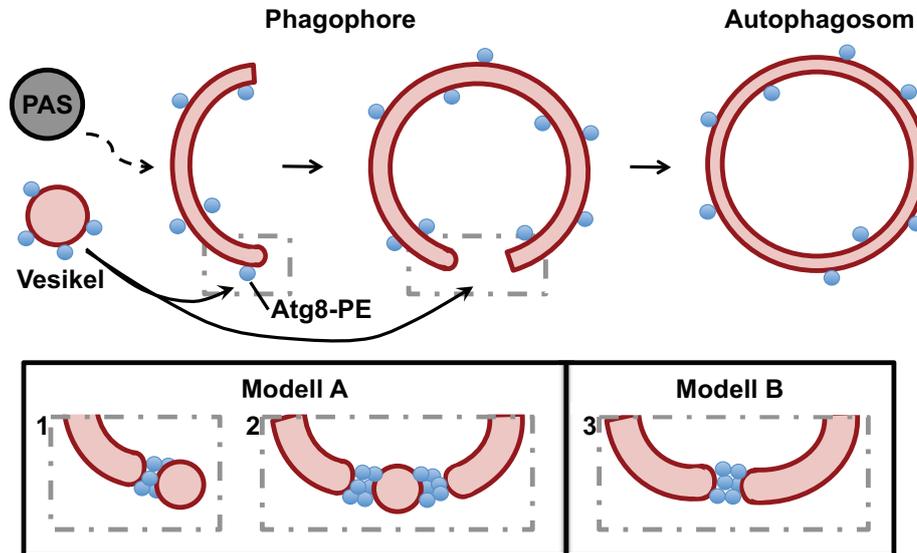


# 1 Einleitung

## 1.1 Autophagie

Die Autophagie (griech. „sich selbst essen“) dient den Zellen zur Bereitstellung von Energie und Substraten durch Degradation von intrazellulären Bestandteilen. Insbesondere unter dem Einfluss von zellulärem Stress, der beispielsweise durch Nährstoffmangel, Hypoxie oder Pathogene ausgelöst wird, ermöglicht die Autophagie das Überleben der Zelle. Gleichzeitig wird der Austausch alter und beschädigter zellulärer Komponenten durch die Autophagie sichergestellt. Fehlfunktionen in der Regulation des Autophagie-Mechanismus können beispielsweise die Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs fördern [1, 2, 3]. Bei der Autophagie handelt es sich um einen in eukaryotischen Zellen konservierten Prozess, wobei es wesentliche Unterschiede in der Signaltransduktion verschiedener Zelltypen und Organismen gibt. Allen Organismen gemein ist jedoch, dass kleinere Zellbestandteile direkt in das Innere des Lysosoms gelangen und dort degradiert werden (Mikroautophagie), während größere Organellen oder Proteinkomplexe zunächst von Membranen des Endoplasmatischen Retikulums umschlossen werden und dann mit dem Autophagosom fusionieren, in dem dann die Degradation stattfindet (Makroautophagie). Die Makroautophagie basiert auf einem Zusammenspiel verschiedener Proteine, wobei die Proteine der Atg8 Familie eine entscheidende Rolle für intrazelluläre Transportprozesse sowie die Fusion von Vesikeln spielen [4, 5]. Abbildung 1.1 zeigt zwei Modelle, die zur Bildung des Autophagosoms in einer Hefezelle vorgeschlagen werden [6]. In Modell A führt die Fusion eines Vesikels mit Hilfe von Atg8 zur Erweiterung einer Phagophore in der Nähe der PAS (engl. pre-autophagosomal structure) (1) oder zum Schließen eines Autophagosoms (2). Modell B

repräsentiert die vesikelunabhängige Fusion, die zum Schließen von Autophagosomen führt [6].



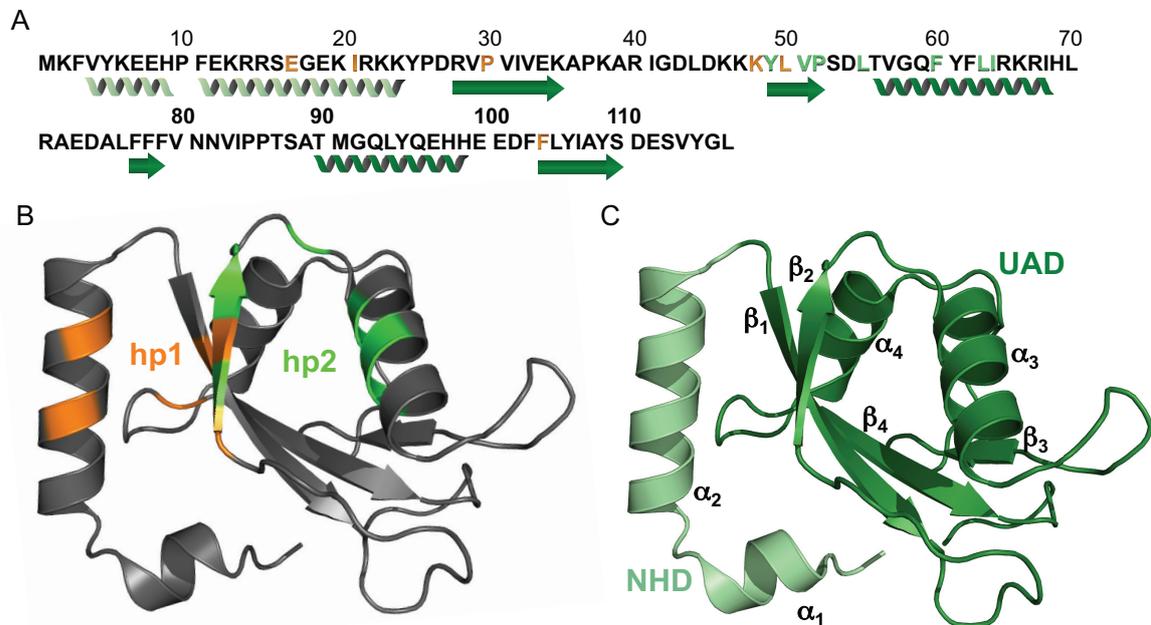
**Abbildung 1.1:** Modelle zur Bildung des Autophagosoms mit Hilfe von Atg8 in einer Hefezelle. Die Autophagie wird in der Nähe der PAS (engl. preautophagosomal structure) initiiert. Modell A) Die Erweiterung (1) und das Schließen (2) der Phagophore erfolgt durch die Fusion von Atg8-verankerten Vesikeln. Modell B) Das Autophagosom wird unabhängig von Vesikeln infolge von Hemifusion durch lipidiertes Atg8-PE geschlossen. (Abbildung nach [6])

## 1.2 Das Autophagie-relevante Protein GABARAP

Das 117 Aminosäuren umfassende humane  $\gamma$ -Aminobuttersäure Typ A ( $\text{GABA}_A$ )-Rezeptor-assoziierte Protein (GABARAP) gehört zur Atg8 Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, die in verschiedensten Organismen von Hefe bis hin zu Säugerzellen exprimiert werden [5]. GABARAP wurde 1999 als Bindungspartner der  $\gamma_2$ -Untereinheit des  $\text{GABA}_A$ -Rezeptors durch ein Hefe-2-Hybrid System entdeckt [7]. Erste Zellkulturstudien haben gezeigt, dass GABARAP essentiell für den Transport des  $\text{GABA}_A$ -Rezeptors zur Plasmamembran ist [8] und mit dem Zytoskelett über Tubulin-Bindung interagiert [9]. Seitdem wurden zahlreiche weitere Interaktionspartner identifiziert [10]. Für eine Vielzahl der Interaktionen sind die hydrophoben Bindetaschen

## 1. Einleitung

hp1 und hp2 im Kern von GABARAP von großer Bedeutung, welche die Aminosäurereste Glu17, Ile21, Pro30, Lys48, Leu50, sowie Phe104 (hp1) und Tyr49, Val51, Pro52, Leu55, Phe60, Leu63, sowie Ile64 (hp2) umfassen (vgl. Abb. 1.2 B). Insbesondere wird



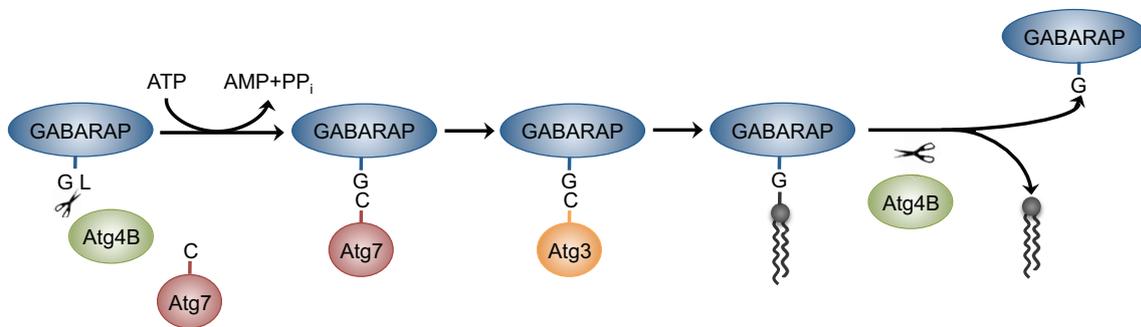
**Abbildung 1.2:** A) Sequenz und Sekundärstrukturelemente von GABARAP. B) Kristallstruktur 1GNU von GABARAP [11]. GABARAP besitzt zwei hydrophobe Bindetaschen hp1 (orange) und hp2 (grün). C) Die Struktur lässt sich in eine N-terminale helikale Subdomäne (NHD, hellgrün) und eine Ubiquitin-artige Subdomäne (UAD, dunkelgrün) einteilen.

GABARAP eine entscheidende Beteiligung beim Vesikeltransport und Membranfusionen in der Autophagie und Apoptose zugeschrieben [4, 12, 13]. Zum einen wird dies durch Assoziation mit Membranproteinen wie dem Transferrin-Rezeptor, dem Angiotensin-Rezeptor AT1 oder dem  $\kappa$ -type Opioid-Rezeptor verdeutlicht [14, 15, 16]. Zum anderen impliziert die direkte Membranverankerung von GABARAP die Beteiligung an fusogenen Prozessen in der Autophagie. GABARAP liegt daher sowohl als lösliches Protein im Zytosol, als auch in einer Membran-verankerten Form vor, dessen Entstehung im Folgenden beschrieben wird. Analog zu seinen Homologen der Atg8 Familie, verursacht eine enzymatische C-terminale Modifikation von GABARAP die kovalente Bindung an Phospholipide. Diese Lipidierung, die in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt ist ähnelt der enzymatischen Ubiquitinierung. Zunächst wird das

## 1. Einleitung

---

C-terminale Leucin 117 durch die Cysteinprotease Atg4B abgespalten. Die verkürzte Form des GABARAP mit einem C-terminalen Glycin wird durch das E1-artige Enzym Atg7 aktiviert und zu einem E2-artigen Enzym Atg3 transferiert, wodurch ein Atg3-GABARAP Komplex durch eine Thioesterbindung entsteht. Dieser Komplex ermöglicht die kovalente Bindung von GABARAP an die Lipide Phosphatidylserin (PS) sowie Phosphatidylethanolamin (PE) und ermöglicht somit die Verankerung von GABARAP an Membranen. Der Prozess ist durch die Cysteinprotease Atg4B umkehrbar [12]. Für Atg8, das als Modellprotein für die gesamte Familie gilt wurde gezeigt,



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Lipidierung von GABARAP. Die Lipidierung ähnelt der Ubiquitinierung. Das C-terminale Leucin 117 wird durch die Cysteinprotease Atg4B abgespalten. Unter Verbrauch von ATP wird GABARAP durch das E1-artige Enzym Atg7 aktiviert und zum E2-artigen Enzym Atg3 transferiert. Der Atg3-GABARAP Komplex ermöglicht die Bindung von GABARAP an die Phospholipide Phosphatidylserin (PS) sowie Phosphatidylethanolamin (PE). Der Lipidierungsprozess ist umkehrbar durch die Cysteinprotease Atg4B. (Abbildung nach [12])

dass es in lipidierter Form oligomerisiert und so zu Hemifusion von Vesikelmembranen führt [17], wobei allein der N-Terminus eine fusogene Funktion in der Autophagosomenbildung aufweist [18]. Einhergehend mit der Sequenzhomologie von GABARAP und anderen Proteinen der Atg8 Familie zeigen hochaufgelöste NMR- und Kristallstrukturen eine große Übereinstimmung der Tertiärstruktur [19, 12, 20, 21]. Insbesondere die Ubiquitin-artige Subdomäne (UAD), die den Proteinkern und den C-Terminus umfasst, ist in den GABARAP-Homologen konserviert, wohingegen es signifikante Unterschiede in der N-terminalen helikalen Subdomäne (NHD) gibt. Abbildung 1.2 (C) zeigt die Kristallstruktur 1GNU von Knight et al. (2002) mit einer farblichen Markierung

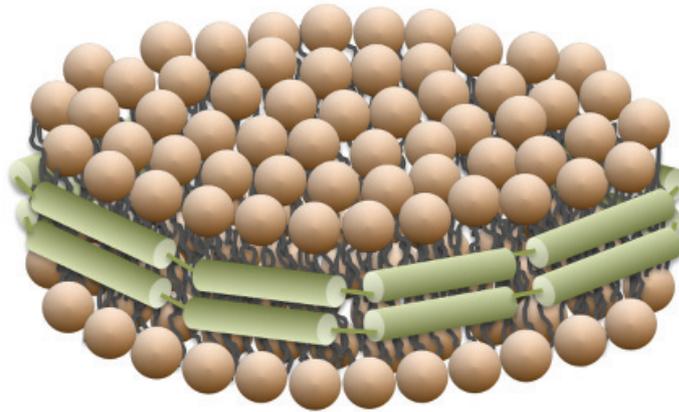
der UAD in dunkelgrün und der NHD in hellgrün. Insgesamt wurden fünf Strukturen von GABARAP publiziert, die Konformationsänderungen der NHD implizieren [22, 23, 19, 11]. Die größte Heterogenität wird von Coyle et al. (2002) beschrieben, die GABARAP neben der monomeren geschlossenen Form in einer oligomeren offenen Form kristallisiert haben. Die monomere geschlossene Struktur stimmt mit den anderen publizierten Strukturen überein. In der oligomeren offenen Struktur, die durch Kristallisation unter Hochsalzbedingungen von 2,4 M Ammoniumsulfat erzielt wurde, formen die ersten zehn N-terminalen Aminosäurereste terminiert durch ein Prolin einen  $\beta$ -Strang, der von der UAD abgewendet ist. Dieser  $\beta$ -Strang formt ein  $\beta$ -Faltblatt mit einem Strang der hydrophoben Bindetasche eines benachbarten Moleküls. Der NHD und der UAD werden jeweils spezifische Funktionen zugeordnet, was am Beispiel von Tubulin, welches mit der NHD interagiert, und dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, der an die UAD bindet, deutlich wird. GABARAP könnte somit als Linker zwischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und dem Zytoskelett fungieren.

Die Vielzahl verschiedener Funktionen erfordert eine hohe Flexibilität und Wandlungsfähigkeit von GABARAP. Da es sich um ein strukturiertes Protein von nur 14 kDa handelt, lässt sich vermuten dass Konformationsänderungen für die Multifunktionalität besonders relevant sind.

### 1.3 Nanodisks

Nanodisks fungieren als Membranmimetika, die aufgrund ihres geringen Molekulargewichts im Vergleich zu Liposomen von besonderem Interesse für die NMR-Spektroskopie sind. Nanodisks bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht, die durch zwei Kopien des sogenannten „membrane scaffold proteins“ (MSP) zusammen gehalten werden [24]. In Abbildung 1.4 ist der Aufbau einer Nanodisk schematisch dargestellt. Für die Assemblierung von Nanodisks werden Phospholipide, die durch ein Detergens in Lösung gehalten werden, mit MSP-Proteinen gemischt. Ein langsames Entfernen des Detergens führt dazu, dass die amphipatischen  $\alpha$ -Helices des MSP mit den Lipiden wechselwirken und die hydrophoben Ketten so von der wässrigen Lösung abgeschirmt

werden. Es bildet sich dabei eine Lipiddoppelschicht, die durch zwei Kopien des MSP zusammengehalten wird. Die Verwendung verschiedener MSP-Konstrukte ermöglicht die Assemblierung von Nanodisks unterschiedlicher Größe. Das MSP1 besteht aus 200 Aminosäuren, sodass die MSP1-Nanodisks einen Durchmesser von etwa 10 nm aufweisen [24]. Das verkürzte Konstrukt MSP1D1 $\Delta$ 5 besteht hingegen aus nur 167 Aminosäuren und bildet Nanodisks mit einem Durchmesser von etwa 9,2 nm und einem geringeren Molekulargewicht [25]. Der Vorteil von Nanodisks als Membranmimetika besteht neben des geringen hydrodynamischen Radius im Vergleich zu Liposomen, in der Monodispersität und Homogenität, sowie einer höheren Stabilität [26].



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung einer Nanodisk. Die hydrophilen Kopfgruppen sind in hellbraun dargestellt. Die beiden MSP-Proteine (grün) schirmen die Lipiddoppelschicht vom wässrigen Medium ab und bestimmen den Durchmesser der Nanodisk. Die Darstellung entspricht nicht den realen Größenverhältnissen.

## 1.4 NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Dynamik von Proteinen

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR, engl. Nuclear Magnetic Resonance) ist eine sehr vielseitige physikalische Methode zur Charakterisierung von Biomolekülen, da sie neben der Bestimmung der dreidimensionalen Struktur mit atomarer Auflösung auch

Kenntnisse über zeitabhängige chemische Prozesse, wie die intramolekulare Dynamik oder Reaktionskinetiken liefert.

Die NMR-Spektroskopie basiert auf dem Effekt, dass die Energiezustände der Kernspins von Atomkernen mit einem magnetischen Dipolmoment in einem externen Magnetfeld aufspalten und gemäß der Boltzmann-Verteilung besetzt sind. Durch die Einstrahlung eines Radiofrequenzpulses (RF-Puls) mit der sogenannten Larmorfrequenz wird ein Übergang zwischen den Energiezuständen generiert. Nach Ausschalten des RF-Pulses präzedieren die Spins um das externe Magnetfeld und induzieren jeweils ein von der elektronischen Umgebung abhängiges magnetisches Wechselfeld. Dieses Wechselfeld wird registriert und ergibt nach einer Fouriertransformation das NMR-Spektrum.

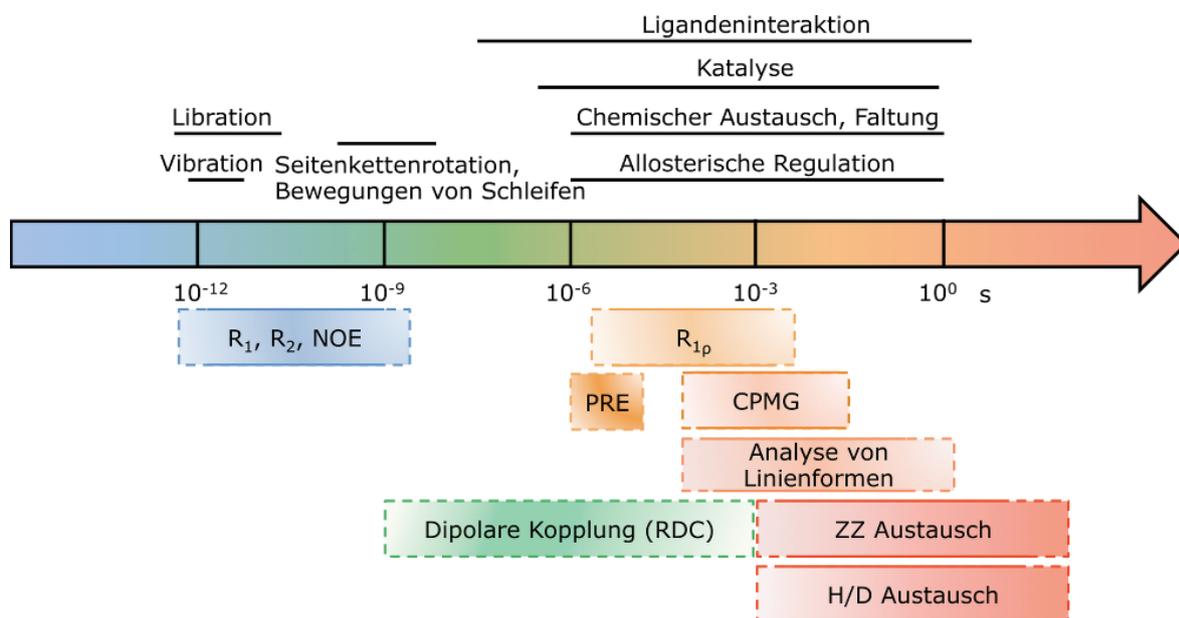
Die Entwicklung der NMR-Spektroskopie begann bereits 1946 durch Felix Bloch und Edward Mills Purcell, die unabhängig voneinander erstmals den Nachweis für Kernresonanzsignale erbracht haben. Seitdem wurde die NMR-Spektroskopie enorm weiterentwickelt, sodass sie in vielen verschiedenen Bereichen in der Physik, Chemie, Biologie, Materialforschung, Pharmazie und Medizin unentbehrlich geworden ist. Das bahnbrechende Konzept zur Strukturbestimmung von Proteinen wurde zu Beginn der 1980 Jahre von Kurt Wüthrich und seinen Mitarbeitern entwickelt [27, 28, 29]. Kurt Wüthrich und Gerhard Wagner entdeckten ebenfalls, dass Proteine dynamische Prozesse auf vielen Zeitskalen aufweisen, die das statische Bild von Proteinstrukturen erweitern [30].

Die Dynamik von Proteinen steht in direkten Zusammenhang mit funktionellen Prozessen, sodass die Charakterisierung der Dynamik neben der Tertiärstrukturbestimmung von großer Bedeutung ist [31]. Funktionelle Prozesse und somit auch die Proteindynamik laufen auf unterschiedlichsten Zeitskalen von Pikosekunden bis hin zu mehreren Sekunden, Stunden oder sogar Tagen ab [32]. Damit verbunden sind verschiedene Prozesse, von der Thermodynamik, welche insbesondere in der Katalyse von Bedeutung ist, bis hin zu kollektiven Bewegungen und Konformationsänderungen, die für Interaktion mit Liganden notwendig sind, um beispielsweise Bindestellen freizulegen oder in der Allosterie um Informationen zwischen verschiedenen Domänen im Protein weiterzuleiten [31]. Für ein vollständiges Verständnis dynamischer Prozesse und der

## 1. Einleitung

---

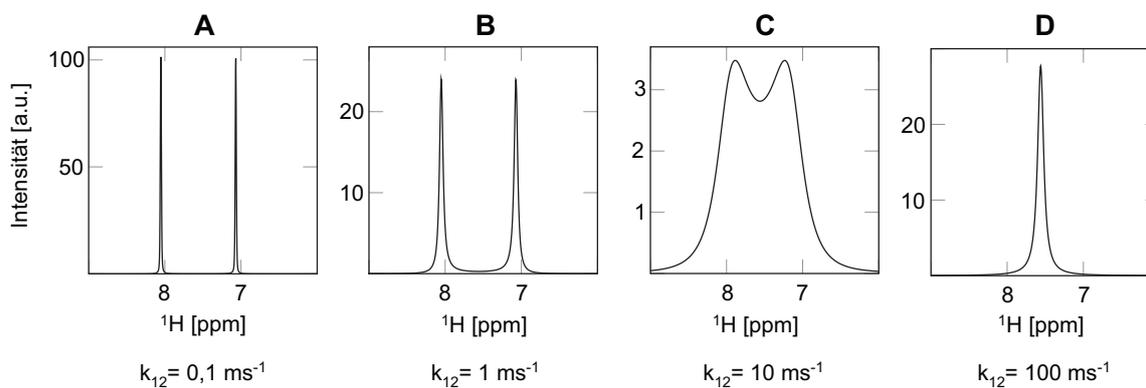
damit verbundenen biologischen Relevanz sind die Thermodynamik, die Kinetik als auch strukturelle Änderungen von besonderem Interesse. Die NMR-Spektroskopie ist eine leistungsstarke Methode, um die Dynamik von Proteinen auf der ganzen relevanten Zeitskala von Pikosekunden bis hin zu mehreren Stunden mit atomarer Auflösung zu analysieren [31, 33, 34]. Die Zeitskala in Abbildung 1.5 zeigt verschiedene dynamische Prozesse und die NMR-Experimente zur Charakterisierung der jeweiligen Prozesse. Dynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala, die schneller als die Rota-



**Abbildung 1.5:** Zeitskala der verschiedenen dynamischen Prozesse in Proteinen und entsprechend mögliche NMR-Experimente zur Analyse. Die Dynamik in Proteinen erstreckt sich über einen 12 Größenordnungen von Pikosekunden bis hin zu Sekunden. Gestrichelte Linien kennzeichnen NMR-Experimente, die nur unter bestimmten Bedingungen für die Analyse geeignet sind. (Abbildung nach [32, 35])

tionskorrelationszeit des Proteins ist, hat einen Einfluss auf die Relaxation von NMR-aktiven Kernspins. Die transversalen und longitudinalen Spinrelaxationsraten  $R_1$ ,  $R_2$  sowie die heteronuklearen NOE-Werte sind demnach sensitiv auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala, die primär Bewegungen von Schleifen oder Seitenkettenrotationen umfasst. Chemischer Austausch, das heißt Veränderungen der chemischen Umgebung aufgrund von Konformationsänderungen, oder Faltung finden hingegen auf der langsameren Mikro- bis Millisekundenzeitskala statt und können durch eine Analyse der

Linienform charakterisiert werden. Der chemische Austausch zwischen zwei Konformationen hat, abhängig von der Population der beiden Zustände und der Austauschrate, einen Einfluss auf die Linienform, was in Abbildung 1.6 anhand von zwei gleichbesetzten Zuständen veranschaulicht ist. Im Regime des langsamen Austauschs ( $k_{ex} \ll \Delta\omega$ ) sind die Peaks für jeden Kern deutlich voneinander separiert (Abb. 1.6 A). Eine höhere Austauschrate führt zu Linienverbreiterung (Abb. 1.6 B). Ist die Austauschrate in der gleichen Größenordnung wie die Differenz der chemischen Verschiebung beider Zustände ( $k_{ex} \approx \Delta\omega$ ), so ist die Linienverbreiterung maximal und die jeweiligen Peaks sind nicht mehr eindeutig unterscheidbar (Abb. 1.6 C). Im schnellen Austauschregime ( $k_{ex} \gg \Delta\omega$ ) nimmt die Linienbreite ab und beide Zustände sind durch einen Peak bei einer gemittelten chemischen Verschiebung repräsentiert (Abb. 1.6 D). Dieses Beispiel zeigt, dass die Linienform in NMR-Spektren einen wichtigen Beitrag für die Charakterisierung chemischer Austauschprozesse liefert.



**Abbildung 1.6:** Linienformen bei chemischem Austausch von zwei gleichbesetzten Zuständen mit einer Austauschrate von A)  $0,1 \text{ ms}^{-1}$ , B)  $1 \text{ ms}^{-1}$ , C)  $10 \text{ ms}^{-1}$  und D)  $100 \text{ ms}^{-1}$ . Die Simulation der Spektren erfolgte mit Spinach [36], unter der Annahme einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz und einem  $\Delta\omega$  von 1 ppm.

Zur Quantifizierung der Austauschparameter dienen Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) oder longitudinale ZZ-Austauschexperimente. Chemischer Austausch auf der spektralen Zeitskala ( $\mu\text{s} - \text{ms}$ ) führt aufgrund von Fluktuationen der chemischen Verschiebung zu Linienverbreiterungen in NMR-Spektren und zu Änderungen der

Relaxation, die durch CPMG-Experimente quantifiziert werden können. Das grundlegende Prinzip eines CPMG-Experiments, den Einfluss von chemischem Austausch auf die Relaxation durch eine Folge refokussierender Pulse zu verringern und dadurch Informationen über chemischen Austausch zu erlangen, wurde bereits vor 60 Jahren entdeckt [37, 38, 39]. Es gestaltete sich zunächst als eine schwierige Herausforderung die Linienverbreiterung durch chemischen Austausch von anderen Effekten, wie der homo- oder heteronuklearen skalaren Kopplung zu benachbarten Spins zu trennen, was jedoch Loria et al. (1999) gelang, die somit das erste robuste CPMG-Relaxationsdispersions(RD)-Experiment für Amide des Proteinrückgrats publizierten [40]. Seither gab es enorme Weiterentwicklungen und Modifikationen dieses CPMG-Experiments, die es ermöglichen ansonsten „unsichtbare“ Zustände mit einer Population von nur 0,5 % bei einer Austauschrate von  $100\text{ s}^{-1}$  bis  $2000\text{ s}^{-1}$  anhand verschiedener Kerne zu charakterisieren, ohne das System durch äußere Bedingungen aus dem Gleichgewicht zu bringen [41]. Angeregte Zustände sind neben der Existenz eines energetisch niedrigsten Grundzustand gemäß der Boltzmann-Verteilung häufig sehr gering populiert, jedoch nicht minder wichtig in Hinblick auf Funktion oder Dysfunktion des Proteins. Durch CPMG-RD-Experimente konnten beispielsweise intermediäre Proteinfaltungszustände [42] oder funktionell relevante intermediäre Zustände eines Enzyms [43] nachgewiesen werden. Des Weiteren ermöglicht die Entwicklung von TROSY-basierten CPMG-RD-Experimenten die Aufdeckung von Austauschprozessen in großen Proteinen oder Makromolekülen. Dies konnte erfolgreich anhand einiger Membranproteine, wie beispielsweise dem integralen Membranprotein PagP in Mizellen gezeigt werden [44]. Ist der Austausch zwischen zwei Zuständen hingegen langsamer als die spektrale Zeitskala ( $< 100\text{ ms}$ ), so sind die Resonanzen verschiedener Konformere im NMR-Spektrum sichtbar. In diesem Fall eignet sich die Quantifizierung von longitudinalem ZZ-Austausch zur Bestimmung der Austauschrate zwischen zwei Zuständen und der Population der beiden Zustände [45]. Je größer die Population des angeregten Zustands, desto geeigneter ist diese Methode, weshalb sie häufig Anwendung in der Analyse von Protein-Liganden-Interaktionen findet, da die Population der Zustände durch die Konzentration des Liganden beeinflusst werden kann [46].

### 1.5 Ziele dieser Arbeit

GABARAP ist ein multifunktionales Protein mit einer Vielzahl an Interaktionspartnern, das sich nicht durch eine einzige starre Struktur beschreiben lässt. Die Unterschiede in bekannten NMR- und Kristallstrukturen weisen auf eine Dynamik im N-Terminus hin, die in der Familie der GABARAP-Homologen konserviert ist, jedoch weder im Hinblick auf die funktionelle Relevanz charakterisiert ist, noch hinsichtlich der Dynamik quantifiziert ist. So ist über das Zusammenspiel von löslichem GABARAP und Membran-verankertem GABARAP, sowie eine mögliche Oligomerisierung und dessen Relevanz für Membran-fusogene Prozesse nur wenig bekannt. Diese Multifunktionalität von GABARAP impliziert hohe Flexibilität und die Existenz von chemischen Austausch.

Das Ziel dieser Arbeit war eine umfangreiche Charakterisierung und Quantifizierung der Dynamik von GABARAP mittels NMR-Spektroskopie auf der gesamten relevanten Zeitskala von Pikosekunden bis hin zu Millisekunden. Um die interne Dynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala von GABARAP zu charakterisieren, sollten  $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsexperimente durchgeführt werden, die außerdem eine Beschreibung der Hydrodynamik von GABARAP liefern. Die Hydrodynamik sollte zusätzlich durch Diffusionsexperimente bestimmt werden.

Da die Dynamik im N-Terminus schon während der Resonanzzuordnung von GABARAP im Jahre 2002 erstmals aufgefallen ist, jedoch nie quantifiziert wurde, war die Bestimmung der Austauschkinetik mittels ZZ-Austausch ein wichtiger Teil dieser Arbeit. Weiterhin war es von besonderem Interesse, bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntes gering populierte Austauschzustände auf der Millisekundenzeitskala aufzuspüren und mittels CPMG-Relaxationsdispersion (RD) zu quantifizieren. Zur Erlangung von Informationen über strukturelle Änderungen, die mit chemischem Austausch einhergehen, sollten CPMG-RD-Kurven verschiedener Kerne im Proteinerückgrat (N,  $\text{H}^N$ , CO) betrachtet werden. Um das Zusammenspiel von löslichem GABARAP und Membran-verankertem GABARAP und damit die funktionelle Relevanz in der Autophagie besser zu verstehen, ist ein Vergleich der Dynamik mit

und ohne Membran nötig. Das Ziel war demnach Nanodisk-verankertes GABARAP herzustellen und Möglichkeiten für die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Dynamik von Membran-verankertem GABARAP Proteinen aufzuzeigen.

Um den physiologischen Gegebenheiten möglichst nahe zu kommen, sollten diese NMR-Experimente an dem wildtypischen GABARAP mit 117 Aminosäuren durchgeführt werden. Dementsprechend musste die Resonanzzuordnung, die von GABARAP mit einem N-terminalen Überhang existiert (119 Aminosäuren), angepasst und vervollständigt werden. Außerdem sollten in dieser Arbeit verschiedene Cysteinvarianten hergestellt und charakterisiert werden, um die konformationelle Dynamik von GABARAP im Rahmen einer Kooperation auch fluoreszenzspektroskopisch analysieren zu können.

## 2 Material

### 2.1 Verwendete Biochemikalien, Chemikalien und Kits

**Tabelle 2.1:** Verwendete Biochemikalien, Chemikalien und Kits

Material	Bezugsquelle
Acrylamid 4K Lösung (30%) (Mix 29:1)	AppliChem, Darmstadt
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
11,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide](MPB-PE)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
$^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
$^{13}\text{C}$ -, $^{13}\text{C}$ -d7-Glukose	Euriso-top, Gif-Sur-Yvette, Frankreich
$\text{D}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, Steinheim
4,4-Dimethyl-4-silapentan-5-Sulfonsäure (DSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase	AppliChem, Darmstadt
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena, Jena
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent, Santa Clara, USA

## 2.2 Bakterienstämme und Plasmide

**Tabelle 2.2:** Genotypen und Referenzen der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)	Novagen, Darmstadt
OmniMAX <sup>TM</sup> 2 T1R	$F'$ { <i>proAB+</i> <i>lacIq lacZ</i> ΔM15 <i>Tn10</i> (TetR) Δ( <i>ccdAB</i> )} <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80( <i>lacZ</i> )ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> <i>tonA panD</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
XL10 Gold	$Tet^r$ Δ ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-</i> <i>mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 lac Hte</i> [ $F'$ <i>proABlacI<sup>q</sup>Z</i> ΔM15 <i>Tn10</i> ( $Tet^r$ ) <i>Amy Cam<sup>r</sup></i> ]	Stratagene, La Jolla, USA

**Tabelle 2.3:** Bezeichnung, Resistenz, Eigenschaft und Referenz der Plasmide

Plasmid	Resistenz	Eigenschaft	Referenz
pET11a_GABARAP	Ampicillin	Kodiert für GABARAP	Life Technologies, Carlsbad, USA
pET28a_MSP1D1Δ5	Kanamycin	Kodiert für His- MSP1D1Δ5	AG Wagner, Harvard Medical School

## 2.3 Verwendete Geräte

**Tabelle 2.4:** Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Branson Sonifier 250 (Ultraschallstab)	Branson Ultrasoncis Corporation, Danbury, USA
Avanti J-20XP (Zentrifuge)	Beckmann-Coulter, Palo Alto, USA
ÄKTAPurifier	GE Healthcare, Freiburg
Lambda 25 UV/Vis-Spektrometer	Perkin Elmer, Skelton, USA
GelDoc MP	BioRad, München
NMR-Spektrometer 600 MHz, 800 MHz und 900 MHz	Agilent (Varian), Santa Clara, USA
NMR-Spektrometer 600 MHz	Bruker, Billerica, USA

## 2.4 Chromatographien

**Tabelle 2.5:** Verwendete Chromatographiesäulen

Material	Bezugsquelle
Q-Sepharose im Gravitationsfluss	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad 16/10 SP Sepharose HP	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare, Freiburg
Superdex 200 Increase 5/150 GL	GE Healthcare, Freiburg
PD-10	GE Healthcare, Freiburg

## 2.5 Datenbanken und Software

**Tabelle 2.6:** Verwendete Datenbanken und Software

Datenbank/Software	Verwendungszweck
BMRB Datenbank, <a href="http://bmrw.wisc.edu">http://bmrw.wisc.edu</a>	NMR-Zuordnungen von Biomolekülen
cpmg_fit (Dmitry Korzhnev)	Auswertung und Analyse von CPMG-Daten
ExPASy-ProtParam, <a href="http://web.expasy.org">http://web.expasy.org</a>	Analyse von Proteinsequenzen
ExPASy-Translate Tool, <a href="http://web.expasy.org">http://web.expasy.org</a>	Translation von DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen
Matlab	Auswertung und Analyse von Relaxationsdaten und ZZ-Austausch
MUNIN [47, 48]	Bestimmung von Peakintensitäten aus mehrdimensionalen Spektren
nmrPipe [49]	Prozessieren von NMR-Daten
nmrViewJ 8.0.3 [50]	Visualisierung und Analyse von NMR-Spektren
PDB Datenbank, <a href="http://rcsb.org">http://rcsb.org</a>	Strukturen biologischer Makromoleküle
PrimerX, <a href="http://www.bioinformatics.org/primerx">http://www.bioinformatics.org/primerx</a>	Primerdesign für die Mutagenese
PyMOL	Visualisierung von Proteinstrukturen
relax [51, 52, 53, 54, 55]	Model-free-Analyse von Relaxationsdaten
Spinach [36]	Simulation von Spindynamik
Secondary Structure Propensity (SSP) [56]	Sekundärstrukturvorhersage durch chemische Verschiebungen
Tensor2 [57]	Model-free-Analyse von Relaxationsdaten
TopSpin	Bedienung der Varian NMR-Spektrometer
VnmrJ	Bedienung der Varian NMR-Spektrometer

# 3 Methoden

## 3.1 Molekularbiologische Methoden

### 3.1.1 Transformation von *E. coli*

Das GABARAP Gen ist in einem pET11a-Vektor mit einer Ampicillinresistenz codiert. Die Transformation des Plasmids erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) T1r Zellen. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, bevor 0,5  $\mu\text{l}$  des Plasmids mit einer Konzentration von etwa 200 ng/ $\mu\text{l}$  zu einem 50  $\mu\text{l}$  Zellaliquot pipettiert wurden. Es folgte eine Inkubation für 15 bis 30 Minuten auf Eis. Der Ansatz wurde für 45 Sekunden bei 42 °C erhitzt und anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  LB-Medium (Tab. 3.2) wurden die kompetenten Zellen bei 37 °C für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Die Ausplattierung von 100  $\mu\text{l}$  der kompetenten Zellen erfolgte auf Agarplatten mit Ampicillin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), sodass nur erfolgreich transformierte Zellen, die das Plasmid tragen wachsen. Nach 14 bis 18 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.1.2 Isolierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Für die Isolation kleiner Mengen DNA wurde das innuPREP Mini Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ausbeute betrug dabei etwa 5  $\mu\text{g}$  DNA aus 5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur. Die Isolation im größeren Maßstab erfolgte unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Midi Kits aus 50 ml einer *E. coli* Übernachtskultur. Bei den verwendeten *E. coli* Stämmen handelte es sich um Omnimax oder XL10 Gold.

#### 3.1.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem NanoPhotometer der Firma Implen. Die Konzentrationsbestimmung basiert auf der Absorption doppelsträngiger DNA bei der Wellenlänge  $\lambda = 260 \text{ nm}$  [58]. Eine optische Dichte von eins bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  und einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke entspricht einer DNA Konzentration von  $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### 3.1.4 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Herstellung von GABARAP-Varianten mit Mutationen wurde das QuikChange II XL Mutagenese Kit der Firma Agilent verwendet. Für die Mutagenese wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Es wurden zunächst einzelne Mutationen durchgeführt. Dabei handelt es sich um die Mutationen  $\Delta 117$ , E100A, V4C, E7C, K13C, I41C und F62C. Für das Einführen einer zweiten Mutation wurde jeweils das bereits einfach mutierte Plasmid verwendet. Somit wurde die Mutation des Gly116 zu einem Cys116 nach der bereits erfolgten Deletion des Leu117 vorgenommen. Die Herstellung der Plasmide von GABARAP-E7C/E73C, GABARAP-E7C/F62C, GABARAP-K13C/F62C erfolgte an den Plasmiden von GABARAP-E7C und GABARAP-K13C. Die Primer wurden mit dem Programm PrimerX konstruiert.

#### 3.1.5 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Es wurden immer zwei Proben mit  $1,2 \mu\text{g}$  DNA in  $12 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  vorbereitet, um eine komplementäre Sequenzierung mit den Primern T7 und T7-Terminator durchzuführen.

## 3.2 Proteinnachweis und Konzentrationsbestimmung

### 3.2.1 SDS-PAGE nach Laemmli

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe, erfolgte durch die diskontinuierliche Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli. Für die SDS-PAGE werden Proteine in einem SDS enthaltenden Puffer aufgekocht, was zur Denaturierung führt. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an, überdeckt so die Eigenladung der Proteine und führt aufgrund der sich abstoßenden negativen Ladungen zusätzlich zu einer Linearisierung. Damit ist die Proportionalität der Proteinladung zum Molekulargewicht gewährleistet. Die Proteine werden in die Taschen eines Sammelgels geladen. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert. Durch negativ geladene Leitonen im Gel und positiv geladene Folgeionen im Laufpuffer wird ein Feldstärkegradient aufgebaut, der zu unterschiedlichen lokalen Feldstärken führt. Proteine geringerer Mobilität erfahren ein größeres elektrisches Feld und werden daher stärker beschleunigt als Proteine größerer Mobilität, die unmittelbar hinter den Leitonen laufen. Somit stapeln sich die Proteine unmittelbar hinter dem Leiton auf. Beim Einwandern in das engporige Trenngel führt die erzeugte Reibung zu noch schärferen Banden. Der Proteinstapel löst sich auf und die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Für die Trennung von lipidiertem und nicht lipidiertem GABARAP wurde Probenpuffer ohne  $\beta$ -ME verwendet, um ein Aufbrechen der Maleimidkopplung zwischen Protein und Lipid zu verhindern. Die Färbung der Gele erfolgte mit einer angewärmten Coomassie Färbelösung (Tab. 3.1) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Entfärbung wurde durch Aufkochen in  $H_2O$  und anschließendes Schütteln erreicht.

### 3. Methoden

---

**Tabelle 3.1:** Verwendete Gele und Puffer zur SDS-PAGE

5 % Sammelgel	15 % Trenngel
16,8 % (v/v) Acrylamid 30 %	50 % (v/v) Acrylamid 30 %
125 mM Tris-HCl, pH 6,8	375 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (v/v) 10 % APS	0,1 % (v/v) 10 % APS
0,1 % (v/v) TEMED	0,1 % (v/v) TEMED
1-fach SDS-Laufpuffer	4-fach Probenpuffer
50 mM Tris-HCl, pH 8,3	200 mM Tris-HCl, pH 6,8
385 mM Glycerin	8 % (v/v) $\beta$ -ME
0,1 % (w/v) SDS	8 % (w/v) SDS
	40 % (v/v) Glycerin
	0,05 (w/v) Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	
25 % Isopropanol	
10 % Essigsäure	
0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R250	
in H <sub>2</sub> O	

#### 3.2.2 UV/Vis-Spektroskopie

Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, sodass die Proteinkonzentration direkt aus der Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums im Wellenlängenbereich von 220 nm bis 320 nm bestimmt wurde. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren diente ein Spektrophotometer des Typs Lambda 25 der Firma Perkin Elmer (Skelton, USA). Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden durch Extraktion beruht auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz

$$E_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d, \quad (3.1)$$

das die Extinktion  $E_{280}$  bei 280 nm in Abhängigkeit des proteinspezifischen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280}$ , der Proteinkonzentration  $c$  sowie der Schichtdicke  $d$  der verwendeten Küvette beschreibt. Der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm lässt sich mit Hilfe des Webtools Protparam ([web.expasy.org/protparam](http://web.expasy.org/protparam)) basierend auf der Anzahl aromatischer Aminosäuren und des Molekulargewichts bestimmen. Der molare Extinktionskoeffizient von GABARAP beträgt  $\epsilon_{280} = 11920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Da die Aminosäuresequenz von GABARAP kein Tryptophan enthält, ist der Extinktionskoeffizient mit einem Fehler von etwa 10% behaftet.

### 3.3 Expression von GABARAP und GABARAP-Varianten

Die Expression von GABARAP und GABARAP-Varianten erfolgte jeweils nach dem gleichen Protokoll, das im Folgenden beschrieben wird. Zunächst wurde eine 25 ml LB-Kultur mit frisch transformierten und ausplattierten Bakterienkolonien angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Für die Isotopenmarkierung des später exprimierten GABARAPs erfolgte die weitere Kultivierung der Bakterienzellen in einem M9-Minimalmedium (Tab. 3.2), welches nach Bedarf  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid und  $^{13}\text{C}$ -Glukose als einzige Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle enthielt. Eine unmarkierte M9-Vorkultur von 100 ml Volumen, welche durch ein entsprechendes Volumen der LB-Übernachtskultur auf eine OD von 0,1 angeimpft wurde, diente dazu die Zellen zunächst an das Wachstum im M9-Minimalmedium zu gewöhnen. Bei Erreichen einer OD von 1,0 wurden die Zellen der Vorkultur abzentrifugiert und 1:10 (in Bezug auf das Volumen der Vorkultur) in markiertem M9-Medium verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nachdem die OD dieser Kultur auf 0,8 bis 1,0 angestiegen war, erfolgte die Expression von GABARAP durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die weitere Inkubation fand bei 20 °C statt bevor die Zellen nach 15 Stunden durch Zentrifugation bei 5000 x g für 20 Minuten geerntet wurden. Das so erhaltene Pellet wurde einmal mit

### 3. Methoden

---

PBS gewaschen, auf zwei Behälter verteilt, abzentrifugiert und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder für die unmittelbare Reinigung auf Eis aufbewahrt.

**Tabelle 3.2:** Verwendete Puffer zur Expression von GABARAP und GABARAP-Varianten

LB-Medium	M9-Minimalmedium
10 g/l Trypton	9,1 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
5 g/l Hefeextrakt	3 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
5 g/l NaCl	0,5 g/l NaCl
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin	1 g/l $^{15}\text{N}]\text{H}_4\text{Cl}$
	100 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$
	2 mM $\text{MgSO}_4$
	10 $\mu\text{M}$ Fe(III)-Cl
	3 g/l Glukose bzw. 1,5 g/l $^{13}\text{C}$ -Glukose
	0,2 % (v/v) Spurenelemente (TS2)
	5 mg/ml Thiaminhydrochlorid
	0,1% (v/v) Vitamincocktail
	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin
Spurenelemente TS2	Vitamincocktail
30 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1 g/l Biotin
58,8 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g/l Cholinchlorid
300 mg/l $\text{H}_3\text{BO}_3$	1 g/l Folsäure
200 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1 g/l Nicotinamid
20 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1 g/l Natium-D-panthothenat
900 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1 g/l Pyridoxalhydrochlorid
20 mg/l $\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0,1 g/l Riboflavin
10 mg/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	
PBS	
140 mM NaCl	
2,7 mM KCl	
10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	
1,8 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	
pH 7,4	

## 3.4 Reinigung von GABARAP und GABARAP-Varianten

Das im Folgenden beschriebene Reinigungsprotokoll bezieht sich auf GABARAP, die C-terminale Deletionsvariante GABARAP $\Delta$ 117 und GABARAP-E100A. Die Reinigung wurde im Wesentlichen nach Coyle et al. (2002) durchgeführt [19]. Zunächst wurde das aus der Expression erhaltene Pellet in Lysepuffer1 aufgenommen. Es wurden dabei 20 ml Lysepuffer1 für ein Pellet verwendet, das einem halben Liter Bakterienkultur entspricht. Zur Lyse der Zellen wurden diese in einem maximalen Volumen von 20 ml mit dem Branson Sonifier bei Power Level 5 mit einem Duty Cycle von 50 %, 6 x 30 Sekunden beschallt. Zwischen den Sonifizierungszyklen wurde das Lysat für je 30 Sekunden auf Eis gekühlt. Um die gelösten Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen, wurde das Lysat für 45 Minuten bei 50000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Spritzenfilter der Porengröße 0,22  $\mu$ m sterilfiltriert, während das Pellet in Lysepuffer mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid gelöst wurde, um auch das in Einschlusskörpern eingeschlossene GABARAP zu lösen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Lysat bei 50000 xg für 45 Minuten abzentrifugiert und der Überstand mittels Dialyse gegen 1 l Ionenaustauschpuffer A zurückgefaltet. Während der Dialyse wurde der Puffer über einen Zeitraum von 14 Stunden zwei mal gegen je 2 l frischen Puffer ausgetauscht. Das bei der Dialyse ausgefallene Protein wurde bei 50000 xg für 45 Minuten abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde sterilfiltriert und durch eine Kationenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mithilfe des ÄKTAPurifier Chromatographiesystems durch die Verwendung einer HiLoad 16/10 SP Sepharose mit 20 ml Säulenvolumen. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute betrieben. Zur sauberen Trennung des GABARAPs von den restlichen Proteinen eignete sich ein Salzgradient, der durch eine ansteigende Konzentration von Ionenaustauschpuffer B über 15 Säulenvolumen eine maximale Konzentration von 40 % Puffer B (400 mM KCl) erreichte. Die finale Trennung von GABARAP und Verunreinigungen wurde durch eine Gelfiltration mit

### 3. Methoden

---

einer HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule angeschlossen an ein ÄKTApurifier System erreicht. Die Trennung erfolgte mit Gelfiltrationspuffer in 2 ml Fraktionen bei einer Flussrate von 1 ml/min. Fraktionen, die laut SDS-PAGE reines GABARAP enthielten, wurden vereinigt und mittels Zentrifugation bei 3000 x g in einem Vivaspin Konzentratoren (MWCO 3,5 kDa) auf eine Konzentration von bis zu 1 mM eingengt.

Die GABARAP-E100A-Variante wurde von einem Mitarbeiter des ICS-6 exprimiert und gereinigt.

Die Reinigung von allen verwendeten GABARAP-Cysteinvarianten erfolgte, ausgenommen von GABARAP mit der Mutation K13C/F62C, mit nur wenigen Unterschieden analog zu der Reinigung des GABARAP-Wildtyps. Die Unterschiede bestanden darin, den verwendeten Puffern 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol bzw. dem Gelfiltrationspuffer 2 mM TCEP hinzuzufügen, um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu vermeiden. Des Weiteren wurde für die Reinigung der Varianten auf den denaturierenden Reinigungsschritt durch Lösen des Zellpellets in 6 M Guanidinhydrochlorid nach der Sonifizierung verzichtet.

Die Reinigung von GABARAP-K13C/F62C erfolgte hingegen mittels einer Anionenaustauschchromatographie. Dazu wurden die Bakterienzellen nach der Expression in Lysepuffer2 aufgenommen. Es wurden dabei 20 ml Lysepuffer2 für ein Pellet aus einem halben Liter Bakterienkultur verwendet. Zur Lyse der Zellen wurden diese in einem maximalen Volumen von 20 ml mit dem Branson Sonifier bei Power Level 5 mit einem Duty Cycle von 50 %, 6 x 30 Sekunden beschallt. Zwischen den Sonifizierungszyklen wurde das Lysat für je 30 Sekunden auf Eis gekühlt. Um die gelösten Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen, wurde das Lysat für 45 Minuten bei 50000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Spritzenfilter der Porengröße 0,22  $\mu$ m sterilfiltriert. Die Aufreinigung erfolgte durch eine Anionenaustauschchromatographie im Gravitationsfluss. Dazu wurden 4 ml Q Sepharose als Säulenmaterial für je 20 ml Lysat verwendet. Der Durchfluss wurde aufgefangen und enthielt das zu reinigende Protein GABARAP-K13C/F62C. Die finale Trennung von GABARAP-K13C/F62C und Verunreinigungen wurde wie im Falle der Reinigung von GABARAP durch eine Gelfiltration mit einer HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule angeschlossen an ein

### 3. Methoden

---

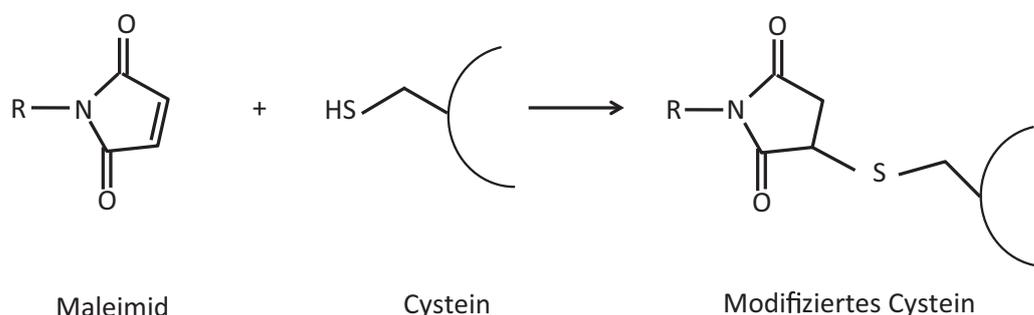
ÄKTApurifier System erreicht. Die Trennung erfolgte mit Gelfiltrationspuffer inklusive 2 mM TCEP in 2 ml Fraktionen bei einer Flussrate von 1 ml/min. Fraktionen, die gemäß SDS-PAGE reines GABARAP-K13C/F62C enthielten, wurden vereinigt und mittels Zentrifugation bei 3000 x g in einem Vivaspin Konzentrator (MWCO 3,5 kDa) eingengt.

**Tabelle 3.3:** Verwendete Puffer zur Reinigung von GABARAP und GABARAP-Varianten

Lysepuffer1	Lysepuffer2
25 mM Natriumphosphatpuffer	25 mM Tris
100 $\mu$ M EDTA	100 $\mu$ M EDTA
10 U DNase A	10 U DNase A
1 Tablette/50ml Complete Protease Inhibitor	1 Tablette/50ml Complete Protease Inhibitor
50 mM KCl	pH 8,8
pH 6,5	
Ionenaustauschpuffer A	Ionenaustauschpuffer B
25 mM Natriumphosphatpuffer	25 mM Natriumphosphatpuffer
pH 6,5	pH 6,5
50 mM KCl	1 M KCl
100 $\mu$ M EDTA	100 $\mu$ M EDTA

### 3.5 Herstellung von GABARAP-Nanodisks

Die Lipidierung von GABARAP wurde chemisch durch eine Maleimid-Reaktion zwischen Phosphatidylethanolamin(PE)-MPB und dem C-Terminus des Proteins herbeigeführt. Dazu wurde im GABARAP codierten Plasmid eine Mutation des Glycins an Position 116 zu einem Cystein vorgenommen und das C-terminale Leucin deletiert. Das Maleimid des PE-MPB reagiert mit der Thiol-Gruppe des Cysteins unter Ausbildung einer kovalenten Bindung (Abb. 3.1). Für die Lipidierung wurde GABARAP wie in Kapitel 3.4 beschrieben mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt, wobei



**Abbildung 3.1:** Maleimid-Reaktion des PE-MPB mit dem Cystein des GABARAP-G116CΔ117.

die Reinigung mittels Gelfiltration für den Lipidierungsansatz nicht erforderlich war. Zunächst erfolgte ein Pufferaustausch von GABARAP enthaltenden Fraktionen durch eine PD-10 Säule, um das zuvor verwendete Reduktionsmittel zu entfernen. Dazu wurde die Probe in einem Volumen von 2,5 ml auf die PD-10 Säule geladen, der Durchfluss verworfen und das Protein mit 3,5 ml Elutionspuffer eluiert. Für die Lipidierung wurden zwei PE-MPB-Moleküle (0,61 mg, 660  $\mu$ M) pro GABARAP (4,6 mg, 330  $\mu$ M) in Lipidpuffer gelöst und in gleichen Volumenanteilen mit dem GABARAP in Elutionspuffer gemischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und der Kopplungserfolg mittels SDS-PAGE überprüft.

Bei der Nanodiskassemblierung wurde nach dem Protokoll von Pavlidou et al. (2013) vorgegangen [59]. Für die Assemblierung von DMPC-Nanodisks wurde GABARAP-PE, das „membrane scaffold protein“ MSP1D1Δ5 und DMPC im molaren Verhältnis 1:1:53 gemischt. Dazu wurde zunächst das als Pulver vorliegende DMPC in Lipidpuffer gelöst, sodass eine 50 mM Lösung entsteht. Das MSP1D1Δ5 mit einer Konzentration von 3 mg pro ml wurde in Assemblierungspuffer gelöst. Der GABARAP-PE, MSP1D1Δ5 und DMPC Ansatz wurde abwechselnd drei mal 20 Minuten auf Eis und zweimal 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Detergens durch Dialyse (MWCO 3,5 kDa) gegen 1,5l Assemblierungspuffer bei 4 °C für 24 Stunden entfernt, wobei der Assemblierungspuffer zweimal durch frischen Puffer ersetzt wurde. Nach der Dialyse

### 3. Methoden

---

erfolgte die Trennung von Nanodisk-verankertem GABARAP und gelösten Proteinen mittels Größenausschlusschromatographie über eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, die an einen ÄKTAPurifier angeschlossen war. Dazu wurde Assemblierungspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet und die Probe in 2 ml Fraktionen eluiert. Fraktionen, die laut SDS-PAGE GABARAP und MSP1D1 $\Delta$ 5 enthalten, wurden vereinigt und mittels Zentrifugation bei 600 x g in einem Vivaspin Konzentrator (MWCO 10 kDa) auf eine Konzentration von bis zu 300  $\mu$ M eingengt.

Die zur Gelfiltration verwendete Säule HiLoad 16/600 Superdex 200 pg wurde von einer Mitarbeiterin des ICS-6 mit einem Proteinstandard kalibriert, um den hydrodynamischen Durchmesser und das Molekulargewicht der eluierten Nanodisks abzuschätzen. Die Kalibrierung erfolgte an den folgenden Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht bzw. hydrodynamischen Durchmesser: Thyroglobulin (MW = 669 kDa, 17 nm), Ferritin (440 kDa, 12,2 nm), Aldolase (158 kDa, 9,62 nm), Conalbumin (75 kDa, 7,28 nm) und Ribonuclease A (13,7 kDa, 3,28 nm). Für die analytische Gelfiltration mittels einer Superdex 200 Increase 5/150 GL Säule zur Überprüfung der Nanodiskstabilität wurden die Größenstandards dem Datenblatt des Herstellers entnommen und dienten somit als Richtwert.

**Tabelle 3.4:** Verwendete Puffer

Elutionspuffer	Lipidpuffer
25 mM HEPES/KOH	25 mM HEPES/KOH
pH 7,4	pH 7,6
100 mM KCl	100 mM KCl
0,25 mM TCEP	0,25 mM TCEP
	100 mM Natriumcholat

---

Assemblierungspuffer
10 mM Natriumphosphatpuffer
pH 7,4
150 mM NaCl

---

## 3.6 Kernresonanz(NMR)-Spektroskopie

### 3.6.1 NMR-Proben

Alle NMR-Experimente wurden in NMR-Puffer bestehend aus 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 100  $\mu$ M EDTA, 25 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6,9 und 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> aufgrund der bakteriziden und fungiziden Wirkung und 10 % (v/v) D<sub>2</sub>O für den Feldfrequenz-Lock durchgeführt. Aufgrund des hohen Salzgehalts wurden 5 mm Shigemi-Rundröhrchen des Typs BMS-005V verwendet, um die Pulslängen gering zu halten. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-Experimente wurden die folgenden Proben hergestellt:

1. 1,0 mM [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP
2. 0,5 mM [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP, 0,5 % (v/v) Dioxan
3. 0,9 mM [U-<sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP
4. 0,5 mM [U-<sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP
5. 0,9 mM [U-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP
6. 0,5 mM [U-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP
7. 0,3 mM [U-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP
8. 1,0 mM [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP $\Delta$ 117
9. 0,7 mM [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP-G116C $\Delta$ 117
10. 380  $\mu$ M [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP-V4C
11. 240  $\mu$ M [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP-E7C
12. 340  $\mu$ M [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP-K13C
13. 750  $\mu$ M [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP-F62C
14. 1,0 mM [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP-E100A
15. 675  $\mu$ M [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP-K13C/F62C
16. 550  $\mu$ M [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP-E7C/E73C
17.  $\approx$  300  $\mu$ M [U-<sup>15</sup>N]-markiertes GABARAP an Nanodisks

### 3.6.2 Aufnahme der Spektren

Die NMR-Messungen wurden mit NMR-Spektrometern der Firma Varian (Palo Alto, USA) und Bruker (Karlsruhe) aufgenommen, deren Details aus Tabelle 3.5 zu entnehmen sind. Alle wichtigen Aufnahmeparameter der gemessenen NMR-Spektren von GABARAP sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Eine Temperaturkalibrierung der NMR-Spektrometer wurde regelmäßig mit einer deuterierten Methanolprobe als  $^1\text{H}$ -NMR-Thermometer durchgeführt [60].

**Tabelle 3.5:** Verwendete NMR-Spektrometer

Hersteller/Serie	Protonenlarmorfrequenz	Probenkopf
Varian	600 MHz	XYZ-PFG- $^1\text{H}$ - $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{31}\text{P}\}$ Raumtemperatur
Varian	600 MHz	5mm Z-PFG $^1\text{H}$ - $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ kryogengekühlt
Varian	800 MHz	5mm Z-PFG $^1\text{H}$ - $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ kryogengekühlt
Varian	900 MHz	5mm Z-PFG $^1\text{H}$ - $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ kryogengekühlt
Bruker	600 MHz	5mm Z-PFG $^1\text{H}$ - $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{31}\text{P}\}$ kryogengekühlt
Bruker	600 MHz	5mm Z-PFG $^1\text{H}$ - $\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ kryogengekühlt

**Tabelle 3.6:** NMR-Experimente. Die erste Spalte gibt die Probennummer entsprechend der Nummerierung aus Abschnitt 3.6.1 an. Bei  $t_1$  handelt es sich um die Anzahl der aufgenommenen reellen Punkte,  $t_2$  und  $t_3$  werden als komplexe Punkte angegeben.

#	Pulssequenz	$sw_1$ [ppm]	$t_1$ [Pkt]	$sw_2$ [ppm]	$t_2$ [Pkt]	$sw_3$ [ppm]	$t_3$ [Pkt]	nt	$d_1$ [s]	Relaxationsintervall/ Mischzeit [ms]	$^{15}\text{N}$ [ppm]	$^{13}\text{C}$ [ppm]	T [K]
1	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC	16	1230	29	64	-	-	16	1,25	-	116,5	-	273, 298
1	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC	16	1230	31	64	-	-	16	1,25	-	116,5	-	298
1	$^{15}\text{N}$ - $T_1$ (600/900 MHz)	16	1024/ 2048	29	96	-	-	16	2,0	10, 1200, 120, 1000, 240, 800, 360, 600, 480, 10, 120, 480, 600	116,5	-	278, 288, 298, 308
1	$^{15}\text{N}$ - $T_{1\rho}$ (600/900 MHz)	16	1024/ 2048	29	96	-	-	16	3,0	2, 100, 10, 90, 20, 80, 30, 70, 40, 60, 50,2, 80, 100	116,5	-	278, 288, 298, 308
1	$\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$ NOE (600/900 MHz)	16	1024/ 2048	29	128	-	-	16	15,0, 9,0	-	116,5	-	278, 288, 298, 308
1	ZZ- $^{15}\text{N}$ - $T_1$	16	2048	29	64	-	-	64	2,0	0, 5,9, 11,8, 23,6, 35,4, 47,2, 59	116,2	-	278, 283
1	$^{15}\text{N}$ -SQ-CPMG (600 MHz)	16	1230	29	64	-	-	16	2,0	0, 40, 2, 36, 4, 32, 8, 28, 12, 24 16, 20, 2, 20, 40	116,5	-	288, 298, 308

1	<sup>15</sup> N-SQ-CPMG (900 MHz)	16	2048	29	88	-	-	16	2,5	0, 48, 2, 42, 4, 36, 6, 32, 8, 28, 10, 24, 12, 20, 16, 2, 24, 48	110, - 123	288, 298, 308
1	<sup>15</sup> N-TROSY- CPMG (600/900 MHz)	16	2048	29	64/96	-	-	16	2,3	0, 40, 2, 36, 4, 32, 8, 28, 12, 24 16, 20, 2, 20, 40	116,5 -	313
1	<sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N- H(S/M)QC (600/900 MHz)	16	2048	29	256	-	-	40/ 48	1,9/ 1,8	-	116,5 -	298
2	1D <sup>1</sup> H- PG-SLED (600 MHz)	16	16384, 19224	-	-	-	-	1024	1,5	-	-	298
2	2D <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N- PG-SLED (600 MHz)	16	1230	29	96	-	-	32	1,5	-	116,5 -	298
3	<sup>15</sup> N-TROSY- CPMG (900 MHz)	16	2048	29	96	-	-	16	2,3	0, 40, 2, 36, 4, 32, 8, 28, 12, 24 16, 20, 2, 20, 40	116,5 -	298

3	$^1\text{H}^N$ -SQ-CPMG (900 MHz)	16	2048	29	96	-	-	16	2,5	0, 30, 1, 27, 2, 24, 3, 21, 4, 18, 5, 15, 6, 12, 8, 10, 1, 15, 30	116,5	-	298
4	$^{15}\text{N}$ -TROSY- CPMG (600 MHz)	16	2048	29	64	-	-	16	2,5	0, 48, 1, 40, 2, 32, 3, 24, 4, 21, 5, 18, 6, 16, 8, 14, 10, 12, 1, 12, 48	116,5	-	298
4	$^1\text{H}^N$ -SQ-CPMG (600 MHz)	16	2048	29	96	-	-	16	2,4	0, 30, 1, 27, 2, 24, 3, 21, 4, 18, 5, 15, 6, 12, 8, 10, 1, 15, 30	116,5	-	298
5	$^{15}\text{N}$ -SQ- CW-CPMG (800 MHz)	16	1228	29	64	-	-	16	3,0	0, 40, 1, 36, 2, 32, 3, 28, 4, 24, 6, 20, 8, 18, 10, 16, 12, 14, 2, 20, 40	116,5	-	298
5	$^{13}\text{CO}$ -SQ- CPMG (800 MHz)	16	1650	29	100	12	1	16	2,0	0, 40, 2, 36, 4, 32, 6, 28, 8, 24, 10, 20, 12, 18, 14, 16, 2, 20, 40	116,5	19,5	298
6	3D HNC0 (600 MHz)	16	1230	29	32	12	64	16	1,0	-	116,5	176,1/ 176,0	283/298

6	3D HNCA (800 MHz)	16	1650	29	32	24	64	24/ 16	1,25/ 1,0	-	116,5	56,0	283/298
6	3D $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC (800 MHz)	16	1664	29	32	24	64	24/ 16	1,25/ 1,0	-	116,5	-	283/298
7	$^{15}\text{N}$ -TROSY- CPMG (600 MHz)	16	2048	29	64	-	-	16	2,5	0, 48, 1, 40, 2, 32, 3, 24, 4, 21, 5, 18, 6, 16, 8, 14, 10, 12, 1, 24, 48	116,5	-	298
7	$^{13}\text{CO}$ -SQ- CPMG (600 MHz)	16	2048	29	96	12	1	24	2,0	0, 40, 2, 36, 4, 32, 6, 28, 8, 24, 10, 20, 12, 18, 14, 16, 2, 20, 40	116,5	19,5	298
8	$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC	16	1230	29	64	-	-	16	1,25	-	116,5	-	298
9	$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC	16	1230	29	64	-	-	16	1,25	-	116,5	-	298
9	$^{15}\text{N}$ -T <sub>1</sub> (600 MHz)	16	2048	29	96	-	-	16	2,0	10, 1200, 120, 1000, 240, 800, 360, 600, 480, 10, 120, 480, 600	116,5	-	298

9	$^{15}\text{N-T}_{1\rho}$ (600 MHz)	16	2048	29	96	-	-	16	3,0	2, 100, 10, 90, 20, 80, 30, 70, 40, 60, 50, 2, 80, 100	116,5	-	298	3. Methoden
9	$\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE (600 MHz)	16	12048	29	128	-	-	16	15,0, 9,0	-	116,5	-	298	
9	$^{15}\text{N-TROSY-CPMG}$ (800 MHz)	16	1024	29	88	-	-	16	2,25	0, 40, 2, 36, 4, 32, 8, 28, 12, 24, 16, 20, 2, 20, 40	116,5	-	313	
10	$^1\text{H},^{15}\text{N-HSQC}$ (600 MHz)	16	2048	29	192	-	-	96	1,3	-	116,5	-	283	
11	$^1\text{H},^{15}\text{N-HSQC}$ (800 MHz)	16	1650	29	128	-	-	32	1,0	-	116,5	-	298	
12	$^1\text{H},^{15}\text{N-HSQC}$ (600 MHz)	16	2048	29	192	-	-	56	1,5	-	116,5	-	298	
13	$^1\text{H},^{15}\text{N-HSQC}$ (800 MHz)	16	1650	29	128	-	-	32	1,25	-	116,5	-	298	
14	$^1\text{H},^{15}\text{N-HSQC}$ (900 MHz)	16	2048	29	192	-	-	32	1,5	-	116,5	-	298, 313	

14	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC (900 MHz)	16	2048	29	192	-	-	64	1,5	-	116,5	-	283
15	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC (600 MHz)	16	2048	29	192	-	-	16	1,5	-	116,5	-	298
16	$^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC (900 MHz)	16	2048	29	192	-	-	24	1,3	-	116,5	-	298
17	$^{15}\text{N}$ -TROSY- CPMG (800 MHz)	16	1024	29	88	-	-	112	2,3	0, 28, 2, 24, 4, 20, 6, 16, 8, 12, 2, 12, 28	116,5	-	313

#### 3.6.3 Prozessierung und Auswertung der Spektren

#### 3.6.4 Resonanzzuordnung des GABARAP-Wildtyps

Die vorhandene NMR-Zuordnung nach Stangler et al. (2002) bezieht sich auf GABARAP mit zwei zusätzlichen Aminosäureresten Gly und Ser am N-Terminus, da zur Reinigung ein GST-Affinitätstag verwendet wurde [23]. In dieser Arbeit wurde das wildtypische aus 117 Aminosäuren bestehende GABARAP wie in Abschnitt 3.4 beschrieben ohne Affinitätstag gereinigt. Für die Überprüfung der Zuordnung diente ein 3D HNCA-, ein 3D HNCQ-, sowie ein NOESY-HSQC-Spektrum von 0,5 mM [U- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-GABARAP bei einer Temperatur von 10 °C und 25 °C.

#### 3.6.5 Translationsdiffusion zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius

Die Messung des hydrodynamischen Radius erfolgte an 0,5 mM [U- $^{15}\text{N}$ ]-GABARAP mit 0,5 % (v/v) Dioxan bei einer Temperatur von 25 °C. Der hydrodynamische Radius wurde auf zwei verschiedene Weisen bestimmt. Zum einen wurde die Methode nach Wilkins et al. (1999) angewendet, bei der Dioxan als interner Standard dient [61] und zum anderen wurde die Methode nach Choy et al. (2002) angewendet, welche auf dem Zusammenhang der Signalintensität in der Amidprotonenregion und der Gradientenstärke beruht [62]. Im Folgenden werden beide Methoden beschrieben.

##### 3.6.5.1 Bestimmung des hydrodynamischen Radius mit Dioxan als Referenz

Für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius mit Dioxan als Referenz wurden insgesamt 15 verschiedene 1D  $^1\text{H}$ -PG-SLED-NMR-Spektren basierend auf einer Pulssequenz nach Altieri et al. (1995) mit zwei Gradienten entlang der Richtung des externen Magnetfeldes aufgenommen [63]. Die Stärke der Gradienten betrug dabei 6,25 %, 12,50 %, 18,75 %, 25,0 %, 31,25 %, 37,50 %, 43,75 %, 50,0 %, 56,25 %, 62,50 %, 68,75 %, 75,0 %, 81,25 %, 87,50 %, 93,75 % bzw. 100 %. Zunächst wurde die Signalintensität der

### 3. Methoden

---

$^1\text{H}$ -Methylgruppenresonanzen des GABARAP von 0,27 bis 1,05 ppm für die jeweilige Gradientenstärke integriert. Die integrierten  $^1\text{H}$ -Methylgruppenresonanzen wurden durch einen nichtlinearen 2-Parameter-Fit gemäß

$$I_{methyl}(G_{rel}) = I_{methyl}(0) \cdot e^{-d_{gabarap} G_{rel}^2} \quad (3.2)$$

gefittet, um so die Konstanten  $I_{methyl}(0)$  sowie die relative Translationsdiffusionskonstante von GABARAP  $d_{gabarap}$  zu erhalten. Anschließend wurden die integrierten Signalintensitäten der  $^1\text{H}$ -Resonanzen von GABARAP und Dioxan im Bereich von 3,753 bis 3,763 ppm bestimmt und die Konstanten  $I_{gabarap}(0)$ ,  $I_{dioxan}(0)$  sowie die Translationsdiffusionskonstante von Dioxan  $d_{ref}$  durch einen nichtlinearen 3-Parameter-Fit mittels

$$I_{ges} = I_{ref}(0) \cdot e^{-d_{ref} G_{rel}^2} + I_{gabarap}(0) \cdot e^{-d_{gabarap} G_{rel}^2} \quad (3.3)$$

ermittelt. Die Stokes-Einstein-Gleichung liefert den Zusammenhang zwischen der Diffusionskonstante, der Viskosität der Lösung  $\eta$  und dem hydrodynamischen Radius  $r_H$  gemäß

$$d \propto D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta r_H}, \quad (3.4)$$

wobei es sich bei der Konstante  $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K um die Boltzmann-Konstante handelt. Da GABARAP und das Referenzmolekül Dioxan sich in der gleichen Lösung befinden, lässt sich folgender Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Radius von GABARAP und Dioxan herstellen:

$$r_{H,gabarap} = \frac{d_{ref}}{d_{protein}} \cdot r_H^{ref} \quad (3.5)$$

Der hydrodynamische Radius des Referenzmoleküls Dioxan ist bekannt und beträgt  $r_H^{ref} = 2,12 \text{ \AA}$  [61].

Neben der Möglichkeit den hydrodynamischen Radius von GABARAP indirekt mit Dioxan als Referenz zu bestimmen, konnte auch die Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 4.3) direkt angewendet werden. Die Ausführung der 2- bzw. 3-Parameter Fits und die

anschließende Umrechnung in den hydrodynamischen Radius sowie die direkte Bestimmung aus der Stokes-Einstein-Gleichung erfolgte mit Hilfe von Matlab.

Es wurden insgesamt zwei 1D  $^1\text{H}$ -PG-SLED-Experimente unabhängig voneinander aufgenommen, sodass sich der hydrodynamische Radius aus dem Mittelwert beider Messungen ergibt.

#### 3.6.5.2 Bestimmung des hydrodynamischen Radius mit $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -PG-SLED-Experimenten

Für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius aus der integrierten Signalintensität im Amidprotonenbereich wurden 2D  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -PG-SLED-Experimente basierend auf der Pulssequenz von Choy et al. (2002) aufgenommen [62]. Die Stärke der Gradienten betrug dabei 6,67 %, 13,33 %, 20,00 %, 26,67 %, 33,33 %, 40,00 %, 46,67 %, 53,33 %, 60,00 %, 66,67 %, 73,33 %, 80,00 %, 86,67 %, 93,33 % bzw. 100 %. Für die Auswertung wurde zunächst die 1D Projektion dieser Spektren im Bereich der Amidprotonenregion von 6,9 bis 9,6 ppm für die jeweilige Gradientenstärke integriert. Die integrierte Signalintensität in Abhängigkeit der Gradientenstärke folgt einem Gaußschen Zusammenhang

$$I(G_{rel}) = I_0 \cdot e^{-\gamma_H^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{3}{4}\beta + \frac{1}{4}\beta') D G_{rel}^2 G_{max}^2}, \quad (3.6)$$

wobei es sich bei  $\gamma_H$  um das gyromagnetische Verhältnis der Protonen, D um den Diffusionskoeffizienten und  $\Delta$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  um Pulssequenz-spezifische Delays handelt. Die relative Gradientenstärke  $G_{rel}$  lässt sich aus der maximalen Gradientenstärke  $G_{max}$  ermitteln. Durch einen Fit der integrierten Intensitäten lässt sich somit der Diffusionskoeffizient D von GABARAP bestimmen und daraus durch Anwendung des Stokes-Einstein-Gesetzes der hydrodynamische Radius  $r_H$ .

Eine Abschätzung des hydrodynamischen Radius von GABARAP erfolgte anhand der Gleichung

$$r_H = (4,75 \text{ \AA} \pm 0,48 \text{ \AA}) N^{(0,29 \pm 0,02)}, \quad (3.7)$$

die lediglich die Anzahl der Aminosäuren  $N$  des Proteins als variablen Parameter enthält [61, 64]. Für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius aus dem Stokes-Einstein-Gesetz muss die Viskosität der Lösung bekannt sein. Die Lösung wurde als ein Gemisch bestehend aus 90 %  $H_2O$  und 10 %  $D_2O$  angenommen und die Viskosität unter Vernachlässigung der übrigen Komponenten des NMR-Puffers gemäß

$$\eta = 0,9 \cdot \eta(H_2O) + 0,1 \cdot \eta(D_2O) \quad (3.8)$$

bestimmt. Die Viskositäten von  $H_2O$  und  $D_2O$  wurden von Cho et al. (1999) übernommen [65]. Aus dem hydrodynamischen Radius  $r_H$  lässt sich die globale Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  von GABARAP mit Hilfe des Gesetzes von Stokes abschätzen:

$$\tau_c = 4\pi\eta \frac{r_H^3}{3k_B T} \quad (3.9)$$

Dabei ist  $\eta$  die Viskosität der Lösung,  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die Temperatur in Kelvin. Die Verwendung des Gesetzes von Stokes erfolgt unter der Annahme, dass GABARAP ein Protein mit isotroper Symmetrie ist. Zum Vergleich mit den experimentellen Daten wurden die hydrodynamischen Eigenschaften auf Grundlage der NMR- und Kristallstruktur von GABARAP (PDB-Eintrag 1KOT [23] und 1GNU [11]) mit dem Programm Hydropro theoretisch ermittelt [66].

#### 3.6.6 Piko- bis Nanosekundendynamik

Radiofrequenz(RF)-Pulse wirken auf die Dichtematrix und orientieren die Spins aus dem thermischen Gleichgewicht, sodass sich die Besetzung zugunsten des angeregten Zustands verändert. Dabei wird in der transversalen Ebene eine makroskopische Magnetisierung erzeugt. Nach Einwirken eines RF-Pulses relaxieren die Spins zurück in das thermische Gleichgewicht, wobei die transversale Spin-Spin Relaxation durch Dephasierung und die longitudinale Spin-Gitter Relaxation unterschieden werden. Die Zeitkonstante für die Rückkehr ins Gleichgewicht ist im Falle der longitudinalen Relaxation  $T_1$  und für die transversale Relaxation  $T_2$ . Die Relaxationsmechanismen beruhen auf

der dipolaren Kopplung zwischen zwei Kernen und der Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA), die abhängig von der Orientierung des Spins zum äußeren Magnetfeld ist. Sind die Kernspins  $I \geq 1$ , so tritt Relaxation auch durch elektrische Quadrupolkopplung auf. Die Brownsche Rotationsdiffusion der Moleküle sowie die interne Dynamik einzelner Kernspins führt zu Fluktuationen des Dipolfeldes und beeinflusst damit die Relaxation. Die Dynamik des Proteinrückgrats auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala bestimmt somit die  $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsraten  $R_1=1/T_1$  und  $R_2=1/T_2$  sowie die heteronuklearen NOE-Werte. Somit lässt sich die interne Dynamik der einzelnen Reste im Protein durch die Messung der Relaxationsraten bestimmen. Der mathematische Zusammenhang besteht über die Autokorrelationsfunktion  $C(\tau)$ , welche sowohl von der internen Dynamik einzelner Reste als auch von der globalen Rotationsdiffusion des Proteins abhängig ist (Gl. 3.10). Die Autokorrelationsfunktion lautet

$$C(\tau) = C_g(\tau) \cdot C_i(\tau), \quad (3.10)$$

wobei die globale Autokorrelationsfunktion

$$C_g(\tau) = \frac{1}{5} \sum_{i=-k}^k c_i \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_i}} \quad (3.11)$$

durch die globalen Rotationskorrelationszeiten  $\tau_i$  bestimmt ist. Bei den Konstanten  $c_i$  handelt es sich um Wichtungsfaktoren zur Berücksichtigung der Symmetrie. Im Fall der isotropen Rotationsdiffusion ist der Wichtungsfaktor  $c = 1$  und es gibt lediglich eine globale Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$ . Für eine vollständig anisotrope Symmetrie und damit einer anisotropen Rotationsdiffusion existieren hingegen fünf verschiedene Rotationskorrelationszeiten. Für die interne Autokorrelationsfunktion  $C_i(\tau)$  werden in der NMR-Spektroskopie üblicherweise maximal zwei interne Korrelationszeiten  $\tau_s$  und  $\tau_f$ , die eine langsame (Index s) und eine schnelle (Index f) interne Dynamik beschreiben, angenommen. Es ergibt sich somit der Zusammenhang

$$C_i(\tau) = S^2 + (1 - S_f^2)e^{-\frac{\tau}{\tau_f}} + (S_f^2 - S^2)e^{-\frac{\tau}{\tau_s}} \quad (3.12)$$

### 3. Methoden

---

mit dem Ordnungsparameter  $S^2 = S_f^2 \cdot S_s^2$  [67]. Die Fouriertransformation der Autokorrelationsfunktion  $C(\tau)$  ergibt die spektrale Dichtefunktion

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \sum_{i=-k}^k c_i \cdot \tau_i \left( S^2 \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + (1 - S_f^2) \frac{\tau_{f'}}{1 + \omega^2 \tau_{f'}^2} + S_f(1 - S_s) \frac{\tau_{s'}}{1 + \omega^2 \tau_{s'}^2} \right) \quad (3.13)$$

mit

$$\tau_{f'}^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_f^{-1} \quad (3.14)$$

und

$$\tau_{s'}^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_s^{-1}. \quad (3.15)$$

Die Spinrelaxationsdaten werden durch die spektrale Dichtefunktion bei den Larmorfrequenzen  $\omega_H$  und  $\omega_N$  der  $^1\text{H}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -Kerne beschrieben. Die Messung der Relaxationsraten erlaubt daher die Rekonstruktion der spektralen Dichtefunktion anhand diskreter Messpunkte und somit die Bestimmung der kinetischen Parameter dynamischer Prozesse. Es besteht folgender Zusammenhang zwischen den Relaxationsdaten und der spektralen Dichtefunktion:

$$R_1 = d[J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + cJ(\omega_N) \quad (3.16)$$

$$R_2 = \frac{d}{2}[4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N) + 6J(\omega_H)] + \frac{c}{6}[4J(0) + 3J(\omega_N)] + R_{ex} \quad (3.17)$$

$$NOE = 1 + d \cdot \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \cdot \frac{6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)}{R_1} \quad (3.18)$$

mit

$$c = \frac{1}{3}\omega_N^2(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})^2 \text{ und } d = \frac{1}{4} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_H^2 \gamma_N^2 \left( \frac{\hbar}{2\pi} \right)^2 < r_{\text{NH}}^{-3} >^2. \quad (3.19)$$

Dabei handelt es sich bei  $\gamma_H$  und  $\gamma_N$  um das gyromagnetische Verhältnis der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kerne und  $h$  entspricht dem Planckschen Wirkungsquantum. Für die Differenz der parallelen und senkrechten Komponente des axialsymmetrischen  $^{15}\text{N}$ -Tensors der chemischen Verschiebung  $\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$  wird ein Wert von -172 ppm angenommen. Der mittlere Abstand der N–H-Bindungen beträgt 1,02 Å. Die Bestimmung der Proteinerückgratdynamik mittels  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten erfolgt auf Grundlage der sogenannten model-free-Analyse von Lipari und Szabo [68, 69], die in verschiedenen Programmen implementiert und weiterentwickelt wurde. Die model-free-Analyse basiert auf der Annahme eines Diffusionstensors und entsprechenden spektralen Dichtefunktionen, aus denen wiederum die Relaxationsdaten  $R_1$ ,  $R_2$  und NOE-Werte zurückgerechnet werden. Dies erfolgt iterativ, bis die Übereinstimmung zwischen den zurückgerechneten und gemessenen Relaxationsdaten optimal ist. Die Kenntnis dieser spektralen Dichtefunktionen, welche die Relaxationsdaten am besten beschreiben, erlaubt schließlich die Bestimmung von Parametern der Proteindynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala. Zu diesen Parametern gehört der Diffusionstensor, die globale Rotationskorrelationszeit, der Ordnungsparameter  $S^2$ , sowie interne Korrelationszeiten. In dieser Arbeit wurde das Programm Tensor2 für die Auswertung von Relaxationsdaten verwendet, die bei nur einer Feldstärke aufgenommen wurden [57]. Die Auswertung bei nur einer Feldstärke eignet sich insbesondere für die Bestimmung der globalen Rotationskorrelationszeit, da diese durch das Verhältnis der Relaxationsraten  $R_2/R_1$  bestimmt ist, wohingegen bei der Bestimmung interner Korrelationszeiten insbesondere die Feldstärkeabhängigkeit zu berücksichtigen ist. Für die Bestimmung der Rotationskorrelationszeit mittels Tensor2 wurden flexible Aminosäurereste, dessen Verhältnis der Relaxationsraten  $R_2/R_1$  um mehr als 15 % von Mittelwert abweichen, von der Analyse ausgeschlossen. Für die Auswertung von interner Dynamik ist das komplexere Programm relax von E. d’Auvergne und P. R. Gooley geeignet, in das ein vollautomatisches Python Skript „dAuvergne\_protocol.py“ implementiert wurde [51, 52, 53, 54, 55]. Für die Analyse mit Hilfe dieses Programms sind Relaxationsdaten in Form von  $R_1$ ,  $R_2$  und heteronuklearen NOE-Werten bei mindestens zwei verschiedenen Feldstärken essentiell. Die Messung der Relaxationsraten  $R_1$ ,  $R_2$  und den heteronuklearen NOE-Werten erfolgte

an einer 1,0 mM [U- $^{15}\text{N}$ ]-GABARAP Probe bei Temperaturen von 5 °C bis 35 °C und einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz. Für die Auswertung der internen Dynamik mit Hilfe von relax wurde ein zusätzlicher Datensatz bei 25 °C und einer Protonenlarmorfrequenz von 900 MHz aufgenommen.

#### 3.6.6.1 Experimentelle Bestimmung von $R_1$

Die longitudinalen Spin-Gitter Relaxationszeiten  $T_1$  wurden durch ein Pseudo-3D Experiment basierend auf Farrow et al. ermittelt [70]. In diesem Experiment wird die  $^{15}\text{N}$ -Magnetisierung antiparallel zum externen Magnetfeld ausgerichtet. Während einer variablen Zeit  $t$ , dem sogenannten Inversion-Recovery-Delay, relaxieren die  $^{15}\text{N}$ -Kerne je nach Dauer unterschiedlich weit zurück in den Gleichgewichtszustand mit der Magnetisierung parallel zum externen Magnetfeld. Diese Magnetisierung wird durch einen 90°-Puls in die transversale Ebene orientiert, um sie als FID zu registrieren. Das Peakvolumen ist ein Maß für den Anteil der longitudinalen Magnetisierung und folgt dem Zusammenhang

$$I = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_1}}. \quad (3.20)$$

Üblicherweise wird die longitudinale Relaxationsrate  $R_1=1/T_1$  anstelle der Relaxationszeit  $T_1$  angegeben. Für die Bestimmung von  $R_1$ -Relaxationsraten der  $^{15}\text{N}$ -Kerne im Proteinrückgrat von GABARAP wurden [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ]-Spektren mit 10 verschiedenen Zeiten bei einer maximalen Länge von 1200 ms aufgenommen. Die Fehleranalyse erfolgte durch vier doppelt aufgenommene Spektren mit einem Inversion-Recovery-Delay von 10, 480, 600 und 1200 ms. Die Peakvolumina wurden für jeden Aminosäurerest und jeden Zeitpunkt mit Hilfe des Programms MUNIN extrahiert und gemäß Gleichung 3.20 gefittet um die  $R_1$ -Raten zu ermitteln [47, 48].

### 3.6.6.2 Experimentelle Bestimmung von $R_2$

Die transversale Spin-Spin-Relaxation ist durch die Dephasierung von transversaler Magnetisierung in der xy-Ebene nach einem RF-Puls bestimmt. Die transversale Relaxationsrate  $R_2$  wird in Abhängigkeit von  $R_1$  und  $R_{1\rho}$  gemäß

$$R_2 = \frac{1}{T_2} = \frac{1}{\gamma^2 B_1^2} \cdot ((\Omega^2 + \gamma^2 B_1^2) R_{1\rho} - \Omega^2 R_1). \quad (3.21)$$

ermittelt.  $R_1$  ist die longitudinale Relaxationsrate und bei  $R_{1\rho}$  handelt es sich um die Dephasierung der Magnetisierung entlang  $B_1$ , einem Spin-Lock-Feld im rotierenden Koordinatensystem. Es besteht eine Analogie zur longitudinalen Relaxation  $R_1$  mit dem Unterschied, dass die Relaxation  $R_{1\rho}$  in Bezug zu dem Spin-Lock-Feld  $B_1$  anstatt zum externen Magnetfeld  $B_0$  definiert ist. Die Messung von  $R_{1\rho}$ -Raten basiert auf einem Pseudo-3D Experiment, wie von Farrow et al. (1994) und Korzhnev et al. (2002) beschrieben [70, 71]. Zunächst orientiert ein  $90^\circ$ -Puls die Gleichgewichtsmagnetisierung in die transversale Ebene. Ein  $90^\circ$ -phasenverschobener Spin-Lock-Puls wird dann so angelegt, dass das Spin-Lock-Feld  $B_1$  mit dem Referenzvektor im rotierenden Koordinatensystem übereinstimmt. Während des Spin-Lock-Pulses dephasiert die ursprünglich zum externen Feld  $B_0$  orientierte Gleichgewichtsmagnetisierung entlang  $B_1$ . Bei dieser Relaxationsrate handelt es sich somit um  $R_{1\rho}$ . Für die Bestimmung von  $R_{1\rho}$  der  $^{15}\text{N}$ -Kerne im Proteinrückgrat von GABARAP wurden  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -Spektren mit 11 Spin-Lock-Pulsen unterschiedlicher Länge und einer maximalen Länge von 100 ms aufgenommen. Die Fehleranalyse erfolgte durch die Aufnahme von drei doppelten Zeitpunkten bei  $t = 2, 80$  und  $100$  ms. Die Peakvolumina wurden für jeden Aminosäurerest und jeden Zeitpunkt mittels MUNIN extrahiert und analog zu Gleichung 3.20 gefittet, um die  $R_{1\rho}$ -Raten zu ermitteln [47, 48]. Für die Berechnung der transversalen Relaxationsrate  $R_2$  mittels Gleichung 3.21 ist neben der Messung von  $R_1$  und  $R_{1\rho}$  die Kenntnis des Offsets  $\Omega$  aller Resonanzen zum  $^{15}\text{N}$ -Carrier notwendig. Diese wurden aus der Peakliste von GABARAP mittels NMRviewJ 8.0.3 bestimmt.

#### 3.6.6.3 Heteronukleare NOEs

Das heteronukleare  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ -Experiment liefert Informationen über die N–H-Bindungsvektordynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala. Unterliegen die N–H-Bindungsvektoren einer schnellen Dynamik, so weisen diese einen geringeren NOE-Wert auf im Vergleich zu N–H-Bindungen in rigiden Bereichen des Proteins. Für die Bestimmung der  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte wird ein Spektrum mit gesättigter  $^1\text{H}$ -Magnetisierung sowie ein Referenzspektrum aufgenommen. Der NOE des N–H-Bindungsvektors berechnet sich aus dem Verhältnis der Peakintensität eines Aminosäurerestes im gesättigten Spektrum und dem Referenzspektrum gemäß:

$$NOE = \frac{I_{\text{gesättigt}}}{I_{\text{Referenz}}} \quad (3.22)$$

Der maximal mögliche  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Wert eines gefalteten Proteins, das sich isotrop bewegt beträgt 0,82 bei einer Protonenlarmorfrequenz von 500 MHz und tritt nur in Abwesenheit von interner Dynamik auf [72]. Für die Bestimmung der NOE-Werte von GABARAP wurden die Amidprotonen für 6 s angeregt bei einem Recycle Delay von 9 s. Für das Referenzspektrum wurden die Amidprotonen nicht angeregt und die Aufnahme erfolgte ebenfalls mit einem Recycle-Delay von 9 s. Die Extraktion der maximalen Peakintensitäten erfolgte mit NMRviewJ 8.0.3 und die Ermittlung des Fehlers anhand des Rauschlevels.

#### 3.6.7 Mikro- bis Millisekundendynamik

##### 3.6.7.1 ZZ-Austauschexperimente

Das ZZ-Austauschexperiment eignet sich zur Charakterisierung langsamer Austauschprozesse von Proteinen mit Austauschraten im Bereich von  $0,5$  bis  $50\text{ s}^{-1}$  [73]. Dazu wird der Austausch von longitudinaler Magnetisierung zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand als Funktion einer Mischzeit bestimmt [74]. Die zeitliche

### 3. Methoden

---

Entwicklung der Magnetisierung während der Mischzeit wird in diesem Fall durch die modifizierten longitudinalen Bloch-McConnell-Gleichungen beschrieben:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \Delta \hat{M}_{z,A}(t) \\ \Delta \hat{M}_{z,B}(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -R_{1A}^0 - k_1 & k_{-1} \\ k_1 & -R_{1B}^0 - k_{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta \hat{M}_{z,A}(t) \\ \Delta \hat{M}_{z,B}(t) \end{bmatrix} \quad (3.23)$$

Dabei entsprechen  $\Delta \hat{M}_{z,A}$  und  $\Delta \hat{M}_{z,B}$  der longitudinalen Magnetisierung von Zustand A bzw. Zustand B. Bei der Größe  $R_1^0$  handelt es sich um die longitudinale Relaxationsrate. Die Austauschraten von Zustand A zu B und umgekehrt sind durch  $k_1$  und  $k_{-1}$  beschrieben. Die Lösung dieser Gleichungen lautet:

$$\begin{bmatrix} \Delta \hat{M}_{z,A} \\ \Delta \hat{M}_{z,B} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{AA}(t) & a_{AB}(t) \\ a_{BA}(t) & a_{BB}(t) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Delta \hat{M}_{z,A} \\ \Delta \hat{M}_{z,B} \end{bmatrix} \quad (3.24)$$

mit

$$\begin{aligned} a_{AA}(t) &= \frac{1}{2} \left[ \left( 1 - \frac{R_{1A}^0 - R_{1B}^0 + k_{ex}(p_B - p_A)}{\lambda_+ - \lambda_-} \right) e^{-\lambda_- t} \right. \\ &\quad \left. + \left( 1 + \frac{R_{1A}^0 - R_{1B}^0 + k_{ex}(p_B - p_A)}{\lambda_+ - \lambda_-} \right) e^{-\lambda_+ t} \right] \\ a_{BB}(t) &= \frac{1}{2} \left[ \left( 1 + \frac{R_{1A}^0 - R_{1B}^0 + k_{ex}(p_B - p_A)}{\lambda_+ - \lambda_-} \right) e^{-\lambda_- t} \right. \\ &\quad \left. + \left( 1 - \frac{R_{1A}^0 - R_{1B}^0 + k_{ex}(p_B - p_A)}{\lambda_+ - \lambda_-} \right) e^{-\lambda_+ t} \right] \\ a_{AB}(t) &= \frac{k_{ex} p_A}{(\lambda_+ - \lambda_-)} [e^{-\lambda_- t} - e^{-\lambda_+ t}] \\ a_{BA}(t) &= \frac{k_{ex} p_B}{(\lambda_+ - \lambda_-)} [e^{-\lambda_- t} - e^{-\lambda_+ t}]. \end{aligned} \quad (3.25)$$

Die Austauschrate  $k_{ex}$  ergibt sich aus der Summe  $k_1 + k_{-1}$  und  $p_A$  bzw.  $p_B$  entsprechen den Populationen des Zustands A und B. Die Eigenwerte  $\lambda$  berechnen sich wie folgt:

$$\lambda_{\pm} = \frac{1}{2} \{ R_{1A}^0 + R_{1B}^0 + k_{ex} \pm [(R_{1A}^0 - R_{1B}^0 + k_{ex}(p_B - p_A))^2 + 4p_A p_B k_{ex}^2]^{\frac{1}{2}} \} \quad (3.26)$$

Die Lösungen der modifizierten longitudinalen Bloch-McConnell-Gleichungen vereinfachen sich unter der Annahme, dass  $R_{1A}^0 = R_{1B}^0$  zu

$$\begin{aligned}
 a_{AA}(t) &= [p_a + p_b e^{-2k_{ex}t}] e^{-R_1^0 t} \\
 a_{BB}(t) &= [p_b + p_a e^{-2k_{ex}t}] e^{-R_1^0 t} \\
 a_{AB}(t) &= p_a [1 - e^{-2k_{ex}t}] e^{-R_1^0 t} \\
 a_{BA}(t) &= p_b [1 - e^{-2k_{ex}t}] e^{-R_1^0 t}.
 \end{aligned}
 \tag{3.27}$$

Das ZZ-Austauschexperiment basiert auf der Pulssequenz von Farrow et al. (1994) und wurde so umprogrammiert, dass eine variable Mischzeit in Schritten von 5,9 ms eingefügt werden kann [74]. Das Experiment erfolgte an 1,0 mM [U-<sup>15</sup>N]-GABARAP bei 5 °C und 10 °C mit einer maximalen eingefügten Mischzeit von 59 ms (Parameter s. Tabelle 3.6). Die Peakintensitäten wurden in Abhängigkeit der Mischzeit durch die Bloch-McConnell-Gleichungen mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit geschriebenen Matlab Programms nach der Methode des kleinsten  $\chi^2$  gefittet. Dabei waren die Intensitäten zum Zeitpunkt t=0 ms lokale Fitparameter, während die Austauschrate und Population des angeregten Zustands als globale Fitparameter gewählt wurden. Eine Monte-Carlo-Simulation diente der Fehlerabschätzung.

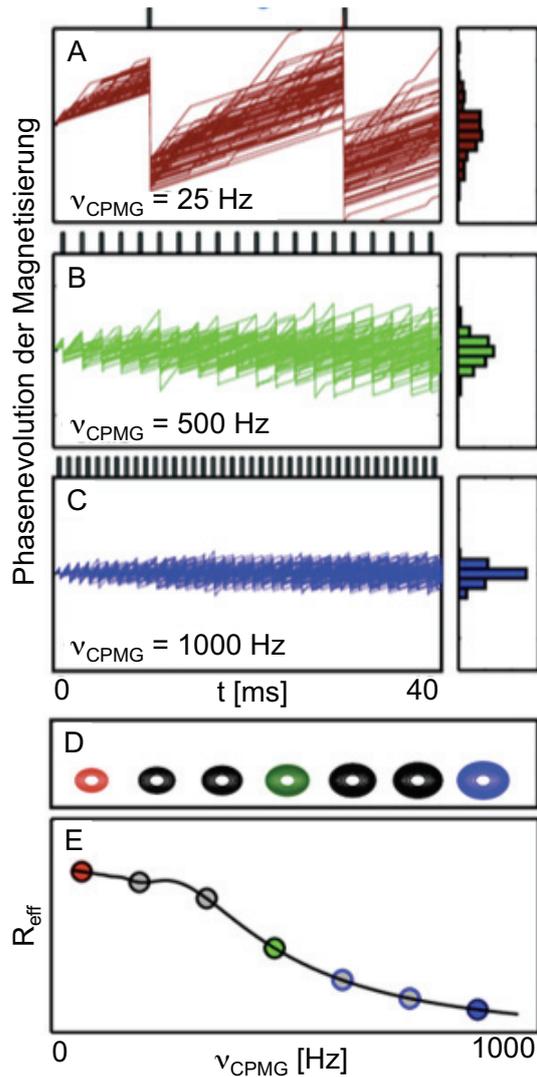
#### 3.6.7.2 Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)-Experimente

Befindet sich ein System im schnellen Austausch zwischen zwei Zuständen A und B oder ist Population des angeregten Zustands B so klein, dass der Peak des Zustands B im NMR-Spektrum nicht sichtbar ist, eignen sich Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)-Relaxationsdispersions(RD)-Experimente zur Quantifizierung der Austauschkinetik. Diese Methode eignet sich zur Charakterisierung von Austauschprozessen mit einer Population von nur 0,5 % bei einer Rate von bis zu  $2000 \text{ s}^{-1}$  [41]. Im CPMG-RD-Experiment wird die effektive Relaxationsrate  $R_{eff}$  in Abhängigkeit der Anzahl aufeinanderfolgender refokussierender  $180^\circ$ -Pulse innerhalb eines konstanten Zeitelements  $T_{CPMG}$  bestimmt. Die Anzahl der  $180^\circ$ -Pulse innerhalb des konstanten

Zeitintervalls  $T_{CPMG}$  bestimmt die CPMG-Frequenz  $\nu_{CPMG} = 1/(2\tau)$ , wobei  $\tau$  der Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden refokussierenden Pulsen entspricht. Die effektive Relaxationsrate wird durch

$$R_{eff} = \frac{-1}{T_{CPMG}} \ln \frac{I}{I_0} \quad (3.28)$$

beschrieben, wobei  $I$  die Peakintensität im jeweiligen Spektrum einer bestimmten CPMG-Frequenz  $\nu_{CPMG}$  ist und  $I_0$  die entsprechende Peakintensität im Referenzspektrum ohne das Zeitelement der Länge  $T_{CPMG}$ . Eine schematische Darstellung der CPMG-RD-NMR-Spektroskopie ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Durch chemischen Austausch verursachte stochastische Fluktuationen der chemischen Verschiebung führen zu einer Dephasierung der Magnetisierung, die sich bei Erhöhung der CPMG-Frequenz verringert (Abb. 3.2 A–C). Aus der Dephasierung resultiert eine Linienverbreiterung, sodass die Peakintensität bei Erhöhung der CPMG-Frequenz zunimmt (Abb. 3.2 D). CPMG-RD-Kurven stellen die effektive Relaxationsrate  $R_{eff}$  in Abhängigkeit der CPMG-Frequenz dar (Abb. 3.2 E). Die effektive Relaxationsrate  $R_{eff}$  nimmt gemäß Gleichung 3.28 mit steigender CPMG-Frequenz ab und erreicht einen Wert, welcher der transversalen Relaxationsrate  $R_{2,\infty}$  entspricht. Der Verlauf einer CPMG-RD-Kurve ist durch die Population der austauschenden Zustände  $p_A$  und  $p_B$ , der Austauschrate  $k_{ex}$ , sowie durch den Absolutwert der Differenz von chemischen Verschiebungen  $|\Delta\omega|$  der intrinsischen Resonanzen von Zustand A und B bestimmt. Der Zusammenhang zwischen dem Intensitätsabfall und den Austauschparametern besteht über die Bloch-McConnell-Gleichungen (s. Gl. 3.23). Unterliegt das System keinem chemischen Austausch, so nimmt die Phase durch jeden refokussierenden Puls wieder ihren ursprünglichen Wert an und eine Veränderung der CPMG-Frequenz hat keinen Effekt. Die CPMG-RD-Kurve ist in Abwesenheit von chemischen Austausch folglich konstant mit einem Wert  $R_{2,\infty}$ . Neben der Bestimmung von  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdispersion wurden weitere CPMG-Pulssequenzen für die Bestimmung des chemischen Austauschs von  $\text{H}^N$ - sowie CO-Kernen angewendet [75, 76]. Für die Messung der  $\text{H}^N$ -Relaxationsdispersionskurven wurde perdeuteriertes GABARAP verwendet, um die homonukleare  $\text{H}^N$ – $\text{H}^\alpha$ -Kopplung zu eliminieren. Die Refokussierung der



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung von CPMG-RD-NMR-Spektroskopie. Der Effekt von refokussierenden Pulsen auf die zeitliche Phasenevolution der Magnetisierung ist in A) – D) für eine unterschiedliche Anzahl von Pulsen dargestellt, welche durch die schwarzen Balken oberhalb der jeweiligen Abbildung repräsentiert werden. Die CPMG-Frequenz  $\nu_{\text{CPMG}} = 1/(2\tau)$  ist durch die Zeit  $\tau$  zwischen zwei refokussierenden Pulsen bestimmt. A) Durch stochastische Fluktuationen der chemischen Verschiebung kommt es zur Dephasierung der Magnetisierung, die in einer starken Linienverbreiterung resultiert. B) Eine Erhöhung der CPMG-Frequenz verursacht eine geringere Dephasierung und damit weniger Linienverbreiterung. C) Bei einer CPMG-Frequenz von 1000 Hz wird die Dephasierung nahezu vollständig unterdrückt und die Linienverbreiterung minimal. D) Die Peakintensität nimmt mit Erhöhung der CPMG-Frequenz zu. E) CPMG-RD-Kurven stellen die effektive Relaxationsrate in Abhängigkeit der CPMG-Frequenz dar. Abbildung adaptiert aus [42].

$H^N-H^\alpha$ -Kopplung, die im Bereich von 3 bis 12 Hz liegt erfordert sehr lange Pulse, was durch die Perdeuterierung umgangen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experimente an 1,0 mM  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP bei verschiedenen Temperaturen zwischen 15 °C und 40 °C, als auch  $^{13}\text{CO}$ -CPMG-Experimente an 0,3 mM bzw. 0,9 mM  $[\text{U-}^{13}\text{C},^{15}\text{N}]$ -GABARAP und  $H^N$ -CPMG-Experimente an 0,9 mM bzw. 0,5 mM  $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GABARAP bei 25 °C und je zwei verschiedenen Feldstärken aufgenommen. Die Relaxationsintervalle  $T_{\text{CPMG}}$  betragen im Falle der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experimente 48 ms und 40 ms, für die  $^{13}\text{CO}$ -CPMG-Experimente 40 ms, sowie 30 ms für die  $H^N$ -CPMG-Experimente. Aufgrund hoher Salzkonzentrationen und daraus folgenden großen Puls-längen, wurden für die Messung von  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experimenten bei Temperaturen über 30 °C, bzw. bei der Verwendung von Probenköpfen der Firma Bruker bei allen Temperaturen, TROSY-CPMG-Spektren aufgenommen. Da für die Messung der Relaxationsdispersion von  $H^N$ - sowie CO-Kernen jeweils verschiedene Proben notwendig waren, wurde mit jedem  $H^N$ -CPMG und  $^{13}\text{CO}$ -CPMG auch ein  $^{15}\text{N}$ -CPMG zum Vergleich aufgenommen. Details zu verschiedenen CPMG-Experimenten sind der Tabelle 3.6 zu entnehmen. Die Intensitäten der Resonanzen wurden mit dem Programm MUNIN quantifiziert und in effektive transversale Relaxationsraten gemäß Gleichung 3.28 umgerechnet. Die Fehlerbestimmung erfolgte durch die doppelte Aufnahme von drei verschiedenen CPMG-Frequenzen [77]. Die Auswertung der Austauschkinetik wurde mit Hilfe des Programms `cpmg_fit` von Dmitry Korzhnev durchgeführt, das auf Anfrage beim Entwickler verfügbar ist.

#### 3.6.7.3 Vorzeichenbestimmung von Differenzen der chemischen Verschiebung

Aus den Relaxationsdispersionskurven wird das Quadrat der Differenz der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega^2$  zwischen den intrinsischen Resonanzen von zwei Austauschzuständen erhalten, sodass der Absolutbetrag bestimmt werden kann, während die Information über das Vorzeichen durch das Quadrieren verloren geht. Zur Bestimmung des Vorzeichens von  $\Delta\omega$  der  $^{15}\text{N}$ -Kerne ( $\Delta\omega_N$ ) vergleicht man die Peakpositionen in einem Paar aus  $[\text{}^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC/HMQC-Experimenten bei einer Feldstärke oder in zwei

[ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Experimenten bei verschiedenen Feldstärken [78]. Im HMQC-Spektrum führt die nichtlineare Mittelung von ZQ- und DQ-Kohärenz zu einer anderen Peakposition im Vergleich zum HSQC-Spektrum, vorausgesetzt die Differenz der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_H$  in Protonendimension ist ungleich null. In Abb. 3.3 sind die  $^{15}\text{N}$ -Peakpositionen in HSQC- bzw. HMQC-Spektren für zwei austauschende Zustände schematisch dargestellt. Detektierbare Peaks sind als durchgehende Linien dargestellt, während hypothetische intrinsische Resonanzen, sowie aufgrund von Linienverbreiterung nicht detektierbare Peaks durch gestrichelte Linien repräsentiert werden. Abbildung 3.3(A) zeigt die intrinsischen Resonanzen für einen hoch populierte Grundzustand und einen gering populierte angeregten Zustand. Im Falle von chemischem Austausch, ist der im HSQC-Spektrum (Abb. 3.3 B) bei einer Feldstärke  $B_0^i$  auftretende Peak linienverbreitert und im Vergleich zur intrinsischen Resonanz des Grundzustands um

$$\delta_N^{ex} = k_A \frac{\xi_N}{(1 + \rho)^2 + \xi_N^2}, \quad (3.29)$$

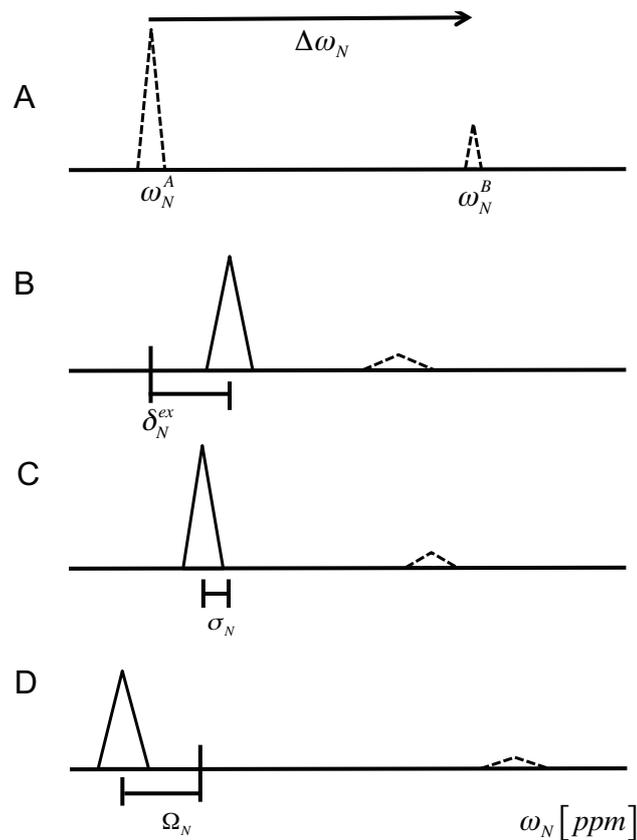
zur intrinsischen Resonanz des angeregten Zustands verschoben. Dabei gilt  $k_A = k_{ex} \cdot p_B$ ,  $\rho = (R_{2,A} - R_{2,B})/k_B$  und  $\xi_N = \Delta\omega_N/k_B$ , wobei  $k_B = k_{ex} \cdot p_A$ . Im HSQC-Spektrum bei einer höheren Feldstärke von  $B_0^{ii}$  (Abb. 3.3 C) ist der Peak schärfer und ebenfalls gemäß Gleichung 3.29 verschoben. Insgesamt beträgt die Differenz  $\sigma_N$  zwischen den Resonanzen bei zwei verschiedenen Feldstärken  $B_0^i$  und  $B_0^{ii}$  somit

$$\sigma_N = \frac{k_A \xi_N}{(1 + \rho)^2 + (\gamma_N B_0^i \xi_N)^2} - \frac{k_A \xi_N}{(1 + \rho)^2 + (\gamma_N B_0^{ii} \xi_N)^2}, \quad (3.30)$$

mit  $\sigma_N$  in ppm. Der entsprechende Peak im HMQC-Spektrum (Abb. 3.3 D) ist bei gleicher Feldstärke um

$$\Omega_N = k_A \left\{ \frac{\xi_N}{(1 + \rho)^2 + \xi_N^2} - \frac{1}{2} \left[ \frac{\xi_N + \xi_H}{(1 + \rho)^2 + (\xi_N + \xi_H)^2} + \frac{\xi_N - \xi_H}{(1 + \rho)^2 + (\xi_N - \xi_H)^2} \right] \right\}, \quad (3.31)$$

mit  $\xi_H = \Delta\omega_H/k_B$  gegenüber des Peaks im HSQC-Spektrum verschoben.  $\Omega_N/2\pi$  wird dabei in Hz angegeben. Würde die intrinsische Resonanz des gering populierte Zustands eine größere chemische Verschiebung als die des Grundzustands aufweisen, so wären die Peaks jeweils in die entgegengesetzte Richtung verschoben. Die relative Position der Peaks in HSQC-Spektren bei verschiedenen Feldstärken bzw. in einem HSQC- und einem HMQC-Spektrum bei gleicher Feldstärke gibt demnach Aufschluss über das Vorzeichen der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Zuständen. Für die Analyse von Peakdifferenzen in GABARAP wurden  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC und  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HMQC-Experimente bei einer Temperatur von 25 °C und zwei verschiedenen Feldstärken (600 MHz und 900 MHz) aufgenommen.



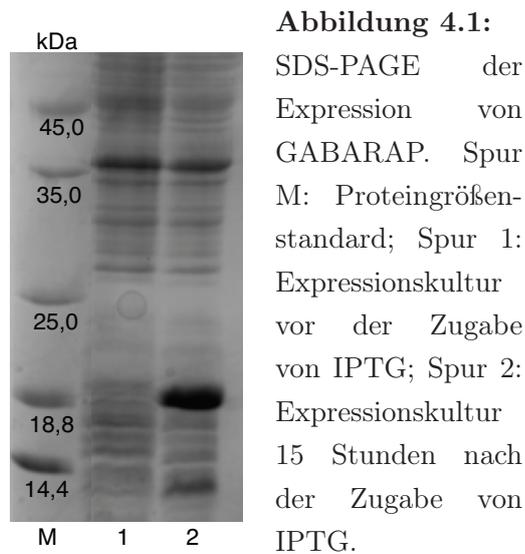
**Abbildung 3.3:** Resonanzen bei schnellem chemischen Austausch zwischen zwei unterschiedlich besetzten Zuständen. Detektierbare Peaks sind als durchgehende Linien dargestellt, während hypothetische intrinsische Resonanzen, sowie aufgrund von Linienverbreiterung nicht detektierbare Peaks durch gestrichelte Linien repräsentiert werden. A) Intrinsische Resonanzen der beiden Zustände. B) In einem bei der Feldstärke  $B_0^i$  aufgenommenen HSQC-Spektrum wird aufgrund von schnellem Austausch nur ein Peak detektiert, der um  $\delta_N^{ex}$  zur intrinsischen Resonanz des stärker besetzten Zustands verschoben ist. C) Im HSQC-Spektrum bei einer Feldstärke  $B_0^{ii} > B_0^i$  verschiebt sich der Peak um  $\sigma_N$  im Vergleich zum Spektrum bei der kleineren Feldstärke  $B_0^i$ . D) Im HMQC-Spektrum bei der Feldstärke  $B_0^{ii}$  verschiebt sich der Peak um  $\Omega_N$ . Der Peak im HMQC-Spektrum kann entweder links oder rechts der intrinsischen Resonanz liegen, jedoch ist der Peak in jedem Fall weiter entfernt von der intrinsischen Resonanz des gering populierte Zustands als im HSQC-Spektrum, solange die hinreichende Bedingung  $|\Delta\omega_N| < \sqrt{3}k_b$  erfüllt ist. Abbildung nach [78].

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression und Reinigung von GABARAP

Die Expression und Reinigung von GABARAP wurde wie in Kapitel 3.3 und 3.4 beschrieben durchgeführt. Die SDS-PAGE der Expression ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Nach der Zugabe von 1 mM IPTG ist nach 15 Stunden eine deutliche Überexpression von GABARAP zu erkennen, was der Vergleich einer *E. coli* Probe vor der Zugabe von IPTG (Spur 1) und kurz vor der Ernte der *E. coli* Kultur (Spur 2) zeigt. GABARAP läuft im Gel bei einem Molekulargewicht von 18,8 kDa, obwohl das tatsächliche Molekulargewicht 14 kDa beträgt.

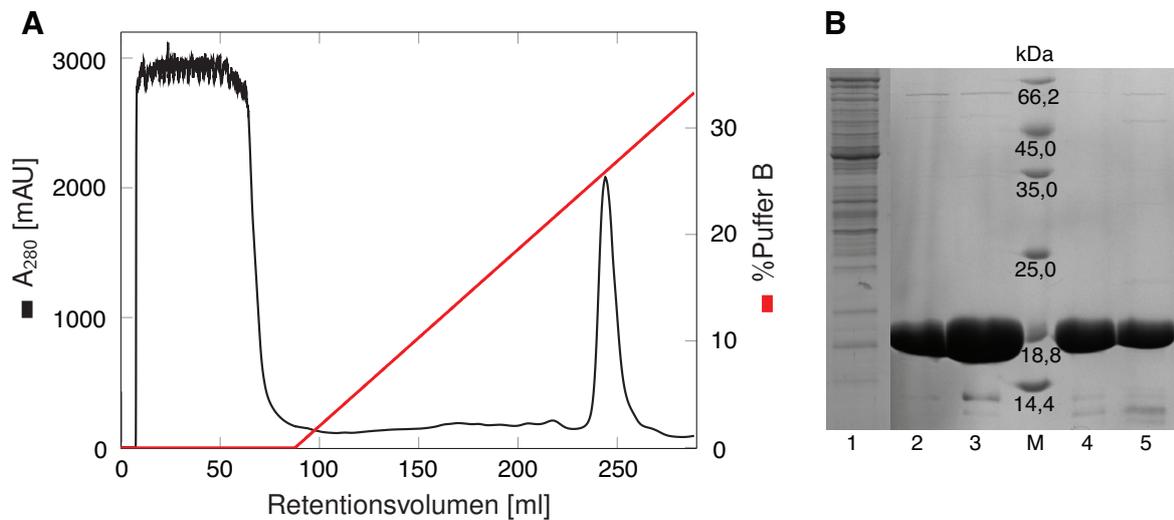
Der erste wesentliche Reinigungsschritt ist die Ionenaustauschchromatographie mittels SP Sepharose. Abbildung 4.2 (A) zeigt ein typisches Ionenaustauschchromatogramm mit einer HiLoad SP Sepharose 16/10 Säule, bei dem die Absorption bei 280 nm und die Salzkonzentration in Abhängigkeit des durchgelaufenen Volumens aufgetragen sind. Der Durchfluss enthält nahezu alle Proteine mit Ausnahme von GABARAP, wie Spur 1 in Abbildung 4.2 (B) zeigt. GABARAP eluiert bei einer Puffer B Konzentration von etwa 26 %, was einer Salzkonzentration von 300 mM KCl entspricht. Eine SDS-PAGE der Peakfraktionen (Abb. 4.2 (B) Spur 2 bis 5) im Bereich von 26 % Puffer B zeigt deutlich, dass GABARAP nach der Ionenaustauschchromatographie eine Reinheit von mehr als 90 % aufweist. Des Weiteren zeigt die SDS-PAGE dieser Peakfraktionen, dass sich die Verunreinigungen in ihrem Molekulargewicht von GABARAP deutlich unterscheiden, sodass die Möglichkeit der weiteren Aufreinigung durch eine Größenausschlusschromatographie gegeben ist. Nach der Ionenaustauschchromatographie beträgt die Ausbeute von GABARAP in den vereinigten Fraktionen etwa 30 mg (pro 1 l Expressionskultur),



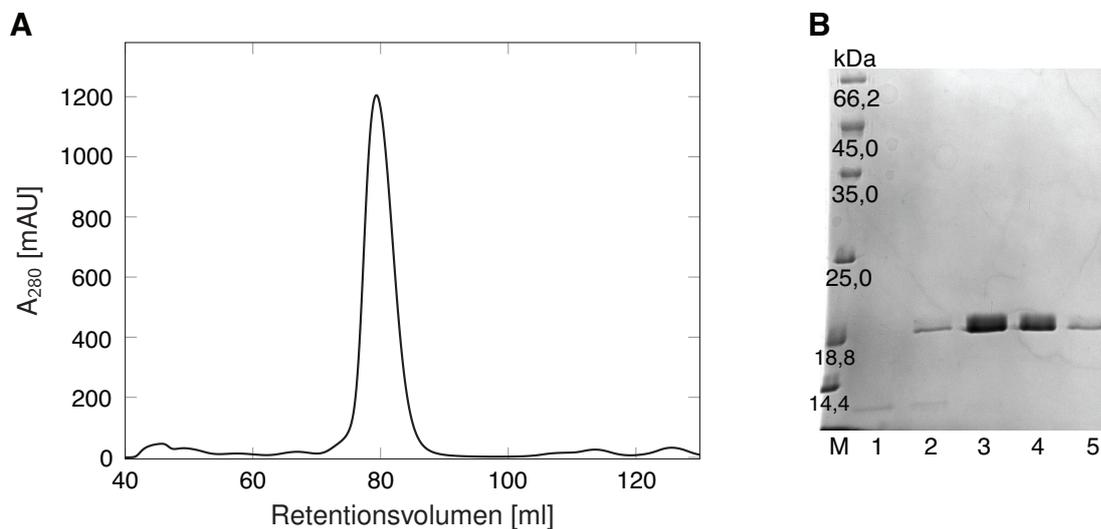
wobei durch die Einengung in einem Vivaspin Konzentrator (MWCO 3,5 kDa) etwa 15 % des GABARAPs durch Bindung an die Membran verloren gehen.

Die Größenausschlusschromatographie mittels einer HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule ist in Abbildung 4.3 (A) dargestellt. Demnach eluiert GABARAP bei einem Retentionsvolumen von 75 ml bis 85 ml, während die Verunreinigungen bei deutlich geringeren Volumina oder im Ausschlussvolumen ( $> 120$  ml) eluieren. Die SDS-PAGE in Abbildung 4.3 (B) zeigt eine leichte Verunreinigung an der linken Schulter des Elutionspeaks (Spur 1), sodass diese Fraktion verworfen wurde und die restlichen Fraktionen des Elutionspeaks eine Reinheit von mehr als 95 % aufweisen. Die vereinigten Peakfraktionen wurden mittels Vivaspin Konzentrator (MWCO 3,5 kDa) auf eine Konzentration von 1 mM eingengt, wobei erneut ein Teil des Proteins durch Bindung an die Konzentratormembran verloren ging. Aus einem Liter Expressionskultur in M9 Minimalmedium ließen sich etwa 21 mg GABARAP reinigen.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.2:** A) Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie mittels HiLoad SP Sepharose 16/10 an einem ÄKTAPurifier. In schwarz ist die Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Retentionsvolumens aufgetragen. Die Konzentration des Hochsalzpuffers B (1 M KCl) ist in rot dargestellt. GABARAP eluiert bei einer Salzkonzentration von etwa 26 % Puffer B. Andere Proteine binden nicht an die SP Sepharose und eluieren im Durchfluss (< 80 ml). B) SDS-PAGE mit dem Durchfluss der Ionenaustauschchromatographie (Spur 1) und den Peakfraktionen im Bereich von 26 % Puffer B der Ionenaustauschchromatographie (2–5).

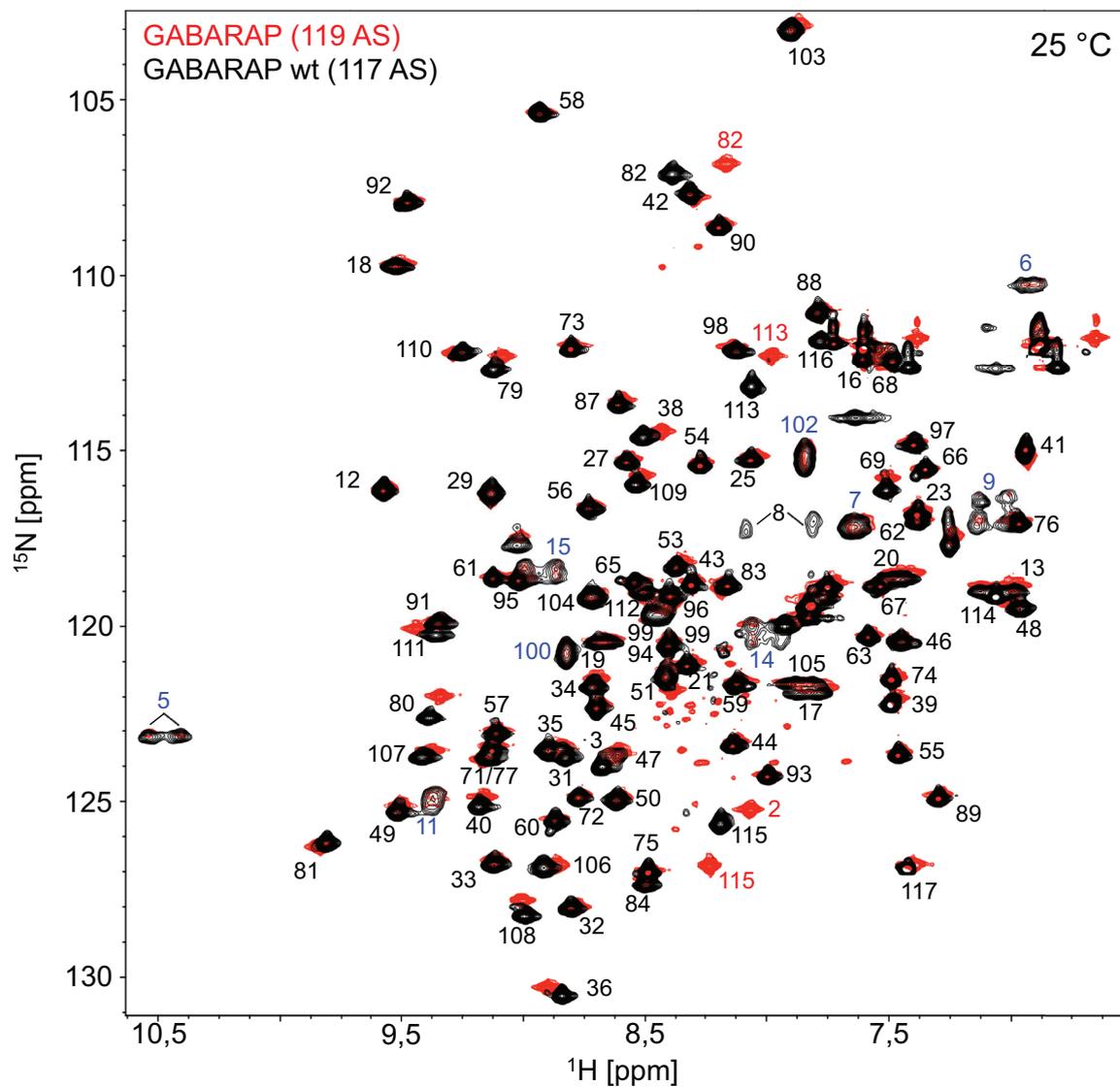


**Abbildung 4.3:** A) Größenausschlusschromatographie mit einer HiLoad 16/600 Superdex 75 pg Säule an einem ÄKTAPurifier. Die Absorption bei 280 nm zeigt ein Maximum und somit die Elution von GABARAP bei einem Retentionsvolumen von 75 ml bis 85 ml. B) SDS-PAGE der Elutionsfraktionen von 75 ml bis 85 ml.

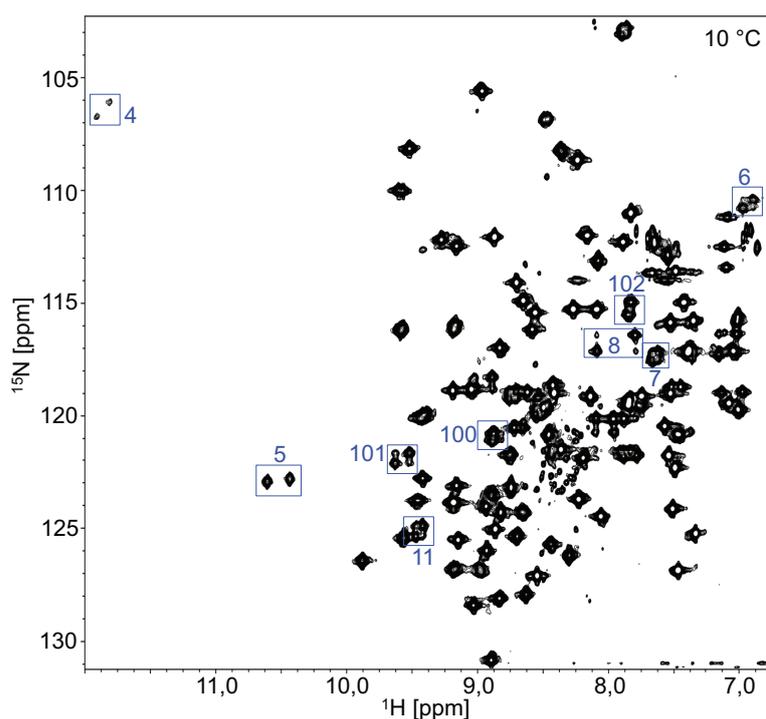
## 4.2 Resonanzzuordnung des GABARAP-Wildtyps

Die NMR-Struktur von GABARAP (PDB-Eintrag 1KOT) basiert auf einem 119 Aminosäuren umfassenden Konstrukt, das gegenüber dem wildtypischen GABARAP zwei zusätzliche N-terminale Aminosäurereste aufweist [79, 23]. Bei den beiden zusätzlichen Aminosäureresten handelt es sich um Gly und Ser einer Thrombin-Schnittstelle, welche für die Abspaltung eines GST-Affinitätstags notwendig war. In dieser Arbeit wurde das wildtypische GABARAP mit 117 Aminosäuren ohne Affinitätstag und damit ohne N-terminales Gly und Ser verwendet, sodass insbesondere die Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrats ( $H^N$ , N,  $C^\alpha$  und CO) zu überprüfen und anzupassen war. Diese Überprüfung wurde durch die Aufnahme von 3D HNCO-, 3D HNCA- sowie 3D NOESY-HSQC-Spektren bei 25 °C sowie 10 °C erreicht. Die niedrigere Temperatur von 10 °C führt zu einem höheren Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Resonanzen im N-Terminus von GABARAP, da diese bei 25 °C von einer starken Linienverbreiterung betroffen sind und daher nicht eindeutig zuzuordnen waren. Abbildung 4.4 zeigt eine Überlagerung der Spektren von GABARAP mit 119 und 117 Aminosäuren bei 25 °C. Die Zahlen repräsentieren die Sequenzposition der jeweiligen Resonanz, wobei Resonanzen mit einem signifikanten Unterschied zwischen beiden GABARAP Konstrukten jeweils separat in rot und schwarz gekennzeichnet sind. Die größten Änderungen zeigen sich bei den chemischen Verschiebungen von Lys2, Asn82, Ser113 und Tyr115. Die chemischen Verschiebungen der Protonen und Stickstoffatome im Proteinrückgrat der Aminosäurereste Tyr5, Lys6, Glu7, His9, Phe11, Arg14, Arg15, Glu100, Glu101 und Asp102 fehlen in dem BMRB-Eintrag 5058, der die Zuordnung von GABARAP bestehend aus 119 Aminosäuren nach Stangler et al. (2001) beinhaltet [79].

Die Proteinrückgratresonanzen dieser Aminosäuren konnten durch die Aufnahme der oben genannten 3D Experimente bei 10 °C erfolgreich zugeordnet werden. Die N-terminalen Resonanzen, die im BMRB-Eintrag von GABARAP (5058) fehlen, sind im HSQC-Spektrum bei 10 °C deutlich zu erkennen (vgl. Abb. 4.5).



**Abbildung 4.4:**  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren des wildtypischen GABARAP bestehend aus 117 Aminosäuren (schwarz) und GABARAP mit zwei zusätzlichen N-terminalen Aminosäureresten, auf dem die NMR-Strukturbestimmung von GABARAP mit dem PDB-Eintrag 1KOT basiert (rot). Resonanzen die von Stangler et al. (2001) nicht zugeordnet wurden, sind mit einer blauen Sequenzposition markiert. Das HSQC-Spektrum von GABARAP bestehend aus 119 Aminosäuren wurde von Thomas Stangler aufgenommen.

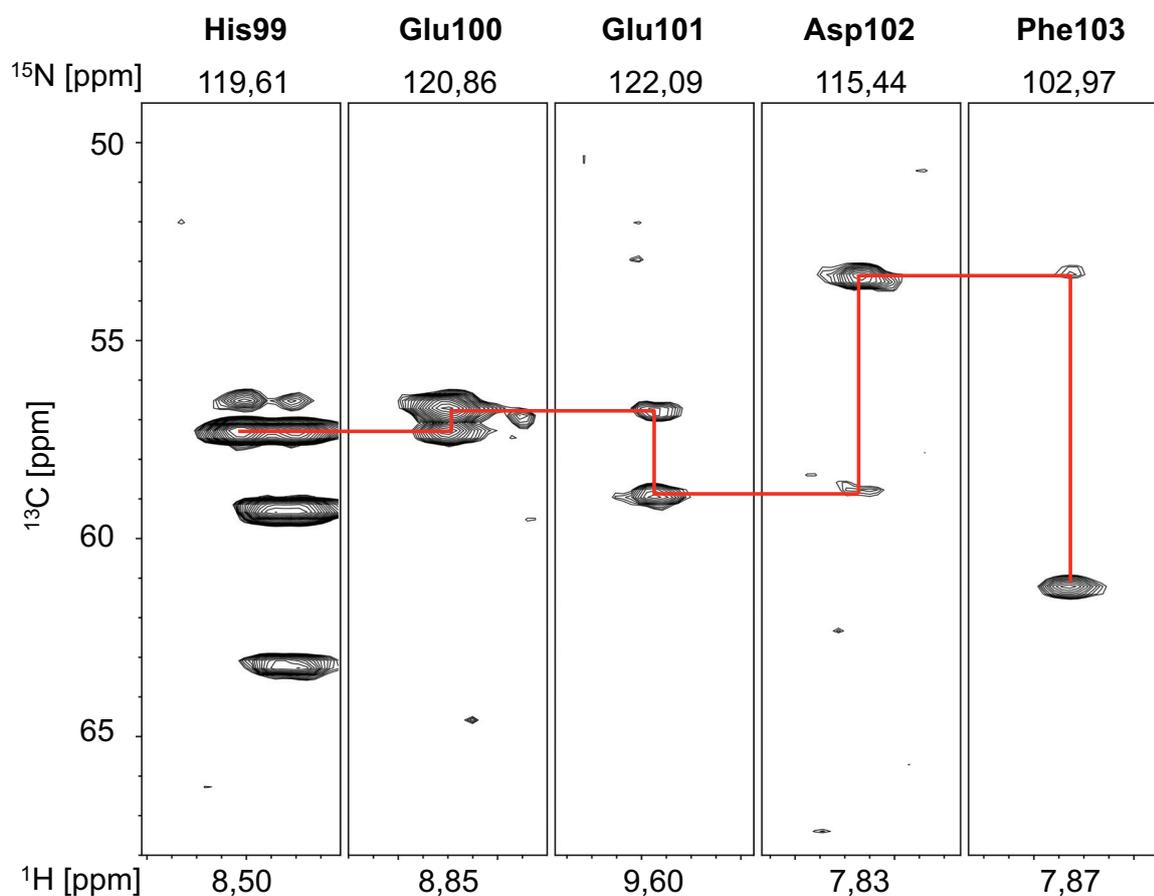


**Abbildung 4.5:** [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von GABARAP bestehend aus 117 Aminosäuren bei 10 °C. Bei tiefen Temperaturen sind Aminosäurereste im N-Terminus und der benachbarten Schleife durch aufgespaltene Resonanzen repräsentiert. Resonanzen, die zusätzlich zu denen im BMRB-Eintrag 5058 zugeordnet werden konnten, sind mit einer blauen Sequenzposition markiert. Eine Änderung der Zuordnung wurde für Glu8 und Val4 festgestellt. Die Resonanzen von Val4 sind in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension in das Spektrum hineingefaltet. Die korrekte chemische Verschiebung von Val4 beträgt in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension demnach 134,9 ppm bzw. 135,58 ppm.

Eine Änderung der Zuordnung im Vergleich zum BMRB-Eintrag 5058 ergibt sich für die N-terminalen Aminosäurereste Val4 und Glu8. In dem HSQC-Spektrum ist zusätzlich zu erkennen, dass beide Aminosäurereste von Peakaufspaltung betroffen sind. Die Resonanzen von Val4 sind in  $^{15}\text{N}$ -Dimension in das Spektrum hineingefaltet, was durch die Aufnahme zweier Spektren mit verschiedener spektraler Weite in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension ermittelt wurde. Die chemischen Verschiebungen der Amidgruppe von Val4 betragen bei 10 °C in  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Dimension somit 11,81 ppm und 134,92 ppm bzw. für den Austauschpeak 11,91 ppm und 135,58 ppm. Im Falle von Glu8 lautet die chemische Verschiebung der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen bei 10 °C 7,79 ppm und 116,32 ppm bzw. 8,08 ppm und 117,02 ppm. Die erweiterte Zuordnung ist in Abb. 4.4 und in Abb. 4.5

#### 4. Ergebnisse

durch blaue Sequenzpositionen markiert. Abbildung 4.6 zeigt einen Ausschnitt der sequenzspezifischen Resonanzzuordnung des Proteinrückgrates von GABARAP mit Hilfe eines 3D HNCA-Spektrums bei 10 °C. Der Ausschnitt des HNCA-Spektrums zeigt die Konnektivität der Resonanzen von His99 bis Phe103, welche durch die rote Linie gekennzeichnet ist. Der Streifen des Aminosäurerestes Glu101 ist bei 10 °C eindeutig zuzuordnen, wohingegen er bei einer Temperatur von 25 °C aufgrund von Linienverbreiterung im Rauschen verschwindet.

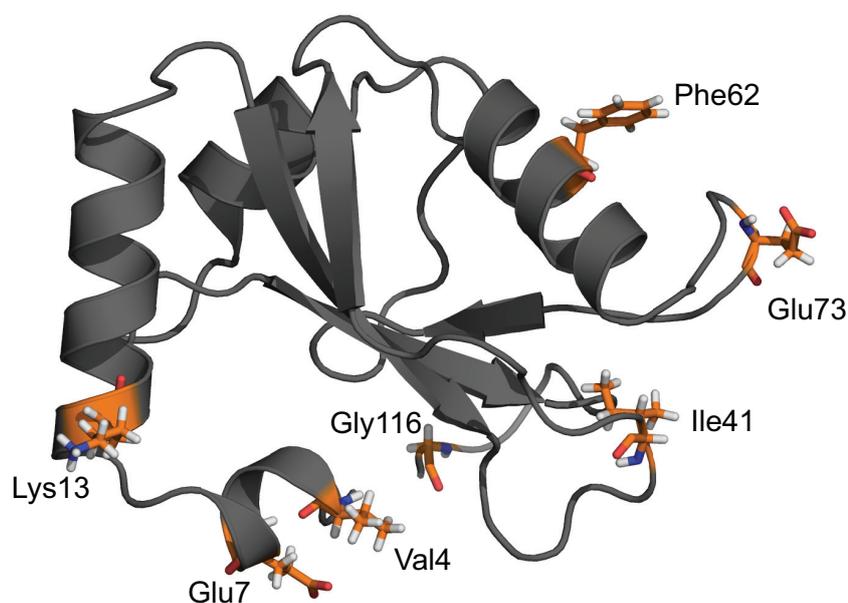


**Abbildung 4.6:** Sequenzspezifische Resonanzzuordnung des Proteinrückgrates von GABARAP mittels 3D HNCA-Spektrum für die Aminosäurereste His99 bis Phe103.  $^{13}\text{C}^\alpha$  (F3)- und  $^1\text{H}$  (F1)-Streifen sind bei entsprechenden  $\text{H}^{\text{N}}$  und  $\text{N}$  chemischen Verschiebungen in den Dimensionen F1 und F2 entnommen und sequentiell angeordnet. Die Konnektivitäten von  $\text{H}^{\text{N}}_i, \text{N}_i, \text{C}^\alpha_i$  und  $\text{H}^{\text{N}}_i, \text{N}_i, \text{C}^\alpha_{i-1}$  sind durch rote Linien gekennzeichnet.

### 4.3 Herstellung von GABARAP-Varianten für die Fluoreszenzspektroskopie

Zusätzlich zur NMR-spektroskopischen Charakterisierung wurden die Dynamiken von GABARAP im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Claus Seidel der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelt. Für die Fluoreszenzspektroskopie ist die Kopplung eines Farbstoffs an das Protein notwendig, was typischerweise durch eine Maleimidkopplung mit der Seitenkette eines Cysteins erfolgt. GABARAP besitzt in seiner natürlichen Aminosäuresequenz keine Cysteine. Durch Mutagenese des GABARAP codierenden Plasmids wurden verschiedene Konstrukte für die Expression von GABARAP-Cysteinvarianten erstellt (s. Kapitel 3.1.4). Um schnelle Dynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala mittels Fluoreszenzspektroskopie zu beobachten, wird ein Farbstoff mit einer eingeschränkten Bewegungsfreiheit verwendet und an GABARAP mit einem einzelnen Cystein gekoppelt. Dazu wurden die GABARAP-Einzelcysteinvarianten mit Mutationen an Position V4C, E7C, K13C, I41C, sowie F62C eingeführt. Des Weiteren wurde GABARAP mit der Mutation G116C $\Delta$ 117 hergestellt, das sowohl für fluoreszenzspektroskopische Experimente, als auch für NMR-Experimente mit Nanodisks verwendet wurde. Für eine Bewertung von langsamer Dynamik auf der Mikrosekundenzeitskala und zur Charakterisierung damit verbundener struktureller Änderungen eignen sich Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Experimente. Dazu wird GABARAP mit je zwei Cysteinen benötigt. Somit wurde GABARAP mit den Mutationen E7C/F62C, E7C/E73C, sowie K13C/F62C hergestellt, die im folgenden als Doppelcysteinvarianten bezeichnet werden. In Abbildung 4.7 sind alle Aminosäurereste, die in ein Cystein mutiert wurden, in der Struktur von GABARAP farblich gekennzeichnet.

Die Expression und Reinigung der Einzelcysteinvarianten erfolgte analog zum wt GABARAP, wobei allen Reinigungsschritten 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel hinzugefügt wurde. Für die NMR-Experimente wurde 2 mM TCEP

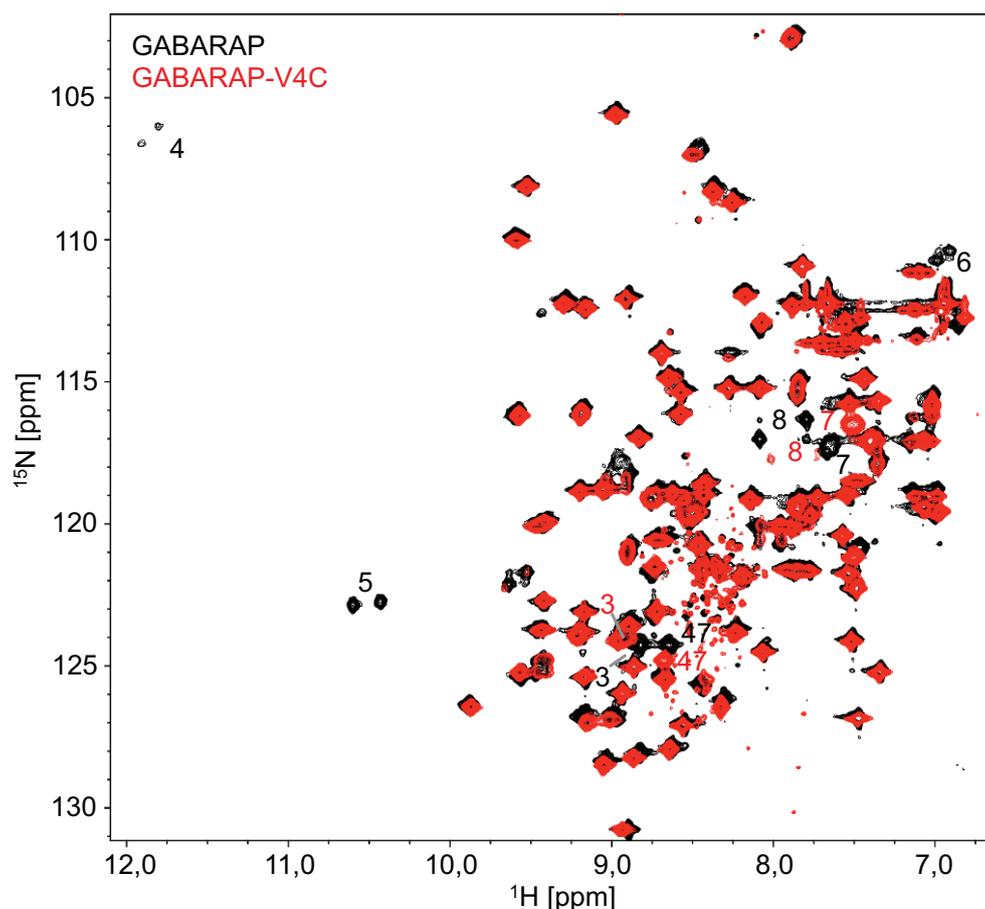


**Abbildung 4.7:** Reste, die für die Fluoreszenzspektroskopie durch ein Cystein ausgetauscht wurden, sind in der Struktur von GABARAP (PDB-Eintrag 1GNU) farblich markiert. Die Cystein-Mutationen von Val4, Glu7, Lys13, Ile41, Phe62 und Gly116 wurden jeweils zur Herstellung von Einzelcysteinvarianten eingeführt. Zusätzlich wurden drei Doppelcysteinvarianten mit den Mutationen Glu7 und Phe62, Lys13 und Phe62, sowie Glu7 und Glu73 hergestellt.

anstatt  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet, da es eine höhere Stabilität aufweist. Die Expression und Reinigung der Doppelcysteinvarianten erfolgte ebenfalls analog zum wt GABARAP, mit Ausnahme der Variante GABARAP-K13C/F62C, die sich mittels Kationenaustauschchromatographie nicht aufreinigen ließ. Die Aufreinigung von GABARAP-K13C/F62C wurde daher mittels Anionenaustauschchromatographie (vgl. Kapitel 3.4) erzielt.

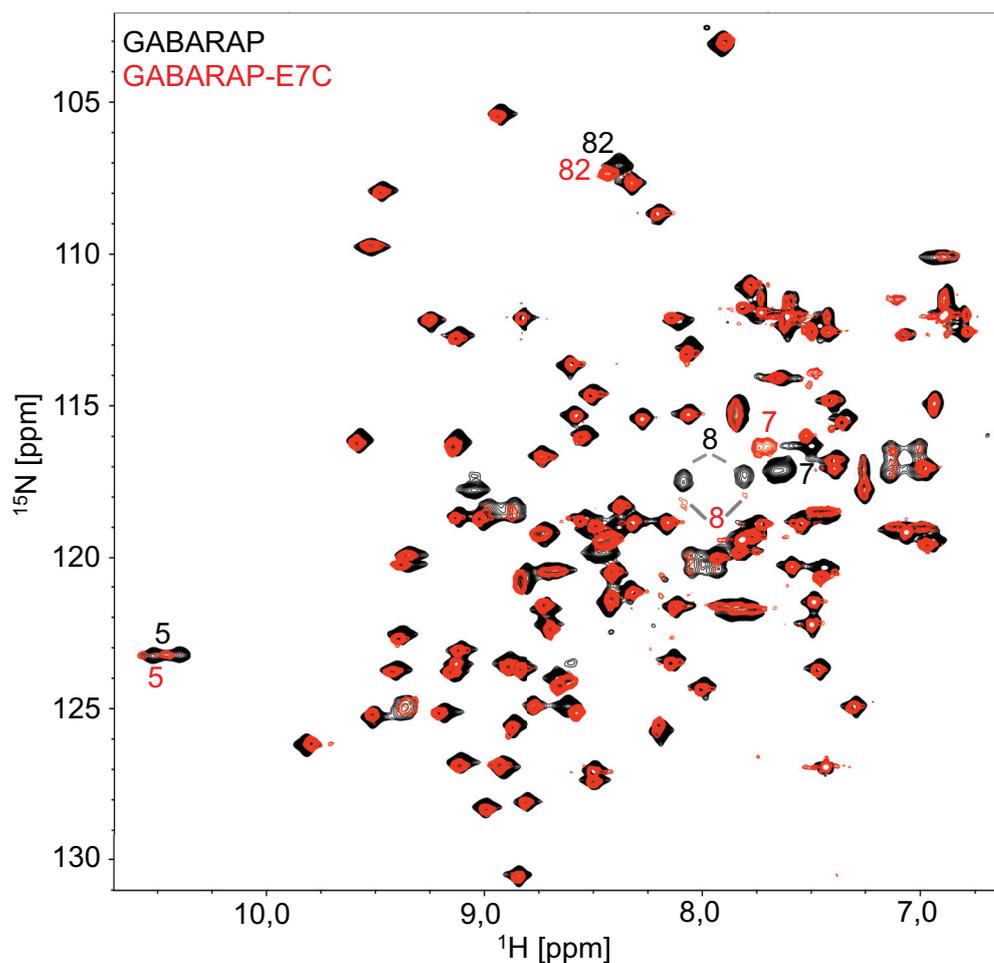
Im Folgenden sind die  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren der hergestellten GABARAP-Cysteinvarianten mit den Mutationen V4C, E7C, K13C, F62C, E7C/E73C und K13C/F62C dargestellt. Mit Hilfe dieser HSQC-Spektren wurde kontrolliert, ob es durch Einfügen der Mutation zu Änderungen der Tertiärstruktur von GABARAP kommt. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 wird in Kapitel 4.8 ausführlich gezeigt und ist daher hier nicht näher erläutert.

Abbildung 4.8 zeigt das  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von 380  $\mu\text{M}$  GABARAP-V4C überlagert mit 1,0 mM GABARAP bei einer Temperatur von 10  $^\circ\text{C}$ .



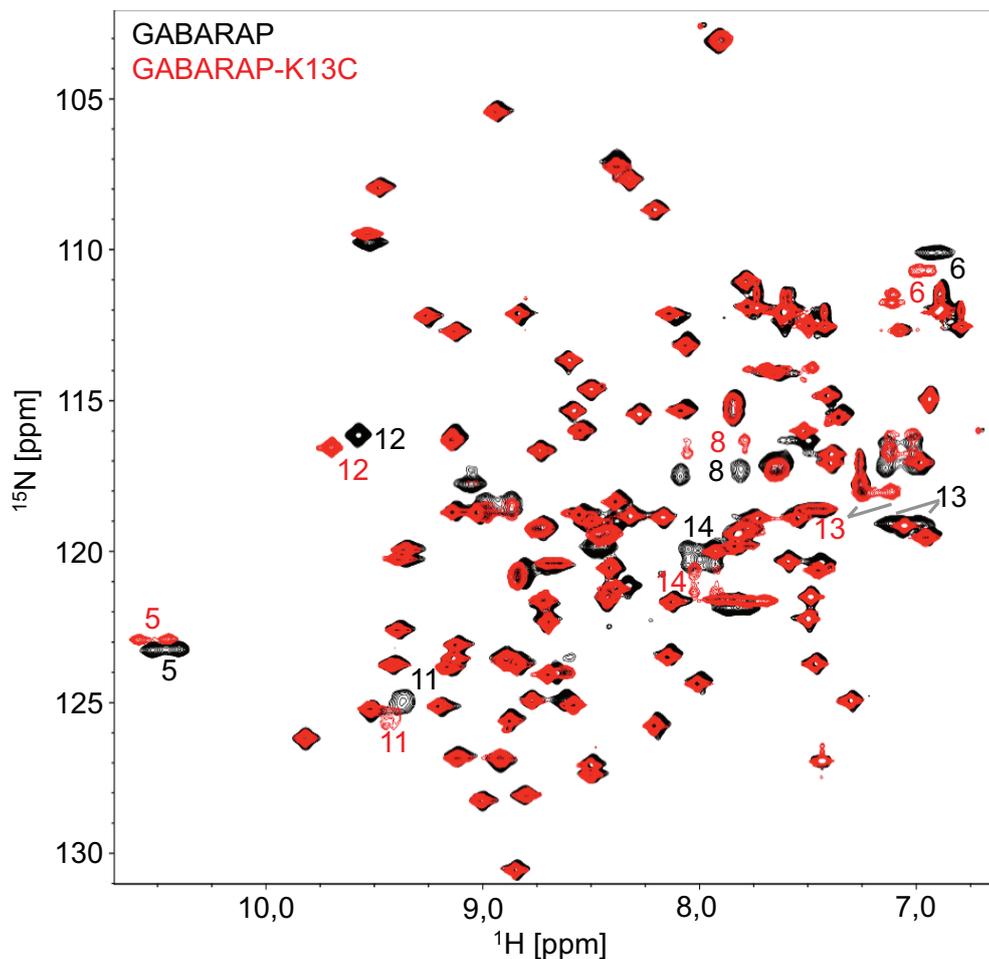
**Abbildung 4.8:**  $[^1\text{H}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von GABARAP (schwarz) und GABARAP-V4C (rot) bei  $10^\circ\text{C}$ .

Die Resonanzen von V4C sowie sequentiell benachbarte Resonanzen (Tyr5, Lys6, Glu8) sind in dem Spektrum der Variante GABARAP-V4C nicht erkennbar. Bei einer Betrachtung des Spektrums nahe des Rauschlevels werden die Resonanzen von Tyr5 und Glu8 jedoch sichtbar. Die Resonanzen von Phe3, Glu7 und Lys47, die sich ebenfalls in der Nähe des mutierten Aminosäurerestes V4C befinden, weisen Änderungen der chemischen Verschiebung auf, die jedoch so gering sind, dass eine eindeutige Zuordnung weiterhin möglich ist. Die chemischen Verschiebungen aller anderen Resonanzen stimmen für GABARAP und GABARAP-V4C überein.



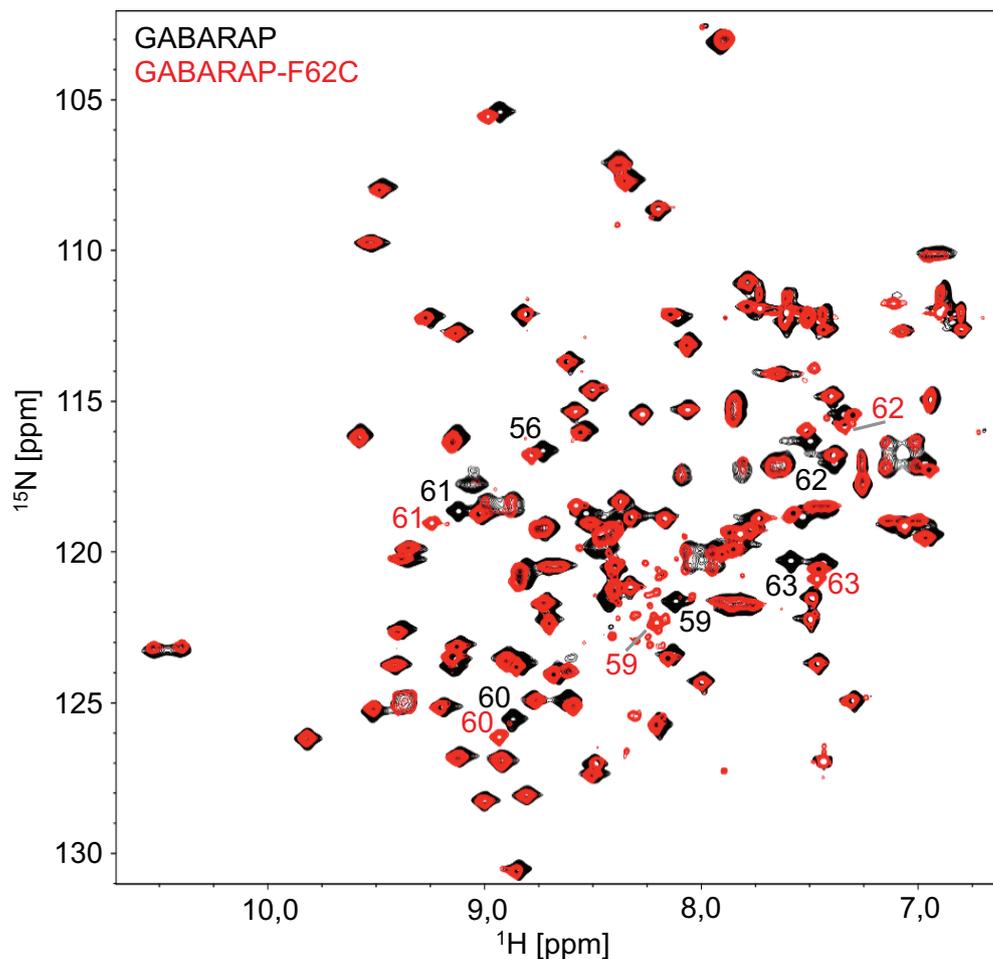
**Abbildung 4.9:**  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von GABARAP (schwarz) und GABARAP-E7C (rot) bei 25 °C.

In Abbildung 4.9 ist das  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von 240  $\mu\text{M}$  GABARAP-E7C überlagert mit 1,0 mM GABARAP bei einer Temperatur von 25 °C gezeigt. Änderungen der chemischen Verschiebungen zeigen sich für Asn82, E7C und Glu8 und damit lediglich für den mutierten Aminosäurerest selbst und räumlich benachbarte Aminosäurereste.



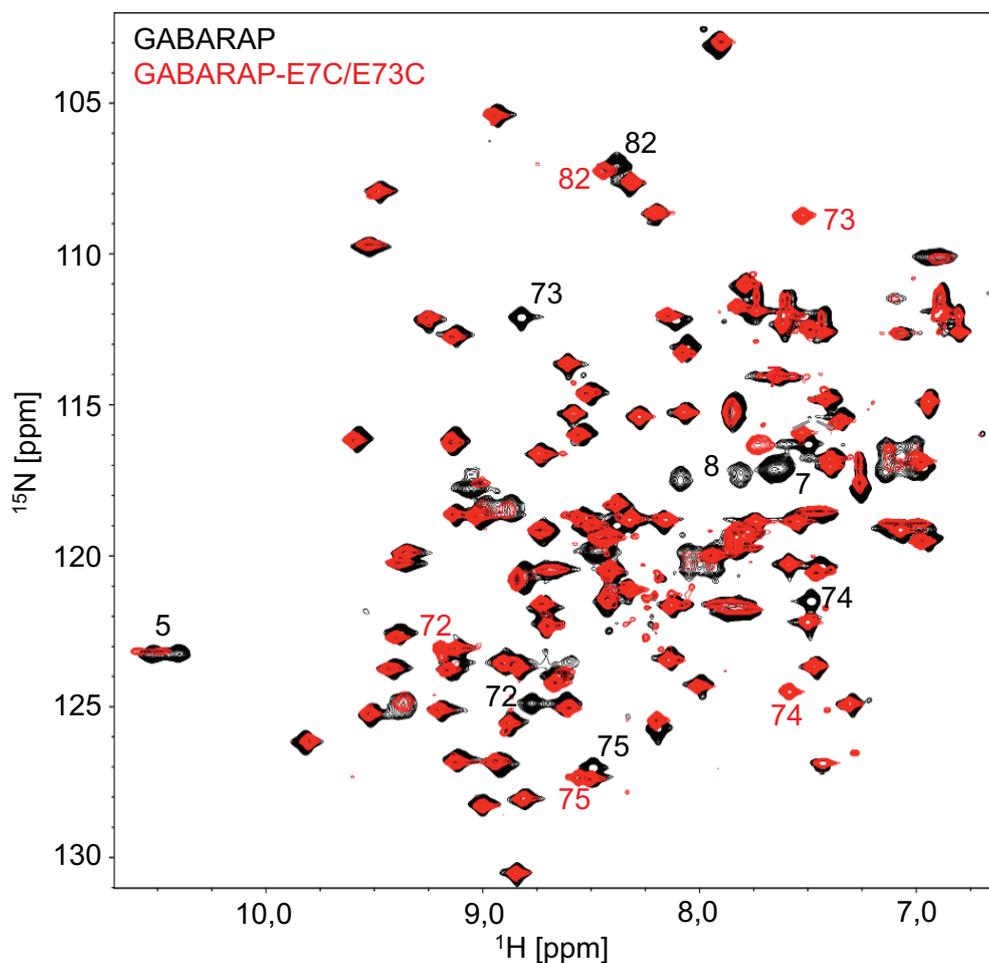
**Abbildung 4.10:**  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von GABARAP (schwarz) und GABARAP-K13C (rot) bei 25 °C.

Abbildung 4.10 zeigt das  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von 340  $\mu\text{M}$  GABARAP-K13C überlagert mit 1,0 mM GABARAP bei einer Temperatur von 25 °C. Änderungen der chemischen Verschiebungen sind für die Resonanzen von Tyr5, Lys6, Glu8, Phe11, Glu12, K13C und Arg14 zu erkennen. Auch hier sind die Veränderungen der chemischen Verschiebungen so gering, dass eine eindeutige Zuordnung der betroffenen Resonanzen im Spektrum von GABARAP-K13C möglich ist.



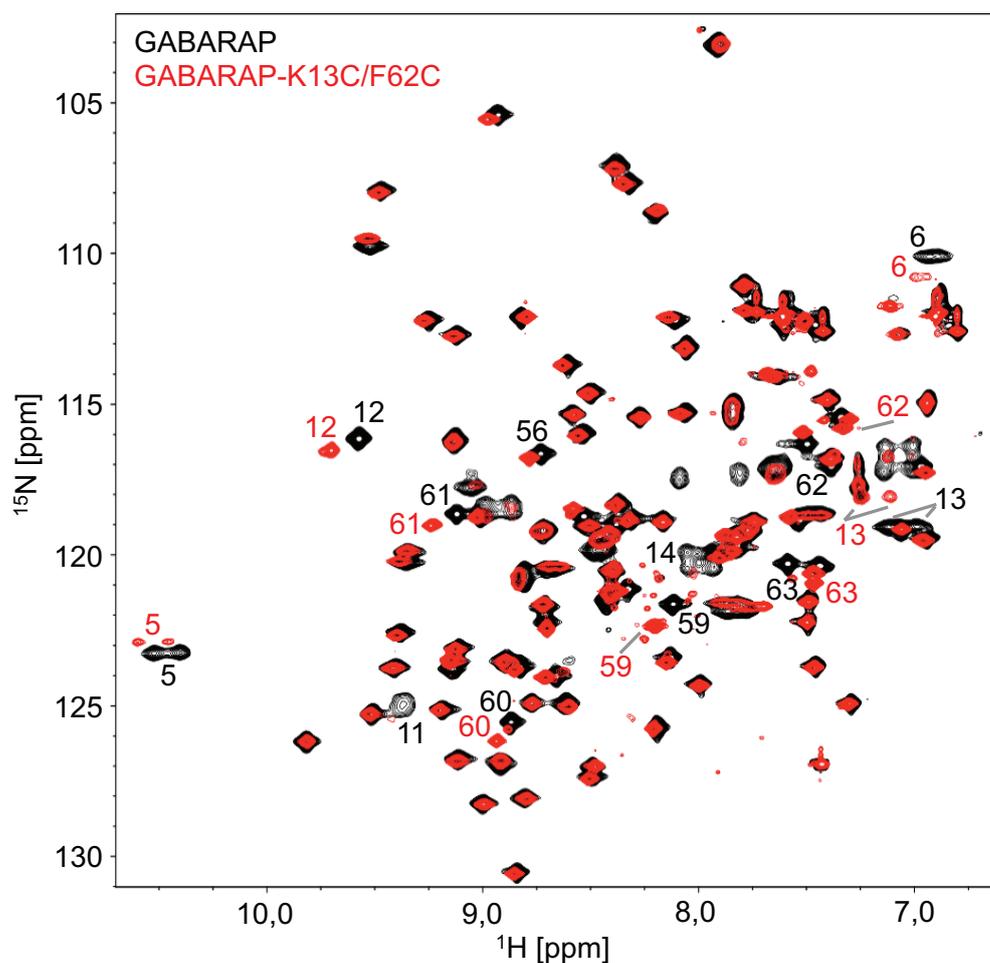
**Abbildung 4.11:** [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren von GABARAP (schwarz) und GABARAP-F62C (rot) bei 25 °C.

Das [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von GABARAP-F62C mit einer Konzentration von 750  $\mu\text{M}$  ist in Abbildung 4.11 in Überlagerung mit dem Spektrum von 1,0 mM GABARAP bei einer Temperatur von 25 °C dargestellt. Differenzen zwischen den chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kerne von GABARAP-F62C und GABARAP werden für die Aminosäurereste Thr56, Gln59, Phe60, Tyr61, F62C und Leu63 beobachtet, während die übrigen Resonanzen übereinstimmen.



**Abbildung 4.12:** [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren von GABARAP (schwarz) und GABARAP-E7C/E73C (rot) bei 25 °C.

Abbildung 4.12 zeigt das [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum der Doppelcysteinvariante GABARAP-E7C/E73C mit einer Konzentration von 550  $\mu\text{M}$  in Überlagerung mit dem Spektrum von 1,0 mM GABARAP bei einer Temperatur von 25 °C. Zusätzlich zu den Differenzen der chemischen Verschiebungen, welche bereits in der Einzelcysteinvariante GABARAP-E7C beobachtet wurden, weisen die benachbarten Aminosäurereste von E73C Änderungen auf. Die Differenzen der chemischen Verschiebungen von Ala72, E73C, Asp74 und Ala75 sind deutlich größer als die in den anderen Varianten beobachteten Änderungen. Alle anderen Resonanzen stimmen jedoch in beiden Spektren überein.



**Abbildung 4.13:** [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren von GABARAP (schwarz) und GABARAP-K13C/F62C (rot) bei 25 °C.

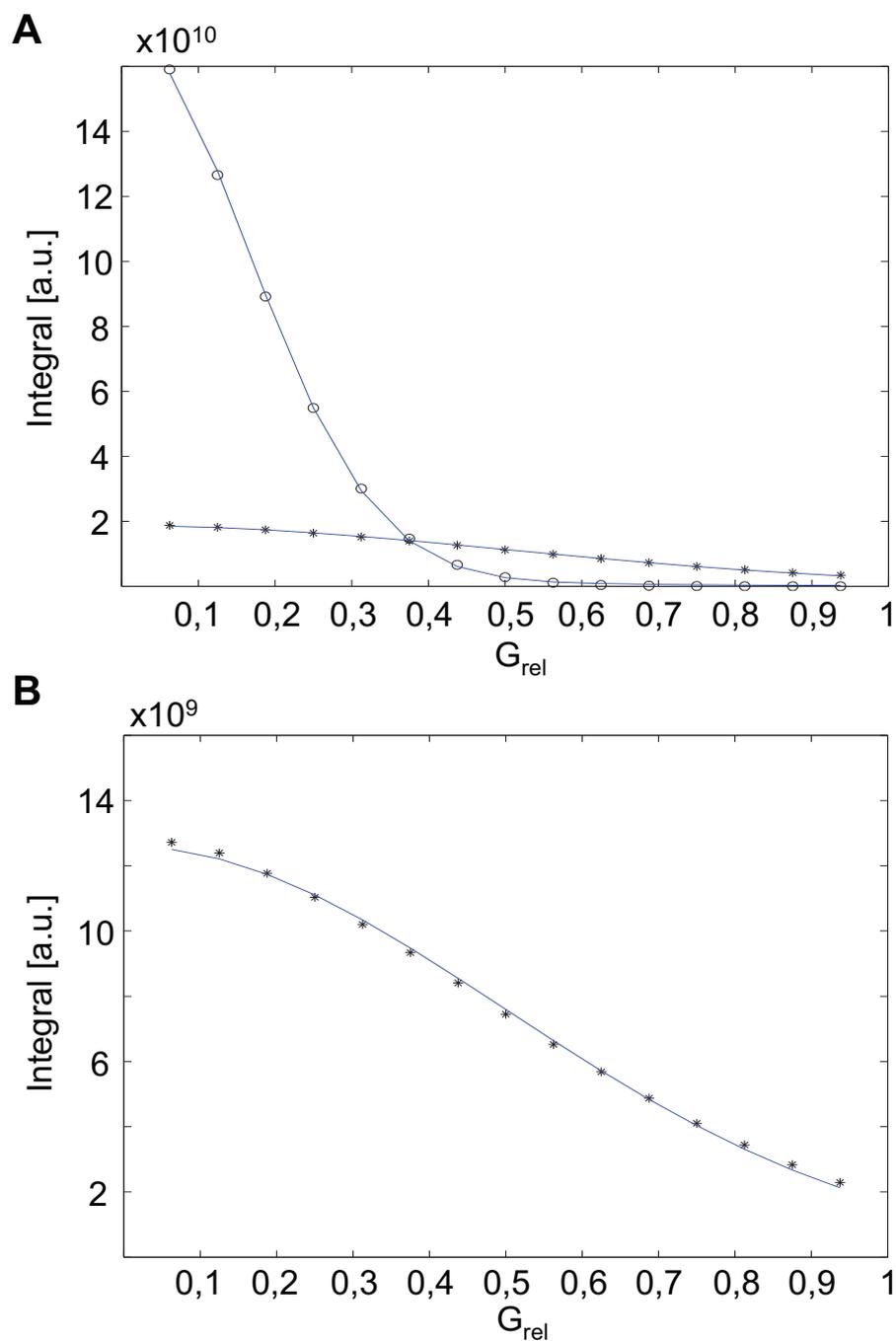
In Abbildung 4.13 ist das [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum der Doppelcysteinvariante GABARAP-K13C/F62C mit einer Konzentration von 675  $\mu\text{M}$  in Überlagerung mit dem Spektrum von 1,0 mM GABARAP bei einer Temperatur von 25 °C dargestellt. Es weisen die gleichen Aminosäurereste Differenzen der chemischen Verschiebungen auf, die bereits in den [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren der Einzelcysteinvarianten GABARAP-K13C sowie GABARAP-F62C betroffen waren. Abgesehen von Resonanzen in der Nähe des mutierten Aminosäurerestes, stimmen die Spektren von GABARAP-K13C/F62C und dem wt GABARAP überein.

Die HSQC-Spektren der GABARAP-Cysteinvarianten zeigen, dass sich Änderungen der chemischen Verschiebungen lediglich für direkt benachbarte Aminosäurereste ergeben und die Mutationen daher keinen Einfluss auf die Tertiärstruktur von GABARAP haben.

## 4.4 Translationsdiffusion

Der hydrodynamische Radius von GABARAP wurde wie in Abschnitt 3.6.5 beschrieben an 0,5 mM GABARAP mit 0,5 % Dioxan bei einer Temperatur von 25 °C bestimmt. Dazu wurden zum einen 1D PG-SLED-Experimente aufgenommen, aus denen die Bestimmung des hydrodynamischen Radius durch die Referenzierung von Dioxan gemäß Gleichung 3.5, als auch direkt durch Anwendung des Stokes-Einstein-Gesetzes (Gl. 4.3) erfolgte. Zum anderen wurde der hydrodynamische Radius aus 2D PG-SLED-Spektren durch Integration der Amidprotonenregion bestimmt. Abbildung 4.14 (A) zeigt die Abnahme der integrierten Intensitäten der  $^1\text{H}$ -Resonanzen von Dioxan und GABARAP im Bereich von 3,753 bis 3,763 ppm in Abhängigkeit der relativen Gradientenstärke  $G_{rel}$ . Es handelt sich dabei um Ergebnisse des 1D PG-SLED-Experiments. In Abbildung 4.14 (B) ist die Abnahme der integrierten Intensitäten der Amidprotonen-Resonanzen von GABARAP im Bereich von 6,9 bis 9,6 ppm gezeigt. Die integrierten Intensitäten der Amidprotonen-Resonanzen wurden aus dem 2D PG-SLED-Experiment extrahiert.

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der ermittelten Diffusionskonstante  $D$  sowie des hydrodynamischen Radius  $r_H$  von GABARAP für die verschiedenen verwendeten Methoden dargestellt. Der hydrodynamische Radius, der durch die Referenzierung auf Dioxan auf Grundlage von zwei 1D PG-SLED-Experimenten bestimmt wurde, ergibt mit  $r_H = 19,2 \pm 0,3 \text{ \AA}$  den kleinsten Wert. Dieser hydrodynamische Radius entspricht einer Diffusionskonstante von  $D = (1,25 \pm 0,02) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ . Für die Auswertung nach Choy et al. (2002), ohne Dioxan als Referenz, erfolgte die Berechnung des hydrodynamischen Radius aus der Diffusionskonstante durch die Stokes-Einstein-Gleichung.



**Abbildung 4.14:** A) Abnahme der integrierten Intensität der  $^1\text{H}$ -Resonanzen von Dioxan (Kreise) und GABARAP (Sterne) in Abhängigkeit der relativen Gradientenstärke  $G_{rel}$  aus dem 1D PG-SLED-Experiment. Die durchgezogenen Kurven entsprechen den nichtlinearen 2- bzw. 3-Parameter-Fits gemäß den Gleichungen 3.2 und 3.3 aus Abschnitt 4.4. B) Abnahme der integrierten Intensität der Amidproton-Resonanzen von GABARAP in Abhängigkeit der relativen Gradientenstärke  $G_{rel}$  aus dem 2D PG-SLED-Experiment. Die durchgezogene Kurve entspricht dem Fit mittels Gleichung 3.6.

**Tabelle 4.1:** Ergebnisse der Translationsdiffusionsexperimente

Methode	Diffusionskonstante D [cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]	Hydrodynamischer Radius [Å]	$\tau_c$ [ns]
<b>1D PG-SLED</b>			
Dioxan Referenz	$(1,25 \pm 0,02) \cdot 10^{-6}$	$19,2 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,4$
Stokes-Einstein	$(1,16 \pm 0,02) \cdot 10^{-6}$	$20,7 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,3$
<b>2D PG-SLED</b>			
Stokes-Einstein	$(1,20 \pm 0,02) \cdot 10^{-6}$	$19,9 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,5$

Die Diffusionskonstante wurde dabei sowohl aus der Abnahme der integrierten Signalintensität von zwei 1D PG-SLED-Experimenten, als auch aus einem 2D PG-SLED-Experiment ermittelt. Die Viskosität der Lösung wurde als ein Gemisch bestehend aus 90 % H<sub>2</sub>O und 10 % D<sub>2</sub>O bei 25 °C zu  $\eta = 0,9113 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  abgeschätzt. Der aus dieser Methode bestimmte hydrodynamische Radius von GABARAP ist bis zu 1,5 Å größer, als der indirekt durch die Referenzierung auf Dioxan erhaltene Wert. Eine Abschätzung des hydrodynamischen Radius aus der Anzahl der Aminosäuren gemäß Gleichung 3.7 ergibt einen Wert von  $r_H = 18,9 \text{ Å} \pm 2,6 \text{ Å}$  und ist damit in der gleichen Größenordnung wie die experimentell ermittelten hydrodynamischen Radien. Diese Abschätzung aus der Aminosäureanzahl erfolgte ohne Berücksichtigung der Struktur von GABARAP.

Unter der vereinfachten Annahme, dass GABARAP ein globuläres Protein mit isotroper Symmetrie ist, lässt sich aus dem Gesetz von Stokes (Gl. 4.3) außerdem die Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  berechnen. Auch dazu wurde für die Viskosität der Lösung der Wert  $\eta = 0,9113 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  angenommen. Aus dem Gesetz von Stokes ergeben sich damit Rotationskorrelationszeiten von  $\tau_c = 6,6$  bis  $8,2 \text{ ns}$ , je nachdem welche Methode zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius verwendet wurde (vgl. Tab. 4.1).

Neben der experimentellen Bestimmung des hydrodynamischen Radius, erfolgte eine theoretische Abschätzung mittels Hydropro. Unter Verwendung der Kristallstruktur von GABARAP (PDB-Eintrag 1GNU) liefert Hydropro eine Rotationskorrelationszeit von  $\tau_c = 8,1 \text{ ns}$  und dementsprechend einen hydrodynamischen Radius von

**Tabelle 4.2:** Hydropro Vorhersage der hydrodynamischen Parameter bei 25 °C

Struktur	$\tau_c$ [ns]	Hydrodynamischer Radius* [ $\text{\AA}$ ]
1GNU	8,1	20,6
1KOT	7,8	20,3

\*Der hydrodynamische Radius entspricht dem Stokes-Radius unter der Annahme eines globulären Proteins in einem Gemisch aus 90 % H<sub>2</sub>O und 10 % D<sub>2</sub>O.

$r_H = 20,6 \text{ \AA}$  (s. Tab. 4.2). Auf Grundlage der NMR-Struktur von GABARAP (PDB-Eintrag 1KOT), ergibt sich ein geringfügig kleinerer hydrodynamischer Radius von  $r_H = 20,3 \text{ \AA}$  und eine Rotationskorrelationszeit von  $\tau_c = 7,8 \text{ ns}$ .

Der Vergleich des experimentell ermittelten hydrodynamischen Radius von GABARAP mit der theoretischen Vorhersage zeigt, dass GABARAP unter gegebenen Pufferbedingungen, bei einer Konzentration von 0,5 mM und einer Temperatur von 25 °C vorwiegend monomer ist.

## 4.5 Piko- bis Nanosekundendynamik

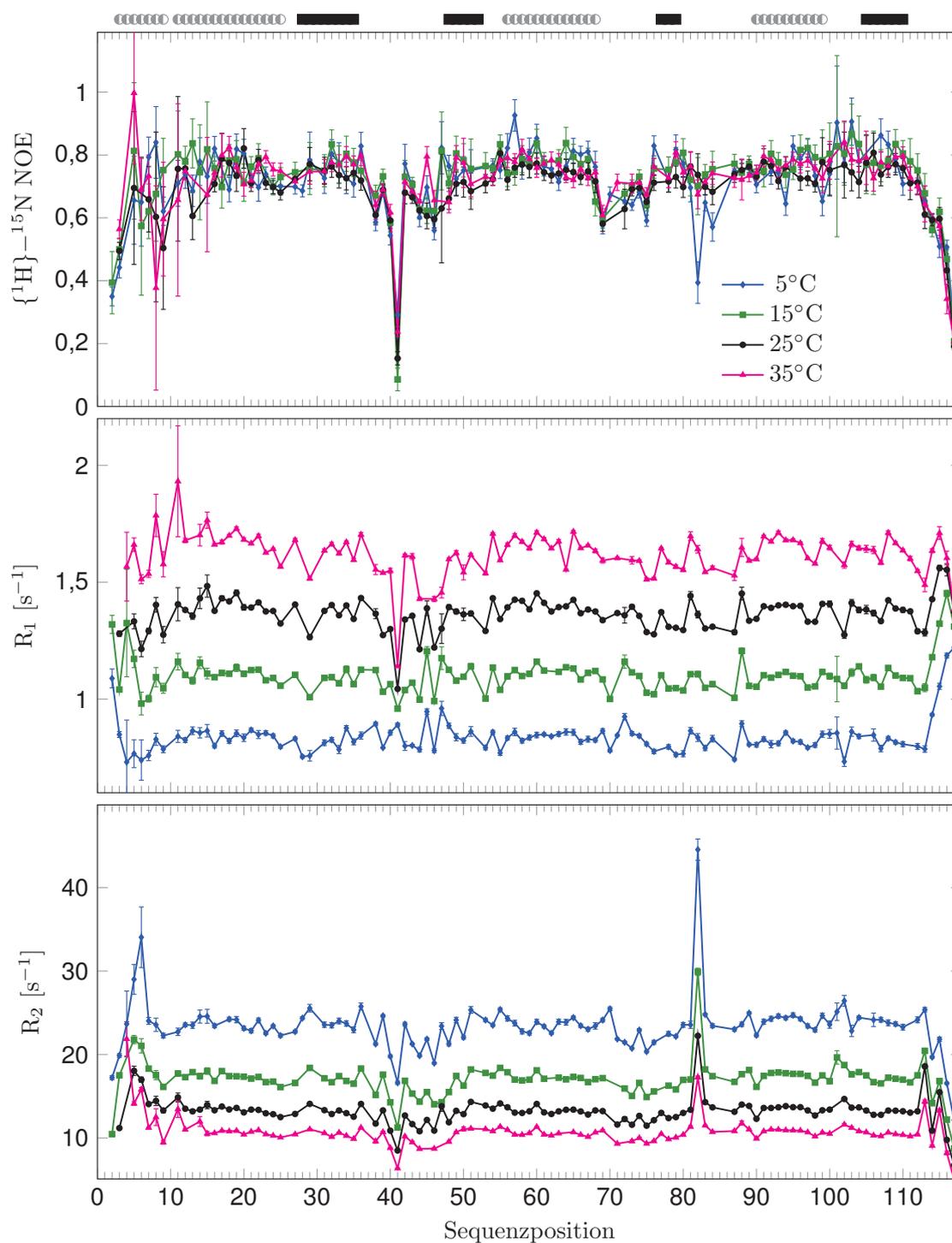
### 4.5.1 Analyse von <sup>15</sup>N-Spinrelaxationsdaten

Die Dynamik von N–H-Bindungen des Proteinrückgrats setzt sich aus einer Komponente der globalen Rotationsdiffusion, aufgrund von Brownscher Molekularbewegung, sowie einzelner Komponenten verursacht durch interne Dynamik des Proteinrückgrates zusammen. Die Dynamik von N–H-Bindungen auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala wurde wie in Kapitel 3.6.6 mit Hilfe von <sup>15</sup>N-Relaxationsexperimenten bei Temperaturen von 5 °C bis 35 °C in 10 °C Schritten und einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz (14,1 T) bestimmt. Bei einer Temperatur von 25 °C wurde zusätzlich ein Relaxationsdatensatz bestehend aus <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N NOE-Werten, longitudinalen Relaxationsraten  $R_1$  und transversalen Relaxationsraten  $R_2$  bei einer Protonenlarmorfrequenz von 900 MHz (21,2 T) aufgenommen und ausgewertet. Die ermittelten longitudinalen

und transversalen Relaxationsraten  $R_1$  und  $R_2$  liefern Informationen zum Reorientierungsverhalten des Proteins und bestimmen dadurch im Wesentlichen die globale Rotationskorrelationszeit, während die heteronuklearen  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte insbesondere die interne Dynamik einzelner Aminosäurereste widerspiegeln. Ein  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Wert von weniger als 0,65 bei einer Feldstärke von 600 MHz gilt dabei als flexibel [80]. Der maximal erreichbare  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Wert beträgt hingegen etwa 0,82 (bei 500 MHz) und deutet auf eine starke Einschränkung der Bewegung hin [72].

In Abbildung 4.15 sind die bei 600 MHz aufgenommenen  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte, als auch die longitudinalen und transversalen Relaxationsraten  $R_1$  und  $R_2$  bei verschiedenen Temperaturen von 5 °C bis 35 °C dargestellt. Fehlende Relaxationsraten und NOE-Werte sind auf Überlapp entsprechender Resonanzen, ein zu geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis oder im Falle der Prolin 10, 26, 30, 37, 52, 85 und 86 auf die nicht vorhandene N–H-Bindung zurückzuführen. Die Relaxationsdaten zeigen bei allen Temperaturen ähnliche Trends, das heißt Aminosäurereste die hinsichtlich ihrer Relaxationsdaten vom Durchschnitt abweichen zeigen dieses Verhalten bei allen Temperaturen. Die Relaxationsdaten N-terminaler Aminosäurereste weisen insbesondere bei Temperaturen oberhalb von 15 °C größere Fehler wegen eines geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses auf. Die schematische Darstellung von  $\alpha$ -Helices sowie  $\beta$ -Strängen oberhalb von Abbildung 4.15 veranschaulicht den Zusammenhang von Flexibilität und der Sekundärstruktur. Es fällt auf, dass die Relaxationsraten in den Bereichen regulärer Sekundärstrukturelemente keinen größeren Schwankungen unterliegen, sodass die zeitliche Reorientierung ähnlich ist. Da die Relaxationsdaten bei verschiedenen Temperaturen lediglich bei einer Feldstärke aufgenommen wurden, ist das Programm Tensor2 für die model-free-Analyse verwendet worden. Dabei wurde die Rotationskorrelationszeit für jede Temperatur unter Ausschluss von flexiblen Bereichen bestimmt (s. Tab. 4.3). Unter der vereinfachenden Annahme von isotroper sphärischer Symmetrie, lässt sich gemäß des Gesetzes von Stokes (Gl. 4.3) der hydrodynamische Radius aus den Rotationskorrelationszeiten abschätzen. Der hydrodynamische Radius beträgt im Mittel  $21,6 \pm 0,2 \text{ \AA}$  und stimmt bei allen Temperaturen unter Berücksichtigung der Messunsicherheit überein. Ein Arrheniusgraph zeigt den linearen Zusammenhang zwischen dem

## 4. Ergebnisse

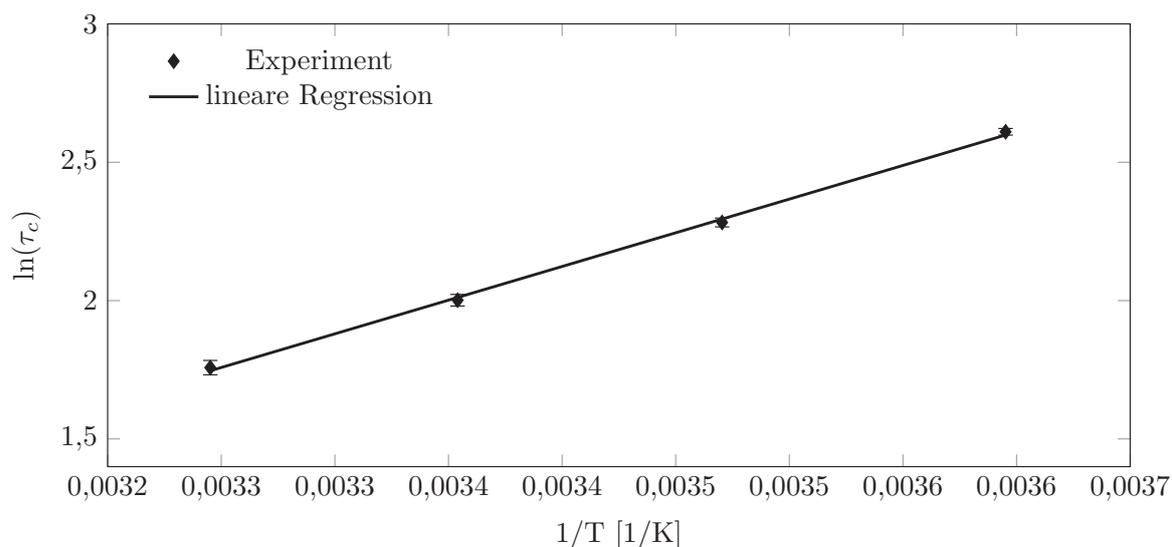


**Abbildung 4.15:**  $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten bei Temperaturen von  $5^\circ\text{C}$  (blau),  $15^\circ\text{C}$  (grün),  $25^\circ\text{C}$  (schwarz) und  $35^\circ\text{C}$  (magenta), aufgenommen bei einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz. Die grauen Kreise oberhalb der Abbildung indizieren  $\alpha$ -helikale Strukturelemente, während die schwarzen Balken  $\beta$ -Stränge kennzeichnen. Von oben nach unten:  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE-Werte, longitudinale Relaxationsraten  $R_1$  und transversale Relaxationsraten  $R_2$ .

**Tabelle 4.3:** Rotationskorrelationszeit und hydrodynamischer Radius bei verschiedenen Temperaturen ermittelt mit dem Programm Tensor2.

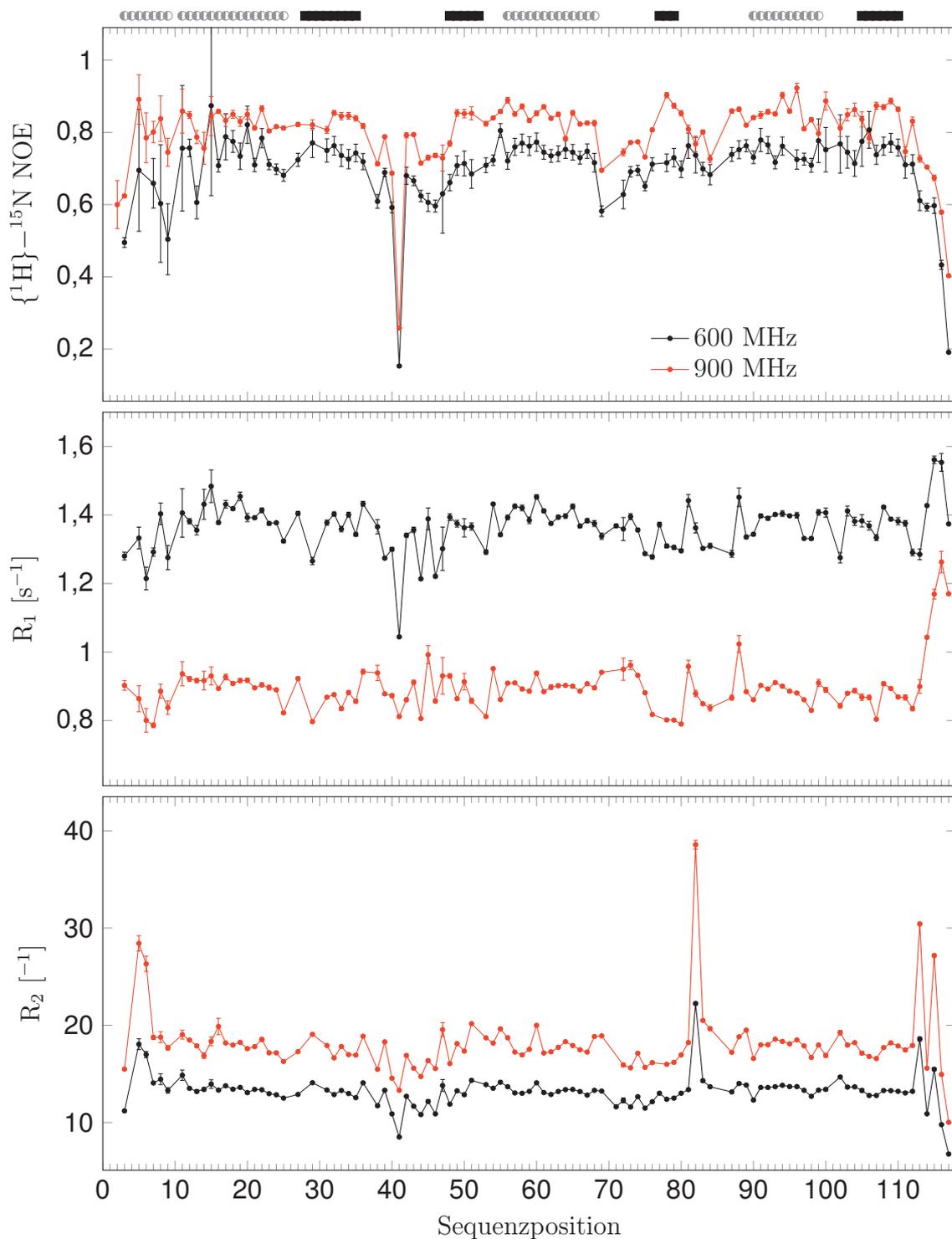
Temperatur [°C]	$\tau_c$ [ns]	Hydrodynamischer Radius $r_H$ [Å]
5	$16,9 \pm 0,2$	$21,5 \pm 0,2$
15	$12,3 \pm 0,2$	$21,5 \pm 0,2$
25	$9,6 \pm 0,2$	$21,7 \pm 0,2$
35	$7,5 \pm 0,2$	$21,8 \pm 0,2$

Logarithmus der globalen Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  und der inversen Temperatur (Abb. 4.16). Dieser lineare Zusammenhang impliziert, dass mit einem Temperaturwechsel keine Phasenübergänge von beispielsweise Monomeren zu Dimeren auftreten.

**Abbildung 4.16:** Arrheniusgraph der Rotationskorrelationszeiten bestimmt durch Spinrelaxationsraten bei verschiedenen Temperaturen von 5 °C, 15 °C, 25 °C und 35 °C. Der Arrheniusgraph folgt einem linearen Zusammenhang.

Für die zuverlässige Analyse von interner Dynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala sind die  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte sowie die longitudinalen und transversalen Relaxationsraten  $R_1$  und  $R_2$  bei einer zweiten Feldstärke essentiell. In Abbildung 4.17 sind die  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten bei den Protonenlarmorfrequenzen von 600 MHz sowie

900 MHz und einer Temperatur von 25 °C dargestellt. Fehlende NOE-Werte und Relaxationsraten sind auf Überlapp der entsprechenden Resonanzen oder eine zu geringe Signalintensität zurückzuführen und im Falle der Proline auf die nicht vorhandenen N–H-Bindungen. Es fällt auf, dass die  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte insbesondere in den Termini als auch in der Schleife um Ile41 am niedrigsten sind, was eine erhöhte interne Dynamik in diesen Bereichen aufzeigt. Die transversalen Relaxationsraten  $R_2$  sind für Tyr5, Glu7, Asn82, Ser113 und Tyr115 auffällig hoch und nehmen bei 900 MHz signifikant zu. Hier ist besonders Asn82 hervorzuheben, das mit einer  $R_2$ -Rate von  $38,6\text{ s}^{-1}$  bei 900 MHz weit über dem Durchschnitt von  $18,1\text{ s}^{-1}$  liegt. Dieser Aminosäurerest befindet sich in einer Schleife zwischen dem dritten  $\beta$ -Strang und der letzten  $\alpha$ -Helix. Die großen  $R_2$ -Raten, die zusätzlich eine Feldstärkeabhängigkeit zeigen, weisen auf einen Beitrag durch chemischen Austausch hin. Diese Relaxationsdaten wurden für die model-free-Analyse mittels relax für eine detaillierte Auswertung der internen Dynamik verwendet (s. Kap. 4.5.2).



**Abbildung 4.17:**  $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten bei einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  und Protonenlarmorfrequenzen von 600 MHz (schwarz) und 900 MHz (rot). Von oben nach unten:  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte, longitudinale Relaxationsraten  $R_1$  und transversale Relaxationsraten  $R_2$  in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz. Die grauen Kreise oberhalb der Abbildung indizieren  $\alpha$ -helikale Strukturelemente, während schwarze Balken  $\beta$ -Stränge kennzeichnen.

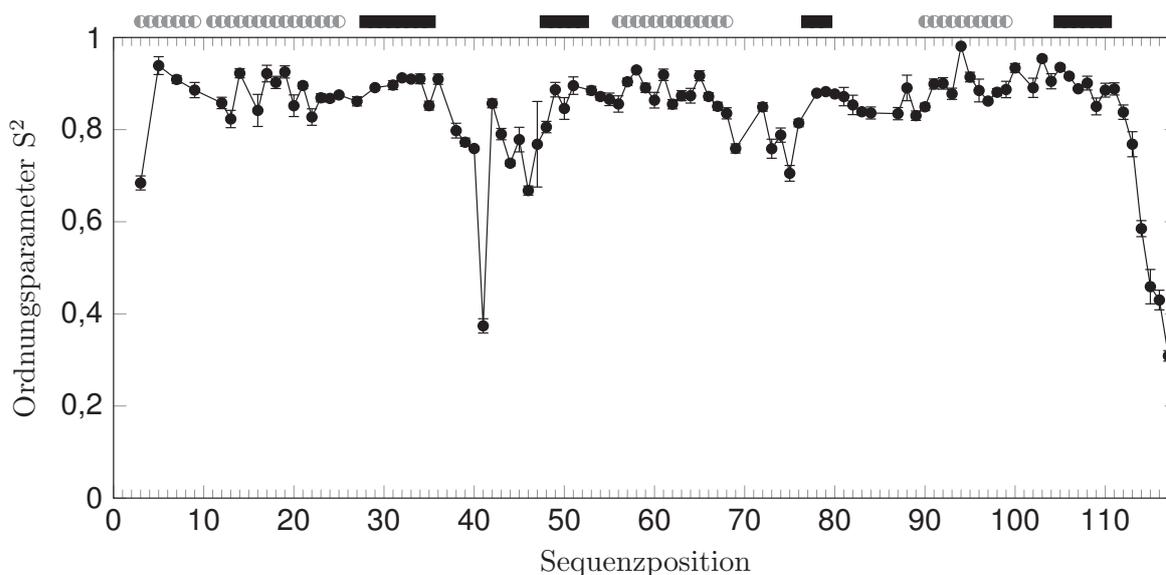
### 4.5.2 Model-free-Analyse der $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten mittels relax

Für eine quantitative Charakterisierung der globalen Rotationsdiffusion sowie interner Dynamik einzelner Aminosäurereste wurde die bereits erwähnte model-free-Analyse durch das Programm relax basierend auf dem erweiterten Lipari-Szabo-Modell gemäß Kapitel 3.6.6 durchgeführt. Im erweiterten Modell von Lipari-Szabo werden maximal zwei interne Dynamiken angenommen, um die Anzahl der Freiheitsgrade nicht größer zu wählen, als es die Daten erlauben. Denn es gilt zu beachten, dass die spektrale Dichtefunktion  $J(\omega)$  durch die Messung der Relaxationsdaten gemäß der Gleichungen 3.16–3.18 lediglich an wenigen Punkten  $J(0)$ ,  $J(\omega_H)$ ,  $J(\omega_N)$ ,  $J(\omega_H+\omega_N)$ ,  $J(\omega_H-\omega_N)$  ermittelt wird. Die Aufnahme bei zwei verschiedenen Feldstärken erhöht zum einen die Anzahl der Datenpunkte und erlaubt zum anderen die Bestimmung von feldstärke-abhängigen Austauschbeiträgen  $R_{ex}$ . Eine aussagekräftige Auswertung der Piko- bis Nanosekundendynamik mit dem Programm relax erfordert daher wie in Kapitel 3.6.6 beschrieben die  $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten bei mindestens zwei Feldstärken, sowie die hochaufgelöste Struktur von GABARAP. Mit dem Programm relax wurden somit die Ordnungsparameter  $S^2$ , die globale Rotationskorrelationszeit, die internen Korrelationszeiten, sowie die Austauschbeiträge  $R_{ex}$  und der Diffusionstensor von GABARAP aus den in Abb. 4.17 dargestellten Daten ermittelt.

Für die model-free-Analyse mittels relax wurde die Kristallstruktur mit dem PDB-Eintrag 1GNU verwendet, da diese im N-Terminus intramolekulare Wechselwirkungen wie Salzbrücken oder Wasserstoffbindungen aufweist, die in der NMR-Struktur mit dem PDB-Eintrag 1KOT nicht definiert sind [11, 23]. Diese Definition von intramolekularen Wechselwirkungen war relevant, da die Ordnungsparameter  $S^2$  ebenfalls im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jun. Prof. Dr. B. Strodel des ICS-6 auf Grundlage der GABARAP-Struktur simuliert wurden. Im Zuge dieser Kooperation wurden die Ordnungsparameter  $S^2$  ebenfalls mittels Fluoreszenzspektroskopie durch das Institut von Prof. Dr. C. Seidel der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ermittelt, wobei die in dieser Arbeit hergestellten Cysteinvarianten von GABARAP verwendet

wurden, an die ein Farbstoff über eine Maleimidkopplung gebunden wurde. Die durch MD-Simulationen und Fluoreszenzspektroskopie ermittelten Werte werden in Kapitel 5.4 gezeigt und zusammen mit den folgenden Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert.

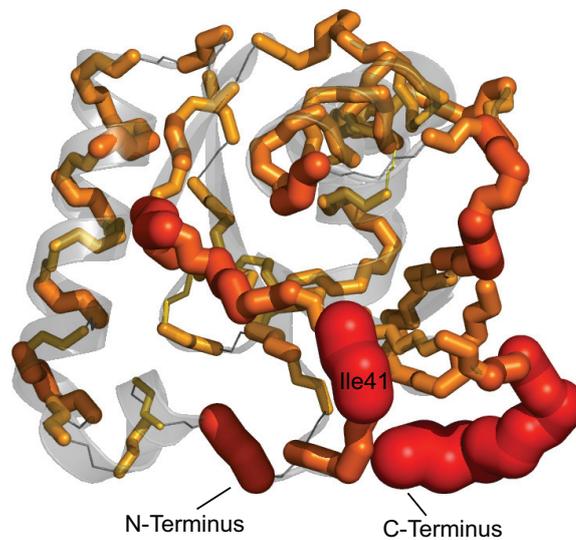
Der aus dem Satz von  $R_1$ ,  $R_2$  und  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werten bei 600 MHz und 900 MHz (s. Abb. 4.17) mit relax bestimmte Ordnungsparameter  $S^2$  ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Der Ordnungsparameter  $S^2$  ist ein Maß für die Amplitude der internen Mobilität,



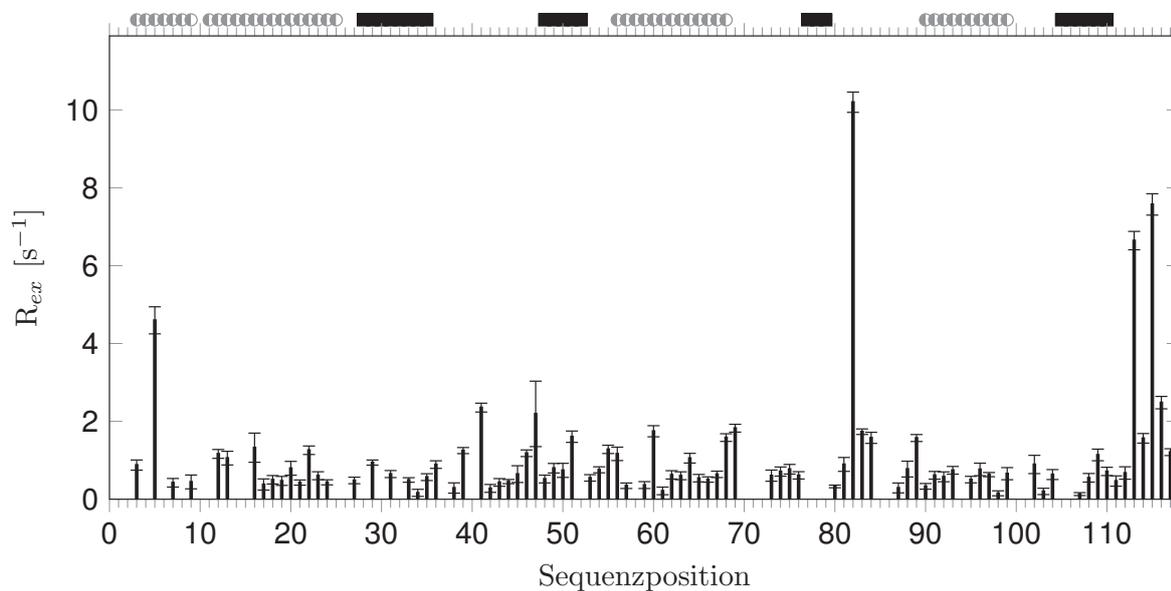
**Abbildung 4.18:** Ordnungsparameter  $S^2$  bestimmt aus  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten bei 25 °C. Das Schema oberhalb der Abbildung markiert  $\alpha$ -Helices (grau) und  $\beta$ -Stränge (schwarz).

wobei kleine Ordnungsparameter auf eine hohe Mobilität hinweisen und ein Wert von eins vollständige Rigidität bedeutet. Abbildung 4.18 lässt sich entnehmen, dass wie bereits durch die  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte angenommen, insbesondere der C-Terminus, die erste N-terminale Subdomäne, als auch die Region um Ile41 besonders flexibel sind, da diese relativ kleine Ordnungsparameter im Vergleich zu anderen Bereichen des Proteins aufweisen. Reguläre Sekundärstrukturelemente sind hingegen rigide auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala. Eine Veranschaulichung der flexiblen Bereiche in der GABARAP Struktur ist in Abbildung 4.19 dargestellt.

Neben der Identifikation von interner Dynamik aus dem Ordnungsparameter liefert die model-free-Analyse der Relaxationsdaten bei zwei verschiedenen Feldstärken auch Informationen darüber, welche Aminosäurereste von chemischem Austausch auf der



**Abbildung 4.19:** Darstellung des durch  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten bestimmten Ordnungsparameters  $S^2$  in der Struktur von GABARAP. Je flexibler das Proteinrückgrat ist, desto größer wird der Bereich um den entsprechenden Aminosäurerest dargestellt.



**Abbildung 4.20:** Chemische Austauschbeiträge  $R_{ex}$  ermittelt aus der model-free-Analyse von  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsexperimenten aufgetragen gegen die Aminosäuresequenz. Das Schema oberhalb der Abbildung markiert  $\alpha$ -Helices (grau) und  $\beta$ -Stränge (schwarz).

Mikrosekundenzeitskala betroffen sind. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.20 dargestellt und zeigt, dass nahezu alle Aminosäurereste einen Austauschbeitrag  $R_{ex}$  zeigen, wobei die größten und damit signifikanten Beiträge für Tyr5 ( $4,6 \text{ s}^{-1}$ ), Asn82 ( $10,2 \text{ s}^{-1}$ ) sowie den C-terminalen Resten Ser113 ( $6,6 \text{ s}^{-1}$ ) und Tyr115 ( $7,6 \text{ s}^{-1}$ ) bestimmt wurden.

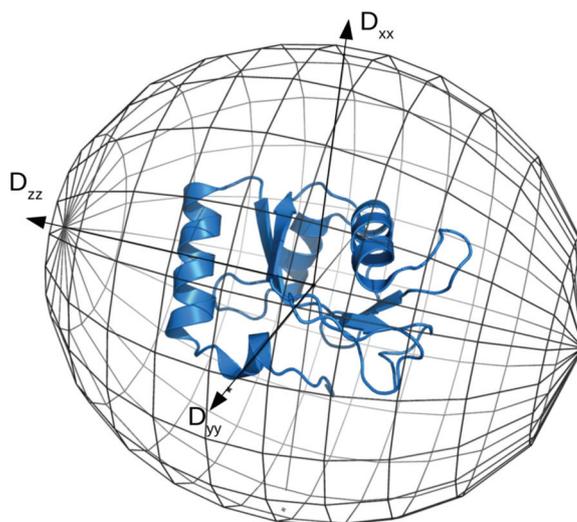
Die Bestimmung der oben beschriebenen internen Dynamik mittels relax erfolgte für verschiedene Diffusionsmodelle von isotroper bis hin zu vollständig anisotroper Symmetrie. Bei  $25 \text{ °C}$  wird der Diffusionstensor von GABARAP am besten durch ein ellipsoides Modell mit einer mittleren globalen Rotationskorrelationszeit von  $9,6 \text{ ns}$  beschrieben. Die Parametrisierung des Rotationsdiffusionstensors ist in Tabelle 4.4 aufgeführt und in Abbildung 4.21 grafisch dargestellt.

**Tabelle 4.4:** Eigenwerte des Rotationsdiffusionstensors von GABARAP

Ellipsoides Modell	
$\tau_c$ [ns]	9,6
$D_{iso}$ [ $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$ ]	$1,737 \cdot 10^7$
$D_{xx}$ [ $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$ ]	$1,598 \cdot 10^7$
$D_{yy}$ [ $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$ ]	$1,680 \cdot 10^7$
$D_{zz}$ [ $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$ ]	$1,933 \cdot 10^7$
$\alpha$ [rad]	0,113
$\beta$ [rad]	1,0483
$\gamma$ [rad]	0,812

Dieser ellipsoide Rotationsdiffusionstensor hat die Eigenwerte  $D_{xx} = 1,598 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_{yy} = 1,680 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  und  $D_{zz} = 1,933 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ . Aufgrund der anisotropen Rotationsdiffusion ergeben sich fünf verschiedene Rotationskorrelationszeiten  $\tau_c$ , die aus den Eigenwerten berechnet wurden und in Tabelle 4.5 zusammengetragen sind [81]. Die Rotationskorrelationszeiten sind in x- bzw. y-Richtung mit  $9,08 \text{ ns}$  bzw.  $9,07 \text{ ns}$  nahezu identisch, wohingegen die Rotationskorrelationszeit entlang der längsten Achse  $10,20 \text{ ns}$  beträgt und demnach etwa  $12 \%$  länger ist.

Aus dem Verhältnis der Eigenwerte lässt sich der Perrin-Formfaktor berechnen, der es ermöglicht den hydrodynamischen Radius aus dem Gesetz von Stokes unter



**Abbildung 4.21:** GABARAP wird beschrieben durch einen ellipsoiden Rotationsdiffusionstensor. Die zugehörigen Eigenwerte bestimmen die Größe des Diffusionstensors.

**Tabelle 4.5:** Rotationskorrelationszeiten von GABARAP unter Berücksichtigung der Anisotropie.

Symmetrie	Rotationskorrelationszeiten
	$\tau_1 = \frac{1}{4D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}} = 10 \text{ ns}$
	$\tau_2 = \frac{1}{D_{xx} + 4D_{yy} + D_{zz}} = 9,76 \text{ ns}$
anisotrop	$\tau_3 = \frac{1}{D_{xx} + D_{yy} + 4D_{zz}} = 9,08 \text{ ns}$
	$\tau_+ = \frac{1}{6D_{iso} + 6\sqrt{D_{iso}^2 - L^2}} = 9,07 \text{ ns}$
	$\tau_- = \frac{1}{6D_{iso} - 6\sqrt{D_{iso}^2 - L^2}} = 10,20 \text{ ns}$
	mit $L^2 = \frac{1}{3}(D_{xx}^2 + 4D_{yy}^2 + D_{zz}^2)$

Berücksichtigung der Symmetrie zu bestimmen. Der Perrin-Formfaktor der Stokes-Reibungskraft bei translativer Bewegung relativ zu einer volumengleichen Kugel berechnet sich gemäß

$$F = \frac{\sqrt{P^2 - 1}}{\sqrt[3]{P} \ln(P + \sqrt{P^2 - 1})}, \quad (4.1)$$

wobei  $P$  dem Verhältnis der Hauptachsen des prolaten Rotationsellipsoids entspricht. Da das Verhältnis der Hauptachsen nicht bekannt ist, muss das Verhältnis der Eigenwerte des Diffusionstensors für die Bestimmung des Formfaktors verwendet werden [82]. Das Verhältnis der Eigenwerte ist durch den Zusammenhang

$$\frac{D_{par}}{D_{per}} = \frac{(2P^2 - S)(P^4 - 1)}{(S(2P^2 - 1) - 2P^2)(P^2 - 1)}, \quad (4.2)$$

$$\text{mit } S = \frac{(2P \ln(P + \sqrt{P^2 - 1}))}{\sqrt{P^2 - 1}}. \quad (4.3)$$

gegeben [82]. Die Eigenwerte eines axialsymmetrischen Diffusionstensors mit den beiden kurzen Halbachsen  $a$  und der langen Halbachse  $b$  werden durch

$$D_{par} = \frac{k_B T \cdot 3(2P^2 - S)}{8\pi\eta(a + 2,8 \text{ \AA})^2(b + 2,8 \text{ \AA}) \cdot 4(P^2 - 1)} \quad (4.4)$$

und

$$D_{per} = \frac{k_B T \cdot 3(S(2P^2 - 1) - 2P^2)}{8\pi\eta(a + 2,8 \text{ \AA})^2(b + 2,8 \text{ \AA}) \cdot 4(P^4 - 1)} \quad (4.5)$$

beschrieben, wobei es sich bei  $k_B$  um die Boltzmann-Konstante,  $\eta$  um die Viskosität des Lösungsmittels handelt und  $2,8 \text{ \AA}$  der Hydrathülle entspricht [82]. Die Berechnung des Verhältnisses der Eigenwerte lässt sich mit den Werten aus Tabelle 4.4 gemäß

$$\frac{D_{par}}{D_{per}} = \frac{D_z}{\frac{1}{2}(D_{xx} + D_{yy})} = 1,177 \quad (4.6)$$

durchführen, sodass der Formfaktor von GABARAP unter Verwendung der Gleichungen 4.1 bis 4.5 numerisch zu  $F = 1,01$  ermittelt werden konnte. Mit Hilfe der Gleichungen 4.5 und dem ermittelten Formfaktor  $F$  lassen sich ebenfalls die Halbachsen  $a$  und  $b$  numerisch bestimmen. Der ermittelte Wert für die kurzen Halbachsen beträgt  $a = 17,1 \text{ \AA}$  und  $b = 23,7 \text{ \AA}$ , sodass der hydrodynamische Radius von GABARAP

$$r_H = \sqrt[3]{a^2 \cdot b} + 2,8 \text{ \AA} = 21,8 \text{ \AA} \quad (4.7)$$

unter der Berücksichtigung der Symmetrie beträgt. Somit wurde für GABARAP mittels Formfaktor aus relax und den Rotationskorrelationszeiten  $\tau_c$  aus Tensor2 (s. Tab. 4.3) ein hydrodynamischer Radius von bis 21,5 nm bis 21,8 nm ermittelt.

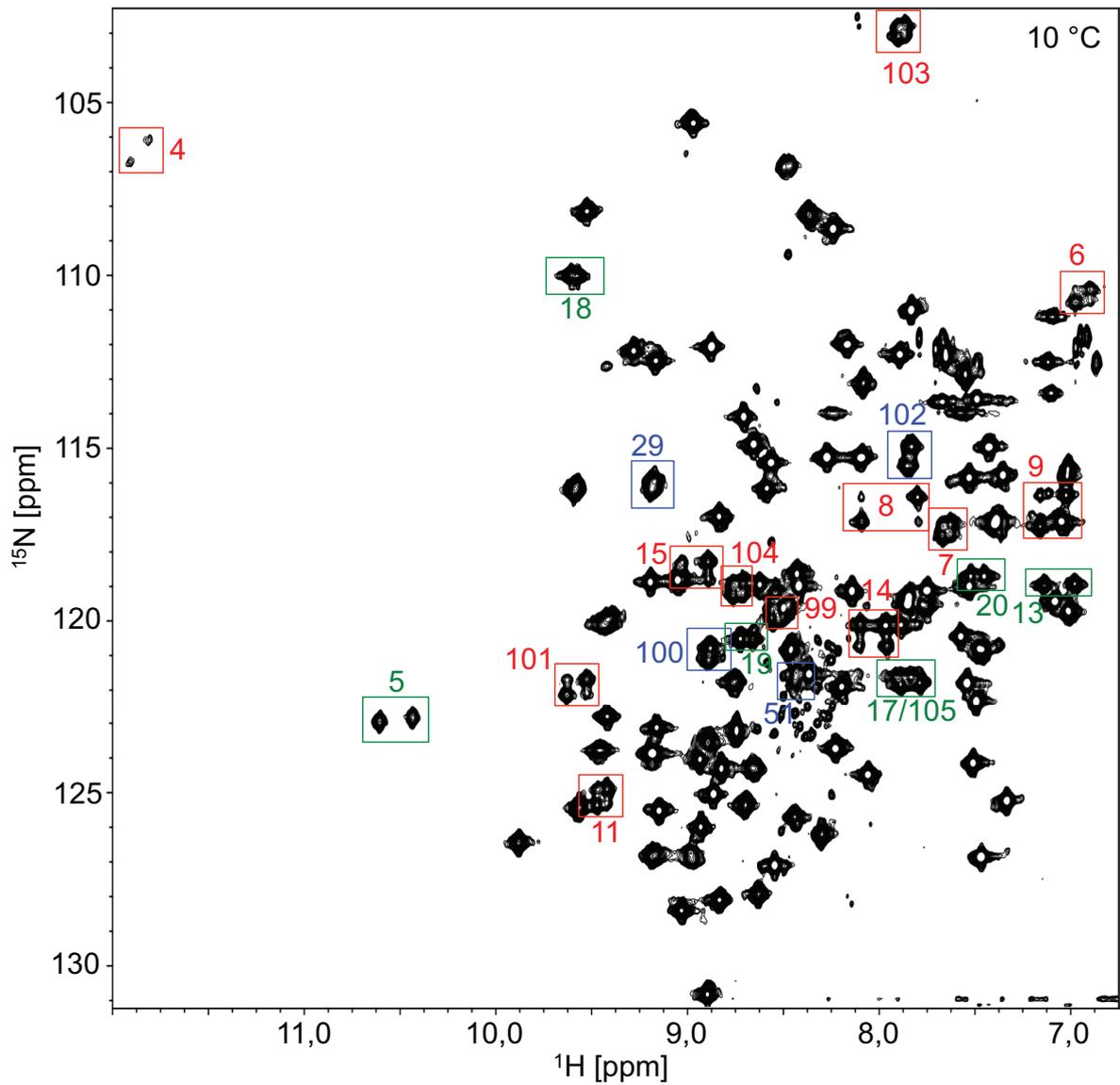
## 4.6 Mikro- bis Millisekundendynamik

### 4.6.1 ZZ-Austausch

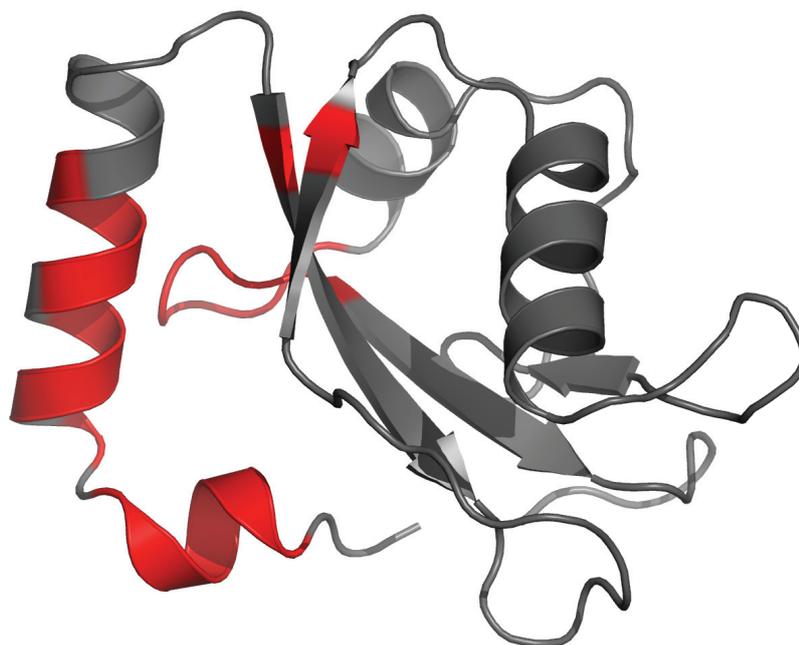
In Kapitel 4.2 wurde bereits die Linienverbreiterung bei 25 °C und die deutliche Aufspaltung von Resonanzen bei 10 °C erwähnt. Die Linienverbreiterung wird durch chemischen Austausch verursacht, der bei 10 °C so langsam wird, dass die Resonanzen beider Zustände eindeutig aufgelöst sind und ein sogenanntes Multiplett entsteht. Resonanzen, die eine Aufspaltung zeigen, sind in dem HSQC-Spektrum in Abbildung 4.22 markiert und wurden in drei Gruppen unterteilt:

1. Resonanzen die lediglich eine Aufspaltung in der Protonendimension zeigen, wie Tyr5, Lys13, Leu17, Gly18, Glu19, Lys20 und Leu105 (grün).
2. Resonanzen die lediglich eine Aufspaltung in der Stickstoffdimension zeigen, wie Val29, Val51, Glu100 und Asp102 (blau).
3. Resonanzen die eine Aufspaltung sowohl in Protonen- als auch Stickstoffdimension aufweisen, wie Val4, Lys6, Glu7, Glu8, His9, Phe11, Arg14, Arg15, His99, Glu101, Phe103 und Phe104 (rot). Eine Einfärbung dieser aufgespaltenen Aminosäurereste in der Struktur von GABARAP zeigt, dass Reste des N-Terminus, der räumlich nahen Schleife und der benachbarten  $\beta$ -Stränge  $\beta_1$  und  $\beta_2$  betroffen sind (s. Abb. 4.23).

Die Population der beiden Zustände ließ sich anhand des Intensitätsverhältnisses der aufgespaltenen Resonanzen aus Gruppe 1 und 2 bestimmen. Dazu wurden nur Resonanzen berücksichtigt, die deutlich aufgelöst sind und keinen Überlapp mit anderen Resonanzen aufweisen. Aus diesen Intensitätsverhältnissen ergibt sich eine Verteilung der Population von etwa 44 % zu 56 %. Für die Bestimmung der Austauschrate wurden ZZ-Experimente, wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, mit variablen Mischzeiten aufgenommen. Die Signalintensität der einzelnen Resonanzen in einem Multiplett wurde dann



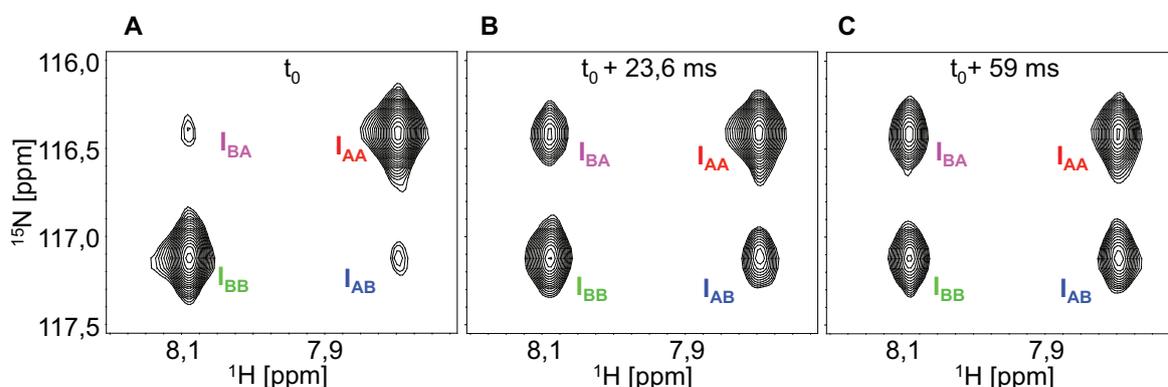
**Abbildung 4.22:** [ $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von GABARAP bei 10 °C. Aufgespaltene Resonanzen sind in drei Gruppen unterteilt. Grün: Aufspaltung in  $^1\text{H}$ -Dimension, blau: Aufspaltung in  $^{15}\text{N}$ -Dimension und rot: Aufspaltung in  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Dimension.



**Abbildung 4.23:** Aminosäurereste, dessen entsprechende Resonanzen im HSQC-Spektrum bei 10 °C eine Aufspaltung zeigen, sind in der Struktur von GABARAP rot eingefärbt. Es handelt sich dabei um den N-Terminus (Val4 bis Lys20), die angrenzende Schleife mit den Resten His99 bis Phe104, sowie die benachbarten  $\beta$ -Stränge  $\beta_1$  und  $\beta_2$  (Val29, Val51).

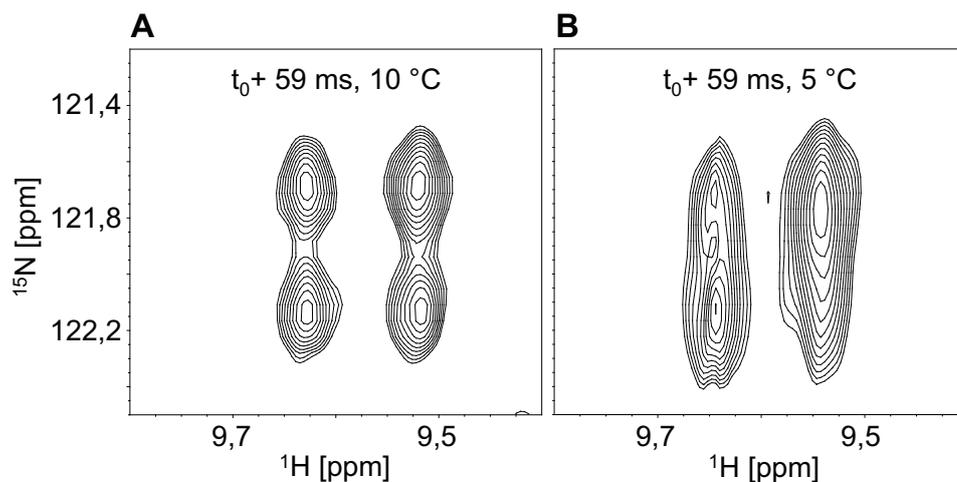
in Abhängigkeit der Mischzeit analysiert und durch die Bloch-McConnell-Gleichungen gefittet, um kinetische Parameter wie die Population des angeregten Zustands und die Austauschrate zu bestimmen. Für diese Analyse eignen sich daher die Resonanzen der Gruppe 3, mit Ausnahme von His99, dessen Resonanzen mit der von Gln96 überlappen, sowie Glu7, Phe103 und Phe104, dessen Resonanzen innerhalb eines Multipletts nicht eindeutig aufgelöst sind. Obwohl das Multiplett von Val4 keinen Überlapp zeigt, wird es aufgrund eines zu geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht berücksichtigt. Ein Multiplett besteht aus zwei Autopeaks für den Zustand A und B sowie zwei Kreuzpeaks, welche die durch den Austausch erzeugten Mischzustände AB und BA repräsentieren. Abbildung 4.24 zeigt das Multiplett des N-terminalen Aminosäurerestes Glu8 in einem Referenzspektrum ohne zusätzliche Mischzeit ( $t_{mix}=0$ ) (A), sowie mit 23,6 ms (B) und mit 59 ms Mischzeit (C). Dass auch ohne das Einfügen einer Mischzeit in die Pulssequenz chemischer Austausch während des INEPT-Transfers stattfindet, lässt sich an der Präsenz der Kreuzpeaks in Abbildung 4.24 (A) erkennen. Daher ergibt

sich die tatsächliche Mischzeit aus der Addition der bekannten eingefügten Zeit  $t_{mix}$  mit einer der INEPT-Transferzeit entsprechenden Konstante  $t_0$ , sodass  $t = t_{mix} + t_0$  ist. Um zu überprüfen, ob eine langsamere Austauschrate verursacht durch eine Temperaturverminderung den Austausch während des INEPT-Transfers soweit minimiert, dass ohne Einfügen einer Mischzeit auch keine Kreuzpeaks auftreten, wurde zusätzlich ein ZZ-Austauschexperiment bei 5 °C aufgenommen. Die Spektren bei 5 °C weisen jedoch eine stärkere Linienverbreiterung auf, infolgedessen einzelne Resonanzen im Multiplett nicht aufgelöst sind, was in Abbildung 4.25 anhand des Multipletts von Glu101 bei 10 °C (A) und bei 5 °C (B) gezeigt ist.



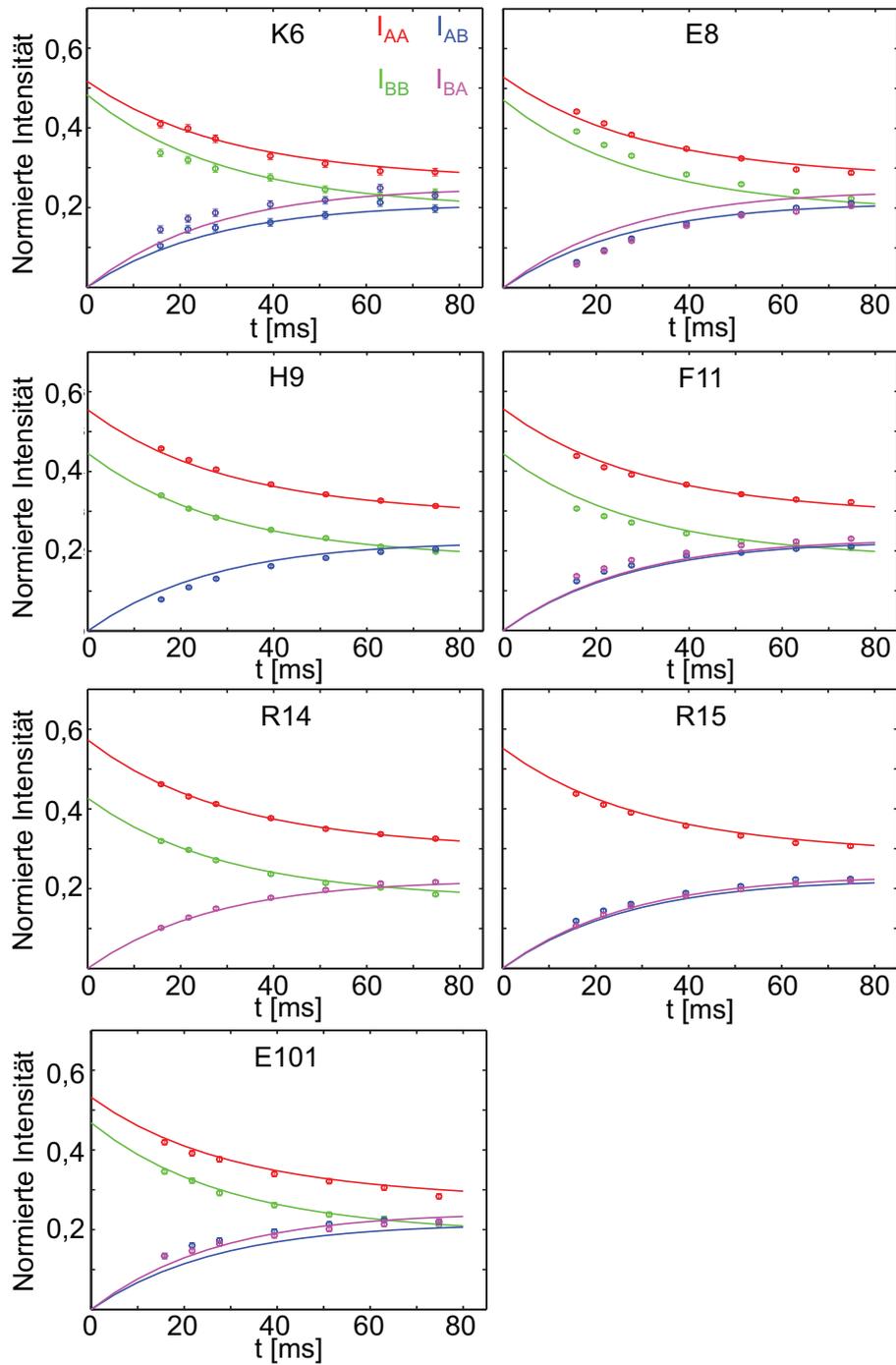
**Abbildung 4.24:** Resonanzen des Multipletts von Glu8 aus dem ZZ-Experiment für A) keine Mischzeit, B) 29 ms Mischzeit und C) 59 ms Mischzeit. Gezeigt ist das Multiplett der Aminosäure Glu8, bestehend aus den Autopeaks  $I_{AA}$  (rot) und  $I_{BB}$  (grün) sowie den Kreuzpeaks  $I_{AB}$  (blau) und  $I_{BA}$  (magenta).

Das ZZ-Pulsprogramm wurde so umprogrammiert, dass die Mischzeit in Blöcken von 5 ms variiert werden kann. Zusammen mit einem Puls von 900  $\mu$ s Länge, der die Magnetisierung des Wassers in die Richtung des externen Magnetfeldes ausrichtet, ist die Mischzeit damit in 5,9 ms Schritten variierbar. Insgesamt wurden Spektren mit sechs verschiedenen Mischzeiten von 5,9 ms bis 59 ms sowie ein Referenzspektrum ohne zusätzliche Mischzeit aufgenommen. In einem globalen Fit sind die Intensitäten  $I_{AA}(0)$  und  $I_{BB}(0)$  ohne Mischzeit für jeden Rest einzeln als lokale Fitparameter und die Austauschrate  $k_{ex}$ , die Population des angeregten Zustands  $p_B$ , sowie die konstante Mischzeit  $t_0$  als globale Fitparameter gewählt. Die Population des angeregten Zustands beträgt demnach  $p_B = 43,8 \pm 0,1 \%$  bei einer Austauschrate von  $k_{ex} = 34,6 \text{ s}^{-1} \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ .



**Abbildung 4.25:** Resonanzen des Multipletts von Glu101 aus dem ZZ-Experiment mit einer Mischzeit von 59 ms bei A) 10 °C und B) 5 °C. Die starke Linienverbreiterung bei 5 °C führt zu einem Überlapp der einzelnen Resonanzen im Multiplett.

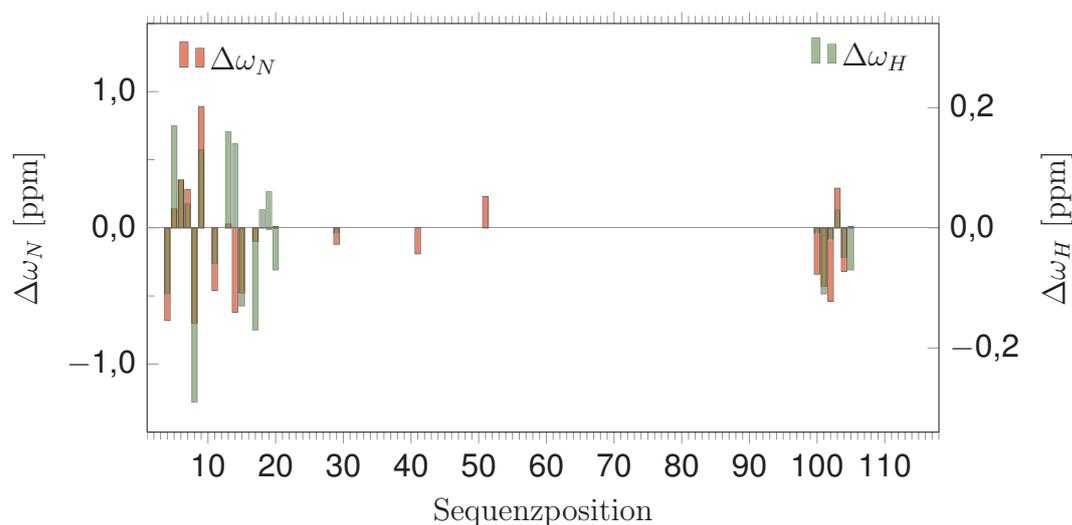
Die durch Delays und Transfers bedingte konstante Mischzeit  $t_0$  beträgt  $15,8 \pm 0,2$  ms. Der Fehler der Intensitätsmessungen wurde aus dem Rauschen abgeschätzt. Die Fehlerbestimmung der Fitparameter erfolgte durch 1000 Monte-Carlo-Simulationen. In Abbildung 4.26 sind die Signalintensitäten der verschiedenen Resonanzen eines Multipletts für den jeweiligen Aminosäurerest aufgetragen. Die Datenpunkte repräsentieren die experimentell gemessenen Werte, wobei die durchgezogene Linie den globalen Fit durch die Bloch-McConnell-Gleichungen zeigt. Die Intensitäten wurden dabei jeweils auf die Summe der Signalintensitäten der beiden Autopeaks  $I_{AA}(0) + I_{BB}(0)$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  normiert. Die gefittete Zeit  $t_0$  entspricht 15,8 ms, sodass bei der Aufnahme des ersten Spektrums mit  $t_{mix} = 5,9$  ms die tatsächliche Mischzeit etwa 22 ms beträgt. Die maximale Mischzeit in dem ZZ-Austauschexperiment beträgt demnach 75 ms. Neben der Austauschrate und der Besetzung eines angeregten Zustands ist auch die Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Resonanzen von Zustand A und B von Interesse ( $\Delta\omega = \omega_A - \omega_B$ ), da diese ein Maß für die zugrundeliegende Strukturänderung zwischen beiden Zuständen sein kann. Die Differenzen der chemischen Verschiebungen  $\Delta\omega_H$  und  $\Delta\omega_N$  zwischen beiden Zuständen können dem HSQC-Spektrum bei 10 °C direkt entnommen werden und sind in Abbildung 4.27 grafisch dargestellt. In dieser



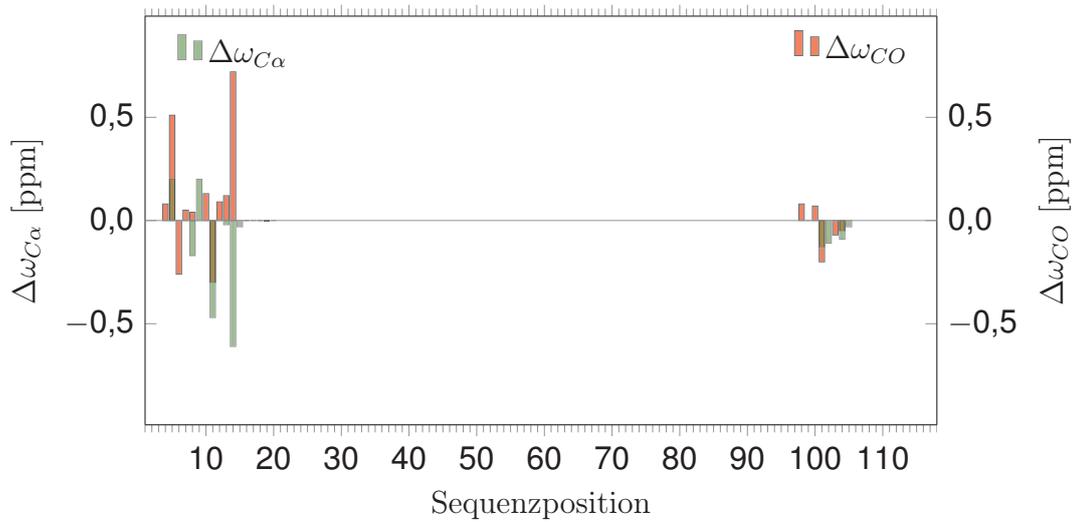
**Abbildung 4.26:** Intensitäten der Autopeaks  $I_{AA}$  (rot) bzw.  $I_{BB}$  (grün) und der Kreuzpeaks  $I_{AB}$  (blau) bzw.  $I_{BA}$  (magenta) in Abhängigkeit der Mischzeit  $t$ . Die experimentell ermittelten Peakintensitäten (Kreise) wurden auf die Summe der Autopeakintensitäten zum Zeitpunkt  $t=0$  normiert. Die durchgehende Linie entspricht dem Fit durch die Bloch-McConnell-Gleichungen (reduziertes  $\chi^2 = 11,6$ ). Die Intensitäten zum Zeitpunkt  $t=0$  wurden als lokale Fitparameter behandelt, während die Population des angeregten Zustands  $p_B = 43,8 \pm 0,1 \%$ , die Austauschrate  $k_{ex} = 34,6 \text{ s}^{-1} \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ , sowie die durch Delays und Transfers bedingte konstante Mischzeit  $t_0 = 15,8 \pm 0,2 \text{ ms}$  als globale Parameter gefittet wurden.

## 4. Ergebnisse

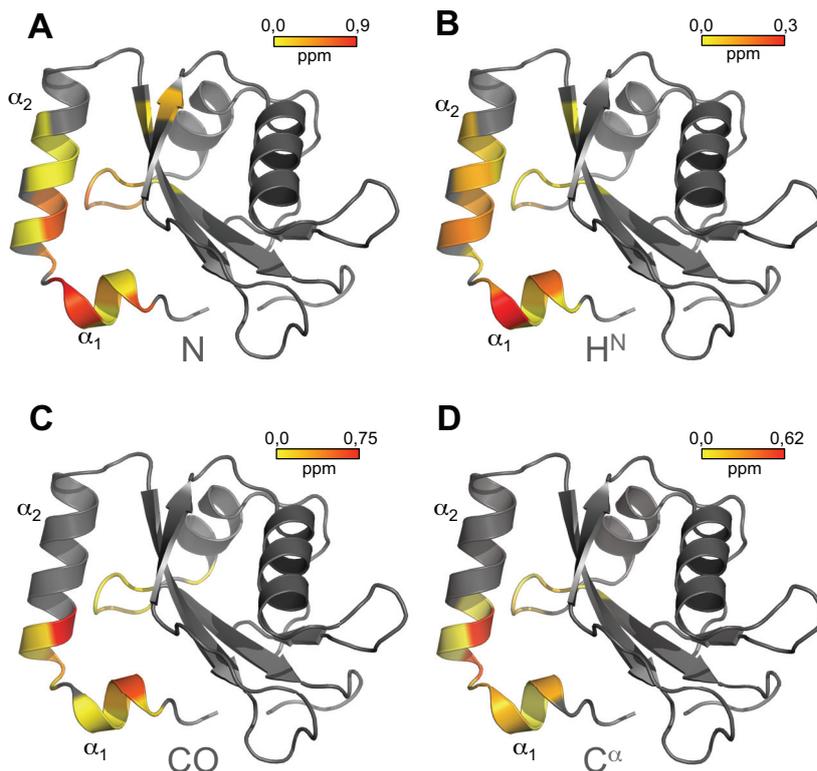
Abbildung ist zu beachten, dass der gezeigte Bereich der y-Achse für die  $\Delta\omega_H$ -Werte aufgrund der Übersichtlichkeit um den Faktor fünf kleiner gewählt ist, im Vergleich zur y-Achse der  $\Delta\omega_N$ -Werte. Die größte Differenz der chemischen Verschiebung in der Protonendimension weist Glu8 auf mit  $\Delta\omega_H = -0,29$  ppm, wohingegen die Differenz der chemischen Verschiebung in der Stickstoffdimension für His9 mit  $\Delta\omega_N = 0,89$  ppm am größten ist. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen von CO- und C $^\alpha$ -Kernen sind besonders sensitiv für Sekundärstrukturänderungen. Daher wurden auch  $\Delta\omega_{CO}$  und  $\Delta\omega_{C^\alpha}$  aus einem 3D HNCA- und 3D HNC(O)-Spektrum bei 10°C bestimmt, sofern die Auflösung eine eindeutige Trennung von zwei Maxima zuließ. Die Differenzen der chemischen Verschiebungen von den CO- und C $^\alpha$ -Kernen sind in Abbildung 4.28 aufgetragen. Die größte Differenz der chemischen Verschiebung zeigt Arg14 mit  $\Delta\omega_{CO} = 0,72$  ppm. Aus den chemischen Verschiebungen von CO- und C $^\alpha$ -Kernen kann die SSP (engl. secondary structure propensity) bestimmt werden, die Hinweise auf die Sekundärstruktur liefert [56]. Die SSP wurde daher jeweils auf Grundlage der verschiedenen chemischen Verschiebungen von CO- und C $^\alpha$ -Kernen für den Zustand A und B bestimmt. Die SSP deutet darauf hin, dass keine Sekundärstrukturunterschiede zwischen den beiden austauschenden Zuständen existieren (s. Abb. A.1).



**Abbildung 4.27:** Differenzen der chemischen Verschiebungen von Amidprotonen  $\Delta\omega_H$  sowie  $^{15}\text{N}$ -Kernen  $\Delta\omega_N$  zwischen den beiden austauschenden Zuständen A und B mit  $\Delta\omega = \omega_A - \omega_B$ .



**Abbildung 4.28:** Differenzen der chemischen Verschiebungen von Carbonylen  $\Delta\omega_{CO}$  sowie  $C^\alpha$ -Kernen  $\Delta\omega_{C^\alpha}$  zwischen den beiden austauschenden Zuständen A und B mit  $\Delta\omega = \omega_A - \omega_B$ .



**Abbildung 4.29:** Darstellung von Differenzen von chemischen Verschiebungen  $\Delta\omega$  zwischen beiden Austauschzuständen der A)  $^{15}\text{N}$ -, B)  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -, C)  $^{13}\text{CO}$ - sowie D)  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne in der Struktur von GABARAP. Die Differenzen wurden direkt aus einem  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-, einem HNCO-, sowie einem HNCA-Spektrum bei  $10^\circ\text{C}$  ermittelt.

In Abbildung 4.29 sind zum Vergleich noch einmal Aminosäurereste, die eine Aufspaltung zeigen gemäß der Größe des Absolutbetrags von  $\Delta\omega$  für die  $^1\text{H}^N$ -,  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{CO}$ - sowie  $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kerne farblich in der Struktur von GABARAP markiert. Die Einfärbung der  $\Delta\omega$  verschiedener Kerne in der Struktur von GABARAP zeigt insgesamt, dass die größten Änderungen für alle betrachteten Kerne in unmittelbarer Nähe des Pro10 in der N-terminalen helikalen Subdomäne (NHD) auftreten.

### 4.6.2 CPMG-RD-Experimente

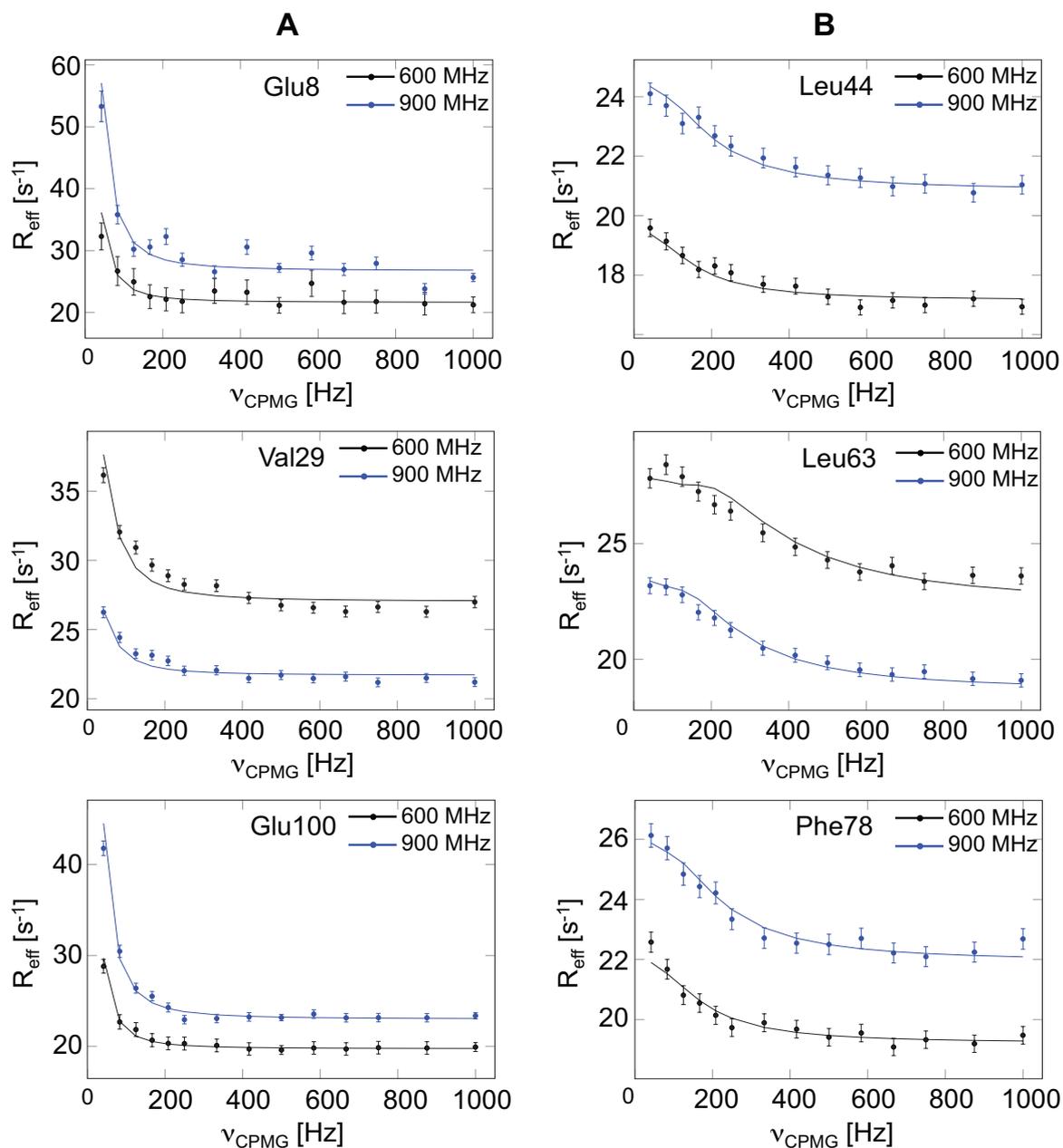
Um gezielt chemische Austauschprozesse von GABARAP zu untersuchen, wurden CPMG-RD-Experimente aufgenommen, die sich wie in Kapitel 3.6.7.2 beschrieben zur Identifizierung und Quantifizierung von Austausch mit einer Rate von  $100\text{ s}^{-1}$  bis etwa  $2000\text{ s}^{-1}$  und einer Population des angeregten Zustands von mindestens 0,5 % eignen. Es wurden  $^{15}\text{N}$ -SQ-CPMG- sowie  $^{15}\text{N}$ -TROSY-CPMG-Experimente an  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP,  $^1\text{H}^N$ -SQ-CPMG-Experimente an  $[\text{U-}^{15}\text{N}, ^2\text{H}]$ -GABARAP, sowie  $^{13}\text{CO}$ -SQ-CPMG-Experimente an  $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -GABARAP bei je zwei verschiedenen Feldstärken aufgenommen.

#### 4.6.2.1 CPMG-RD der $^{15}\text{N}$ -Kerne

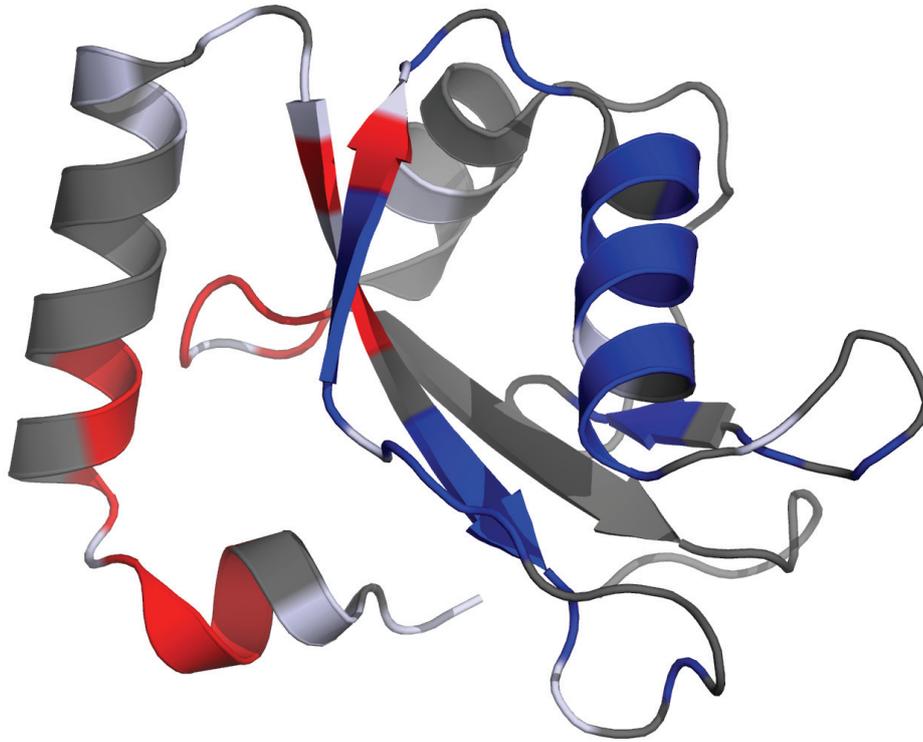
Der Fokus der Analyse lag auf der CPMG-Relaxationsdispersion der  $^{15}\text{N}$ -Kerne, die bei verschiedenen Temperaturen von  $15\text{ }^\circ\text{C}$  bis  $40\text{ }^\circ\text{C}$  intensiv analysiert wurde. Die CPMG-RD-Experimente wurden bei Protonenlarmorfrequenzen von  $600\text{ MHz}$  und  $900\text{ MHz}$  aufgenommen. Anhand der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven war es möglich, zwei verschiedene spezifische Austauschprozesse eindeutig zu identifizieren, was anhand der Kurvenverläufe in Abbildung 4.30 ersichtlich wird. In Abbildung 4.30 (A) wird der langsamere Austauschprozess exemplarisch durch die Aminosäurereste Glu8, Val29 und Glu100 gezeigt, während der schnellere Austausch in Abbildung 4.30 (B) durch die Aminosäurereste Leu44, Leu63 sowie Phe78 repräsentiert wird. Die effektiven Relaxationsraten der Aminosäurereste Glu8, Val29, sowie Glu100 fallen schon für kleine CPMG-Frequenzen

schnell ab, was auf den langsameren Austausch hindeutet, wohingegen die CPMG-RD-Kurven von Leu44, Leu63 und Phe78 langsamer abfallen und damit die schnellere Austauschrate vorliegt. Die von dem jeweiligen Austauschprozess betroffenen Aminosäurereste wurden in der Struktur von GABARAP in rot (langsamer Prozess) und blau (schneller Prozess) eingefärbt (s. Abb. 4.31). Bei den rot eingefärbten Aminosäureresten handelt es sich neben den oben bereits erwähnten Resten Glu8, Val29 und Glu100 auch um Glu7, His9, Phe11, Arg14, Arg15, Val31, Val51, Glu100, Asp102, Phe103 und Phe104. Somit zeigen die N-terminale Helix (Glu7, Glu8, His9, Phe11, Arg14, Arg15), die räumlich nahe Schleife (Glu100, Asp102, Phe103, Phe104) und die benachbarten  $\beta$ -Stränge  $\beta_1$  und  $\beta_2$  (Val29, Val31, Val51) den gleichen langsamen Austauschprozess. Dies entspricht den Resten, die auch im HSQC (s. Abb. 4.22) von offensichtlicher Linienverbreiterung bzw. Aufspaltung der Resonanzen bei 10 °C betroffen sind. Lediglich Val31 zeigt im HSQC-Spektrum keine Aufspaltung. Da die CPMG-RD-Kurven hier den RD der  $^{15}\text{N}$ -Kerne entsprechen, wird der Austausch für Kerne, die lediglich eine Differenz der chemischen Verschiebung in Protonendimension aufweisen, nicht detektiert. Die CPMG-RD-Kurven von Val4 und Lys6 in der N-terminalen Helix wurden aufgrund eines zu geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht detektiert. Die Resonanz von His99 in der Schleife überlappt mit Gln96 und konnte demnach ebenfalls nicht analysiert werden.

Neben dem langsamen Austauschprozess wurde wie bereits erwähnt mittels  $^{15}\text{N}$ -CPMG ein weiterer Austauschprozess detektiert, der im Wesentlichen den Proteinkern im und um den Bereich der hydrophoben Tasche hp2 von GABARAP betrifft (Abb. 4.31, blau). Dieser schnellere Austauschprozess umfasst neben den bereits erwähnten Aminosäurereste Leu44, Leu63 und Phe78 auch die Aminosäurereste Glu34, Lys35, Ala36, Ala39, Asp45, Lys46, Lys48, Tyr49, Leu50, Ser53, Leu55, Gly58, Gln59, Phe60, Tyr61, Lys66, Arg67, Ile68, Asp74, Leu76, Phe78 und Phe79. Die in der gleichen Proteinregion befindlichen Reste Lys47 und Ile64 konnten wegen Überlapp mit anderen Resonanzen oder im Falle von Pro52 aufgrund des fehlenden Stickstoffs im Proteinerückgrat nicht analysiert werden.



**Abbildung 4.30:**  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD Kurven bei  $25^\circ\text{C}$  offenbaren mindestens zwei verschiedene Austauschprozesse auf der Millisekundenzeitskala. Durchgezogene Linien entsprechen den Fits eines Zwei-Zustands-Modells. A) Die Aminosäurereste Glu8, Val29 und Glu100 zeigen schnell abfallende CPMG-RD-Kurven und unterliegen daher einem langsameren Austauschprozess. B) Aminosäurereste im und um den Bereich der hydrophoben Tasche hp2, repräsentiert durch Leu44, Leu63 und Phe78, zeigen hingegen langsam abfallende CPMG-RD-Kurven, die auf einen schnelleren Austausch hinweisen.



**Abbildung 4.31:** Die  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven lassen sich zwei verschiedenen Austauschprozessen zuordnen, die hier farblich in der Struktur von GABARAP markiert sind. Der langsamere Austauschprozess (rot) umfasst die Aminosäurereste Lys6, Glu7, Glu8, His9, Phe11, Arg14, Arg15, Val29, Val31, Val51, Glu100, Asp102, Phe103 und Phe104, die auch eine Peakspaltung in  $^{15}\text{N}$ -Dimension im HSQC-Spektrum aufweisen und bereits durch das ZZ-Austauschexperiment bei  $10^\circ\text{C}$  analysiert wurden. Der blau markierte Bereich umfasst die Aminosäurereste Val33, Glu34, Lys35, Ala36, Ala39, Leu44, 45Asp, Lys46, Lys48, Tyr49, Leu50, Ser53, Leu55, Gly58, Gln59, Phe60, Tyr61, Phe62, Leu63, Lys66, Arg67, Ile68, Asp74, Leu76, Phe78 und Phe79 im Proteinkern. Dieser Austausch im Proteinkern lässt sich ausschließlich durch CPMG-RD-Experimente detektieren und ist der schnellere der beiden Austauschprozesse. Für die hellblau eingefärbten Aminosäurereste kann keine Aussage getroffen werden, da es sich entweder um Proline handelt oder um Reste deren Resonanzen Überlapp oder ein zu geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen.

Für beide Austauschprozesse erfolgte die exakte Bestimmung von Austauschrate und Population des angeregten Zustands durch je einen globalen Zwei-Zustands-Fit. Dazu wurden CPMG-RD-Datensätze bei den insgesamt vier verschiedenen Temperaturen 15 °C, 25 °C, 35 °C und 40 °C aufgenommen und gemeinsam gefittet. Zusätzlich zur Austauschrate und Population liefert der Fit von CPMG-RD-Kurven auch das Quadrat der Differenz von chemischen Verschiebungen  $\Delta\omega^2 = (\Delta\omega_A - \Delta\omega_B)^2$  zwischen beiden Zuständen. Daraus lässt sich der Absolutbetrag der Differenz der chemischen Verschiebung berechnen, jedoch geht die Information des Vorzeichens verloren und damit die Kenntnis, in welche Richtung die Resonanz von Zustand B gegenüber der von Zustand A verschoben ist. In dem Fit unter Berücksichtigung der Daten bei verschiedenen Temperaturen wird ein temperaturunabhängiges  $\Delta\omega$  angenommen.

Für den langsamen Austauschprozess sind die Resonanzen aufgespalten bzw. linienverbreitert, wobei die Linienverbreiterung bei 25 °C bis 35 °C am stärksten ist. Der Austausch ist dann im sogenannten Koaleszenzregime, in dem der Austausch weder dem schnellen noch dem langsamen Austauschregime eindeutig zugeordnet werden kann. Bei einer Temperatur von 40 °C befindet sich das System im schnellen Austausch, infolgedessen sich die Linienverbreiterung verringert und die Resonanzen beider Zustände durch einen einzigen Peak repräsentiert werden. Aufgrund der Aufspaltung der Resonanzen bei Temperaturen von 15 °C bis 35 °C, werden sie unabhängig von den 40 °C Daten gefittet. Des Weiteren weisen sämtliche Aminosäurereste im N-Terminus ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf und werden daher in dem Fit nicht berücksichtigt, sodass der Fit des langsameren Austauschprozesses nur anhand der in Tabelle A.4 aufgeführten Resonanzen durchgeführt wurde. Für den Fit wurden die Peakintensitäten der jeweils intensitätsstärkeren Resonanz eines Multipletts verwendet. Wird im Falle der CPMG-RD-Kurven bei 15 °C bis 35 °C neben der Austauschrate  $k_{ex}$  und der Population  $p_B$  als globale Fitparameter, auch die Differenz der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_N$  als lokaler Fitparameter gewählt, ergibt sich ein  $p_B$  von etwa 20 %. Da die Resonanzen jedoch trotz der Linienverbreiterung noch eindeutig voneinander getrennt sind, lässt sich aus dem Intensitätsverhältnis dieser beiden Resonanzen bereits erkennen, dass beide Zustände annähernd gleich populiert sind und das durch den Fit

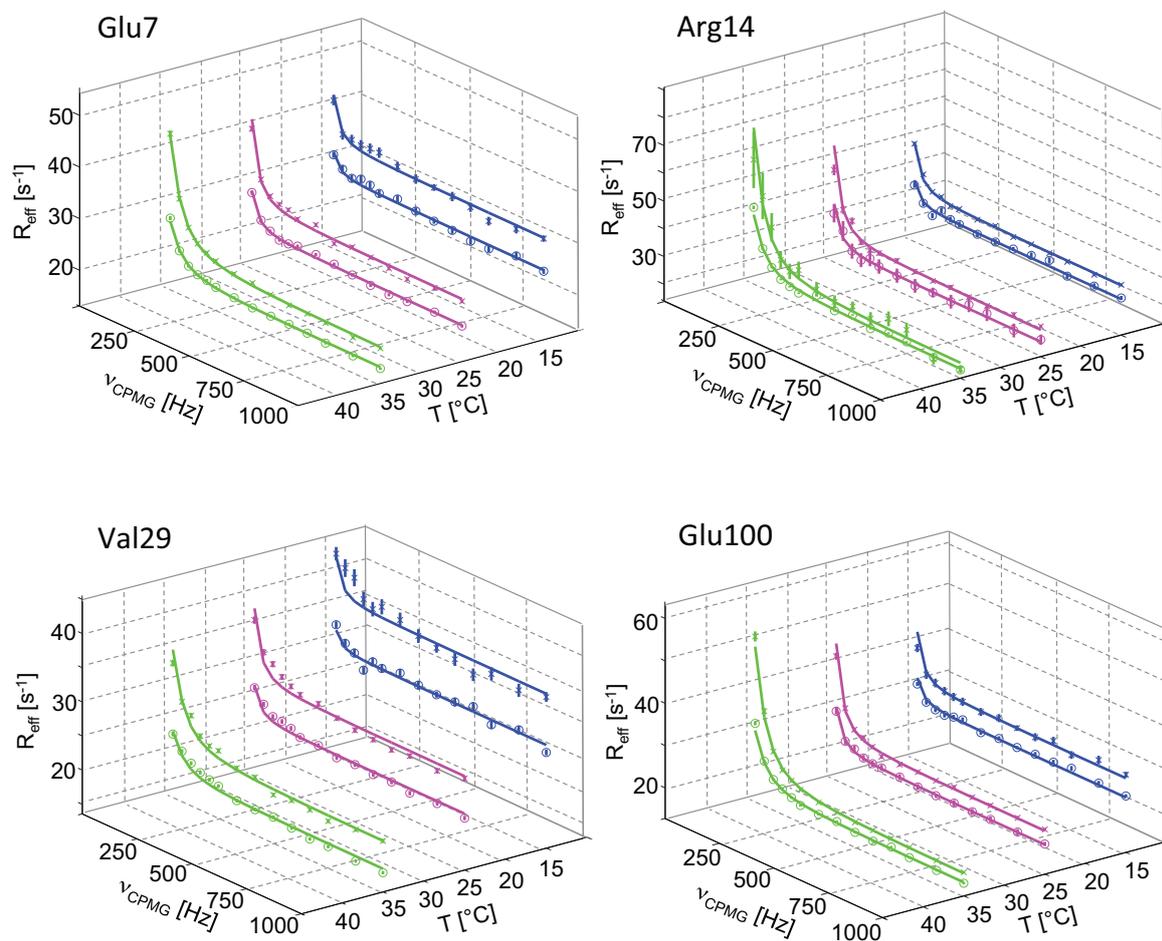
#### 4. Ergebnisse

**Tabelle 4.6:** Fitparameter von  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven des langsameren Austauschprozesses bei Temperaturen von 15 °C bis 40 °C.

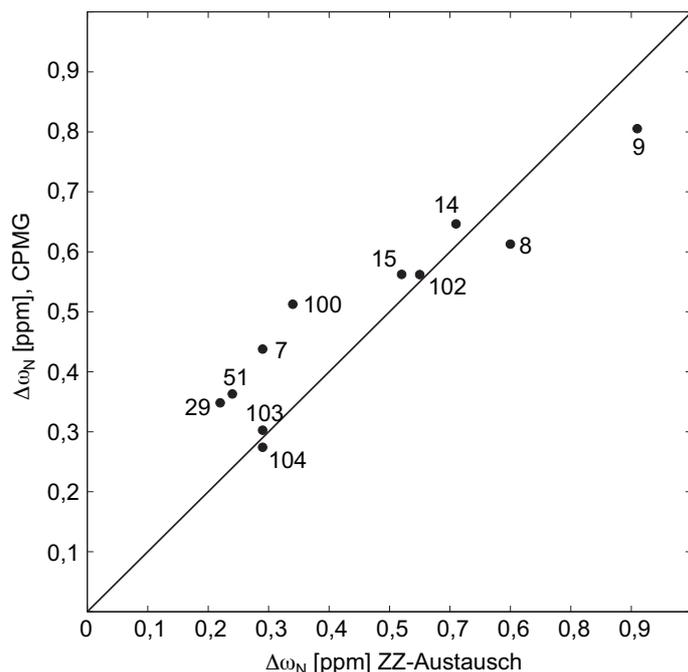
simultaner Fit (15 °C bis 35 °C) red. $\chi^2 = 3,1$			separater Fit (15 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C) red. $\chi^2 = 2,3, 1,6, 6,0, 2,8$		
Temp. [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]	Temp. [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]
15	44	-	15	44	-
25	44	-	25	44	-
35	44	-	35	44	-
40	-	-	40	44	-
Temp. [°C]	$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Temp. [°C]	$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
15	66	3	15	35	0,6
25	127	4	25	285	14
35	389	12	35	375	17
40	-	-	40	595	11

bestimmte  $p_B$  daher fehlerhaft ist. Der Fehler von  $p_B$  äußert sich gleichzeitig in einer fehlerhaften Austauschrate. Um die Qualität des Fits zu verbessern, wurde die aus dem ZZ-Austausch bestimmte Population  $p_B = 44\%$  als fester Parameter gewählt und nur die Austauschrate  $k_{ex}$  sowie die Differenz der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_N$  gefittet. Die Fits der CPMG-RD-Kurven unter Berücksichtigung der Temperaturen 15 °C, 25 °C und 35 °C sind in Abbildung 4.32 repräsentativ für die Aminosäurereste Glu7, Arg14, Val29 sowie Glu100 dargestellt. Die durch den Fit erhaltene Austauschrate beträgt  $k_{ex} = 66 \text{ s}^{-1} \pm 3 \text{ s}^{-1}$  bei einer Temperatur von 15 °C und zeigt eine Verdopplung bis Verdreifachung bei Temperaturerhöhungen um 10 °C zu  $k_{ex} = 127 \text{ s}^{-1} \pm 4 \text{ s}^{-1}$  bei 25 °C bis hin zu  $k_{ex} = 389 \text{ s}^{-1} \pm 12 \text{ s}^{-1}$  bei 35 °C (s. Tab. 4.6). Den Ergebnissen des simultanen Fits unter Berücksichtigung der CPMG-RD-Kurven bei 15 °C bis 35 °C sind die für jede Temperatur separat gefitteten CPMG-RD-Kurven in Tabelle 4.6 gegenübergestellt.

Die aus dem CPMG-RD-Fit bei 15 °C bis 35 °C ermittelten Absolutwerte von Differenzen der chemischen Verschiebungen  $\Delta\omega_N$  sind in Abbildung 4.33 gegen die aus dem HSQC-Spektrum bei 10 °C gemessenen Werte aufgetragen. Unterschiede zeigen sich insbesondere für die Reste Glu7, Val29, Val51 sowie Glu100, dessen Resonanzen im Multiplett aufgrund einer geringen Peakaufspaltung überlappen.

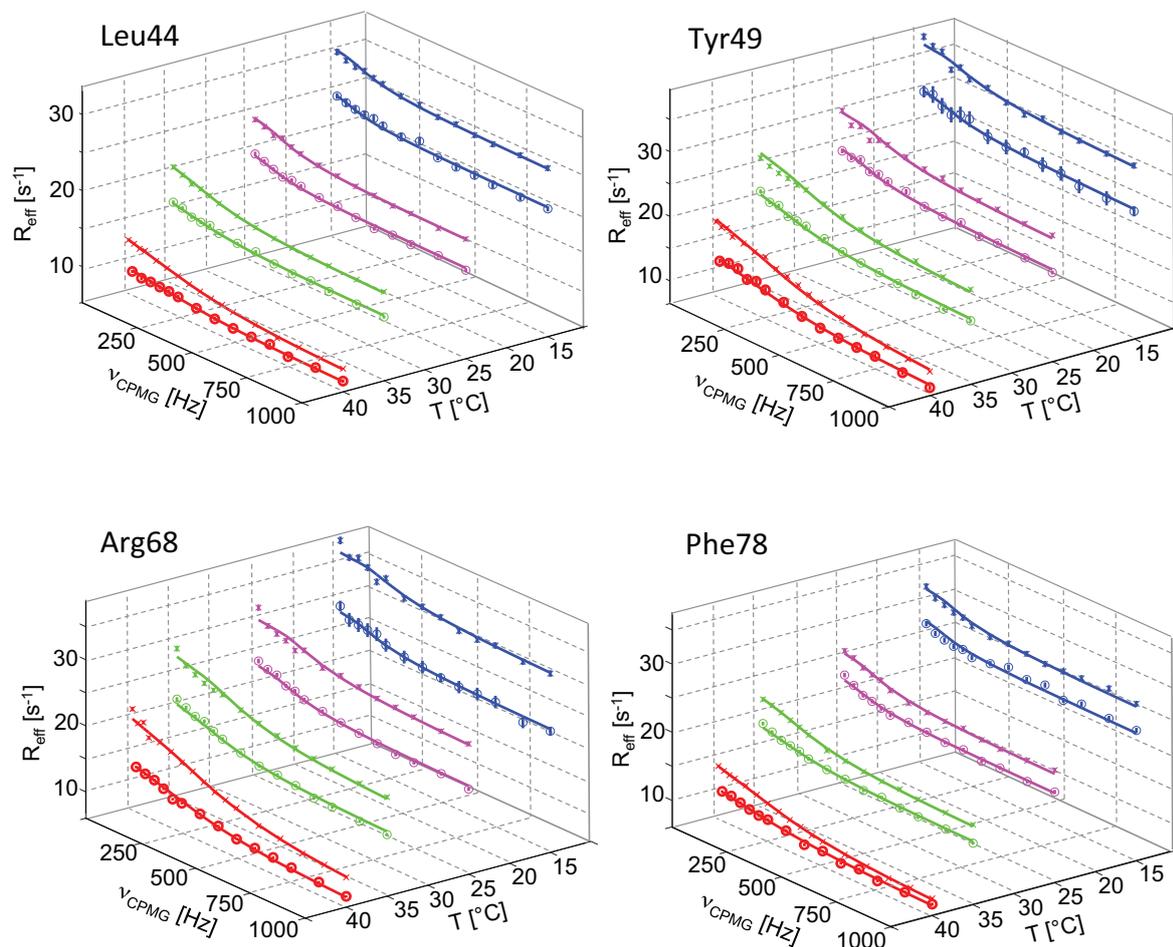


**Abbildung 4.32:**  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven des langsamen Austauschprozesses von GABARAP bei Temperaturen von  $15^{\circ}\text{C}$  bis  $35^{\circ}\text{C}$  und je zwei Protonenlarmorfrequenzen (600 MHz und 900 MHz). Die CPMG-RD-Kurven der Reste Glu7, Arg14, Val29 und Glu100 repräsentieren den langsamen Austauschprozess der den N-Terminus, die nahe liegenden Schleife sowie Bereiche der benachbarten  $\beta$ -Stränge betrifft. Die durchgezogenen Linien entsprechen den Fits unter Berücksichtigung der Daten bei allen gemessenen Temperaturen. Die jeweils kleinere CPMG-RD-Kurve einer Farbe entspricht der Messung bei 600 MHz (Kreise).



**Abbildung 4.33:** Absolutwerte der  $\Delta\omega_N$  von GABARAP ermittelt aus dem Fit der CPMG-RD-Kurven des langsamen Austauschprozesses bei 15 °C bis 35 °C aufgetragen gegen die  $\Delta\omega_N$  von GABARAP, die in dem  $[^1\text{H}^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum bei 10 °C direkt gemessen wurden. Die Diagonale ist durch die durchgezogene Linie gekennzeichnet.

Im Falle des schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern werden die entsprechenden CPMG-RD-Kurven von 15 °C bis 40 °C berücksichtigt. Das am Bruker Spektrometer aufgenommene TROSY-CPMG-Spektrum bei 40 °C wurde mit einer maximalen CPMG-Frequenz  $\nu_{\text{CPMG}}$  von 2000 Hz aufgenommen, im Gegensatz zu 1000 Hz am Varian Spektrometer. Da die CPMG-RD-Kurven sämtlicher Aminosäurereste jedoch für  $\nu_{\text{CPMG}} > 1000$  Hz wieder ansteigende effektive Raten zeigen, wurden die Datenpunkte für diese Frequenzen verworfen (s. Anhang Abb. A.2). Dieser Anstieg der effektiven Raten für große CPMG-Frequenzen ist auf einen Hardwarefehler zurückzuführen. Der Fit konnte ohne diese Datenpunkte problemlos durchgeführt werden. Die Austauschrate  $k_{ex}$  und die Population  $p_B$  sind in Tabelle 4.7 für den simultanen Fit unter Berücksichtigung aller Temperaturen und dem jeweils separaten Fit bei entsprechender Temperatur dargestellt. Mit einer Austauschrate von  $k_{ex} = 721 \text{ s}^{-1} \pm 42 \text{ s}^{-1}$  bei 25 °C und einer Population  $p_B$  von lediglich 0,8 %, bei Berücksichtigung aller Temperaturen, unterscheidet sich dieser Austauschprozess deutlich von dem langsameren Prozess. Der angeregte Zustand wird mit Erhöhung der Temperatur vermehrt populiert und weist bei 40 °C eine Besetzung von  $p_B = 1,3\%$  auf.

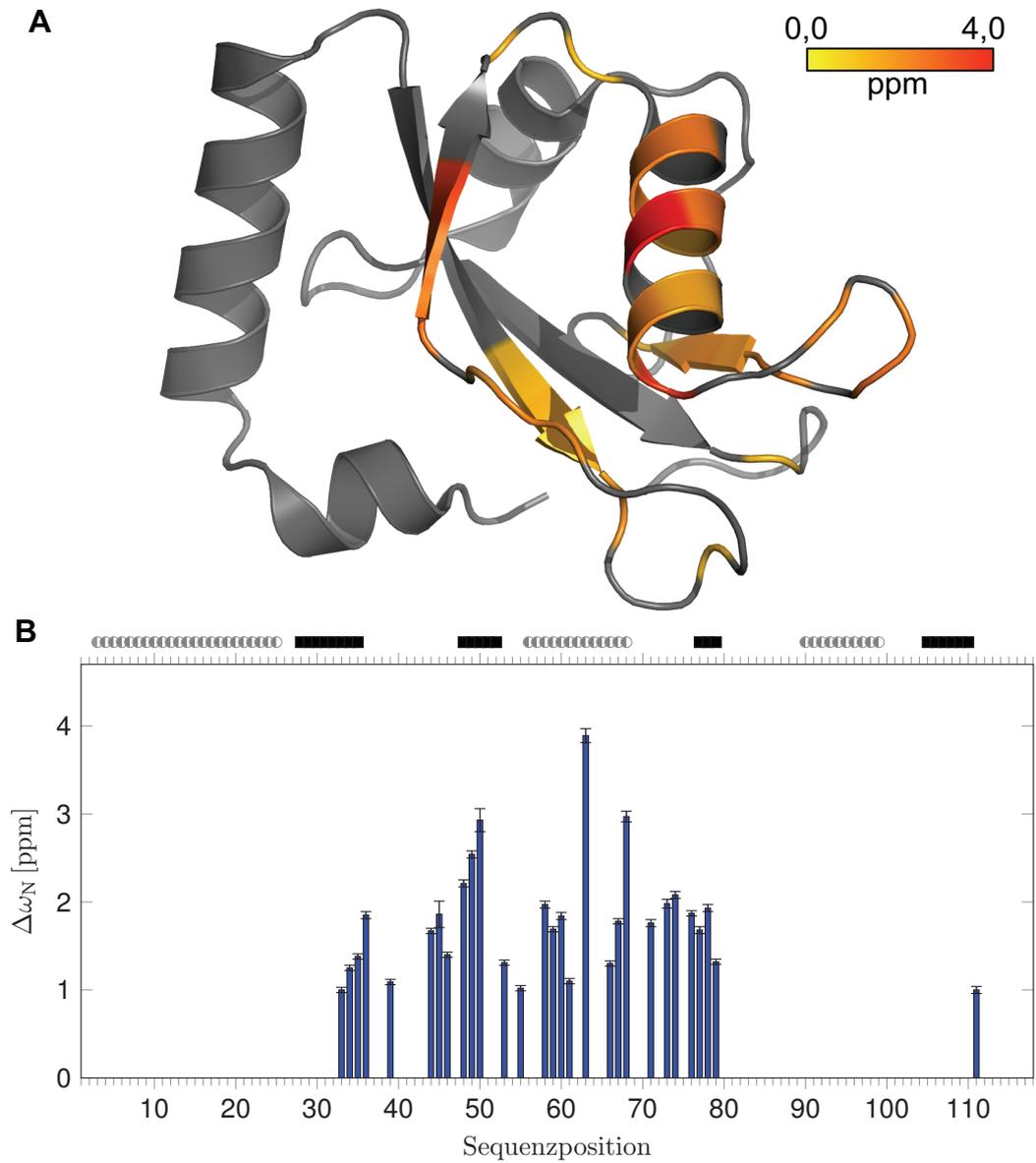


**Abbildung 4.34:**  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven des schnelleren Austauschprozesses von GABARAP bei Temperaturen von  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  und je zwei Protonenlarmorfrequenzen (600 MHz und 900 MHz). Die CPMG-RD-Kurven der ausgewählten Aminosäurereste Leu44, Tyr49, Arg68 und Phe78 repräsentieren den schnelleren, gering populierten Austauschprozess im Proteinkern. Die durchgezogenen Linien entsprechen den Fits unter Berücksichtigung der Daten bei allen gemessenen Temperaturen. Die jeweils kleinere CPMG-RD-Kurve einer Farbe entspricht der Messung bei 600 MHz (Kreise).

**Tabelle 4.7:**  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Fitparameter des Austauschprozesses im Proteinkern bei Temperaturen von 15 °C bis 40 °C.

simultaner Fit (15 °C bis 40 °C) red. $\chi^2 = 1,9$			separater Fit (15 °C, 25 °C, 35 °C, 40 °C) red. $\chi^2 = 0,7, 0,9, 1,1, 1,9$		
Temp. [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]	Temp. [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]
15	0,76	0,04	15	0,9	0,05
25	0,80	0,02	25	0,78	0,02
35	1,00	0,02	35	0,88	0,02
40	1,30	0,03	40	1,42	0,06
Temp. [°C]	$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	Temp. [°C]	$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
15	607	57	15	1004	65
25	725	42	25	892	44
35	1305	42	35	1312	40
40	2005	34	40	1997	40

Zur Veranschaulichung welche Aminosäurereste die größte Änderung der chemischen Verschiebung zeigen, dient Abbildung 4.35. Die größte Änderung zeigt der hydrophobe Aminosäurerest Leu63 mit einem  $\Delta\omega_N$  von 3,99 ppm. Je weiter die Aminosäurereste vom hydrophoben Kern entfernt sind, desto kleiner werden die Änderungen der chemischen Verschiebungen.

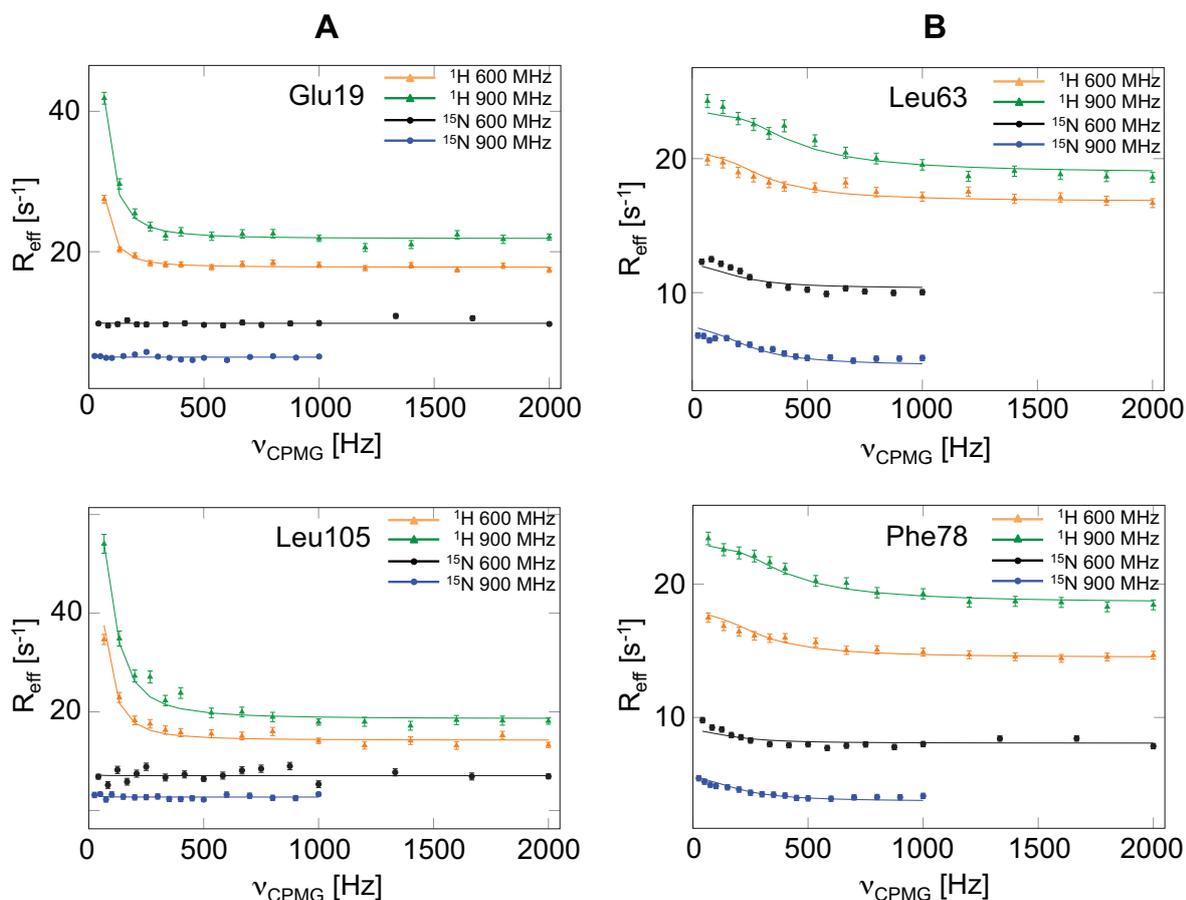


**Abbildung 4.35:** Absolutwerte der Differenzen von chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_N$  für den schnelleren Austauschprozess. A) Die betroffenen Aminosäurereste sind gemäß der Größe von  $\Delta\omega_N$  eingefärbt. B) Auftragung der Absolutbeträge von  $\Delta\omega_N$  der am schnelleren Austauschprozess beteiligten Aminosäurereste gegen die Aminosäuresequenz von GABARAP.

#### 4.6.2.2 CPMG-RD der $^1\text{H}^N$ -Kerne

Im Hinblick auf strukturelle Details der chemischen Austauschprozesse ist die CPMG-RD-Analyse verschiedener Kerne im Proteinrückgrat notwendig. Die Aufnahme von  $^1\text{H}^N$ -CPMG-Spektren erfolgte an  $900\ \mu\text{M}$   $[\text{U-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -GABARAP bei einer Protonenlarmorfrequenz von  $900\ \text{MHz}$  bzw. an  $500\ \mu\text{M}$   $[\text{U-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -GABARAP bei  $600\ \text{MHz}$  und einer Temperatur von  $25\ ^\circ\text{C}$ . Zusätzlich zum  $^1\text{H}^N$ -CPMG wurde an der gleichen Probe jeweils ein  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experiment aufgenommen, um die CPMG-RD-Kurven der beiden Kerne mit gemeinsamen Austauschparametern zusammen zu fitten.

Für den langsamen Austauschprozess ist die Besetzung gegenüber der  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP Probe entgegengesetzt, sodass der zuvor zu  $44\%$  besetzte Zustand nun mit  $56\%$  stärker populiert ist. Der Fit von CPMG-RD-Kurven des langsameren Austauschprozesses wurde anhand der intensitätsstärkeren Resonanzen durchgeführt. In Abbildung 4.36 sind die CPMG-RD-Kurven und der Fit für beide Austauschzustände repräsentativ durch je zwei Aminosäurereste gezeigt. Der langsamere Austauschprozess wird durch die Aminosäurereste Glu19 und Leu105 repräsentiert (Abb. 4.36 A). Diese Reste zeigen keine RD des  $^{15}\text{N}$ -Kerns, wohl aber für den  $\text{H}^N$ -Kern. Dies ist zu erwarten, da die Peaks von Glu19 und Leu105 im HSQC-Spektrum bei  $10\ ^\circ\text{C}$  nur in Protonendimension aufgespalten sind. Aminosäurereste im und um den Bereich der hydrophoben Tasche hp2, repräsentiert durch Leu63 und Phe78, zeigen hingegen langsam abfallende CPMG-RD-Kurven für die  $^1\text{H}^N$ - sowie  $^{15}\text{N}$ -Kerne (Abb. 4.36 B). Die aus dem Fit der CPMG-RD-Kurven erhaltenen Ergebnisse der Austauschrate und der angeregten Population des langsamen und schnelleren Austauschprozesses sind in Tabelle 4.8 gezeigt. Für den langsamen Austauschprozess ergibt sich eine Austauschrate von  $k_{ex} = (251 \pm 7)\ \text{s}^{-1}$ , was in Übereinstimmung mit dem separaten Fit bei  $25\ ^\circ\text{C}$  der  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP Probe ist (s. Tab. 4.6). Da der langsame Austauschprozess hinsichtlich der Austauschrate und Besetzung bereits durch das ZZ-Experiment charakterisiert wurde und die  $\Delta\omega_H$  aus dem HSQC-Spektrum bei  $10\ ^\circ\text{C}$  bekannt sind, lag der Fokus auf der Auswertung des schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern. Die aus dem Fit der CPMG-RD-Kurven erhaltenen  $\Delta\omega_H$  sind in Tabelle A.7 dargestellt. Der

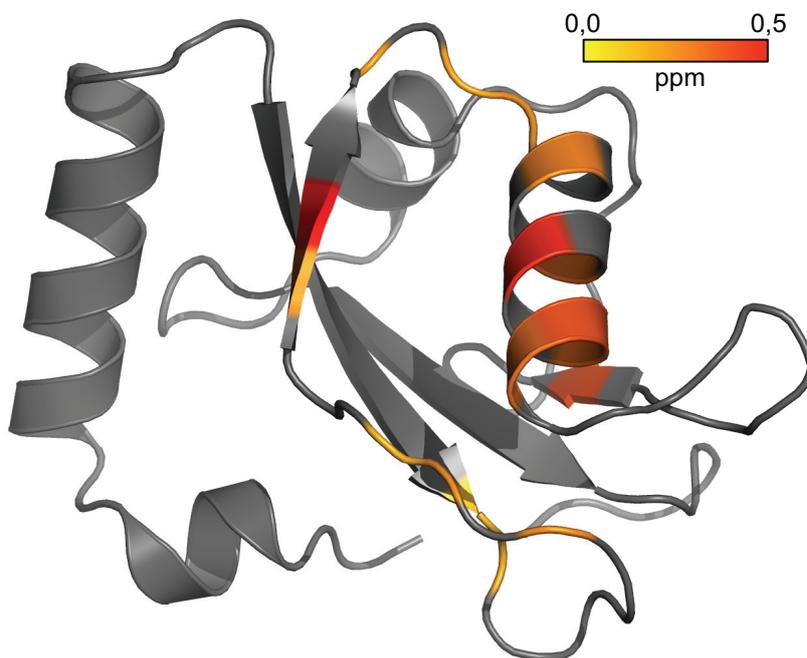


**Abbildung 4.36:**  $^1\text{H}^N$ - und  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven bei 25 °C. Durchgezogene Linien entsprechen den Fits eines Zwei-Zustands-Modells. A) Die Aminosäurereste Glu19 und Leu105 zeigen schnell abfallende  $^1\text{H}^N$ -CPMG-RD-Kurven, wohingegen die  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven flach sind. B) Aminosäurereste im und um den Bereich der hydrophoben Tasche hp2, repräsentiert durch Leu63 und Phe78, zeigen langsam abfallende CPMG-RD-Kurven für die  $^1\text{H}^N$ - sowie die  $^{15}\text{N}$ -Kerne.

**Tabelle 4.8:**  $^1\text{H}^N$ -CPMG-Fitparameter des langsamen und des schnellen Austauschprozesses bei 25 °C. Die  $^1\text{H}^N$ -CPMG-RD-Kurven wurden zusammen mit  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven gefittet. Die Aufnahme der Experimente erfolgte jeweils an der gleichen Probe bei einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz und 900 MHz.

langsamer Austauschprozesses		schneller Austauschprozesses	
reduziertes $\chi^2 = 3,2$		reduziertes $\chi^2 = 1,82$	
$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]
44	-	0,53	0,02
$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
251	7	1087	56

Fit von  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven des schnelleren Austauschprozess im Proteinkern von GABARAP weist eine Besetzung von  $p_B = 0,53\%$  auf, bei einer Austauschrate von  $k_{ex} = (1087 \pm 56) \text{s}^{-1}$ . Um zu erkennen welche Bereiche in der Struktur die größte Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den austauschenden Zuständen zeigen, sind die Absolutwerte von  $\Delta\omega_H$  gemäß ihrer Größe farblich in der Struktur von GABARAP gekennzeichnet. Der schnellere Austauschprozess im Proteinkern von GABARAP zeigt demnach die größten Änderungen der chemischen Verschiebung für Leu63 und dem strukturell zugewandten Tyr49 und stimmt damit mit dem Bereich überein, der auch im  $^{15}\text{N}$ -CPMG die größten  $\Delta\omega_N$  aufweist. Die Differenzen von  $\Delta\omega_N$ , welche durch diese Messung an der  $[\text{U-}^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -GABARAP Probe ermittelt wurden, sind der Tabelle A.7 zu entnehmen. Die Werte sind insgesamt kleiner, als die aus den  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experimenten ermittelten Werten bei verschiedenen Temperaturen (vgl. Abb. A.3).



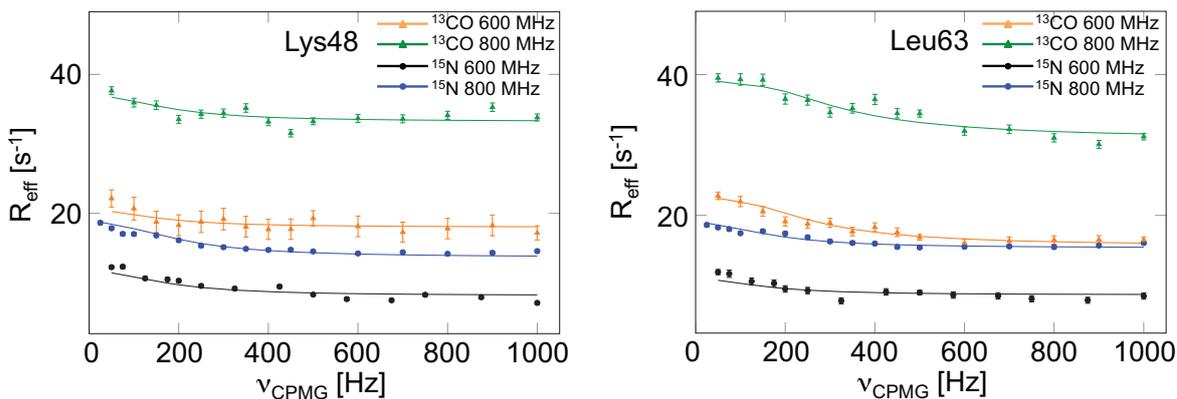
**Abbildung 4.37:** Differenzen der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_H$  für den schnelleren Austauschprozess im Bereich der hydrophoben Tasche hp2. Die Farbskala repräsentiert den Absolutwert von  $\Delta\omega_H$  für den schnelleren Austauschprozess im Proteinkern von GABARAP.

### 4.6.2.3 CPMG-RD der $^{13}\text{C}$ -Kerne

Die Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ -CPMG-Experimenten erfolgte an  $[\text{U-}^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$ -GABARAP bei einer Protonenlarmorfrequenz von 800 MHz und 600 MHz und einer Temperatur von 25 °C. Zusätzlich zum  $^{13}\text{C}$ -CPMG-Experiment wurde an der gleichen Probe jeweils ein  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experiment aufgenommen, um die CPMG-RD-Kurven der beiden Kerne mit gemeinsamen Austauschparametern zusammen zu fitten. Da die  $^{13}\text{C}$ -CPMG-Pulssequenz zunächst lediglich für Spektrometer der Firma Varian zur Verfügung stand, konnte das Experiment nicht umgehend nach der Messung bei 900 MHz auch am 600 MHz Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen werden. In der Zwischenzeit ist ein Teil der 900  $\mu\text{M}$   $[\text{U-}^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}]$ -GABARAP-Probe degradiert, was an zusätzlich auftretenden Resonanzen im HSQC-Spektrum zu erkennen war. Daher erfolgte eine erneute Aufreinigung der Probe durch eine Gelfiltration, sodass die Endkonzentration der bei 600 MHz gemessenen Probe lediglich 300  $\mu\text{M}$  betrug.

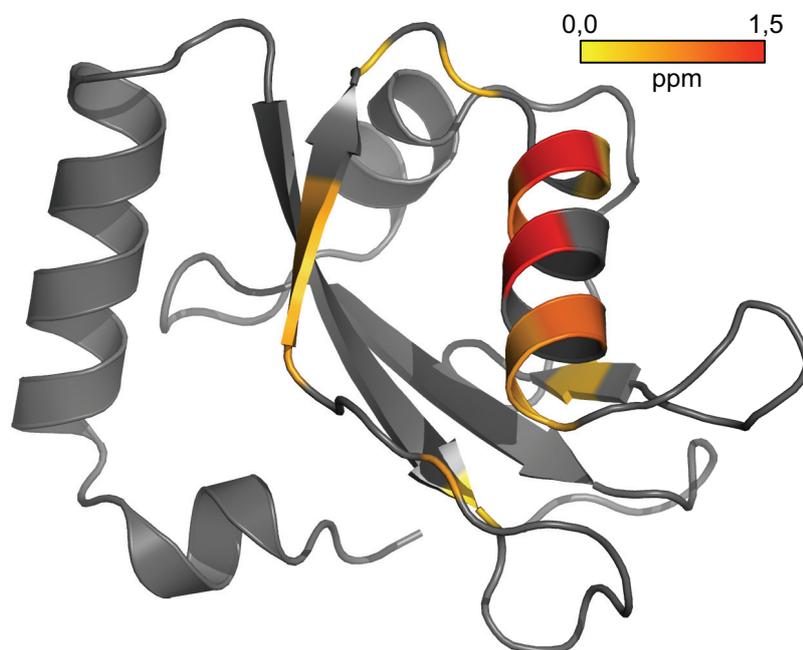
Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Aminosäureresten des langsameren Austauschprozesses im N-Terminus, der Schleife sowie den benachbarten  $\beta$ -Strängen ist so gering, dass keine CPMG-RD-Kurven gefittet werden konnten. Da der langsamere Austauschprozess jedoch wie in Kapitel 4.6.1 dargestellt bereits durch das ZZ-Experiment und NMR-Spektren bei 10 °C charakterisiert wurde, war die Wiederholung des  $^{13}\text{C}$ -CPMG-Experimentes mit einer höher konzentrierten Probe zur Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht notwendig.

Der schnellere Austauschprozess im Proteinkern konnte hingegen unter Berücksichtigung der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven gefittet werden. Abbildung 4.38 zeigt zwei repräsentative CPMG-RD-Kurven des schnellen Austauschprozesses der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kerne von Lys48 und Phe63. Die aus dem Fit erhaltene Austauschrate beträgt  $k_{ex} = (903 \pm 55) \text{ s}^{-1}$  bei einer Population des angeregten Zustands von  $p_B = 1,2\%$  (s. Tab. 4.9). Damit ist die Rate und Population gegenüber denen aus dem Fit der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven unter Berücksichtigung verschiedener Temperaturen erhöht (vgl. Tab. 4.7).



**Abbildung 4.38:**  $^{13}\text{CO}$ - und  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven bei 25 °C. Durchgezogene Linien entsprechen den Fits eines Zwei-Zustands-Modells. Die Aminosäurereste Lys48 und Phe63 repräsentieren den schnellen Austauschprozess im Proteinkern. Sowohl  $^{13}\text{CO}$ -als auch  $^{15}\text{N}$ -Kerne sind vom Austausch betroffen.

Die Differenzen der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_{CO}$  sind in Abbildung 4.39 gemäß ihres Absolutwertes farblich in der Struktur von GABARAP dargestellt. Die Werte sind ebenfalls in Tabelle A.8 im Anhang zu finden. Der Austauschprozess im Proteinkern von GABARAP betrifft insbesondere die Aminosäurereste der Helix  $\alpha_3$  in der Region der hydrophoben Tasche hp2. Die größte Differenz der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_{CO}$  weist Leu63 auf, das auch bereits die größten Änderungen des schnellen Austauschprozesses im  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}^N$ -CPMG-Experiment gezeigt hat. Die Differenzen der chemischen Verschiebung der  $^{15}\text{N}$ -Kerne  $\Delta\omega_N$  sind Tabelle A.8 zu entnehmen. Die Werte sind insgesamt kleiner, als die aus den  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experimenten ermittelten Werten bei verschiedenen Temperaturen, die an der  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP Probe gemessen wurden (s. Abb. A.4).



**Abbildung 4.39:** Differenzen der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_{CO}$  für den schnellen Austauschprozess im Bereich der hydrophoben Tasche hp2. Die Farbskala repräsentiert den Absolutwert von  $\Delta\omega_{CO}$ .

**Tabelle 4.9:**  $^{13}\text{C}$ O-CPMG-Fitparameter des schnellen Austauschprozesses bei 25 °C. Die  $^{13}\text{C}$ O-CPMG-RD-Kurven wurden zusammen mit  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven gefittet. Die Aufnahme der Experimente erfolgte jeweils an der gleichen Probe bei einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz und 800 MHz.

schneller Austauschprozesses	
reduziertes $\chi^2 = 2,3$	
$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]
1,20	0,08
$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
903	55

#### 4.6.2.4 Vorzeichenbestimmung von Differenzen der chemischen Verschiebung

Im Hinblick auf eine Rekonstruktion der Struktur des angeregten Zustands von GABARAP ist es notwendig, die Differenzen der chemischen Verschiebungen zwischen beiden austauschenden Zuständen zu kennen, um so die NMR-Spektren des angeregten Zustands zu rekonstruieren. Während die Resonanzen des langsameren Austauschprozesses für beide Zustände direkt aus dem HSQC-Spektrum bei 10 °C ersichtlich waren, müssen die Vorzeichen der Peakdifferenzen für den schnelleren Austauschprozess im Proteinkern aus der Aufnahme von HSQC-Spektren bei verschiedenen Feldstärken (H(S/S)QC) bzw. HSQC- und HMQC-Spektren (H(S/M)QC) bei einer Feldstärke wie in Kapitel 3.6.7.3 beschrieben extrahiert werden. Die erwarteten Differenzen  $\sigma_N$  zwischen den vom schnelleren Austausch betroffenen Resonanzen im HSQC-Spektrum bei 600 MHz und bei 900 MHz können mit Hilfe von Gleichung 3.29 aus Kapitel 3.6.7.3 berechnet werden. Die Berechnung erfolgte unter der Annahme, dass die Differenz der Relaxationsraten beider austauschenden Zustände vernachlässigbar ist ( $\Delta R = 0$ ), was laut Skrynnikov et al. (2002) für gering populierte Zustände zulässig ist [78]. Für die Berechnung wurden die aus dem Fit der CPMG-RD-Kurven ermittelten Absolutwerte von  $\Delta\omega_N$  sowie die Austauschrate  $k_{ex}$  und die Population des angeregten Zustands  $p_B$  verwendet. Die theoretisch ermittelte Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den Resonanzen in den HSQC-Spektren bei 600 MHz und bei 900 MHz in  $^{15}\text{N}$ -Dimension ist bei 25 °C für alle Aminosäurereste kleiner als 3,5 ppb (s. Tab. A.11). Damit ist die Differenz in der gleichen Größenordnung wie die Messungenauigkeit der chemischen Verschiebungen, sodass eine Bestimmung des Vorzeichens von  $\Delta\omega_N$  nicht möglich war. Auch bei Temperaturen von 15 °C, 35 °C oder 40 °C ist das berechnete  $\sigma_N$  für die Mehrzahl der Aminosäurereste kleiner als 3 ppb (s. Tab. A.11). Da  $^{15}\text{N}$ -Kerne ein niedrigeres gyromagnetisches Verhältnis aufweisen, als  $^1\text{H}$ - oder  $^{13}\text{C}$ -Kerne und die Differenz  $\sigma$  antiproportional zu diesem ist, sind die Differenzen für andere Kerne noch geringer und daher auch nicht anhand von H(S/S)QC Spektren analysierbar. Eine sensitivere Alternative ist durch die Differenz der chemischen Verschiebung zwischen den

Resonanzen im HSQC- und HMQC-Spektrum bei einer Feldstärke gegeben. Zusätzlich liefert diese Methode eine größere Messgenauigkeit, da die Aufnahme der Spektren am gleichen NMR-Spektrometer und damit unter exakt gleichen Bedingungen erfolgte. Die für eine Vorzeichenbestimmung aus dem H(S/M)QC hinreichende Bedingung lautet gemäß [78]

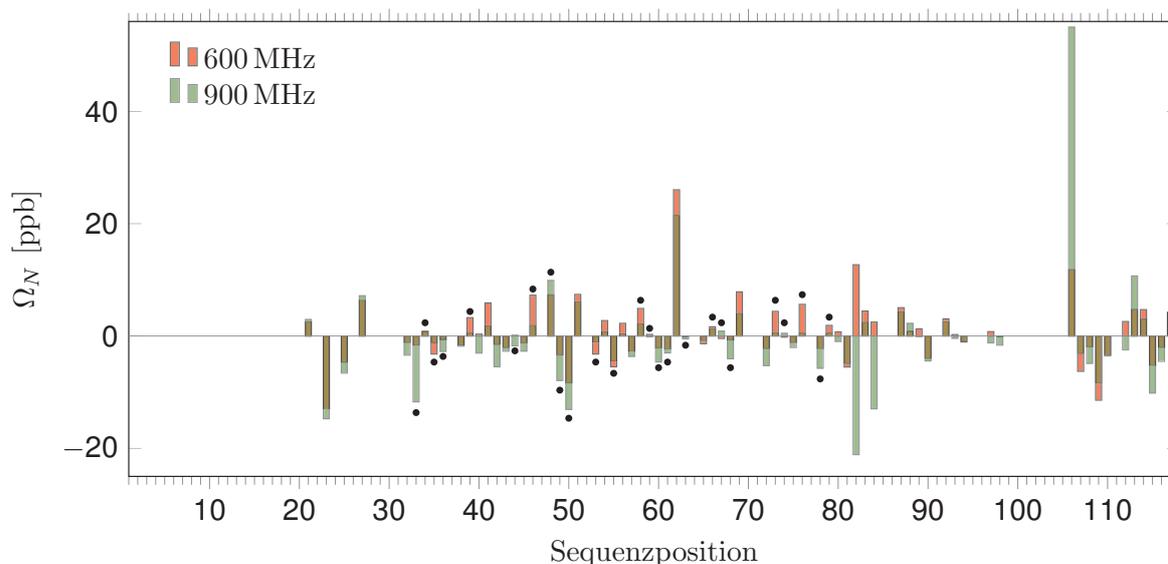
$$|\Delta\omega_N| < \sqrt{3}k_{ex} \cdot p_A.$$

Diese Bedingung ist nicht für alle am schnelleren Austausch beteiligten Reste erfüllt, was am Beispiel von Leu63 mit dem größten  $\Delta\omega_N$  von 3,99 ppm bei 25 °C und einer Protonenlarmorfrequenz von 900 MHz deutlich wird:

$$|\Delta\omega_N| = 2\pi \cdot 3,99 \text{ ppm} \cdot 90 \text{ MHz} = 2256 \text{ s}^{-1}$$

$$\sqrt{3}k_{ex} \cdot p_A = 1246 \text{ s}^{-1}$$

Da es sich jedoch nur um eine hinreichende Bedingung handelt und eine zusätzliche Abhängigkeit von  $\Delta\omega_H$  besteht, bedeutet dies nicht zwingend, dass eine Vorzeichenbestimmung aus dem aufgenommenen H(S/M)QC unmöglich ist. Die Differenz der Peakpositionen aus den H(S/M)QC Spektren bei 600 MHz und bei 900 MHz sind in Abbildung 4.40 grafisch dargestellt, wobei sowohl alle Aminosäurereste, die von Aufspaltung betroffen sind als auch überlappende Resonanzen nicht berücksichtigt wurden. Es zeigt sich, dass die ermittelten Peakdifferenzen bei 600 MHz (rot) und 900 MHz (grün) bis auf Arg67 und Asn82 das gleiche Vorzeichen aufweisen. Die Kreise indizieren Aminosäurereste, die den schnellen Austauschprozess im Proteinkern definieren. Einige Aminosäurereste, die zu keinem der beiden durch CPMG-RD-Kurven identifizierten Zustände gehören, weisen ebenfalls Differenzen der Peakpositionen auf.



**Abbildung 4.40:** Peakshifts  $\Delta\Omega_N$  der  $^{15}\text{N}$ -Kerne aus dem Vergleich der Peakposition eines HSQC- und HMQC-Spektrum bei 600 MHz (rot) und 900 MHz (grün). Die Kreise indizieren Aminosäurereste, die am schnellen Austauschprozess im Proteinkern beteiligt sind.

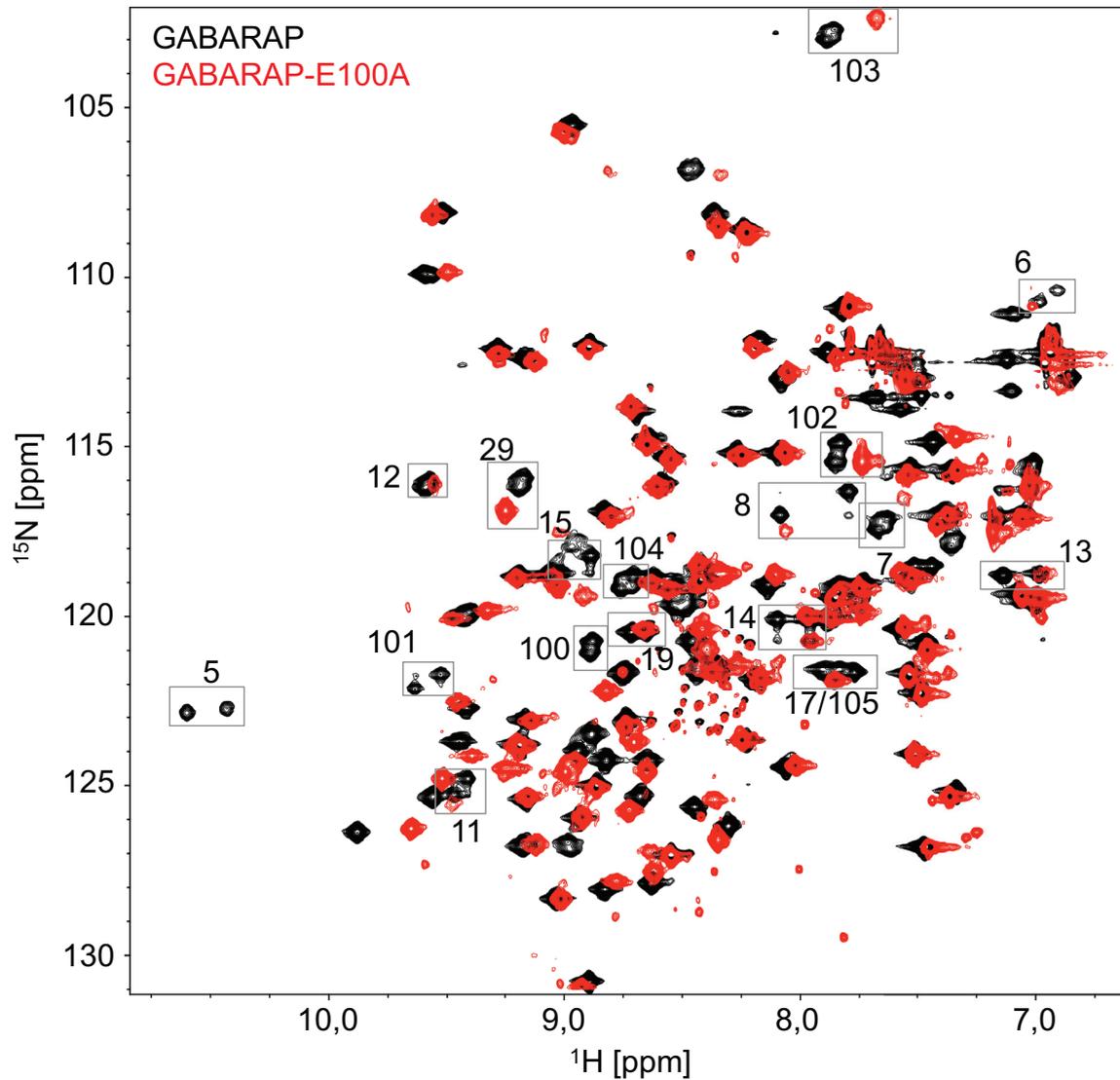
## 4.7 Charakterisierung von GABARAP-E100A

Im Hinblick darauf, die offene Konformation von GABARAP zu stabilisieren, welche von Coyle et al. (2002) durch die Kristallisation unter hohen Salzbedingungen entstanden ist, wurde die Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100 durch die Mutation von Glu100 zu Ala100 in GABARAP-E100A entfernt.

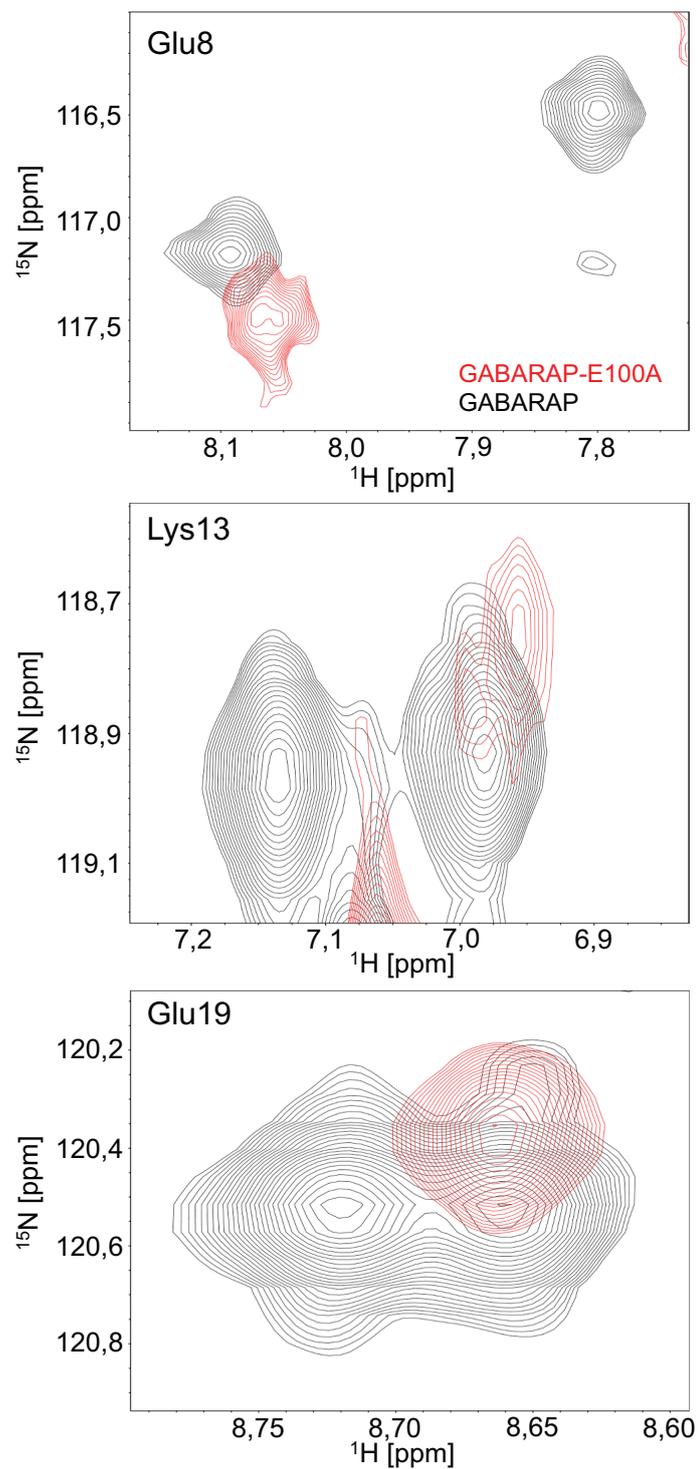
In Abbildung 4.41 ist das  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von GABARAP-E100A in Überlagerung mit dem wt GABARAP gezeigt. Es fällt auf, dass die im wt GABARAP vom langsamen Austausch betroffenen Aminosäurereste in der E100A-Variante keine Resonanzaufspaltung zeigen. Die Abbildung 4.42 von drei repräsentativen Aminosäureresten Glu8, Lys13 und Glu19 des langsamen Austauschprozesses in vergrößerter Ansicht zeigt, dass es sich im Falle der GABARAP-E100A-Variante um die Resonanzen handelt, die im wt GABARAP ( $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ ) den geringer besetzten Zustand mit  $p_B = 44\%$  repräsentieren (s. Kap. 4.6.1). Die Signalintensität der Resonanzen von Tyr5 und Glu101 der GABARAP-E100A-Variante sind so gering, dass sie nur nahe des Rauschlevels erkennbar sind und daher im gezeigten Spektrum nicht auftreten. Doch

#### 4. Ergebnisse

auch diese Aminosäurereste werden durch nur eine Resonanz im HSQC-Spektrum von GABARAP-E100A repräsentiert.



**Abbildung 4.41:**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von GABARAP (schwarz) und GABARAP-E100A (rot) bei  $10^\circ\text{C}$  und einer Konzentration von je 1 mM. Sämtliche Aminosäurereste, dessen entsprechende Resonanzen im HSQC-Spektrum bei  $10^\circ\text{C}$  eine Aufspaltung zeigen sind markiert.



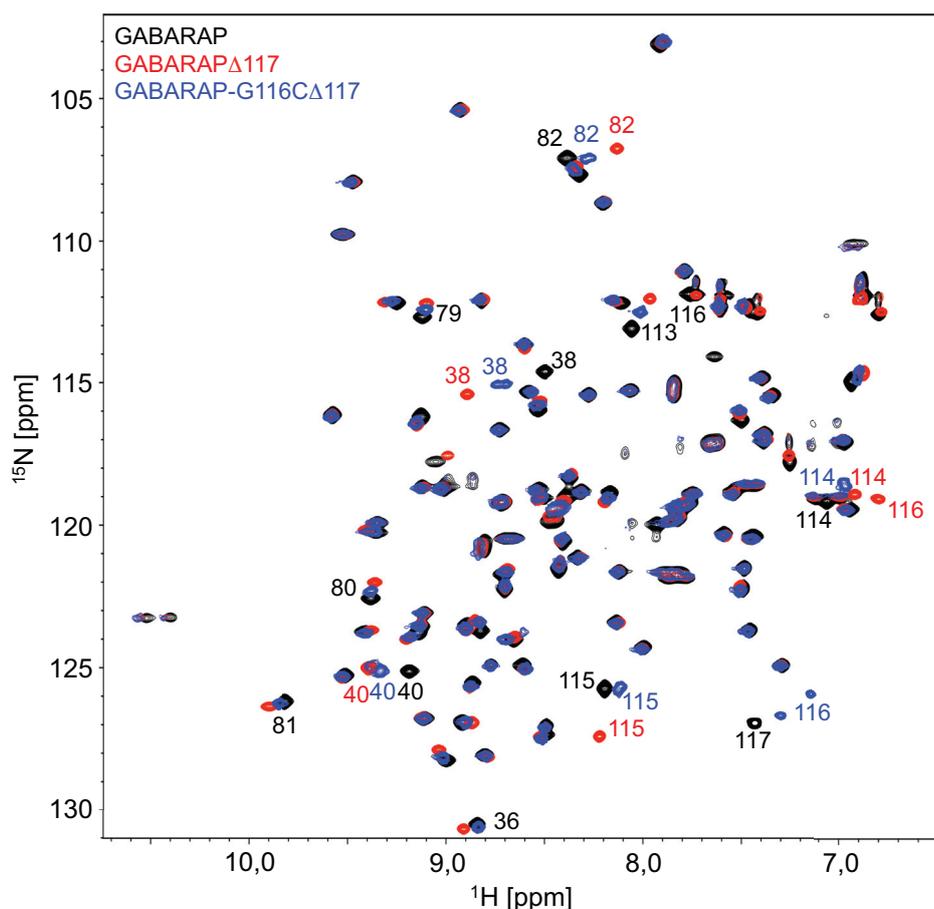
**Abbildung 4.42:** Vergrößerte Ansicht der Resonanzen Glu8, Lys13 und Glu19 aus dem  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von GABARAP (schwarz) und GABARAP-E100A (rot) bei 10 °C.

## 4.8 GABARAP $\Delta$ 117/GABARAP-G116C $\Delta$ 117

Für die *in vivo* Lipidierung von GABARAP wird das C-terminale Leu117 durch die Cysteinprotease Atg4B abgespalten und das dabei entstehende GABARAP $\Delta$ 117 durch die Enzyme Atg7 und Atg3 aktiviert und transferiert, um so die Bindung an Phospholipide zu ermöglichen (s. Kap. 1.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde GABARAP nicht enzymatisch an Membranmimetika gekoppelt, sondern mittels des modifizierten Lipids MPB-PE. Um GABARAP mittels modifiziertem Lipid an die Membranmimetika zu koppeln, wurde die Variante GABARAP-G116C $\Delta$ 117 hergestellt. Zusätzlich wurde die Variante GABARAP-G116C $\Delta$ 117 im Rahmen der Kooperation mit dem Institut von Prof. Dr. C. Seidel (HHU Düsseldorf) fluoreszenzspektroskopisch bezüglich interner Dynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala untersucht.

Die Konstrukte der C-terminal modifizierten Varianten GABARAP $\Delta$ 117 und GABARAP-G116C $\Delta$ 117 wurden gemäß Abschnitt 3.1.4 durch eine zielgerichtete Mutagenese hergestellt und der Erfolg der Mutation durch eine Sequenzierung bestätigt. Die Varianten wurden wie das wildtypische GABARAP exprimiert und gereinigt, wobei die Reinigung von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 unter Verwendung eines Reduktionsmittels erfolgte. Um auszuschließen, dass die C-terminale Deletion sowie die Mutation des Gly116 zu einem Cystein die Struktur von GABARAP beeinflusst, wurden [ $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren von GABARAP $\Delta$ 117 sowie GABARAP-G116C $\Delta$ 117 aufgenommen, die in Abbildung 4.43 in Überlagerung mit dem wt GABARAP gezeigt sind. Veränderungen der chemischen Verschiebung sind für beide Konstrukte insbesondere für den Aminosäurerest 116 sowie für räumlich benachbarte Bereiche zu erkennen. Diese Resonanzen sind in Abb. 4.43 durch die jeweilige Sequenzposition gekennzeichnet. Da die anderen Resonanzen in allen drei Spektren überlappen, treten keine signifikanten Strukturänderungen durch die C-terminale Deletion und die Mutation von Gly116 zu einem Cys116 auf.

Für die Beurteilung des Einflusses der C-terminalen Deletion auf die Piko- bis Nanosekundendynamik wurden  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsexperimente für die Bestimmung von  $R_1$ ,  $R_2$  und  $\{^1\text{H}\}$ - $^{15}\text{N}$  NOE-Werten von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 aufgenommen.



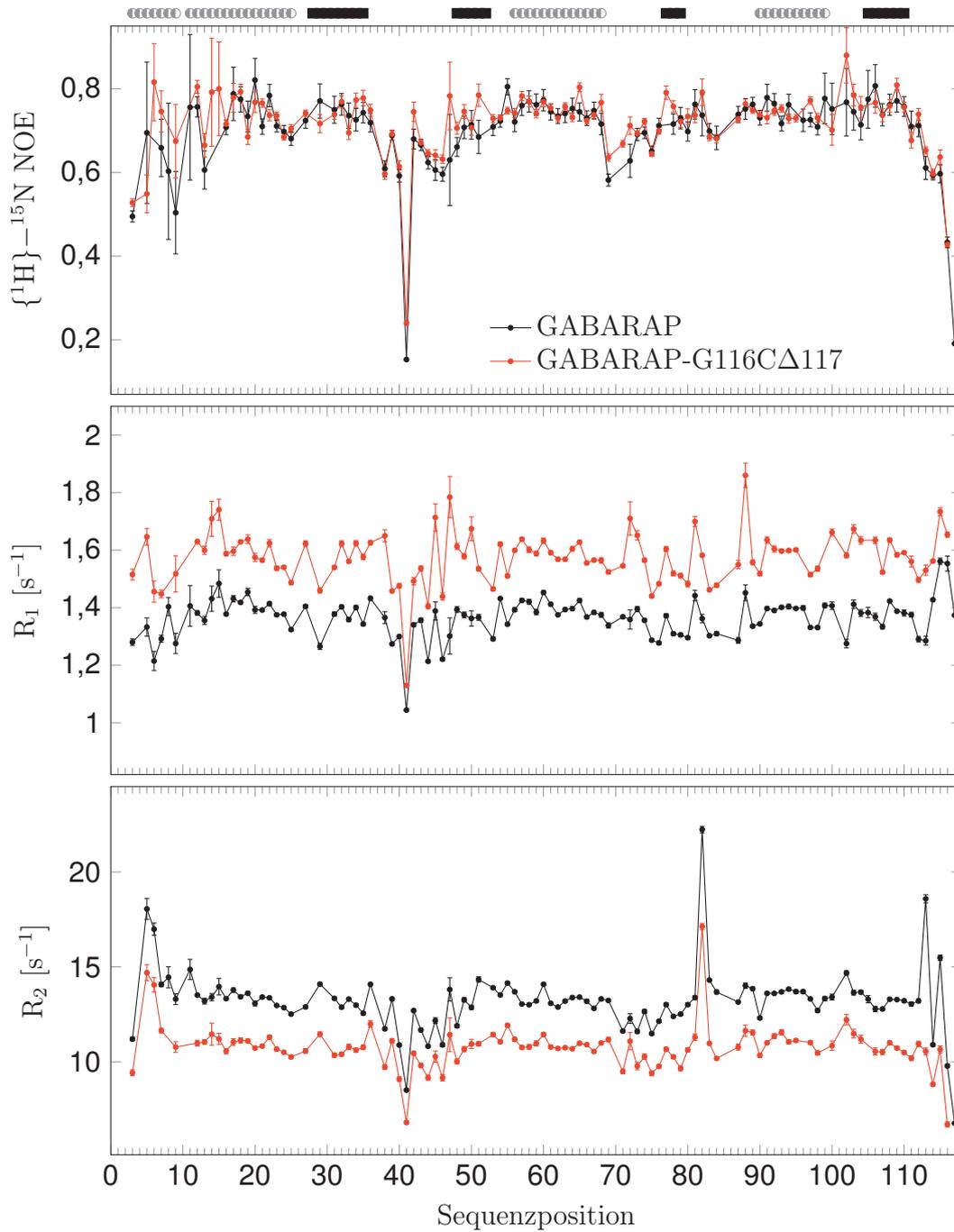
**Abbildung 4.43:** Überlagerung der HSQC-Spektren von den C-terminalen Deletionsvarianten GABARAP-G116C $\Delta$ 117 (blau) und GABARAP $\Delta$ 117 (rot) mit dem wt GABARAP (schwarz). Die Spektren wurden bei 25 °C und einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz aufgenommen.

Die Wahl fiel dabei auf die Cysteinvariante, da so ein Vergleich mit den Ergebnissen der Fluoreszenzspektroskopie möglich war. In Abbildung 4.44 sind die Spinrelaxationsdaten von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 und dem wt GABARAP im direkten Vergleich dargestellt. Die  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 stimmen im Wesentlichen mit denen des Wildtyps überein, sodass sich die interne Flexibilität in keinem Bereich aufgrund der Mutation ändert. Größere Unterschiede treten lediglich bei Aminosäureresten auf, die aufgrund eines geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses auch einen großen Fehler aufweisen. Auch die  $R_1$ - und  $R_2$ -Relaxationsraten zeigen gleiche Trends für die interne Dynamik in der Deletionsvariante und dem wt GABARAP.

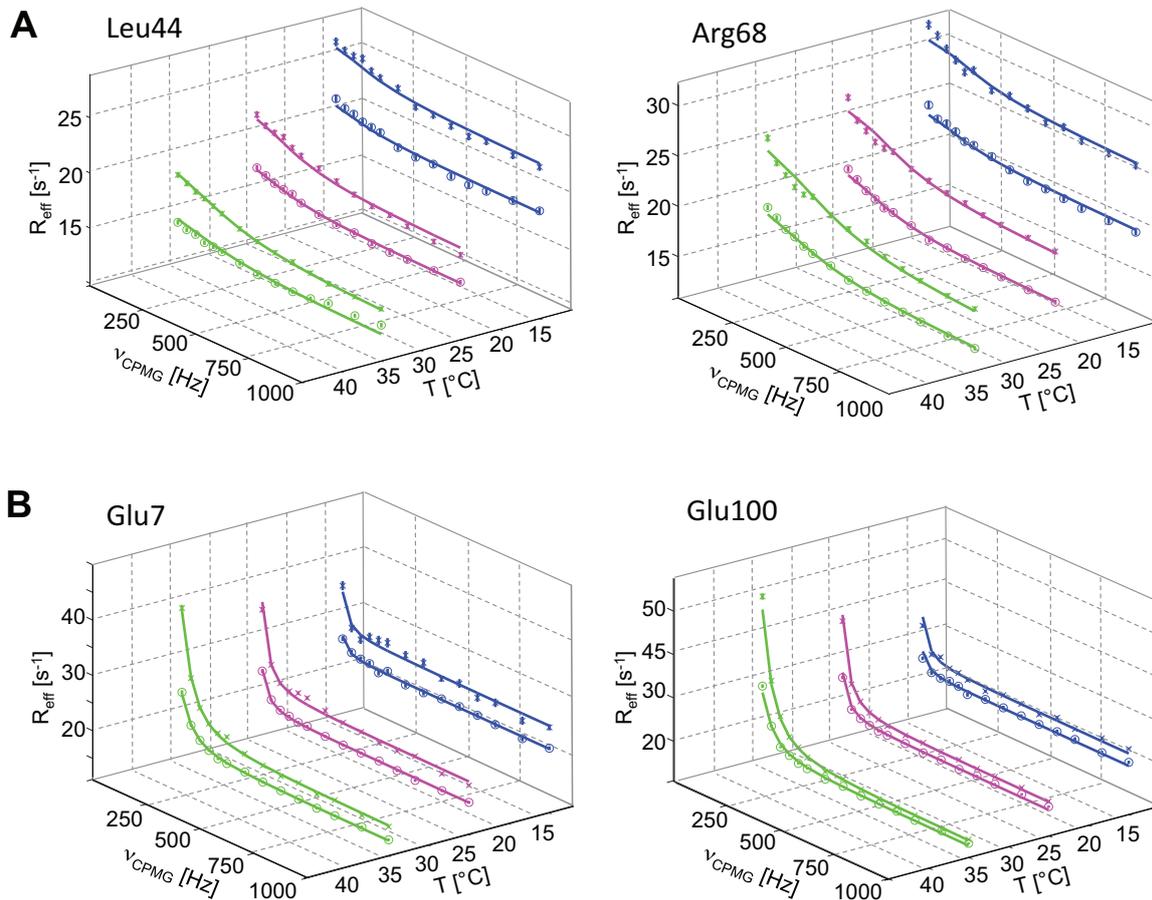
Lediglich im Bereich des C-Terminus zeigt die Deletionsvariante keine erhöhten  $R_2$ -Raten von Ser113 und Tyr115 im Vergleich zum Rest des Proteins. Insgesamt ist festzustellen, dass die  $R_1$ -Raten der Deletionsvariante etwas größer sind und sich demzufolge kleinere  $R_2$ -Raten im Vergleich zum wildtypischen GABARAP ergeben. Das Verhältnis von  $R_2$  und  $R_1$  beschreibt das Reorientierungsverhalten, sodass die globale Rotationskorrelationszeit der Deletionsvariante kleiner ist, als die des wildtypischen GABARAP.

Zusätzlich zum Vergleich der internen Dynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala wurde die langsamere Dynamik von GABARAP $\Delta$ 117 auf der Mikro- bis Millisekundenzeitskala durch die Aufnahme von  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven analysiert. Die Experimente wurden bei 15 °C, 25 °C sowie 35 °C und zwei verschiedenen Protonenlarmorfrequenzen (600 MHz und 900 MHz) aufgenommen. Mit Hilfe der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven lassen sich in der Variante die gleichen Austauschprozesse wie im wt GABARAP detektieren. Abbildung 4.45 zeigt je zwei repräsentative Aminosäurereste für beide Austauschprozesse. Die langsam abfallenden CPMG-RD-Kurven von Leu44 und Arg68 (Abb. 4.45 A) weisen auf einen schnelleren Austauschprozess hin, wohingegen Glu7 und Glu100 (Abb. 4.45 B) wie im Falle des wildtypischen GABARAP stärker abfallende CPMG-RD-Kurven aufweisen, die einen langsameren Austausch indizieren.

Es wurden daher, wie auch für den Wildtyp, zwei separate Zwei-Zustands-Fits für beide Austauschprozesse unter Berücksichtigung der Temperaturen von 15 °C bis 35 °C durchgeführt, welche durch die durchgezogene Linie dargestellt werden. Die sich aus dem Fit der CPMG-RD-Kurven ergebenden Austauschparameter sind in Tabelle 4.10 für beide Austauschprozesse dargestellt. Für den Fit des langsameren Prozesses wurde die Population  $p_B$  zunächst aus dem Verhältnis der Intensitäten  $I_{AA}$  und  $I_{BB}$  von aufgespaltenen Resonanzen des jeweiligen Aminosäurerestes bei 15 °C ermittelt. Daraus ergab sich eine Population des Austauschzustands von  $p_B = 44\%$ . Dies entspricht exakt der Population des Austauschzustands im wt GABARAP. Aus dem Fit der CPMG-RD-Kurven ergeben sich die Austauschrate sowie die Differenzen der chemischen Verschiebungen. Die Austauschrate von GABARAP $\Delta$ 117 entspricht  $k_{ex} = (119 \pm 3)\text{s}^{-1}$  bei einer Temperatur von 25 °C und stimmt mit der Austauschrate von GABARAP, die



**Abbildung 4.44:** Vergleich der Relaxationsdaten vom wt GABARAP (schwarz) und GABARAP-G116C $\Delta$ 117 (rot). Von oben nach unten: Heteronukleare  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte, longitudinale Relaxationsraten  $R_1$  und transversale Relaxationsraten  $R_2$  in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz. Das Schema oberhalb der Abbildung markiert  $\alpha$ -Helices (grau) und  $\beta$ -Stränge (schwarz).



**Abbildung 4.45:**  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven von GABARAP $\Delta$ 117 bei Temperaturen von 15 °C bis 35 °C. A) Die CPMG-RD-Kurven der ausgewählten Aminosäurereste Leu44 und Arg68 repräsentieren den schnelleren gering populierten Austauschprozess im Proteinkern. B) Die CPMG-RD-Kurven von Glu7 und Glu100 werden dem langsameren Austauschprozess mit nahezu gleichbesetzten Zuständen im N-Terminus und der angrenzenden Schleife zugeordnet. Die durchgezogenen Linien entsprechen den Fits unter Berücksichtigung der Daten bei allen gemessenen Temperaturen.

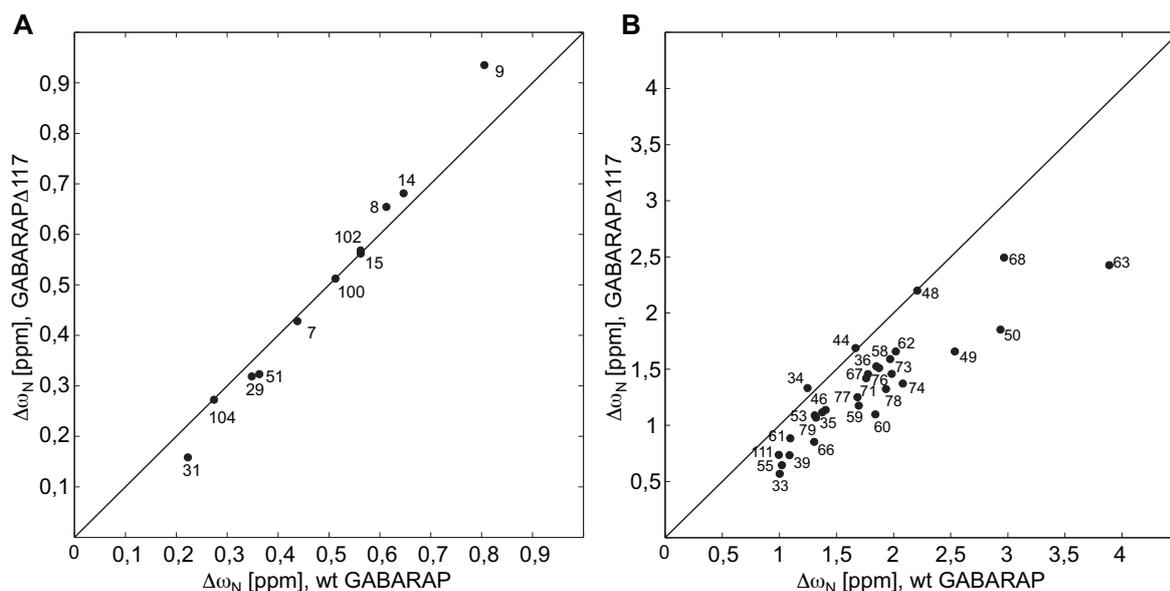
#### 4. Ergebnisse

bei 25 °C  $k_{ex} = (127 \pm 4)s^{-1}$  beträgt, überein. Auch die Differenzen der chemischen Verschiebungen  $\Delta\omega_N$  stimmen für den wt GABARAP und GABARAP $\Delta$ 117 überein, was in Abbildung 4.46 (A) anschaulich dargestellt ist. Ein Vergleich der Austauschparamete-

**Tabelle 4.10:** Fitparameter der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven von GABARAP $\Delta$ 117 bei Temperaturen von 15 °C bis 35 °C.

langsamer Austauschprozesses			schneller Austauschprozesses		
reduziertes $\chi^2 = 2,8$			reduziertes $\chi^2 = 1,7$		
Temp. [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]	Temp. [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]
15	44	-	15	0,50	0,03
25	44	-	25	0,78	0,05
35	44	-	35	1,11	0,08
Temp. [°C]	$k_{ex}$ [ $s^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $s^{-1}$ ]	Temp. [°C]	$k_{ex}$ [ $s^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $s^{-1}$ ]
15	48	1	15	899	113
25	119	3	25	1116	71
35	366	10	35	1610	70

ter des schnelleren Prozesses in der Region der hydrophoben Tasche hp2 zeigen hingegen geringe Abweichungen zwischen GABARAP $\Delta$ 117 und GABARAP. Die Besetzung des angeregten Zustands bei 25 °C beträgt für GABARAP $\Delta$ 117  $p_B = 0,78\%$ , im Vergleich zu  $0,80\%$  für das wildtypische GABARAP. Des Weiteren ergeben sich höhere Raten von  $k_{ex} = (1116 \pm 70)s^{-1}$  im Vergleich zum Wildtyp mit  $k_{ex} = (725 \pm 42)s^{-1}$  bei 25 °C. Die aus dem Fit der CPMG-RD-Kurven bei 15 °C bis 35 °C ermittelten  $\Delta\omega_N$  von GABARAP $\Delta$ 117 sind kleiner, als die  $\Delta\omega_N$  von GABARAP, die aus den entsprechenden CPMG-RD-Kurven bei 15 °C bis 40 °C erhalten wurden. Die grafische Auftragung der  $\Delta\omega_N$  von GABARAP $\Delta$ 117 gegen die des wt GABARAP in Abbildung 4.46 (B) zeigt eine Korrelation dieser Werte, was auf den gleichen Austauschprozess in beiden Proteinen hinweist.



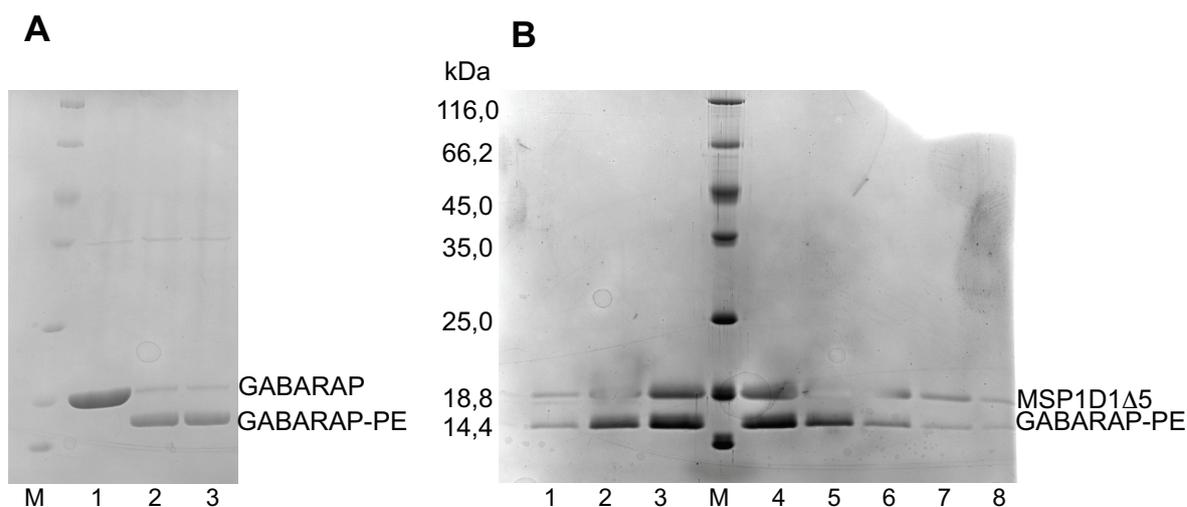
**Abbildung 4.46:**  $\Delta\omega_N$  von GABARAP $\Delta$ 117 aufgetragen gegen die  $\Delta\omega_N$  von wt GABARAP für A) den langsamen Austauschprozess und B) den schnelleren Austauschprozess. Die Diagonale ist durch die durchgezogene Linie gekennzeichnet.

## 4.9 GABARAP an Nanodisks

### 4.9.1 Präparation von Nanodisk-verankertem GABARAP

Für die Herstellung von lipidiertem GABARAP-G116C $\Delta$ 117 wurde ein Lipidmolekül MPB-PE durch eine Maleimidreaktion an das Cys116 von GABARAP gekoppelt. Der Kopplungserfolg lässt sich mit einer SDS-PAGE überprüfen, da lipidiertes GABARAP im Gel schneller läuft als unlipidiertes GABARAP, was in Abb. 4.47 (A) zu erkennen ist. Spur 1 zeigt unlipidiertes GABARAP vor der Maleimidreaktion, wohingegen Spur 2 und 3 GABARAP 10 Minuten bzw. 30 Minuten nach dem Reaktionsstart mit MPB-PE zeigt. Bereits nach 10 Minuten ist GABARAP nahezu vollständig lipidiert.

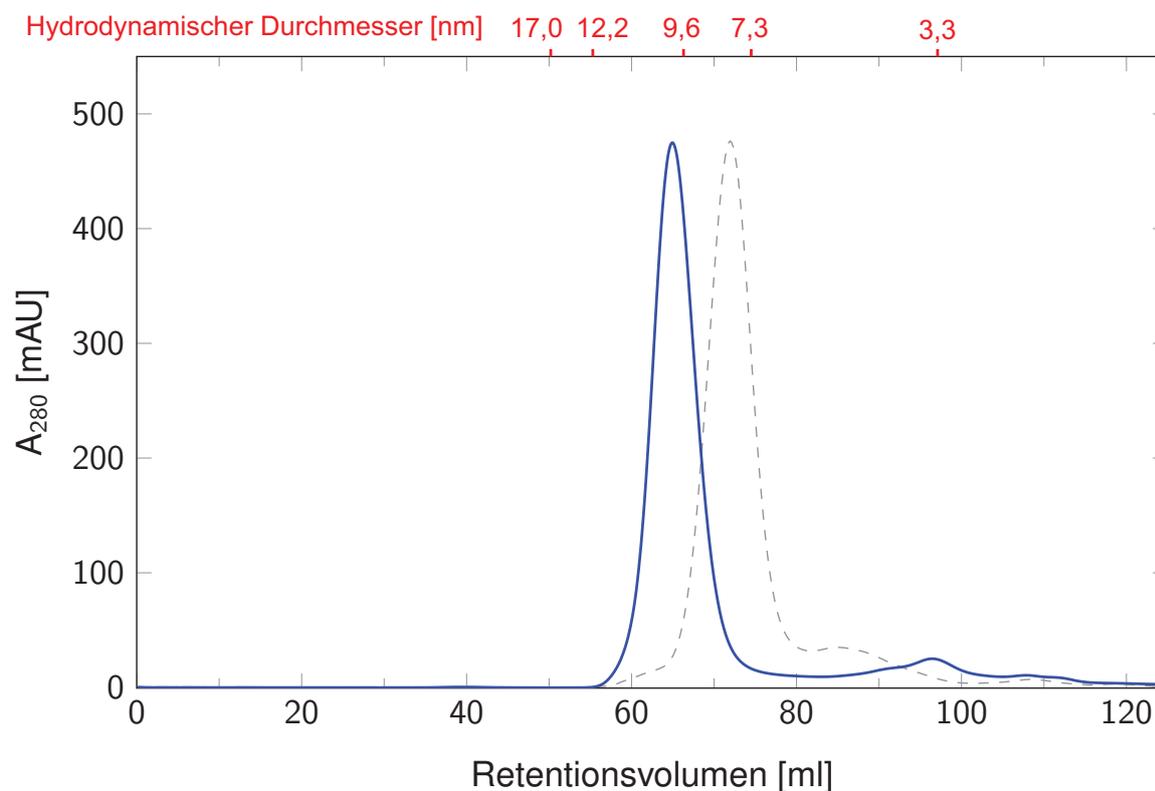
Für die Nanodiskassemblierung wurde DMPC mit lipidiertem GABARAP-PE und MSP1D1 $\Delta$ 5 im Verhältnis 53:1:1 gemischt. Es befinden sich daher rein stöchiometrisch zwei GABARAP Proteine an einer Nanodisk. Die Assemblierung erfolgte mittels Dialyse wie in Abschnitt 3.4 beschrieben. Das verwendete MSP1D1 $\Delta$ 5 entspricht dem MSP1D1, aus dem die Aminosäuren 121 bis 142 durch Mutation entfernt wurden.



**Abbildung 4.47:** SDS-PAGE zur Verifizierung der GABARAP-Lipidierung und Nanodisk-Verankerung. Der Größenstandard ist in der Mitte der Abbildung dargestellt. A) M: Marker, Spur 1: GABARAP, Spur 2: GABARAP 10 Minuten nach der Reaktion mit MPB-PE, Spur 3: GABARAP 30 Minuten nach der Reaktion mit MPB-PE. B) Spuren 1 bis 8 entsprechen den Peakfraktionen von 58 bis 74 ml der Größenausschlusschromatographie von assemblierten Nanodisks mit GABARAP.

Mit dem verkürzten Konstrukt lassen sich Nanodisks mit einem geringeren hydrodynamischen Durchmesser von etwa 9,2 nm herstellen [25]. Da das Molekulargewicht einer MSP1D1Δ5 Nanodisk 95 kDa beträgt, beläuft sich das Molekulargewicht einer GABARAP-Nanodisk rein stöchiometrisch auf etwa 123 kDa.

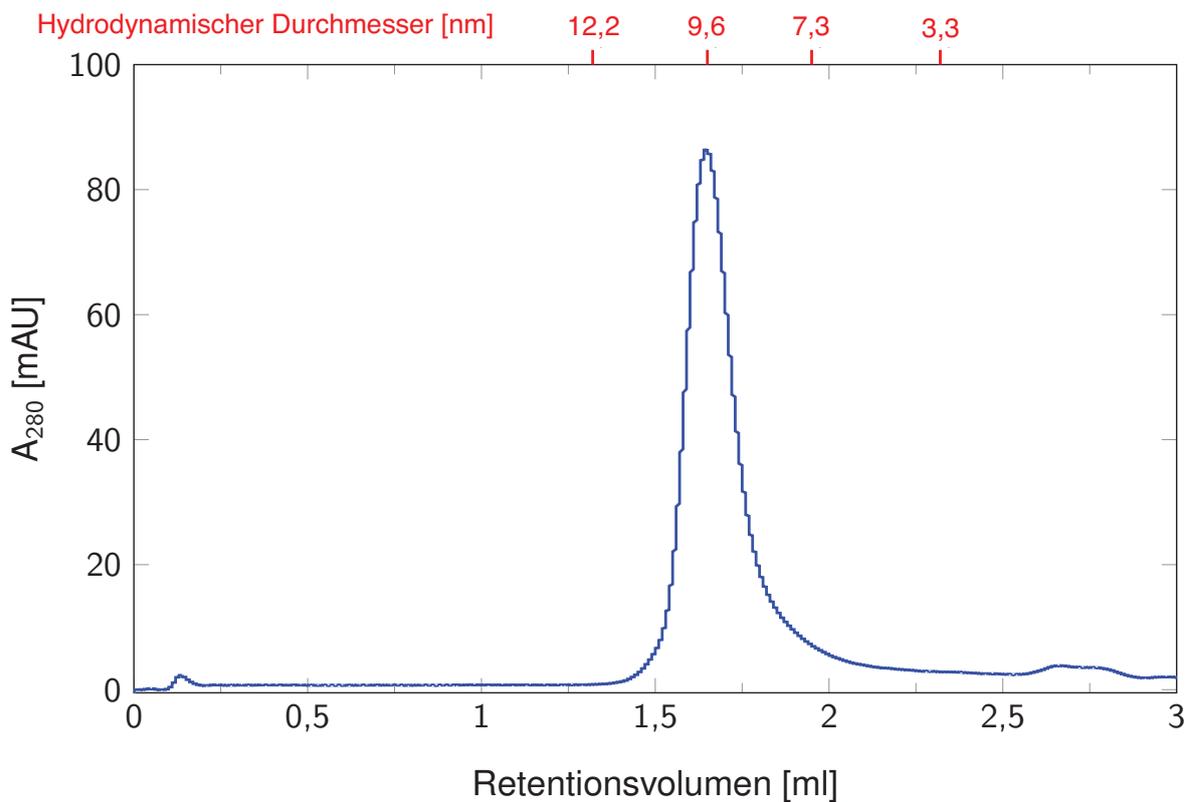
Durch eine Größenausschlusschromatographie mit einer HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule war es möglich, frisch assemblierte Nanodisks mit verankertem GABARAP von freiem Protein zu trennen. Abbildung 4.48 zeigt das Chromatogramm mit der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des Elutionsvolumens. Ein Elutionspeak ist bei einem Volumen von etwa 58 ml bis 74 ml mit einem Maximum bei 65 ml sichtbar und ist somit kleiner als das leerer MSP1D1Δ5 Nanodisks (graue Linie). Die Form des Elutionspeaks weist auf monodisperse Nanodisks mit verankertem GABARAP hin. Der hydrodynamische Durchmesser lässt sich anhand des Größenstandards abschätzen und beträgt etwa 9,7 nm.



**Abbildung 4.48:** Größenausschlusschromatographie mit einer HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule an einem ÄKTAPurifier. Die Absorption bei 280 nm zeigt ein Maximum bei einem Retentionsvolumen von 65 ml. Der Größenstandard oberhalb der Abbildung entspricht den Proteinen Thyroglobulin (MW = 669 kDa, 17 nm), Ferritin (440 kDa, 12,2 nm), Aldolase (158 kDa, 9,6 nm), Conalbumin (75 kDa, 7,3 nm) und Ribonuclease A (13,7 kDa, 3,3 nm). Die graue gestrichelte Linie entspricht leeren MSP1D1Δ5-Nanodisks (Nach L. Möckel [83], skaliert um den Faktor 1/2).

Neben dem Elutionspeak bei 65 ml sind ansonsten keine signifikant erhöhten Absorptionswerte bei 280 nm sichtbar, sodass der Anteil an freiem GABARAP oder MSP1D1Δ5 vernachlässigbar ist und auch keine Aggregate gebildet wurden. Eine SDS-PAGE (Abb. 4.47 B) zeigt, dass die Peakfraktionen sowohl lipidiertes GABARAP als auch MSP1D1Δ5 enthalten. Hinsichtlich des Elutionsvolumens und der SDS-PAGE ist daher von einer erfolgreichen Verankerung von GABARAP an die Nanodisks auszugehen. Die Nanodisks wurden somit für NMR-Experimente verwendet. Zur Überprüfung der Stabilität von den hergestellten Nanodisks wurde ein Teil der NMR-Probe nach Abschluss der NMR-Messungen für eine analytische Gelfiltration mit einer Superdex

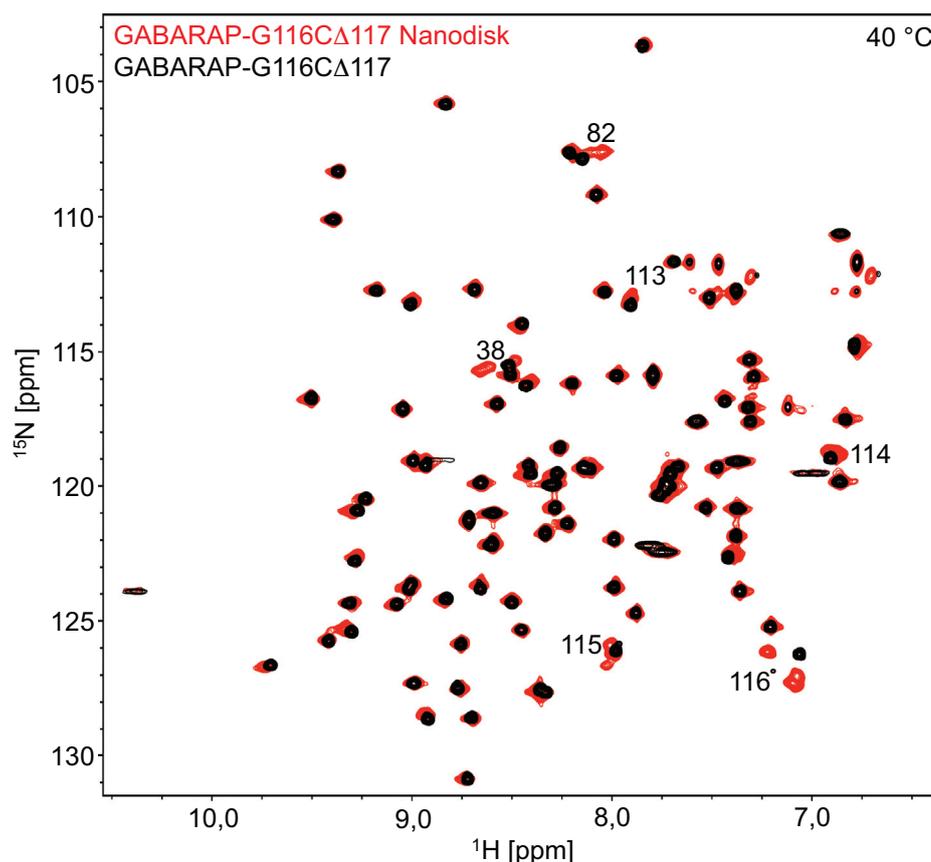
200 Increase 5/150 GL Säule verwendet. Das Chromatogramm dieser Gelfiltration ist in Abbildung 4.49 dargestellt und zeigt das gleiche Profil wie das der frisch assemblierten Nanodisks in Abbildung 4.48, sodass die Nanodisks während der NMR-Messungen stabil und damit monodispers waren. Die Größenstandards in Abbildung 4.48 entsprechen den Herstellerangaben (Kalibrierung wurde an der verwendeten Säule nicht überprüft), sodass die Standards lediglich ein grober Richtwert sind.



**Abbildung 4.49:** Stabilitätstest der Nanodisks durch eine analytische Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 Increase 5/150 GL Säule an einem ÄKTAPurifier. Diese Chromatographie wurde nach Abschluss der NMR-Messungen durchgeführt. Die Standards oberhalb der Abbildung entsprechen den Herstellerangaben und sind daher nur ein grober Richtwert.

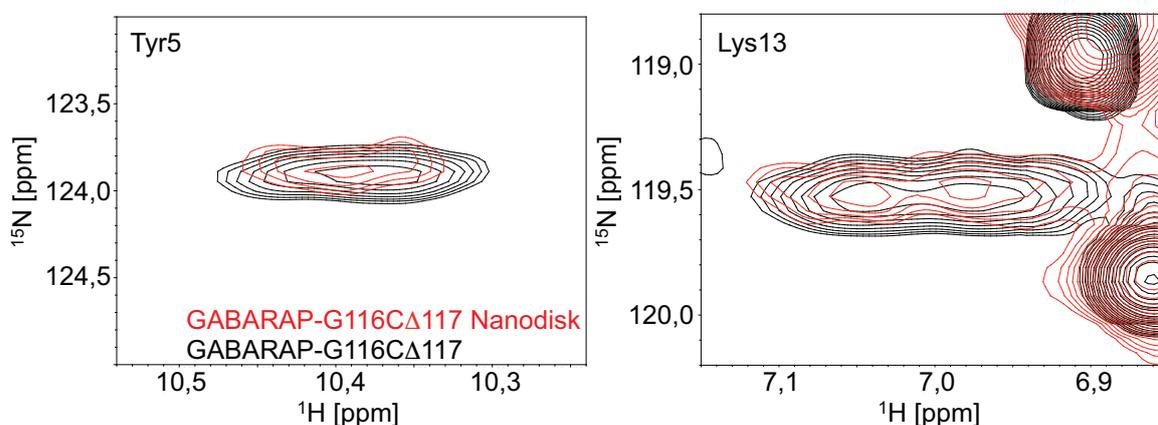
## 4.9.2 NMR-Spektroskopie von Nanodisk-verankertem GABARAP

Zum Vergleich von freiem und Nanodisk-verankertem GABARAP wurden  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -TROSY-Spektren bei 25 °C und 40 °C aufgenommen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis vergrößert sich aufgrund der schnelleren Rotation und damit längeren transversalen Relaxationszeit mit höherer Temperatur (hier nicht gezeigt). Abbildung 4.50 zeigt die Überlagerung des TROSY-Spektrums von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 mit und ohne Nanodisks bei 40 °C. Signifikante Änderungen der chemischen Verschiebungen finden sich im Bereich des C-Terminus und räumlich nahen Aminosäureresten. Die größten Veränderungen ergeben sich wie in Abbildung 4.50 zu erkennen für Lys38, Asn82, Tyr115 und Gly116. Bei Nanodisk-verankertem GABARAP ist es von besonderem Interesse,



**Abbildung 4.50:** Überlagerung der  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -TROSY-Spektren von freiem GABARAP (schwarz) und Nanodisk-verankertem GABARAP (rot) bei einer Temperatur von 40 °C.

die Dynamik mit der von löslichem GABARAP zu vergleichen. Da die langsamere Dynamik des löslichen GABARAPs im Bereich des N-Terminus, der räumlich nahen Schleife, sowie der benachbarten  $\beta$ -Stränge  $\beta_1$  und  $\beta_2$  durch eine Peakaufspaltung bereits im HSQC-Spektrum zu erkennen ist, wurde die Linienform der betroffenen Resonanzen im Nanodisk-Spektrum mit denen des löslichen GABARAP verglichen. Die vergrößerte Ansicht von Tyr5 und Lys13 in Abbildung 4.51 zeigt, dass N-terminale Aminosäurereste auch bei Verankerung an die Nanodisk vom Austausch betroffen sind. Da sich die Linienform in beiden Spektren ähnelt, unterliegt die Austauschkinetik durch die Nanodisk-Verankerung keinen signifikanten Änderungen.

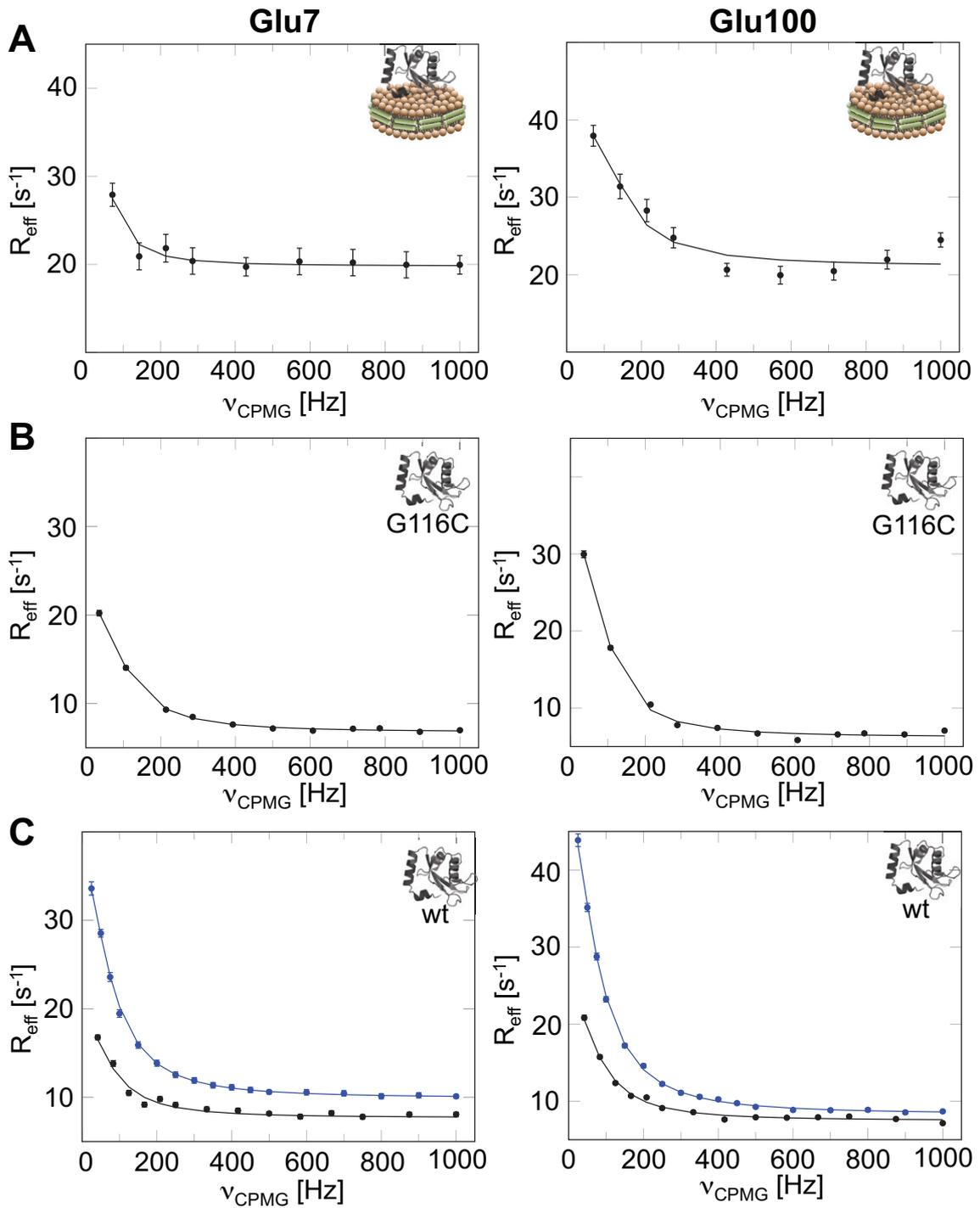


**Abbildung 4.51:** Resonanzen von Tyr5 (links) und Lys13 (rechts) im TROSY-Spektrum von freiem GABARAP (schwarz) und Nanodisk-verankertem GABARAP (rot) bei einer Temperatur von 40 °C. Die Resonanzen sind in beiden Spektren stark linienverbreitert bzw. aufgespalten.

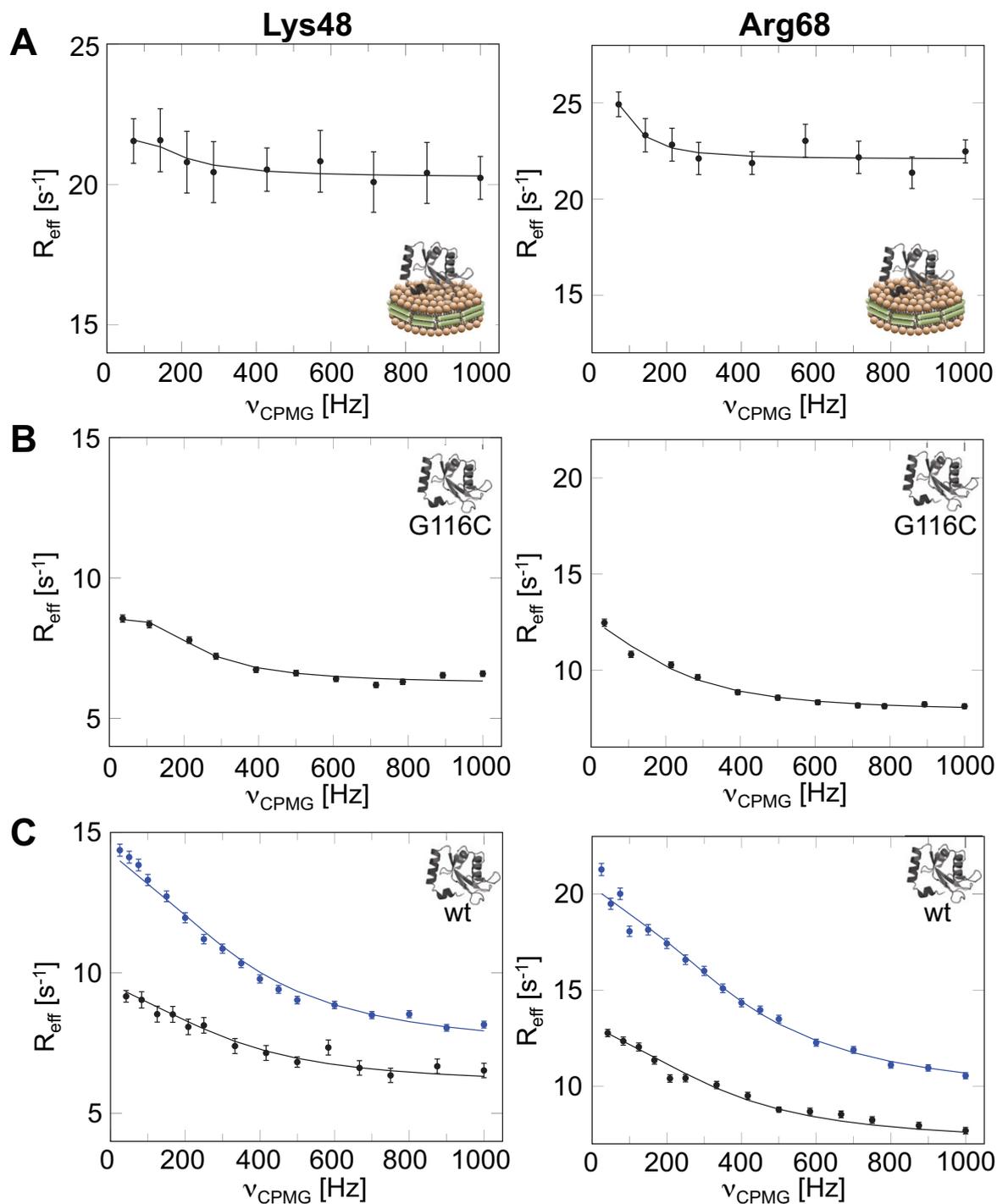
Um festzustellen, ob neben dem langsameren Austauschprozess in der N-terminalen Region auch der gering populierte schnellere Austauschprozess des Proteinkerns im Nanodisk-verankerten GABARAP vorhanden ist, wurde ein TROSY-CPMG-Spektrum bei 40 °C aufgenommen. Dazu wurde ein um 12 ms kürzeres Relaxationsintervall im Vergleich zum freien GABARAP in der Pulssequenz verwendet, da die transversale Relaxationszeit aufgrund des hohen Molekulargewichts der Nanodisks von etwa 123 kDa stark verkürzt ist und so zu einem großem Signalverlust während des Relaxationsintervalls

führt. Für den Vergleich von CPMG-RD-Kurven wurde außerdem ein TROSY-CPMG-Spektrum von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 aufgenommen. Abbildung 4.52 zeigt den Vergleich von CPMG-RD-Kurven der Aminosäurereste Glu7 und Glu100 von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 mit Nanodisks (A) und von freiem GABARAP-G116C $\Delta$ 117 (B) aufgenommen bei 800 MHz bzw. von wt GABARAP bei 600 MHz und 900 MHz (C). Die CPMG-RD-Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf, sodass der langsamere Austauschprozess, wie bereits durch einen Vergleich der Linienform in Abbildung 4.51 angenommen, auch in dem Nanodisk-verankerten GABARAP existiert. Es fällt auf, dass die effektive Relaxationsrate  $R_{eff}$  bei 800 MHz für hohe CPMG-Frequenzen im Falle der Nanodisks etwa vier mal so groß ist wie die von freiem GABARAP-G116C $\Delta$ 117.

In Abbildung 4.53 sind die TROSY-CPMG-RD-Kurven von Lys48 und Arg68 aus Nanodisk-verankerten GABARAP-G116C $\Delta$ 117 (A), freiem GABARAP-G116C $\Delta$ 117 (B) sowie wt GABARAP (C) gegenübergestellt. Der Verlauf der TROSY-CPMG-RD-Kurven ist für Nanodisk-verankertes GABARAP-G116C $\Delta$ 117, freies GABARAP-G116C $\Delta$ 117 sowie wt GABARAP in Abhängigkeit der CPMG-Frequenz sehr ähnlich. Somit ist davon auszugehen, dass der schnellere Austauschprozess im Proteinkern auch bei Nanodisk-verankertem GABARAP weiterhin vorhanden ist. Die Größe der Fehlerbalken weist jedoch auf eine hohe Messungenauigkeit hin, die aufgrund des hohen Molekulargewichts von etwa 123 kDa und dem damit verbundenen geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis im TROSY-CPMG-Spektrum verursacht wird. Eine zuverlässige Auswertung von Austauschrate und Population war daher nicht möglich.



**Abbildung 4.52:** <sup>15</sup>N-TROSY-CPMG-RD-Kurven des langsamen Austauschprozesses in A) Nanodisk-verankertem GABARAP-G116C bei 800 MHz, B) GABARAP-G116C bei 800 MHz und C) wt GABARAP bei 600 MHz und 900 MHz repräsentiert durch die Aminosäurereste Glu7 und Glu100. Die TROSY-CPMG-Experimente wurden bei einer Temperatur von 40 °C aufgenommen.



**Abbildung 4.53:**  $^{15}\text{N}$ -TROSY-CPMG RD Kurven des schnelleren Austauschprozesses in A) Nanodisk-verankertem GABARAP-G116C $\Delta$ 117 bei 800 MHz, B) GABARAP-G116C $\Delta$ 117 bei 800 MHz und C) wt GABARAP bei 600 MHz und 900 MHz repräsentiert durch die Aminosäurereste Lys48 und Arg68. Die TROSY-CPMG Experimente wurden bei einer Temperatur von 40 °C aufgenommen.

# 5 Diskussion

## 5.1 Reinigung von GABARAP ohne Fusionstag

Für die Bestimmung der NMR-Struktur von GABARAP, die 2002 von Stangler et al. erfolgte (PDB-Eintrag 1KOT), wurde GABARAP als rekombinantes GST-Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie gereinigt [79, 23]. Da die Abspaltung des GST über eine Thrombin-Schnittstelle vorgenommen wurde, besitzt dieses GABARAP nach der Spaltung die zwei zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren Gly und Ser. Für die Charakterisierung der Dynamik von GABARAP ist es von Vorteil das wildtypische GABARAP mit 117 Aminosäuren zu verwenden, um einen Einfluss des N-terminalen Überhangs auf die Dynamik auszuschließen. Die Reinigung des wt GABARAP mittels Ionenaustauschchromatographie anstelle der Affinitätschromatographie wurde bereits für die Bestimmung der Kristallstruktur von GABARAP von Coyle et al. (2002) etabliert und im Rahmen dieser Arbeit in leicht abgewandelter Form verwendet. Ein weiterer Vorteil der Reinigung von GABARAP ohne GST-Fusionsprotein ist eine höhere Stabilität von GABARAP während der Reinigung sowie eine nahezu Verdopplung der Ausbeute von durchschnittlich 10,5 mg auf 21 mg pro Liter M9 Kultur [84].

## 5.2 Resonanzzuordnung des GABARAP-Wildtyps

Die Resonanzen der N-terminalen Aminosäurereste von GABARAP erscheinen in NMR-Spektren bei Temperaturen kleiner als 25 °C in Form von Multipletts. Diese Aufspaltung deutet auf einen langsamen Austausch zwischen zwei verschiedenen Zuständen hin. Aufgrund der Aufspaltung ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis so gering, dass die Resonanzzuordnung der Aminogruppen von GABARAP durch Stangler et al. (2001) unvollständig ist [79]. Da die Aufspaltung auf chemischen Austausch hinweist, der im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden sollte, war es notwendig auch die fehlenden Resonanzen zuzuordnen. Dies ist durch die Aufnahme eines 3D HNCA-, 3D HNCO-, sowie eines 3D NOESY-HSQC-Spektrums bei 10 °C gelungen. Die Temperaturverringerng führt zu einer Verringerung der Austauschrate, sodass die Resonanzen innerhalb eines Multipletts deutlicher aufgelöst sind und an Intensität zunehmen. Es zeigt sich, dass die Amidproton- und Stickstoff-Resonanzen von Val4 ungewöhnlich hohe chemische Verschiebungen von 11,81 ppm und 134,92 ppm bzw. für den Austauschpeak 11,91 ppm und 135,58 ppm aufweisen. Die chemischen Verschiebungen von Val4 sind im HSQC-Spektrum daher noch größer als die des Tyr5, was vermutlich von Ringstromeffekten durch die räumlich benachbarten aromatischen Aminosäurereste (Tyr5, Tyr106) verursacht wird. Des Weiteren erwies es sich als sinnvoll, die bestehende Zuordnung für das wt GABARAP ohne N-terminalen Überhang zu kontrollieren, da sich die Resonanzen von Lys2, Val82, Ser113 und Tyr115 so weit verschoben haben, dass die Zuordnung mit den chemischen Verschiebungen von Stangler et al. (2001) nicht mehr eindeutig möglich war.

### 5.3 Herstellung von GABARAP-Varianten für die Fluoreszenzspektroskopie

Für die Expression und Reinigung von GABARAP-Cysteinvarianten für die Fluoreszenzspektroskopie konnte mit Ausnahme von GABARAP-K13C/F62C nach dem gleichen Protokoll vorgegangen werden, das auch für die Reinigung des wt GABARAP verwendet wurde. Es wurde lediglich auf die denaturierende Reinigung aus Einschlusskörpern verzichtet, da bei dem Versuch die Cysteinvarianten zurückzufalten ein erheblicher Teil des Proteins ausgefallen ist. Die Ausbeute an hergestelltem Protein war jedoch für die Verwendung in der Fluoreszenzspektroskopie ausreichend, da die Messungen üblicherweise an Proben mit nano- bis mikromolaren Konzentrationen durchgeführt werden. Zur Vermeidung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen von zwei GABARAP Proteinen wurde durchgehend unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet. Die Doppelcysteinvariante GABARAP-K13C/F62C ließ sich nicht wie das wt GABARAP mittels Kationenaustauschchromatographie aufreinigen. Möglicherweise ist die Ursache dafür der geringere isoelektrische Punkt (PI) von 7,76 der K13C/F62C Variante im Vergleich zu einem PI von 8,73 des wt GABARAP. Eine erfolgreiche Aufreinigung konnte jedoch durch die Anwendung einer Anionenaustauschchromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie durchgeführt werden.

Um zu beurteilen, ob die Cysteinmutationen die Sekundärstrukturelemente von GABARAP stark beeinflussen oder sogar die Tertiärstruktur ändern, wurden [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren aufgenommen. Die Aufnahme des Spektrums von GABARAP-V4C erfolgte bei 10 °C, da die Resonanzen von Val4 nur bei niedrigen Temperaturen sichtbar sind. Jedoch sind die Resonanzen von V4C in dem [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von GABARAP-V4C gar nicht sichtbar und auch die Resonanzen von Tyr5 und Glu8 nur nahe des Rauschlevels erkennbar. Da die Probenkonzentration von GABARAP-V4C lediglich 380  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu 1 mM des wt GABARAP beträgt, wäre eine verminderte Signalintensität aufgrund der geringeren Probekonzentration zu vermuten. Ein

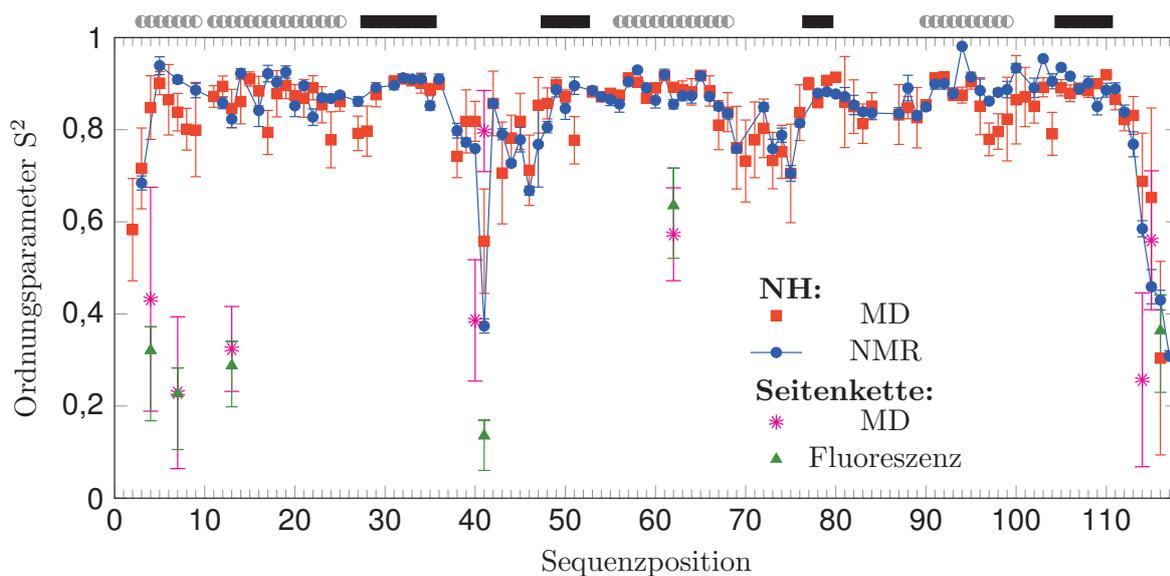
Vergleich von anderen intensitätsstärkeren Peaks zeigt jedoch ein ähnliches Signal-zu-Rausch-Verhältnis in beiden Spektren. Möglicherweise führt die Seitenkette des Cysteins zu geringfügigen lokalen strukturellen Änderungen, sodass die Wasserstoffbrücke zwischen dem Amid von Val4 und Glu34 womöglich durch die Cystein-Mutation nicht mehr ausgebildet wird. Ansonsten stimmte das Spektrum von GABARAP-V4C mit dem des wt GABARAP überein, sodass keine signifikanten strukturellen Änderungen durch die Mutation verursacht werden. Die Aufnahme von  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren der anderen GABARAP-Cysteinvarianten erfolgte bei 25 °C. Es zeigten sich ebenfalls lediglich Änderungen der chemischen Verschiebungen von Resonanzen, die eine sequentielle oder räumliche Nähe zu den mutierten Aminosäureresten aufweisen. Die größten Änderungen wurden für die Mutation des Glutamats an Position 73 zu einem Cystein beobachtet. Es ist möglich, dass die fehlende elektrostatische Wechselwirkung des Glu73 mit dem sequentiell benachbarten Arg72 durch die Mutation zu einem Cys73 lokale Strukturänderungen erzeugt und damit einen größeren Effekt auf die chemische Verschiebung aufweist.

### 5.4 Piko- bis Nanosekundendynamik von GABARAP und GABARAP-G116C $\Delta$ 117

Die Analyse der  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsraten  $R_1$  und  $R_2$  und der heteronuklearen NOE-Werte diente zum einen zur Bestimmung der Hydrodynamik von GABARAP und zum anderen zur Bestimmung von interner Dynamik der N–H-Bindungen im Proteinrückgrat auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala. Während das globale Rotationsverhalten, das im Wesentlichen durch das Verhältnis von  $R_1$  und  $R_2$  bestimmt wird, auch bei einer Feldstärke zuverlässig ermittelt werden kann, wird die Genauigkeit der Auswertung von interner Dynamik durch Relaxationsdatensätze bei mindestens zwei verschiedenen Feldstärken signifikant erhöht [53].

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung von GABARAP war besonders im Rahmen einer Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. C. Seidel (HHU)

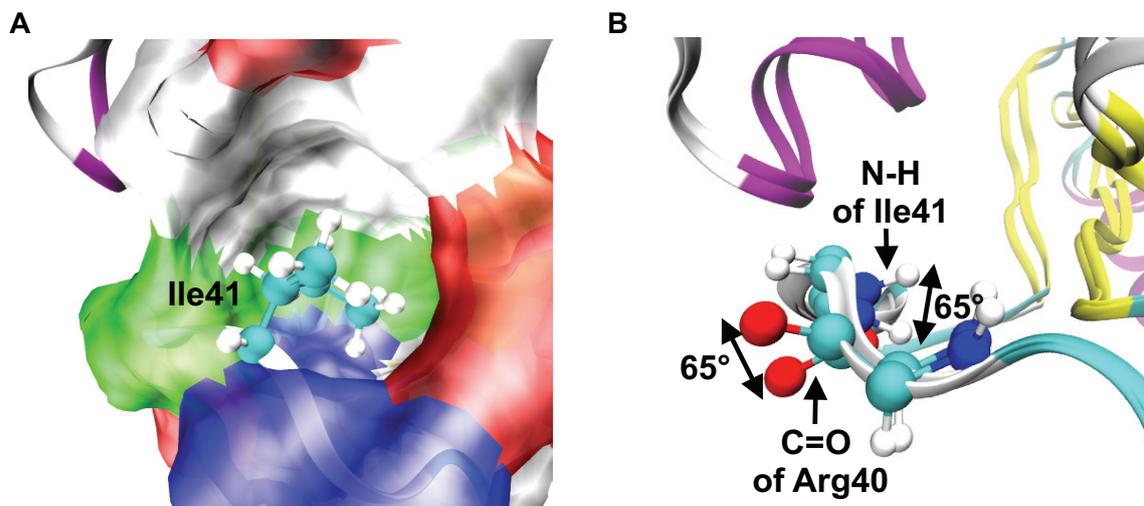
und Jun. Prof. Dr. B. Strodel (ICS-6) von großem Interesse, die ein integriertes Konzept bestehend aus NMR-, Fluoreszenzspektroskopie und Molekulardynamik(MD)-Simulationen zur Bestimmung von Proteindynamiken verfolgt. Die fluoreszenzspektroskopischen Experimente wurden von Dr. Jakub Kubiak durchgeführt und die MD-Simulationen von Dennis Della Corte. Die Auswertung der MD-Simulationen erfolgte im Wesentlichen durch Oliver Schillinger. Der Vergleich dieser verschiedenen Methoden wurde primär anhand des Ordnungsparameters  $S^2$  vorgenommen. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie wurde die Dynamik ausgewählter Aminosäurereste von GABARAP exemplarisch für verschiedene Bereiche, wie den N-Terminus (Val4, Glu7, Lys13), äußerst flexible Bereiche (Ile41, Gly116) und rigide Bereiche (Phe62) ermittelt. Die dazu erforderlichen GABARAP-Cysteinvarianten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt und bereits in Kapitel 5.3 diskutiert. Die zur Fluoreszenzspektroskopie notwendigen Farbstoffe (in diesem Fall Bodipy FL) wurden an die Cystein-Seitenketten gekoppelt, sodass die Fluoreszenzspektroskopie Informationen über die Seitenkettendynamik liefert. Für die Bewertung der experimentell ermittelten Ordnungsparameter  $S^2$  haben sich die mittels MD simulierte Ordnungsparameter sowohl für die N–H-Bindungen im Proteinerückgrat als auch für die Seitenkettendynamik als sehr hilfreich erwiesen. Die MD-Simulationen wurden für das GABARAP $\Delta$ 117 durchgeführt, um die in der Kristallstruktur (PDB-Eintrag 1GNU) vorhandene Salzbrücke zwischen den Termini zu unterbinden, da die NMR-Spektroskopie von GABARAP in Lösung keinen Hinweis auf diese Salzbrücke liefert. In Abbildung 5.1 sind die Ordnungsparameter der verschiedenen Methoden gegenübergestellt. Die experimentell ermittelten Ordnungsparameter weisen für beide Methoden (NMR und Fluoreszenz) auf die erhöhte Flexibilität des C-Terminus und des in der Schleife befindlichen Ile41 hin, wohingegen die N-terminalen Aminosäurereste Glu7 und Lys13 eine höhere Seitenkettenflexibilität aufweisen als die N–H-Bindungen des Proteinerückgrats. Es ist bekannt, dass Seitenketten im Allgemeinen flexibler sind wodurch erklärt wird, dass beide Methoden zwar gleiche Trends aufweisen, sich im Vergleich von absoluten Werten jedoch unterscheiden [85]. Die MD-Simulationen stimmen bis auf eine Ausnahme mit den experimentell ermittelten Daten



**Abbildung 5.1:** Ordnungsparameter  $S^2$  bestimmt aus  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsdaten (blau), MD-Simulationen der N–H-Bindungen (rot) und Seitenketten (magenta) sowie der Fluoreszenzspektroskopie (grün). Das Schema oberhalb der Abbildung markiert  $\alpha$ -Helices (grau) und  $\beta$ -Stränge (schwarz).

überein. Die Ausnahme besteht in der Seitenkettendynamik von Ile41, die laut MD-Simulation stark eingeschränkt ist. Die Ursache für diese Rigidität ist in der Interaktion der Seitenkette von Ile41 mit der hydrophoben Tasche von GABARAP begründet, welche die Dynamik dieser in dem Maße einschränkt, dass die für die Seitenkette eine ähnliche Rigidität wie für sekundäre Strukturelemente besteht (s. Abb. 5.2 A). Im Gegensatz zu Ile41 ist das Cys41 nicht hydrophob, sodass die Stabilisierung der Seitenkette durch hydrophobe Wechselwirkung nicht länger gegeben ist. Des Weiteren ist die Interaktion vermutlich auch sterisch aufgrund der Farbstoff-Verankerung an die Seitenkette des Cys41 nicht mehr möglich, sodass die durch Fluoreszenzspektroskopie ermittelte große Flexibilität der Seitenkette durch die Dynamik des Proteinrückgrats bestimmt wird. Die Proteinrückgratdynamik von Ile41 geht nicht mit einer uneingeschränkten Flexibilität einher, sondern ist durch zwei spezifische Konformationen bestimmt, die durch MD-Trajektorien ermittelt wurden und in Abbildung 5.2 (B) dargestellt sind.

Das integrierte Konzept bestehend aus NMR-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie sowie MD-Simulationen hat eine ausführliche Charakterisierung der Dynamik auf



**Abbildung 5.2:** A) Die Seitenkette von Ile41 befindet sich in einer hydrophoben Tasche und ist daher rigide auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala. B) Die Trajektorien der MD-Simulation von Ile41 offenbaren zwei verschiedene Konformationen der N–H-Bindung des Rückgrats von Ile41. (Abbildung von Oliver Schillinger)

der Piko- bis Nanosekundenzeitskala erlaubt, was durch die einzelnen Methoden jeweils nicht so umfassend möglich gewesen wäre. Die NMR-Spektroskopie bietet den enormen Vorteil, dass  $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsdaten Informationen für jeden Aminosäurerest mit einer N–H-Bindung liefern können, sofern die Resonanzen in den Spektren nicht überlappen. Des Weiteren sind keine Mutationen notwendig, die hingegen eine Voraussetzung für die Fluoreszenzspektroskopie sind. Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenzspektroskopie bei Konzentrationen im nano- bis mikromolaren Bereich möglich und auch eine Auswertung von Protein-Dynamiken in Zellen ist prinzipiell umsetzbar [86]. Zwar ist auch die NMR-Spektroskopie in Zellen möglich, jedoch bedarf es für die Auswertung von Spinrelaxationsdaten eine hohe Konzentrationen des zu analysierenden Proteins im sub-millimolaren Bereich, die in Zellen nicht gewährleistet ist.

Neben der Etablierung eines integrierten methodischen Konzepts, war auch die funktionelle Relevanz der Piko- bis Nanosekundendynamik von Interesse. Die äußerst

signifikante Flexibilität von Ile41 zeigt sich auch in Gate-16, das eine Aminosäuresequenzhomologie zu GABARAP von 75 % aufweist [87]. Signifikant erhöhte transversale Relaxationsraten von Asn82 sowie Ser113 und Tyr115 liefern einen Hinweis auf chemischen Austausch auf der Mikro- bis Millisekundenzeitskala. Die CPMG-RD-Kurven dieser Aminosäurereste sind nicht konstant und deuten somit ebenfalls auf chemischen Austausch hin. Jedoch konnten die CPMG-RD-Kurven nicht gefittet werden, sodass möglicherweise eine zu schnelle Austauschrate vorliegt, die außerhalb der Sensitivität eines CPMG-Experiments von etwa  $2000\text{ s}^{-1}$  liegt. Da die Lipidierung in sämtlichen GABARAP-Homologen und Orthologen über eine kovalente Bindung des C-terminalen Glycins erfolgt, ist ein Zusammenhang von C-terminaler Dynamik und der Lipidierung zu vermuten [88]. Für die enzymatische Lipidierung von GABARAP in der Zelle wird das C-terminale Leu117 durch die Cysteinprotease Atg4B abgespalten. Das dabei entstehende GABARAP $\Delta$ 117 wird von den Enzymen Atg3 und Atg7 aktiviert und schließlich durch die Bindung an Phosphoethanolamin oder Phosphatidylserin lipidiert [12]. Daher war es von Bedeutung auch das entstehende Zwischenprodukt GABARAP $\Delta$ 117 im Hinblick auf strukturelle Änderungen und Dynamik zu analysieren. Die enzymatische Abspaltung des Leu117 wurde umgangen, indem die Deletion durch eine Mutation des Expressionsvektors erfolgte. Außerdem wurde das Gly116 zu einem Cys116 mutiert, da die GABARAP-G116C $\Delta$ 117-Variante auch für die Bestimmung des Ordnungsparameters mittels Fluoreszenzspektroskopie verwendet wurde. Die  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von GABARAP $\Delta$ 117 und GABARAP-G116C $\Delta$ 117 unterscheiden sich vom wt GABARAP lediglich im C-Terminus und strukturell benachbarten Bereichen. Um die Piko- bis Nanosekundendynamik von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 zu untersuchen wurden  $^{15}\text{N}$ -Spinrelaxationsexperimente aufgenommen. Die Deletion des C-terminalen Leucins sowie die Mutation des Gly116 zu Cys116 hat keinen signifikanten Einfluss auf die  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werte. Der NOE-Wert von Gly116 bzw. Cys116 ist mit 0,43 für beide GABARAP-Varianten identisch. Da die heteronuklearen NOE-Werte sehr sensitiv für interne Dynamik auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala sind, lässt sich daraus schließen, dass die Deletion keinen Einfluss auf die interne Dynamik

hat und die Deletion daher funktionell primär für die Wechselwirkung mit Phospholipiden relevant ist. Dieses Ergebnis ist konträr zu dem des Hefe-Homologs Atg8, für das gezeigt wurde, dass die C-terminale Deletion eine Erhöhung des durchschnittlichen NOE-Wertes von 0,69 auf 0,78 verursacht und damit eine höhere Rigidität im gesamten Protein vorliegt [20]. Da sowohl GABARAP als auch das Homolog Gate-16 im Gegensatz zu Atg8 einen strukturierten N-Terminus aufweisen, der dem C-Terminus räumlich nahe kommt, kann der flexible N-Terminus von Atg8 eine Ursache für Unterschiede der Piko- bis Nanosekundendynamik im C-Terminus sein.

Ein Vergleich der transversalen Relaxationsraten  $R_2$  von wt GABARAP und GABARAP-G116C $\Delta$ 117 zeigt Änderungen im C-Terminus. So weisen Ser113 und Tyr115 im wt GABARAP erhöhte  $R_2$ -Raten auf, die in der Deletionsvariante jedoch dem durchschnittlichen  $R_2$ -Wert entsprechen. Hohe  $R_2$ -Raten sind ein Indiz für einen Austauschprozess auf der Mikrosekundenzeitskala [33, 89]. Demnach ist die Dynamik auf einer langsameren Zeitskala möglicherweise durch die Deletion reduziert. Um dies zu bestätigen müsste die Messung jedoch auch an GABARAP $\Delta$ 117 durchgeführt werden um auszuschließen, dass diese Änderung der  $R_2$ -Raten auf die Mutation des Gly116 zu einem Cys116 zurückzuführen ist. Insgesamt fällt auf, dass die longitudinalen Relaxationsraten ( $R_1$ ) des GABARAP-G116C $\Delta$ 117 leicht erhöht und die transversalen Relaxationsraten ( $R_2$ ) niedriger sind, als die des wt GABARAP. Die Unterschiede in den Relaxationsraten entstehen vermutlich aufgrund der geringeren Konzentration von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 mit 700  $\mu$ M anstelle von 1,0 mM für das wt GABARAP. Die Mikroviskosität ist bei hoher Konzentration größer, was zu einer langsameren Rotationsdiffusion und damit zu größeren  $R_2$ -Raten führt [90, 91].

### 5.5 GABARAP liegt überwiegend als Monomer vor

Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius von GABARAP erfolgte aus Translationsdiffusionsexperimenten. Zusätzlich wurde die Hydrodynamik von GABARAP aus den  $^{15}$ N-Relaxationsraten bei verschiedenen Temperaturen von 5 °C bis 35 °C aus dem Rotationskorrelationsverhalten ermittelt.

Die Translationsdiffusionsmessung bei 25 °C und einer GABARAP Konzentration von 0,5 mM ergab einen hydrodynamischen Radius von  $(19,2 \pm 0,3) \text{ \AA}$ , wenn die Bestimmung indirekt über die Referenzierung auf Dioxan erfolgte. Wurde hingegen die Stokes-Einstein-Gleichung für die Auswertung verwendet, so ergab sich aus dem 1D PG-SLED-Experiment ein größerer hydrodynamischer Radius von  $r_H = (20,7 \pm 0,2) \text{ \AA}$ . Bei der Bestimmung des hydrodynamischen Radius von GABARAP aus dem 2D PG-SLED-Experiment ergab sich  $r_H = (19,9 \pm 0,4) \text{ \AA}$ . Der mittlere hydrodynamische Radius beträgt somit  $r_H = (19,9 \pm 0,8) \text{ \AA}$  und stimmt im Rahmen des Fehlers mit dem durch Hydropro vorhergesagten Wert von  $r_H = (20,45 \pm 0,15) \text{ \AA}$  überein. Eine mögliche Fehlerquelle bei Diffusionsmessungen ist die durch Konvektion induzierte Bewegung, welche die Brownsche Molekularbewegung überlagert und in einem zu kleinen gemessenen hydrodynamischen Radius resultiert. Aufgrund der Übereinstimmung des experimentell und theoretisch ermittelten Wertes ist dieser Fehler jedoch als nicht signifikant einzuschätzen. Ein Fehler verursacht durch H/D-Austausch von GABARAP mit dem Lösungsmittel ist auszuschließen, da die Wasser-selektiven flip-back Pulse sorgfältig kalibriert wurden und zudem während des Diffusionsdelays überwiegend  $^{15}\text{N}$ -Magnetisierung vorhanden ist.

Die aus dem 1D PG-SLED mit Dioxan als Referenz ermittelte Diffusionskonstante  $D = (1,25 \pm 0,02) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  zeigt eine größere Übereinstimmung mit dem bereits publizierten Wert von  $D = (1,31 \pm 0,02) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [92] als die durch die Stokes-Einstein-Gleichung ermittelten Diffusionskonstanten. Es ist jedoch zu beachten, dass Pacheco et al. (2010) GABARAP mit N-terminalen Überhang, eine geringere Proteinkonzentration von 0,4 mM, sowie PBS-Puffer verwendet haben und daher leicht verschiedene Bedingungen vorlagen, die zu unterschiedlichen Diffusionskonstanten führen könnten.

Die aus den Spinrelaxationsdaten ermittelte globale Rotationskorrelationszeit wurde mit Hilfe des Stokes-Gesetzes in einen hydrodynamischen Radius von  $(21,6 \pm 0,2) \text{ \AA}$  umgerechnet. Es konnte keine Temperaturabhängigkeit der Rotationskorrelationszeiten von GABARAP festgestellt werden. Des Weiteren wurde der Formfaktor von

GABARAP numerisch aus den Eigenwerten des Diffusionstensors zu  $F = 1,01$  ermittelt. Obwohl das ellipsoide Modell die Rotationsdiffusion von GABARAP am besten beschreibt, beträgt die Abweichung von einer volumengleichen Kugel lediglich 1 %. Die Abschätzung des hydrodynamischen Radius aus der Rotationskorrelationszeit (und umgekehrt) durch das Gesetz von Stokes ist daher auch unter der Annahme einer isotropen Symmetrie hinsichtlich der Messgenauigkeit legitim. Mit der Kenntnis des Formfaktors konnten zusätzlich die Längen der Halbachsen von GABARAP numerisch ermittelt werden, woraus der hydrodynamische Radius von GABARAP zu  $(21,8 \pm 0,2) \text{ \AA}$  berechnet wurde. Der hydrodynamische Radius ist damit etwa 10 % größer als der größte durch die Translationsdiffusion ermittelte Wert. Da die Relaxationsexperimente mit 1,0 mM GABARAP und die Translationsdiffusionsexperimente mit lediglich 0,5 mM GABARAP durchgeführt wurden, ist ein Zusammenhang des hydrodynamischen Radius und der Proteinkonzentration zu vermuten. Dieser Zusammenhang wurde im Rahmen der Kooperation mit dem Institut für physikalische Chemie (AG Seidel, HHU Düsseldorf) durch Fluoreszenzanisotropie-Experimente bestätigt, da eine Erhöhung der Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  GABARAP auf eine NMR-ähnliche Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  zu einer Verlängerung der globalen Rotationskorrelationszeit um 13 % geführt hat. Ebenfalls ist bekannt, dass die durch Spinrelaxationsdaten bestimmte globale Rotationskorrelationszeit um etwa 18 % längere Werte im Vergleich zu anderen Methoden, wie beispielsweise der Fluoreszenzspektroskopie liefert [91]. Damberg et al. (2002) begründen dies in der üblicherweise hohen Konzentration von NMR-Proben, die zu einer erhöhten Mikroviskosität führt [91]. Für die Umrechnung der Rotationskorrelationszeit in einen hydrodynamischen Radius wird die Viskosität der Lösung als ein Gemisch aus 90 %  $\text{H}_2\text{O}$  und 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  angenommen, eine Erhöhung der Mikroviskosität durch die Proteinkonzentration jedoch vernachlässigt, da die exakte Bestimmung der Mikroviskosität nicht ohne Weiteres möglich ist. Auch das im Puffer vorhandene Salz erhöht laut Parmar et al. (2009) die Viskosität der Lösung [93]. Das der zu groß ermittelte hydrodynamische Radius bei hohen GABARAP Konzentrationen eher auf die Mikroviskosität zurückzuführen ist und nicht auf eine Oligomerisierung, zeigt auch

der Vergleich mit den Translationsdiffusionsexperimenten. Der kleinste hydrodynamische Radius wurde durch die Referenzierung auf Dioxan ermittelt, die keine Kenntnis der Viskosität erfordert.

Für eine exakte Bestimmung des hydrodynamischen Radius aus Spinrelaxationsdaten wäre somit eine geringere Konzentration zwar vorteilhaft, jedoch ist eine hohe Konzentration notwendig um die interne Dynamik zu analysieren. Die interne Dynamik beispielsweise spiegelt sich primär in den  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Werten wider und das Protonen-gesättigte  $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$  NOE-Spektrum weist insbesondere in flexiblen Bereichen ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf, das durch eine geringe Proteinkonzentration noch kleiner wird. Insgesamt beträgt die Ungenauigkeit bei dem Vergleich aller Methoden etwa  $\pm 1 \text{ \AA}$  und liegt damit im Rahmen dessen, was auch bei anderen Proteinen als Unsicherheit angegeben wird. So wurde beispielsweise ein hydrodynamischer Radius von 19 bis 20 nm für das 14,3 kDa große Lysozym ermittelt [94, 93].

Der Vergleich des hydrodynamischen Radius von GABARAP mit dem von Lysozym, den theoretisch ermittelten Werten durch Hydropro, sowie der Abschätzung aus der Aminosäureanzahl zeigt, dass es sich überwiegend um monomeres GABARAP handeln muss. Eine kleine Fraktion von Oligomeren ist jedoch aufgrund der Messunsicherheit nicht vollständig auszuschließen. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass GABARAP in Lösung bei pH 6,9 und den gegebenen Salzbedingungen (100 mM KCl, 100 mM NaCl) oligomerisiert, so wie es von Coyle et al. (2002) durch Kristallisation unter Hochsalzbedingungen von 2,4 M Ammoniumsulfat gefunden wurde [19]. Es ist jedoch denkbar, dass eine sehr geringe Population von Oligomeren vorliegt, die unter anderen Bedingungen vermehrt populiert wird.

## 5.6 GABARAP unterliegt zwei verschiedenen chemischen Austauschprozessen

Schon während der NMR-spektroskopischen Resonanzzuordnung von GABARAP im Jahre 2002 ist die Aufspaltung von Resonanzen des N-Terminus und räumlich benachbarten Regionen von GABARAP aufgefallen, die auf einen langsamen Austauschprozess zwischen zwei ähnlich besetzten Zuständen hinweist [79]. Die Kinetik dieses Austauschprozesses konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von ZZ-Austauschexperimenten zuverlässig bestimmt werden. Durch CPMG-RD-Experimente wurde außerdem ein zuvor nicht bekannter schnellerer Austauschzustand im Bereich der hydrophoben Tasche hp2 entdeckt, der mit einer angeregten Population von etwa 1 % sehr niedrig besetzt ist.

### 5.6.1 Das ZZ-Austauschexperiment ermöglicht die Quantifizierung des langsamen Austauschprozesses im N-Terminus von GABARAP

Die Quantifizierung des Austauschprozesses im N-Terminus, der angrenzenden Schleife sowie in Teilen der benachbarten  $\beta$ -Stränge  $\beta_1$  und  $\beta_2$  erfolgte bei 10 °C mit Hilfe von ZZ-Austauschexperimenten. Bei einer Temperatur von 10 °C ist der Austauschprozess so langsam, dass die Resonanzen in einem Multiplett deutlich aufgelöst sind. Die Besetzung der beiden Austauschzustände (56 % zu 44 %) konnte durch ein [ $^1\text{H},^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum aus dem Intensitätsverhältnis von Resonanzen der jeweiligen Aminosäurereste ermittelt werden, die eine Aufspaltung in nur einer Dimension zeigen. Um die Austauschrate zu quantifizieren war das ZZ-Experiment essentiell. Für die Analyse mit Hilfe eines Fits der Bloch-McConnell-Gleichungen ist die Aufspaltung sowohl in  $^1\text{H}$ - als auch in  $^{15}\text{N}$ -Dimension notwendig. Die Resonanzen von Glu7 und Phe104 sind zwar entlang beider Dimensionen aufgespalten, jedoch sind die Differenzen der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega$  zwischen beiden Zuständen so gering, dass die beiden Auto- und

Kreuzpeaks im Bereich der Flanken überlappen. Daher ist die Intensitätszunahme der Kreuzpeaks in Abhängigkeit der Mischzeit etwas zu niedrig und die Intensitätsabnahme der Autopeaks entsprechend zu hoch, sodass die Aminosäurereste Glu7 und Phe104 bei dem Fit der Bloch-McConnell-Gleichungen zur Bestimmung der Austauschparameter nicht berücksichtigt wurden. Für die anderen in Proton- und Stickstoffdimension aufgespaltenen Resonanzen ergab sich eine Austauschrate von  $k_{ex} = 34,6 \text{ s}^{-1} \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$  bei  $10^\circ\text{C}$ . Die Fehlerbestimmung erfolgte dabei aus 1000 Monte-Carlo-Simulationen, wobei die Messunsicherheit aus dem Rauschen abgeschätzt wurde. Da die Kreuzpeaks auch ohne Einfügen einer zusätzlichen Mischzeit detektierbar sind, findet bereits Austausch während der INEPT-Transfer-Periode statt, was durch den zusätzlichen globalen Fitparameter  $t_0$  berücksichtigt wurde. Der Wert von  $t_0$  konnte ebenfalls durch die Länge der INEPT-Transfer-Periode inklusive eingefügter Delays auf Grundlage der Pulssequenz zu  $t_0 = 14,6 \text{ ms}$  abgeschätzt werden und ist damit etwas kürzer als die gefittete Zeit von  $t_0 = 15,8 \text{ ms}$ . Eine genaue Berechnung der Mischzeit  $t_0$  war aufgrund des in der Pulssequenz verwendeten Bax-Logan-Tricks jedoch nicht möglich [74, 95, 96]. Es ist daher nicht eindeutig zu beurteilen, ob die durch den Fit ermittelte Zeit  $t_0$  korrekt ist und damit auch der tatsächliche Fehler der Austauschrate etwas größer ist, als der durch die Monte-Carlo-Simulation ermittelte Wert von  $0,2 \text{ s}^{-1}$ . Eine Verringerung der Temperatur würde aufgrund einer langsameren Austauschrate den Austausch zwischen beiden Zuständen während der INEPT-Transfer-Periode zwar minimieren, jedoch weisen die HSQC-Spektren bei  $5^\circ\text{C}$  eine Linienverbreiterung auf, welche die Auswertung durch das ZZ-Experiment unmöglich macht. Ein Einfluss von Linienverbreiterung durch longitudinale Relaxation, die mit zunehmender Mischzeit zu einer Verringerung der Signalintensität von Auto- und Kreuzpeaks führt, ist in dem hier beobachteten Bereich mit einer maximalen Mischzeit von  $75 \text{ ms}$  nicht relevant, was daran zu erkennen ist, dass die Intensitäten der Kreuzpeaks bei hohen Mischzeiten nicht abnehmen. Daher ist die Annahme von identischen Relaxationsraten für den Zustand A und B zulässig, auch wenn sich die Relaxationseigenschaften von Zustand A und B geringfügig unterscheiden.

Da beide Austauschzustände durch Resonanzen innerhalb eines Multipletts repräsentiert werden, ist es möglich die Differenz der chemischen Verschiebung aus HSQC-, HNCA- und HNC0-Spektren bei 10 °C direkt zu messen. Die Differenz der chemischen Verschiebung zwischen beiden Austauschzuständen ist für alle betrachteten Kerne ( $H^N$ , N, CO,  $C^\alpha$ ) mit weniger als 1 ppm so gering, dass Änderungen der Sekundärstruktur ausgeschlossen werden können und stattdessen lokale Bewegungen zugrunde liegen. Denn insbesondere die chemischen Verschiebungen von CO- und  $C^\alpha$ -Kernen sind charakteristisch für die Sekundärstruktur [97, 98]. Die Veränderung der Sekundärstruktur von einer  $\alpha$ -Helix zu einem ungefalteten Bereich oder einem  $\beta$ -Strang führt bei diesen Kernen zu durchschnittlichen Änderungen der chemischen Verschiebung von mehr als -1 ppm, was bei den hier beobachteten chemischen Verschiebungen nicht der Fall ist [97, 98]. Das die Vorzeichen der Änderungen von chemischen Verschiebungen zwischen beiden Austauschzuständen für gleiche Kerne auch nicht einheitlich positiv oder negativ sind ist ein weiteres Indiz dafür, dass dem Austauschprozess keine Sekundärstrukturänderungen zugrunde liegen. Dies ist in Übereinstimmung mit der berechneten SSP, die nur marginale Unterschiede für beide Zustände zeigt (Abb. A.1).

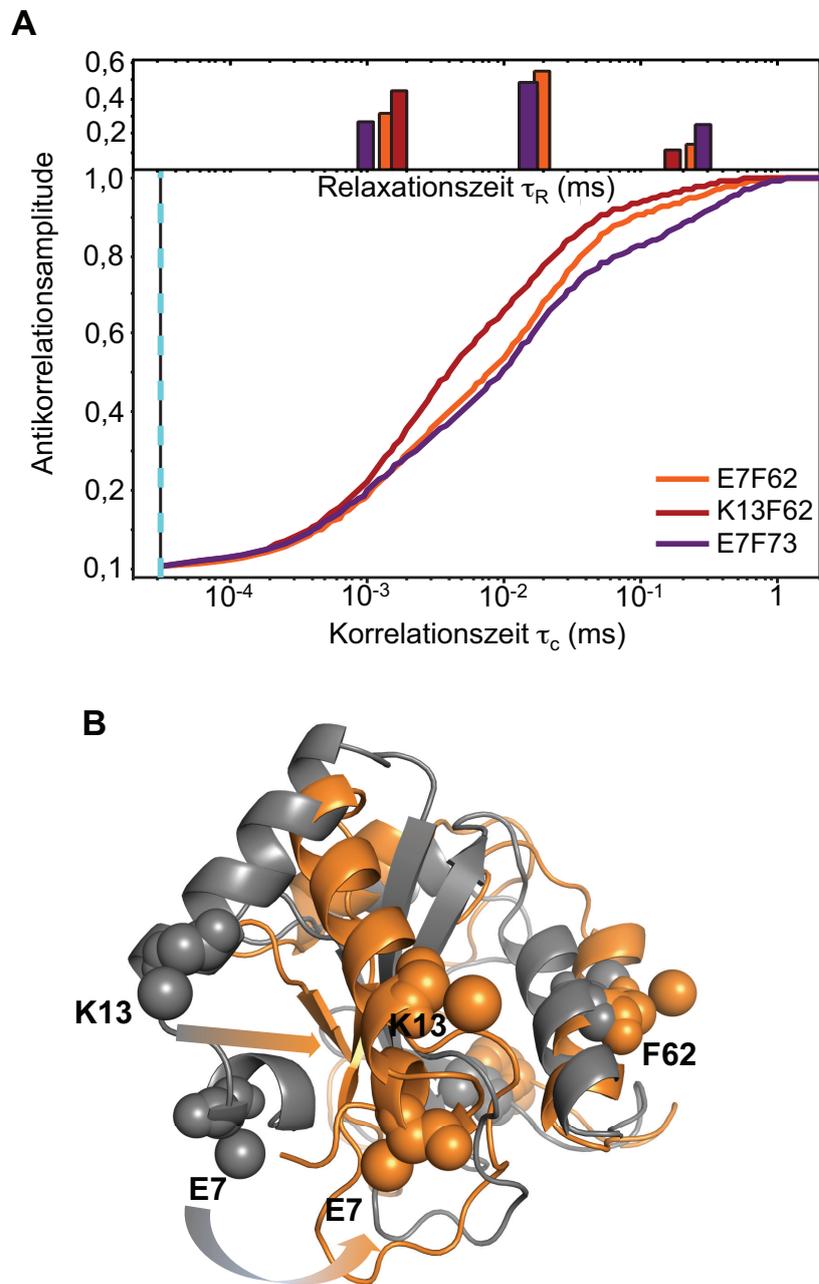
### 5.6.2 Funktionelle Bedeutung des langsamen Austauschprozesses im N-Terminus von GABARAP

Aus der Kristallstruktur (PDB-Eintrag 1GNU) von GABARAP ist bekannt, dass die N-terminale helikale Subdomäne (NHD) durch die Wasserstoffbrücken von Val4 und Tyr5 zu Glu34 sowie einer Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100 mit der Ubiquitinartigen Subdomäne (UAD) verknüpft ist [11]. In der offenen Konformation von GABARAP, welche von Coyle et al. (2002) unter hohen Salzbedingungen kristallisiert wurde, fehlt hingegen die Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100, sodass die geschlossene Konformation nicht länger stabilisiert wird [19]. Es ist daher denkbar, dass der hier charakterisierte langsame Austauschprozess mit einem Öffnen und Schließen der Salz- und Wasserstoffbrücken in Zusammenhang steht. Dies ist in Einklang

mit Förster-Resonanzenergietransfer(FRET)-Messungen, die im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Seidel und seinem Mitarbeiter Dr. Jakub Kubiak von der HHU durchgeführt wurde. Die dazu verwendeten Doppelcysteinvarianten GABARAP-E7C/F62C, -E7C/E73C sowie -K13C/F62C wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Die FRET-Messungen haben zusätzliche Austauschprozesse auf der Mikrosekundenzeitskala offenbart, die durch CPMG-Experimente nicht detektiert wurden. Die Abbildung 5.3 (A) zeigt die Antikorrelation der GABARAP-Doppelcysteinvarianten, die auf mindestens drei verschiedene Austauschprozesse auf der Mikrosekundenzeitskala hinweist, mit denen Abstandsänderungen von bis zu 20 Å verbunden sind. Diese großen Abstandsänderungen sind nur möglich, wenn die NHD von der UAD gelöst ist. Ein hypothetisches Modell ist in Abbildung 5.3 (B) gezeigt. Vermutlich wurde diese Dynamik mittels NMR-Spektroskopie nicht detektiert, da sie von dem langsamen Austauschprozess überlagert wird oder der Austausch zu schnell für eine Detektion mittels CPMG-RD ist. Um das aus der Fluoreszenzspektroskopie hervorgehende Modell mittels NMR-Spektroskopie zu bestätigen, werden in unserer Arbeitsgruppe derzeit Experimente mit paramagnetischer Relaxationsverstärkung (PRE) durchgeführt. PRE-Experimente werden überwiegend für die Bestimmung von statischen Abständen in Proteinen durchgeführt, jedoch liefern sie auch Informationen zu weitreichenden Konformationsänderungen (10 bis 35 Å) und eignen sich zur Charakterisierung von chemischen Austausch auf der Mikrosekundenzeitskala [99, 100]. Für die Validierung der durch FRET-Experimente ermittelten N-terminalen Dynamik von GABARAP mit Hilfe von PRE-Experimenten wird ein paramagnetisches Spin-Label kovalent an GABARAP-E7C oder -K13C<sup>1</sup> gebunden und der Einfluss des Spin-Labels auf die Signalintensität der Resonanzen im HSQC-Spektrum gemessen. Falls eine Verringerung der Signalintensität von Resonanzen auch in Regionen auftritt, die durch die bekannte Struktur von GABARAP nicht zu erklären sind, könnte dies einen Hinweis auf signifikante Konformationsänderungen auf der Mikrosekundenzeitskala liefern.

---

<sup>1</sup>Die Konstrukte von GABARAP-E7C und -K13C wurden in dieser Arbeit für die Fluoreszenzspektroskopie hergestellt und sind daher vorhanden.



**Abbildung 5.3:** A) Antikorrelation der Fluoreszenzspektroskopie von den GABARAP-Doppelcysteinvarianten E7C/F62C, E7C/E73C, K13C/F62C offenbaren mindestens drei verschiedene Austauschprozesse auf der Mikrosekundenzeitskala. B) Ein hypothetisches Model basierend auf FRET-Abständen. Die Änderungen der FRET-Abstände weisen auf eine große Amplitude von Konformationsänderungen der NHD hin, die bei einer Austauschrate von  $(20 \mu\text{s})^{-1}$  auftreten. (Abbildung von Dr. Jakub Kubiak, HHU)

Es ist bekannt, dass der N-Terminus von GABARAP durch die Bindung an Tubulin dessen Polymerisation fördert [19]. Durch FRET-Messungen konnte die Existenz von zwei verschiedenen an Tubulin und GABA<sub>A</sub> gebundene GABARAP-Konformationen nachgewiesen werden, wobei jedoch keine strukturellen Details über diese Zustände bekannt wurden [101]. Um den Zusammenhang von Funktion und Dynamik herzustellen und insbesondere zu überprüfen welche Relevanz die Verknüpfung der NHD mit der UAD besitzt, ist die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte GABARAP-E100A-Variante von großem Interesse, da die Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100 aufgrund der Mutation des Glu100 zu einem Ala100 nicht ausgebildet wird. Diese wird in Abschnitt 5.7 diskutiert.

### **5.6.3 CPMG-RD-Experimente eignen sich insbesondere für die Charakterisierung des schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern von GABARAP**

Mittels CPMG-RD-NMR-Spektroskopie konnten zwei Austauschprozesse auf der Millisekundenzeitskala detektiert und charakterisiert werden. Der langsamere Prozess im N-Terminus, der angrenzenden Schleife sowie den benachbarten  $\beta$ -Strängen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  und ein schnellerer Prozess in der Region der hydrophoben Bindetasche hp2 im Proteinkern.

#### **5.6.3.1 CPMG-RD-Experimente des langsameren Austauschprozesses**

Der langsamere Austauschprozess wurde bereits durch das ZZ-Austauschexperiment bei 10 °C analysiert. Der Fit von CPMG-RD-Kurven, der an diesem langsameren Austausch beteiligten Aminosäurereste, ergab eine falsche Population des angeregten Zustands von  $p_B = 20\%$ . Denn die zuverlässige Interpretation der Populationen aus dem Intensitätsverhältnis in einem Multiplett zeigte bereits eine ähnliche Populierung von 44 % zu 56 % beider Zustände auf. In der Literatur ist bisher kein Fall bekannt, bei dem Austauschprozesse mit solch hohen Populationen des angeregten Zustands durch CPMG-Experimente analysiert wurden, auch weil ZZ-Austauschexperimente

die Methode der Wahl sind, falls die Resonanzen beider Austauschzustände im NMR-Spektrum sichtbar sind. Dennoch ist es möglich, dass der Austausch von zwei nahezu ähnlich populierte Zuständen so schnell ist, dass nur ein Peak im NMR-Spektrum sichtbar ist, wie es beispielsweise für GABARAP bei 40 °C eintritt. Daher ist die Aufnahme von NMR-Spektren bei verschiedenen Temperaturen ratsam, um so die optimale Methode für die Bestimmung der Kinetik bei chemischen Austausch zu wählen. Wird die Population der Fits von CPMG-RD-Kurven des langsameren Zustands von GABARAP festgehalten, lassen sich die anderen variablen Fitparameter, die Austauschrate ( $k_{ex} = 127 \text{ s}^{-1} \pm 4 \text{ s}^{-1}$  bei 25 °C) sowie die Differenz zwischen den chemischen Verschiebungen beider Zustände  $\Delta\omega_N$ , zuverlässig ermitteln, sofern die CPMG-Daten verschiedener Temperaturen (15 bis 35 °C) gleichzeitig einbezogen werden. Der separate Fit der CPMG-RD-Kurven bei 15 °C bzw. 25 °C lieferte auch bei festem  $p_B$  dennoch fehlerhafte Austauschraten. Demnach wäre die Austauschrate bei 15 °C identisch mit der durch ZZ-Austausch bei 10 °C ermittelte Rate und würde sich bei einer Temperaturerhöhung von 10 °C um das 8-Fache erhöhen. Im Vergleich dazu vergrößert sich die gefittete Austauschrate unter Berücksichtigung aller Temperaturen von 15 °C bis 35 °C in nur einem simultanen Fit (statt den drei einzelnen Fits) um das 2- bis 3-fache bei einer Temperaturerhöhung von jeweils 10 °C (Tab. 4.6). Dies entspricht der van-'t-Hoff'schen Regel die besagt, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10 °C um das 2- bis 4-fache erhöht. Dies zeigt noch einmal die Notwendigkeit des simultanen Fits von CPMG-RD-Kurven bei verschiedenen Temperaturen.

Für die aus dem Fit der CPMG-RD-Kurven ermittelten  $\Delta\omega_N$  der Aminosäurereste Glu7, Val29, Val51 und Glu100 wurden größere Werte ermittelt, als durch die direkte Messung in einem HSQC-Spektrum bei 10 °C (s. Abb. 4.33). Da diese Aminosäurereste Peakaufspaltungen mit kleinen  $\Delta\omega_N$  aufweisen und dessen Resonanzen innerhalb eines Multipletts im HSQC-Spektrum bei 10 °C geringfügigen Überlapp zeigen ist zu vermuten, dass die im HSQC-Spektrum ermittelten Peakpositionen nicht den exakten intrinsischen Resonanzen entsprechen, wie es in Kapitel 1.4, Abb. 1.6 (C) veranschaulicht

wurde. Unterschiede sind beispielsweise dadurch zu erklären, dass im Fit der CPMG-RD-Kurven ein temperaturunabhängiges  $\Delta\omega_N$  angenommen wird, geringe Änderungen mit der Temperatur jedoch nicht auszuschließen sind.

### 5.6.3.2 CPMG-RD-Experimente des schnelleren Austauschprozesses

Wie bereits erwähnt, wurde durch CPMG-Experimente zusätzlich ein schnellerer Austauschprozess in der Region der hydrophoben Bindetasche hp2 im Proteinkern detektiert. Dessen Austauschrate beträgt bei 25 °C  $k_{ex} = 725 \text{ s}^{-1} \pm 42 \text{ s}^{-1}$  und weist lediglich eine Population des angeregten Zustands von  $p_B = 0,8 \%$  auf. Die Population des angeregten Zustands liegt daher nahe der Nachweisgrenze eines CPMG-Experiments, die etwa 0,5 % beträgt, und wäre nach aktuellem Stand mit keiner anderen biophysikalischen Methode als der NMR-Spektroskopie nachweisbar [41]. Auch für den schnelleren Austauschprozess zeigt sich, dass die Aufnahme von Experimenten bei verschiedenen Temperaturen notwendig ist, da insbesondere bei 15 °C große Unterschiede zwischen dem separaten Fit und dem Fit unter Berücksichtigung der Temperaturen von 15 bis 40 °C auftreten. Dies ist vermutlich auf die geringe Besetzung von nur 0,78 % bei 15 °C zurückzuführen, die zu CPMG-RD-Kurven mit einem geringen Abfall führt. Bei 40 °C steigt die Besetzung auf etwa 1,3 % an und der separate Fit liefert das gleiche Ergebnis wie der simultane Fit von CPMG-RD-Kurven bei mehreren Temperaturen.

Die größten Differenzen der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_N$  zwischen dem Grundzustand und angeregten Zustand wurden für die hydrophoben Aminosäurereste Leu50, Leu63 und Arg68 aufgezeigt und befinden sich daher im Kern der hydrophoben Tasche hp2. Eine Vorzeichenbestimmung von  $\Delta\omega_N$  erwies sich als äußerst schwierig, da die Differenzen von Peakpositionen in H(S/M)QC Spektren wenige ppb betragen und damit in der gleichen Größenordnung wie die Messunsicherheit lagen. Dennoch haben die Experimente zur Vorzeichenbestimmung aus den H(S/M)QC bei zwei verschiedenen Feldstärken die gleichen Vorzeichen ergeben. Zusätzlich haben jedoch auch Aminosäurereste, die keinem Austauschprozess zugeordnet werden konnten, eine Differenz der chemischen Verschiebung im H(S/M)QC aufgewiesen. Es ist möglich dass diese Aminosäurereste gleichzeitig von dem schnelleren und dem langsameren Austauschprozessen

betroffen sind und daher nicht gefittet werden konnten oder aber noch zusätzliche Austauschprozesse vorliegen. Es ist daher von großem Interesse eine Bedingung zu finden, welche die Besetzung des Austauschzustands erhöht, um so strukturelle Details dieses Prozesses zu erhalten.

Die Aufnahme von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{CO}$ -CPMG-Experimenten erfolgte bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$  und an einer jeweils anderen Probe als die zuvor bei verschiedenen Temperaturen aufgenommenen  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experimente, da eine Deuterierung bzw. eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung erforderlich war. Zum Vergleich wurde zu den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{CO}$ -CPMG-Experimenten jeweils auch ein  $^{15}\text{N}$ -CPMG-Experiment an der selben Probe aufgenommen. Die zuvor detektierten Austauschzustände, ein langsamer Austauschprozess mit nahezu ähnlicher Besetzung sowie der schnellere gering populierte Austauschzustand wurden auch durch die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{CO}$ -CPMG Experimente nachgewiesen. Der langsame Austauschprozess konnte aus den  $^{13}\text{CO}$ -CPMG-RD Kurven jedoch nicht gefittet werden, da die Resonanzen ein zu geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufwiesen. Dies ist primär durch die für die Messung bei einer Protonenlarmorfrequenz von  $600\text{ MHz}$  verwendete geringe Probenkonzentration von  $300\text{ }\mu\text{M}$  zu erklären. In der  $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GABARAP Probe ist die Besetzung des langsamen Austauschprozesses im Vergleich zur  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP Probe genau entgegengesetzt, das heißt der zuvor mit  $44\%$  angeregte Zustand ist nun zu  $56\%$  besetzt. Für den Fit der CPMG-RD-Kurven wurden die Intensitäten der jeweils stärkeren Resonanz verwendet. Die ermittelte Austauschrate von  $k_{ex} = 251\text{ s}^{-1}$  liegt in der gleichen Größenordnung wie die des separaten Fits von  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP mit  $k_{ex} = 285\text{ s}^{-1}$  bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Wie bereits diskutiert, kann der langsame Austauschprozess durch CPMG-RD-Experimente erst durch die Berücksichtigung von CPMG-RD-Kurven bei mehreren Temperaturen zuverlässig ausgewertet werden. Die Veränderung der Besetzung des langsamen Austauschprozesses von  $[\text{U-}^2\text{H},^{15}\text{N}]$ -GABARAP könnte durch die Deuterierung verursacht sein oder aber auch durch leicht unterschiedliche Pufferbedingungen, wie beispielsweise geringfügige Variationen in der Salzkonzentration.

Bezüglich des schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern von GABARAP unterscheiden sich die aus dem Fit erhaltenen absoluten Werte der Austauschrate, Population sowie die  $\Delta\omega$  für die verschiedenen Proben. So ergibt der Fit der  $^1\text{H}$ -CPMG-RD-Kurven bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$  eine Austauschrate von  $k_{ex} = 1087\text{ s}^{-1}$  und eine Population des angeregten Zustands von  $p_B = 0,53\%$  gegenüber  $k_{ex} = 725\text{ s}^{-1}$  und  $p_B = 0,8\%$  der nicht deuterierten Probe unter Berücksichtigung verschiedener Temperaturen. Durch den separaten Fit von  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$  ergab sich jedoch auch eine etwas höhere Austauschrate von  $k_{ex} = 892\text{ s}^{-1}$  mit einem geringeren  $p_B$  von  $0,78\%$ . Dieser Fehler könnte durch die Aufnahme von Experimenten bei mehreren Temperaturen verringert werden, wobei sich insbesondere ein CPMG-Experiment bei  $40\text{ }^\circ\text{C}$  anbietet, da der Fit von CPMG-RD-Kurven bei  $40\text{ }^\circ\text{C}$  im Falle von  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP das gleiche Ergebnis wie der simultane Fit bei mehreren Temperaturen lieferte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{CO}$ -CPMG-Experimente bei  $40\text{ }^\circ\text{C}$  aufgenommen, jedoch zeigte sich für diese Spektren bei  $600\text{ MHz}$  bereits ein proteolytischer Abbau der Probe, was zu einer erhöhten Besetzung des schnelleren Austauschprozesses führte. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass die Interaktion von GABARAP-Proteinen untereinander mit dem schnelleren Austauschprozess in Verbindung steht, falls GABARAP-Fragmente bevorzugt mit dem nicht abgebauten GABARAP interagieren. Jedoch wurde das Abbauprodukt nicht analysiert, sodass hier keine weiteren Aussagen möglich sind. Eine Ursache für Fehler der gefitteten Austauschkinetik könnte aber auch wie bereits erwähnt in leicht variierenden Pufferbedingungen bei der Verwendung verschiedener Proben liegen.

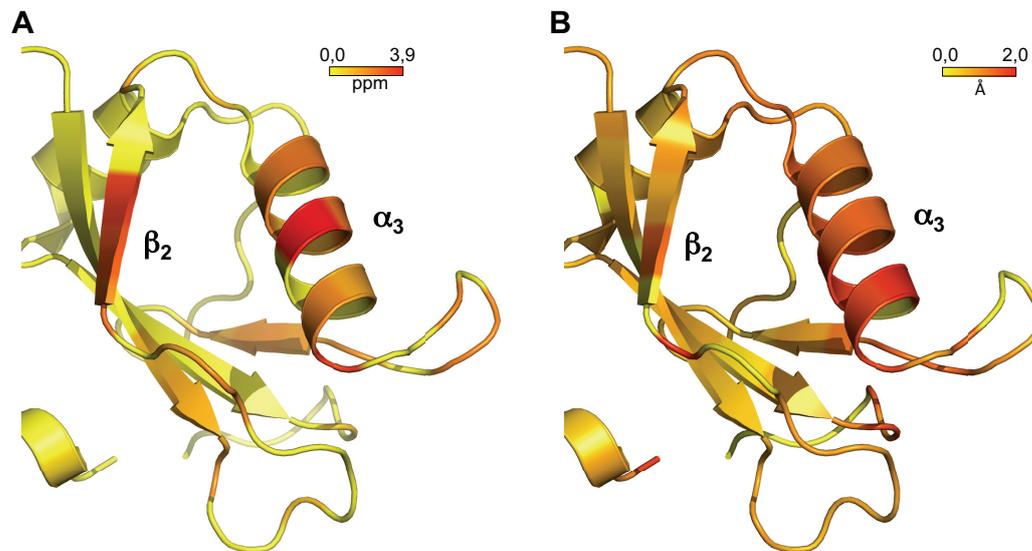
Abgesehen von der Austauschrate und der Population des angeregten Zustands sind auch Unterschiede in den Differenzen der chemischen Verschiebung  $\Delta\omega_N$  bei verschiedenen Proben festzustellen. Vallurupalli et al. (2011) weisen darauf hin, dass das Verhältnis von  $k_{ex}$  zu  $\Delta\omega$  für eine zuverlässige Auswertung Werte zwischen 1 und 2 annehmen soll [102]. Ausgehend davon, dass zumindest die Größenordnung der ermittelten  $\Delta\omega$  korrekt ist, liegen die Verhältnisse von  $k_{ex}$  zu  $\Delta\omega$  in dieser Arbeit zwischen 0,5 und 12 und sind damit für die meisten Aminosäurereste deutlich größer, wodurch Unsicherheiten bei der Auswertung von CPMG-RD-Kurven verursacht werden können. Des

Weiteren haben Schneider et al. (2015) gezeigt, dass die Werte von  $\Delta\omega$  für den Austausch einer Protein-Liganden-Interaktion in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration variieren, wobei der gleiche Trend zu beobachten ist [103]. Aufgrund der geringeren Konzentration von GABARAP während der Messungen bei 600 MHz könnte folglich auch die Konzentration einen Effekt auf die Besetzung des angeregten Zustands haben und damit die  $\Delta\omega$  beeinflussen. Denn auch für GABARAP zeigen die  $\Delta\omega_N$  für verschiedene Proben gleiche Trends. Die Größenordnung der  $\Delta\omega_{CO}$  weist darauf hin, dass der Austauschprozess nicht mit Änderungen der Sekundärstruktur einhergeht, da diese für die meisten am schnellen Austausch beteiligten Aminosäurereste weniger als 1 ppm betragen und für Sekundärstrukturänderungen größere Differenzen typisch sind [97, 98].

### 5.6.4 Funktionelle Bedeutung des schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern von GABARAP

Die hydrophobe Tasche hp2 ist für viele Interaktionen von GABARAP mit anderen Proteinen relevant [10], sodass die Dynamik der hp2 möglicherweise zu einer größeren strukturellen Flexibilität führt, welche die Bindung verschiedener Liganden gewährt. Dies ist in Übereinstimmung mit der Kristallstruktur von GABARAP in Komplex mit einem synthetischen Liganden K1, die eine Auswärtsbewegung der Helix  $\alpha_3$  im Vergleich zur GABARAP Struktur ohne Liganden aufweist [104]. Die grafische Gegenüberstellung in Abbildung 5.4 verdeutlicht, dass die Aminosäurereste des Austauschprozesses im Proteinkern von GABARAP (A) im Wesentlichen mit den Aminosäureresten übereinstimmen, die strukturelle Änderungen durch die Bindung des Liganden K1 aufweisen (B).

Falls die Interaktion mit Liganden ursächlich für den Austauschprozess ist, könnte der angeregte Zustand durch die Titration eines Bindungspartners vermehrt populiert werden. Dazu würde sich beispielsweise Tryptophan anbieten, da diese Aminosäure in sämtlichen Bindungspartnern von GABARAP konserviert ist [105]. Ein Vergleich der Vorzeichen von Änderungen der chemischen Verschiebung durch die Titration von

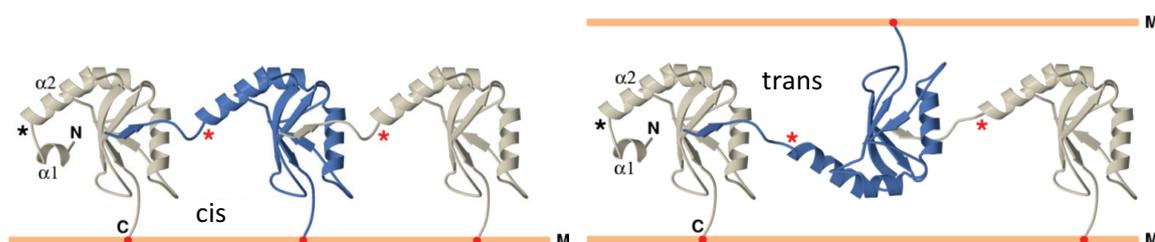


**Abbildung 5.4:** Vergrößerter Ausschnitt der hydrophoben Bindetasche hp2 in der Struktur von GABARAP (PDB-Eintrag 1GNU). A) Aminosäurereste sind in der Struktur von GABARAP gemäß der Größe von  $\Delta\omega_N$  des schnelleren Austauschprozesses farblich markiert. B) Einfärbung nach der Größe des RMSD zwischen der der Kristallstruktur von GABARAP (PDB-Eintrag 1GNU) und GABARAP in Interaktion mit dem synthetischen Liganden K1 (PDB-Eintrag 3D32).

Tryptophan zu GABARAP, die von Thielmann et al. (2008) ermittelt wurden, mit den durch H(S/M)QC ermittelten Vorzeichen zeigt eine Übereinstimmung für neun Aminosäurereste, wobei drei weitere Reste eine deutliche Verschiebung in die andere Richtung aufweisen [105]. Da GABARAP viele Interaktionspartner aufweist, ist davon auszugehen, dass sich die lokale Struktur der hp2 von GABARAP je nach Ligand leicht unterscheidet.

Der gering populierte Austauschprozess könnte außerdem für die Oligomerisierung von GABARAP bedeutsam sein. Die unter Hochsalzbedingungen von Coyle et al. (2002) kristallisierte offene Struktur von GABARAP zeigt, dass GABARAP in dieser Konformation Oligomere bildet, in denen der N-Terminus eines Moleküls in die hydrophobe Bindetasche hp2 eines benachbarten Moleküls bindet [19]. Abbildung 5.5 zeigt wie die GABARAP-Oligomere die Fusion von Membranen induzieren könnten. Für die Interaktion von GABARAP mit einem benachbarten Molekül zeigt der N-Terminus vom Proteinkern weg und interagiert mit der hydrophoben Tasche des benachbarten

Moleküls. Auch wenn die Oligomerisierung möglicherweise durch die Kristallisation bedingt ist, belegen andere nicht strukturell-basierte Studien die Relevanz der Oligomerisierung von Proteinen der Atg8 Familie für die Fusion von Membranen im Rahmen der Autophagie [17, 18]. Es wäre möglich, dass der gering populierte schnellere



**Abbildung 5.5:** Mögliches Modell von Membranfusion durch GABARAP-Oligomere in cis- (links) und trans-Verankerung (rechts) an die Membran. Die Membran ist durch die orangefarbene Linie gekennzeichnet (M). (Abbildung von Dr. Oliver Weiergräber, ICS6 nach Coyle et al. (2002))

Austauschprozess im Proteinkern mit einer Oligomerisierung in Zusammenhang steht. Zwar konnte durch Diffusionsmessung gezeigt werden, dass der hydrodynamische Radius GABARAP-Monomeren entspricht, jedoch ist die Methode nicht sensitiv wenn der Anteil an Dimeren oder Oligomeren vernachlässigbar klein gegenüber der monomeren Fraktion ist. Um tiefere Einblicke zu erlangen, könnten in weiterführenden Arbeiten Titrationsexperimente mit einem der N-terminalen Subdomäne (Aminosäuren Met1 bis Lys6) entsprechenden Peptid zu GABARAP durchgeführt werden. Falls die Konzentration des Peptids einen Einfluss auf den Austauschprozess insbesondere die Besetzung hat, so wäre dies ein Hinweis auf die Oligomerisierung.

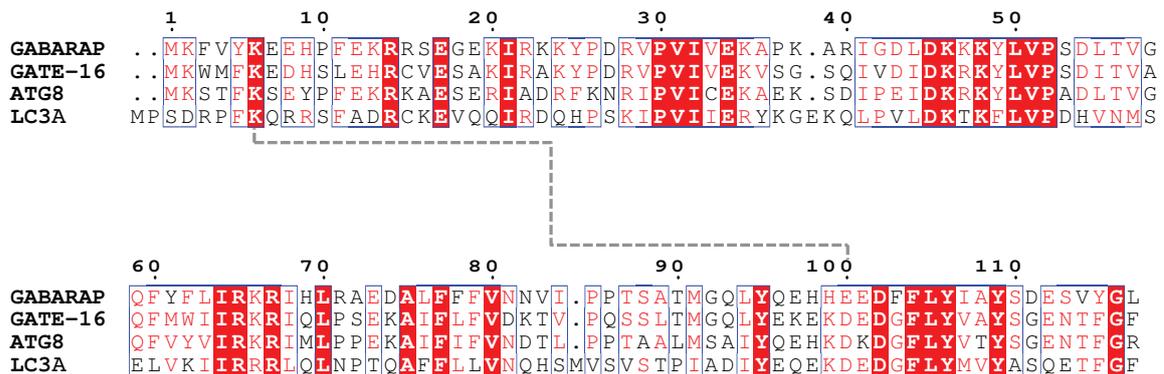
### 5.6.5 Zusammenhang des langsameren und schnelleren Austauschprozess von GABARAP

Die Tatsache, dass der angeregte Zustand des langsameren Austauschprozesses zu 44 % populiert ist und bei 25 °C einer Austauschrate von  $k_{ex} = 127 \text{ s}^{-1} \pm 4 \text{ s}^{-1}$  unterliegt, der angeregte Zustand im Proteinkern jedoch nur 0,8 % populiert ist und mit einer höheren Rate von  $k_{ex} = 725 \text{ s}^{-1} \pm 42 \text{ s}^{-1}$  austauscht lässt zunächst einmal vermuten, dass

beide Prozesse unterschiedliche funktionelle Bedeutung haben. Berücksichtigt man allerdings die FRET-Experimente, die große Konformationsänderungen des N-Terminus auf der Mikrosekundenzeitskala aufzeigen (s. Abschnitt 5.6.1), zusammen mit den durch die NMR-spektroskopische Charakterisierung aufgezeigten lokalen Änderungen des N-Terminus auf der Millisekundenzeitskala, so könnte dies ein Hinweis auf eine Korrelation der verschiedenen durch NMR-Spektroskopie ermittelten Austauschprozesse sein. Das hypothetische Modell in Abbildung 5.3 (B) suggeriert, dass die langsame Dynamik mit einem Öffnen und Schließen der Verknüpfung zwischen NHD und der UAD einhergeht. Im offenen Zustand ist der N-Terminus flexibel und ermöglicht eine Interaktion mit der hydrophoben Tasche eines benachbarten GABARAP-Moleküls. Grundsätzlich wäre es durch einen 3-Zustands-Fit möglich herauszufinden, ob der N-Terminus zusätzlich zu der langsamen Dynamik ebenfalls am schnelleren Austauschprozess beteiligt ist. In Anbetracht der Tatsache, dass der schnellere Austauschprozess an der Detektionsgrenze von CPMG-Experimenten liegt, ist die Chance die Überlagerung durch einen 3-Zustands-Fit zu detektieren jedoch minimal. Eine Überprüfung dieses Modells könnte durch NMR-spektroskopische Experimente mit PREs, GABARAP-E100A oder der Titration eines Liganden, zusammen mit fluoreszenzspektroskopischen Experimenten bei variierender Salzkonzentration oder an GABARAP-E100A erfolgen.

### 5.7 Charakterisierung von GABARAP-E100A

Die NHD ist mit der UAD in GABARAP durch intramolekulare Wechselwirkungen verknüpft. Besonders relevant scheint dabei die Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100 zu sein, da diese in den GABARAP-Homologen Gate-16 und LC3A konserviert ist. Das Alignment der Aminosäuresequenzen von GABARAP, Gate-16, Atg8 und LC3A in Abbildung 5.6 zeigt die Homologie für die Proteine der Atg8 Familie. Zwar besitzen die GABARAP-Homologen ein Asp100 anstelle eines Glu100, jedoch kann dies genauso mit Lys6 durch die Ausbildung einer Salzbrücke wechselwirken wie das Glu100. Im Hefe-Homolog Atg8 hingegen kommt es vermutlich zu keiner Ausbildung dieser Salzbrücke bzw. der Verknüpfung von der NHD mit der UAD, da der N-Terminus höchst flexibel



**Abbildung 5.6:** Sequenzhomologie von GABARAP und den Homologen GATE-16, ATG8 sowie LC3A. Die potentielle Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100 bzw. Asp100 ist durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die in roter Schrift dargestellten Reste weisen gleiche Eigenschaften bezüglich Ladung oder Hydrophobizität in GABARAP und seinen Homologen auf, während rot hinterlegte Reste vollständig konserviert sind.

auf der Mikro- bis Millisekundenzeitskala ist, was sich durch fehlende Resonanzen in dem von Schwarten et al. (2009) aufgenommenen NMR-Spektrum zeigt [106]. Wird jedoch das Lys26 zu einem Pro26 mutiert, das in den Homologen GABARAP, Gate-16 sowie LC3A vorhanden ist, kommt es zu einer Stabilisierung des N-Terminus durch die Ausbildung von helikalen Sekundärstrukturelementen, so wie es für die Homologen der Fall ist [107]. Die unter hohen Salzbedingungen erhaltene Kristallstruktur von Coyle et al. (2002) zeigt GABARAP in einer offenen und oligomeren Konformation. In dieser Konformation ist die Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100 nicht vorhanden. Des Weiteren wurden für GABARAP mittels FRET, wie bereits in Abschnitt 5.6 erwähnt, dynamische Austauschprozesse auf der Mikrosekundenzeitskala ermittelt, die eine große räumliche Änderung des N-Terminus implizieren. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde die Variante GABARAP-E100A erstellt, in der die Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100 nicht ausgebildet werden kann, um einen möglichen funktionellen Zusammenhang zu der N-terminalen Dynamik herzustellen. Wang et al. zeigten bereits im Jahr 2000, dass die Interaktion des N-Terminus von GABARAP mit Tubulin durch erhöhte Salzkonzentrationen (400 mM NaCl) verhindert wird [9]. Im Gegensatz zu GABARAP

und LC3A zeigt Atg8, das einen flexiblen unstrukturierten N-Terminus besitzt, keine Interaktion mit Tubulin, was auf einen Zusammenhang zwischen der N-terminalen Dynamik und der Interaktion mit Liganden hindeutet [108, 109].

Das [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von GABARAP-E100A zeigt bei 25 °C keine Resonanzen der N-terminalen Aminosäurereste. Bei einer Temperaturverringerung auf 10 °C sind einzelne N-terminale Resonanzen sichtbar, die jedoch ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen. Interessanterweise zeigen die N-terminalen Resonanzen bei 10 °C keine Aufspaltung, wie es für das wt GABARAP der Fall ist. Stattdessen ist nur eine Resonanz sichtbar, die dem Zustand B des Multipletts im wt GABARAP entspricht. Diese Unterschiede der Linienform weisen auf Änderungen des N-terminalen Austauschprozesses hin. Um auszuschließen, dass sich lediglich die Rate des Austauschprozesses geändert hat und die Resonanzen aufgrund von maximaler Linienverbreiterung nicht sichtbar sind, wie es im Koaleszenzregime der Fall sein könnte, wurden [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektren bei Temperaturen von 10 °C bis 40 °C aufgenommen. In keinem der Spektren treten zusätzliche Resonanzen auf (Spektren nicht gezeigt). Es wäre möglich, dass GABARAP über den N-Terminus oligomerisiert und dadurch die Resonanzen bei einer Temperaturerhöhung auf 25 °C verschwinden.

Die Herstellung von GABARAP-E100A erweist sich durch die signifikanten Änderungen der N-terminalen Dynamik folglich als sehr interessant um die Frage zu beantworten, ob GABARAP unter bestimmten Bedingungen tatsächlich oligomerisiert. Vertiefende Einblicke können durch die Charakterisierung der Dynamik mittels CPMG-RD sowie Diffusionsmessungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius erlangt werden.

## 5.8 Nanodisk-verankertes GABARAP

### 5.8.1 Assemblierung von Nanodisk-verankertem GABARAP

Vor der Nanodiskassemblierung wurde zunächst lipidiertes GABARAP durch eine Maleimidkopplung von GABARAP-G116C $\Delta$ 117 und MPB-PE hergestellt. Der Vorteil

gegenüber der enzymatischen Lipidierung besteht darin, dass die Lipidierung vollständig kontrollierbar ist und die Enzyme Atg3 und Atg7 nicht benötigt werden. Bisher wurde die enzymatische Lipidierung lediglich mit Konzentrationen von etwa  $10\mu\text{M}$  GABARAP bzw. GABARAP-Homologen an Liposomen durchgeführt [110, 111]. Nath et al. (2014) haben gezeigt, dass Atg3 eine für die Membrankrümmung sensitive Domäne besitzt und daher an flachen Membranen, wie es bei Nanodisks der Fall wäre inaktiv ist [110]. Grundsätzlich besteht jedoch die Möglichkeit das Enzym Atg3 durch eine Mutation auch für flache Membranen zu aktivieren [110]. Da die fusogene Funktion von lipidiertem GABARAP durch das Einfügen der Cysteinmutation jedoch nicht beeinflusst wird, war die Herstellung von lipidiertem GABARAP durch die Maleimidkoppelung im Hinblick auf eine für die NMR-Spektroskopie notwendige hohe Konzentration im sub-millimolaren Bereich die Methode der Wahl [18].

Für die Herstellung der Nanodisks wurde das verkürzte Konstrukt des MSP1D1-Proteins, das MSP1D1 $\Delta$ 5 verwendet. Das MSP1D1 $\Delta$ 5 entspricht dem MSP1D1, aus dem die Aminosäuren 121 bis 142 durch Mutation entfernt wurden [25]. Mit dem verkürzten Konstrukt lassen sich Nanodisks mit einem geringeren hydrodynamischen Durchmesser von etwa 9,2 nm herstellen, was für die NMR-Spektroskopie von Vorteil ist [25]. Das Molekulargewicht einer leeren MSP1D1 $\Delta$ 5-Nanodisk beträgt 95 kDa im Vergleich zu 124 kDa einer MSP1D1-Nanodisk [25]. Rein stöchiometrisch befinden sich an den in dieser Arbeit hergestellten Nanodisks je zwei GABARAP Moleküle an einer Nanodisk, sodass eine GABARAP-Nanodisk ein Molekulargewicht von 123 kDa aufweist. Die Aufreinigung assemblierter monodisperser GABARAP-Nanodisks wurde zunächst über eine Gelfiltration sichergestellt. Das Elutionsvolumen einer Gelfiltration dieser GABARAP-Nanodisks mit einer HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule beträgt 58 ml bis 74 ml und ist damit kleiner als das leere assemblierter MSP1D1 $\Delta$ 5-Nanodisks, die bei einem Volumen von 72 ml eluieren [83]. Das verringerte Elutionsvolumen deutet auf einen größeren hydrodynamischen Radius von etwa 9,7 nm hin und liefert somit einen Hinweis auf die erfolgreiche Verankerung des GABARAP an die Nanodisks. Da neben dem monodispersen Elutionspeak bei 58 ml bis 74 ml ansonsten keine erhöhten

Absorptionswerte bei 280 nm sichtbar waren, ist von einer nahezu vollständigen Verankerung des verwendeten GABARAPs an die Nanodisks auszugehen. Ebenso ist kein freies MSP1D1Δ5 vorhanden, was darauf hindeutet, dass ein geeignetes Verhältnis von MSP1D1Δ5 zu Lipiden gewählt wurde. Eine SDS-PAGE diente der weiteren Verifizierung, dass der Elutionspeak tatsächlich Nanodisk-verankertes GABARAP enthält. Da das lipidierte GABARAP schneller läuft als unlipidiertes GABARAP, sind die Banden in einer SDS-PAGE von denen des etwa 18 kDa großen MSP1D1Δ5 unterscheidbar. Bei einer Konzentration von 300 μM waren die Nanodisks auch nach erfolgten NMR-Messungen noch stabil, was durch eine analytische Gelfiltration überprüft wurde.

Es ist bekannt, dass Proteine in Nanodisks aufgrund des großen Molekulargewichts kleine transversale Relaxationszeiten aufweisen und demnach zu stark linienverbreiterten Resonanzen in NMR-Spektren führen, die auch bei der Verwendung von TROSY-Pulssequenzen signifikant verbreitert sind [112]. Eine Verringerung der Linienbreite ist durch die Verwendung der kleineren Nanodisks mit MSP1D1Δ5 zu erwarten [25]. Des Weiteren handelt es sich bei GABARAP-Nanodisks um eine Verankerung und das GABARAP wird nicht integral in die Nanodisk eingebaut, sodass die TROSY-Spektren von GABARAP an der Nanodisk insbesondere bei 40 °C schärfere Resonanzen aufweisen, als es für ein 123 kDa großes Molekül zu erwarten wäre. So sind die Resonanzen im TROSY-Spektrum bei 40 °C von Nanodisk verankertem GABARAP gegenüber denen des freien GABARAP kaum linienverbreitert. Wichtig für ein großes Signal-zu-Rausch-Verhältnis war dabei insbesondere jedoch die hohe Temperatur von 40 °C. Denn zum einen liegt diese Temperatur oberhalb der Phasenübergangtemperatur der DMPC-Nanodisks (etwa 30 °C) und zum anderen ist die transversale Relaxationszeit der GABARAP-Nanodisks im Vergleich zu 25 °C vergrößert [113, 114]. Die chemischen Verschiebungen von Nanodisk-verankertem GABARAP verändern sich im Vergleich zu freiem GABARAP lediglich für die Aminosäurereste Lys38, Asn82, Tyr115 und Gly116 in der Nähe der Verankerung, was mit der Beobachtung von Ma et al. (2010) übereinstimmt, die ein HSQC-Spektrum von Nanodisk-verankertem GABARAP mit N-terminalen Überhang aufgenommen haben [115]. Der N-terminale Überhang, welcher aufgrund der Thrombin-Schnittstelle in dem von Ma et al. (2010) verwendeten

GABARAP vorliegt, hat daher auch keinen Einfluss auf die Struktur von Nanodisk-verankertem GABARAP.

### 5.8.2 CPMG-RD-Experimente von GABARAP $\Delta$ 117 zeigen die gleichen Austauschprozesse wie das wt GABARAP

Neben dem GABARAP Wildtyp wurde außerdem die Millisekundendynamik von GABARAP $\Delta$ 117 untersucht, das bei der enzymatischen Lipidierung von GABARAP als Zwischenprodukt entsteht. Dies war wichtig um mögliche Änderungen der Dynamik durch eine Nanodisk-Verankerung eindeutig auf die Membranumgebung zurückzuführen und nicht auf die Deletion des Leu117. Dazu wurden  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Experimente bei Temperaturen von 15 °C, 25 °C sowie 35 °C bei zwei verschiedenen Feldstärken aufgenommen. Diese Experimente wurden an 1,0 mM GABARAP $\Delta$ 117 durchgeführt. Das GABARAP $\Delta$ 117 besitzt die gleichen Austauschprozesse wie das wt GABARAP. So konnte zum einen der langsamere Austauschzustand im N-Terminus und der benachbarten Schleife ermittelt werden, der eine ähnliche Besetzung beider Austauschzustände aufweist und zum anderen der schnellere gering populierte Austauschprozess in der Region der hydrophoben Bindetasche hp2. Die Besetzung des langsameren Prozesses beträgt wie für das wt GABARAP  $p_B = 44\%$  und auch die Austauschraten unterscheiden sich lediglich im Rahmen des Fehlers. Für den schnelleren Austauschprozess hingegen ergeben sich für GABARAP $\Delta$ 117 um etwa 1,5-fach höhere Raten und die Besetzung der Zustände ist um 0,1 bis 0,2 % geringer. Während die Änderung von Rate und Besetzung vermutlich auf leicht andere Pufferbedingungen zurückzuführen sind, würde man für die Differenz der chemischen Verschiebung ähnliche Werte erwarten, wenn es sich um den gleichen Austauschprozess handelt. Insgesamt liefert der Fit der CPMG-RD-Kurven von GABARAP $\Delta$ 117 kleinere  $\Delta\omega$  Werte. Eine grafische Auftragung der  $\Delta\omega$  für den wt und die Deletionsvariante zeigt jedoch die Korrelation der Werte, was darauf hindeutet, dass es sich höchstwahrscheinlich um den gleichen Austauschprozess handelt. Die Ursache für die Diskrepanzen könnten beispielsweise leicht unterschiedliche Salz- oder Proteinkonzentrationen sein. Fehler sind jedoch auch

dadurch möglich, dass die Besetzung von weniger als 1% am unteren Limit dessen liegt, was mit Hilfe von CPMG-RD-Experimenten nachweisbar ist. Zwar steigt die Besetzung mit Erhöhung der Temperatur auf bis zu 1,3% an, jedoch wird der Prozess dann so schnell, dass man dann bezüglich der Rate an die Nachweisgrenze (etwa  $2000\text{ s}^{-1}$ ) von CPMG-RD-Experimenten gerät.

### 5.8.3 Austauschprozesse auf der Millisekundenzeitskala existieren auch in Nanodisk-verankertem GABARAP

Um zu beurteilen, ob der langsamere Austauschprozess, der in den NMR-Spektren von GABARAP eine Peakaufspaltung verursacht, auch in dem Nanodisk-verankerten GABARAP vorhanden ist, wurde zunächst die Linienform betroffener Resonanzen verglichen. Die Linienform der vom langsameren Austausch betroffenen Resonanzen ändert sich für das Nanodisk-verankerte GABARAP nicht. Dieser Austauschzustand bleibt daher durch die Lipidierung sowie die Verankerung an Nanodisk unbeeinflusst. Für Atg8, das GABARAP-Homolog in der Hefe wird angenommen, dass die Lipidierung eine Konformationsänderung der NHD verursacht [116]. Die Aussage beruht auf der unterschiedlichen Bindungsaffinität an einen Antikörper, der spezifisch für den N-Terminus von Atg8 ist. Dies ist nicht mit dem in dieser Arbeit charakterisierten Austauschprozess im N-Terminus von GABARAP korreliert. Es ist aber nicht auszuschließen, dass zusätzliche dynamische Prozesse vorhanden sind, die von den langsamen N-terminalen Austausch überdeckt werden.

Für die Beurteilung des gering populierte schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern wurde ein TROSY-CPMG-Spektrum bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgenommen. Eine Literaturrecherche hat ergeben, dass CPMG-Experimente an einem Protein in einem Protein-Nanodisk-Komplex im Rahmen dieser Arbeit das erste mal durchgeführt wurden.

Aufgrund des großen Molekulargewichts von etwa 123 kDa und der damit verbundenen schnellen transversalen Relaxation ist die Aufnahme von CPMG-Spektren eine anspruchsvolle Aufgabe, dennoch war ein Versuch unter Verwendung kleiner Nanodisks und TROSY-CPMG-Experimenten für GABARAP sinnvoll, da GABARAP lediglich

an der Nanodisk verankert ist und damit möglicherweise eine langsamere transversale Relaxation zeigt, als ein in die Nanodisk integriertes Protein. Obwohl die Resonanzen der TROSY-Spektren von Nanodisk-verankertem GABARAP wie bereits erwähnt bei 40 °C eine ähnliche Linienbreite wie die des freien GABARAP aufweisen, führt das im TROSY-CPMG eingefügte Relaxations-Zeitintervall zu einem niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Das Relaxations-Zeitintervall wurde im Vergleich zum freien GABARAP um 12 ms verkürzt um den Signalverlust zu minimieren. Dennoch war die exakte Auswertung der Relaxationsdispersionkurven für die Bestimmung der Austauschrate und Population des angeregten Zustands nicht möglich. Die Relaxationsdispersion von Lys48 und Arg68 ist beispielsweise erkennbar und es ist folglich davon auszugehen, dass auch die Dynamik im Proteinkern weiterhin besteht. Eine Auswertung der Kinetik war jedoch aufgrund des zu großen Fehlers der effektiven Raten nicht möglich. Bei genauerer Betrachtung der CPMG-RD-Kurven fällt auf, dass die effektive Relaxationsrate  $R_{eff}$  für hohe CPMG-Frequenzen im Falle der Nanodisks etwa vier mal so groß ist wie die von freiem GABARAP (vgl. Abb. 4.52 A, B und Abb. 4.53 A, B). Dies ist auf die kürzere transversale Relaxationszeit der Nanodisks zurückzuführen, da sich  $R_{eff,\infty}$  dem Wert der transversalen Relaxationsrate  $R_2$  annähert.

Die TROSY-CPMG-Spektren haben einen Einblick in die Dynamik von Nanodisk-verankertem GABARAP gewährt, der in zukünftigen Arbeiten durch die Verankerung von deuteriertem GABARAP vertieft werden kann. Denn Hagn et al. (2013) haben gezeigt, dass eine Deuterierung die Qualität der NMR-Spektren von Proteinen in Nanodisk deutlich erhöht [25]. Durch die Verwendung deuterierter Proteine und die Anwendung von TROSY-CPMG-Experimenten konnte demnach bereits chemischer Austausch in Proteinen mit großem Molekulargewicht nachgewiesen und charakterisiert werden [117]. Durch Methyl-TROSY-CPMG-Experimente gelang es, chemischen Austausch in einem Exosom-Komplex von 173 kDa zu quantifizieren [118].

Weitere Möglichkeiten die Dynamik von GABARAP in Membran-ähnlicher Umgebung zu untersuchen sind durch die Wahl der Lipide gegeben. So könnte eine mögliche Oligomerisierung von GABARAP an Nanodisks auch von der Lipidkomposition abhängen, da bereits *in vitro* Studien der Lipidierung von Atg8, GABARAP und anderen

Proteinen der gleichen Familie eine Abhängigkeit der Lipidkomposition gezeigt haben [116, 110]. Nath et al. (2014) konnten zeigen, dass die Lipidkomposition insbesondere für die enzymatische Lipidierung relevant ist, da das für die Lipidierung notwendige Enzym Atg3 eine Sensordomäne für die Membrankrümmung besitzt. Die Lipidierung erfolgt demnach am besten bei einer PE-Konzentration von mindestens 30 % [116, 110]. Allerdings spielt auch die Ladung der Lipide eine Rolle, da die *in vitro* Lipidierung von Atg8 auch bei geringeren PE-Konzentrationen durch die Verwendung von 10 % bis 20 % negativ geladenen Aminosäurereste Phosphatidylglycerol (PG) oder Phosphatidylinositol (PI) deutlich effektiver ist [116].

## 6 Ausblick

Die Charakterisierung der internen Dynamik von GABARAP auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala erfolgte im Rahmen dieser Arbeit und darüber hinaus durch eine Kooperation umfassend und ist damit abgeschlossen. Das im Rahmen dieser Kooperation etablierte integrierte Konzept vereint die komplementären experimentellen Methoden der NMR- und Fluoreszenzspektroskopie sowie die MD-Simulation zur Charakterisierung von Proteindynamiken auf der Piko- bis Nanosekundenzeitskala. Dies soll zukünftig im Rahmen des SFB 1208 auf die Charakterisierung langsamerer Mikro- bis Millisekundendynamik erweitert werden.

GABARAP unterliegt auf der Mikro- bis Millisekundenzeitskala einem langsameren Austauschprozess zwischen zwei nahezu gleich besetzten Zuständen, sowie einem schnelleren Austauschprozess mit einem gering populierte angeregten Zustand von lediglich 0,8 % bei 25 °C. Ausgehend von den identifizierten und umfangreich charakterisierten Austauschprozessen ergeben sich sämtliche Möglichkeiten die Gleichgewichtszustände durch verschiedene Bedingungen gezielt zu beeinflussen, um so tiefere Einblicke in die biologische Funktion dieser Austauschzustände zu erlangen.

Der langsamere Austauschprozess ist im N-Terminus, der angrenzenden Schleife und Teilen von  $\beta_1$  und  $\beta_2$  lokalisiert. Durch die Herstellung von GABARAP-E100A, das die Ausbildung der Salzbrücke zwischen Lys6 der NHD und Glu100 der UAD verhindert, scheint ein Zustand des im wt GABARAP langsameren Austauschprozesses stabilisiert zu sein. Die weitere Charakterisierung dieser Variante durch CPMG-RD-Experimente könnte interessante Details über die funktionelle Relevanz dieser Dynamik und eine mögliche Oligomerisierung liefern.

Die großen Konformationsänderungen des N-Terminus von GABARAP, die durch FRET-Experimente im Rahmen der Kooperation mit der AG von Prof. Dr. C. Seidel (HHU) ermittelt wurden, weisen ebenfalls darauf hin, dass die Verbindung der NHD und der UAD durch die Salzbrücke zwischen Lys6 und Glu100 nicht vollständig stabil sein kann. Diese durch FRET ermittelte Dynamik findet auf der Mikrosekundenzeitskala statt und wurde durch die NMR-Experimente nicht entdeckt. Für die NMR-spektroskopische Charakterisierung von Mikrosekundendynamik, die mit großen Konformationsänderungen einhergeht eignen sich PRE-Experimente, die zur Validierung und weiteren Analyse der mittels FRET ermittelten Dynamik des N-Terminus von GABARAP geplant sind.

Die Tatsache, dass die Austauschkinetik des schnelleren gering populierte Zustands im Proteinkern von GABARAP für unterschiedliche Proben leicht variiert, könnte auf eine Änderung der Dynamik in Abhängigkeit des Puffers hindeuten. Es wäre daher äußerst interessant diese Abhängigkeit im Detail zu überprüfen, indem beispielsweise die Auswirkung einer gezielten Änderung der Salzkonzentration auf die Population des angeregten Zustands quantifiziert wird. Falls die Dynamik in der hp2 mit einer möglichen Homo-Oligomerisierung verknüpft ist, würde sich die Population vermutlich durch die Variation der GABARAP-Konzentration oder auch durch die Titration eines Liganden, der dem N-Terminus von GABARAP entspricht beeinflussen lassen, da die Aminosäuren 1–6 von GABARAP laut Coyle et al. (2002) mit der Region der hp2 interagieren.

Da die CPMG-RD-Experimente von Nanodisk-verankertem GABARAP ebenfalls Hinweise auf die im freien GABARAP detektierten Austauschprozesse liefern, ist die Herstellung von deuteriertem Nanodisk-verankerten GABARAP für die Quantifizierung der Austauschkinetik besonders interessant. Dies eröffnet ein weites Feld zur Charakterisierung der Dynamik bei verschiedenen Lipidzusammensetzungen, beispielsweise unter Verwendung negativ geladener Lipide wie PI oder PG, die eine effizientere enzymatische Lipidierung bewirken, mit dem Ziel den Zusammenhang zwischen Konformationsänderungen und Funktionen in der Autophagie herzustellen.

# A Anhang

## Erweitere Zuordnung von $^1\text{H}^N$ und $^{15}\text{N}$ -Resonanzen

**Tabelle A.1:** Erweitere Zuordnung von aufgespaltenen  $^1\text{H}^N$ - und  $^{15}\text{N}$ -Resonanzen. Gezeigt sind die chemischen Verschiebungen des jeweils intensivitätsstärksten Signals eines Multipletts.

Aminosäure	$^1\text{H}^N$ [ppm]	$^{15}\text{N}$ [ppm]
Val4	11,81	134,92
Tyr5	10,60	122,86
Val6	6,98	110,74
Glu7	7,66	117,44
Glu8	7,79	116,32
His9	7,15	117,14
Phe11	9,41	124,80
Glu100	8,88	120,73
Glu101	9,53	121,70
Asp102	7,83	114,91

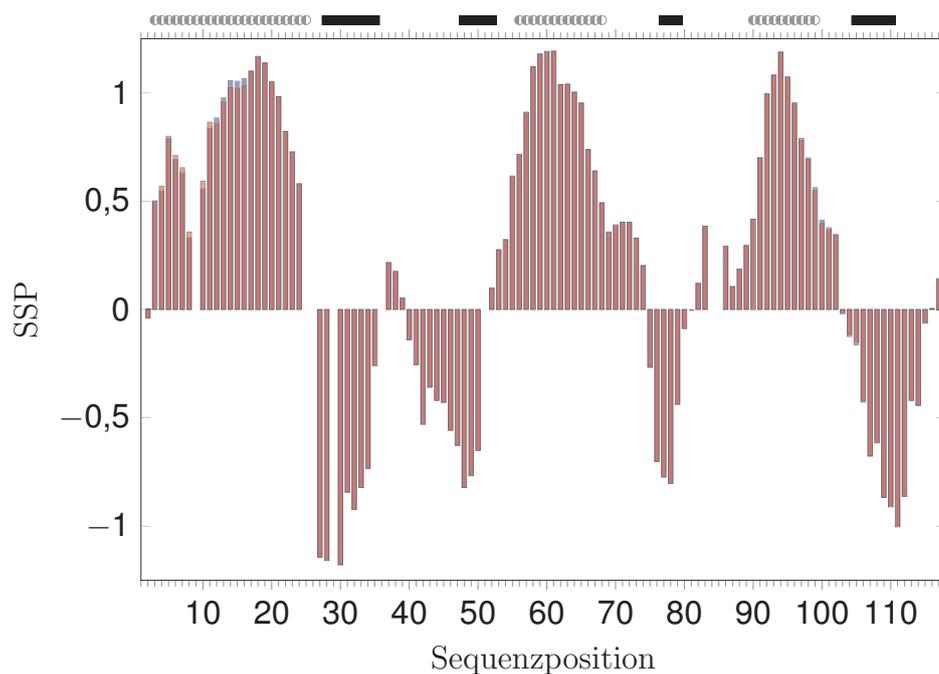
## Gemessene $\Delta\omega$ des langsamen Austauschprozesses von GABARAP

**Tabelle A.2:**  $\Delta\omega$  der  $^1\text{H}^N$  und  $^{15}\text{N}$  Kerne des langsamen Austauschprozesses von GABARAP bestimmt aus einem  $[^1\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC bei 10 °C.

Aminosäure	$\Delta\omega_H$ [ppm]	$\delta\Delta\omega_H$ [ppm]	$\Delta\omega_N$ [ppm]	$\delta\Delta\omega_N$ [ppm]
Val4	-0,11	0,01	-0,69	0,01
Tyr5	0,17	0,01	0,14	0,01
Lys6	0,08	0,01	0,35	0,01
Glu7	0,04	0,01	0,28	0,01
Glu8	-0,29	0,01	0,70	0,01
His9	0,13	0,01	0,89	0,01
Phe11	-0,06	0,01	-0,46	0,01
Lys13	0,16	0,01	0,03	0,01
Arg14	0,14	0,01	-0,62	0,01
Arg15	-0,13	0,01	-0,48	0,01
Leu17	-0,10	0,01	-0,04	0,01
Glu19	0,06	0,01	-0,01	0,01
Lys20	-0,07	0,01	0,01	0,01
Val29	-0,01	0,01	-0,23	0,01
Leu51	-	-	0,24	0,01
Glu100	-0,01	0,01	-0,34	0,01
Glu101	-0,11	0,01	-0,43	0,01
Asp102	-0,02	0,01	-0,54	0,01
Phe103	0,03	0,01	0,29	0,01
Phe104	-0,05	0,01	-0,32	0,01
Leu105	-0,07	0,01	0,01	0,01

**Tabelle A.3:**  $\Delta\omega$  der  $^{13}\text{CO}$  und  $^{13}\text{C}^\alpha$  Kerne des langsamen Austauschprozesses von GABARAP bestimmt aus einem 3D HNC0 und 3D HNCA bei 10 °C.

Aminosäure	$\Delta\omega_{CO}$ [ppm]	$\delta\Delta\omega_{CO}$ [ppm]	$\Delta\omega_{C^\alpha}$ [ppm]	$\delta\Delta\omega_{C^\alpha}$ [ppm]
Val4	0,08	0,09	-	-
Tyr5	0,51	0,09	0,2	0,09
Lys6	-0,26	0,09	-	-
Glu7	0,05	0,09	-	-
Glu8	0,04	0,09	-0,17	0,09
His9	-	-	0,20	0,09
Phe 11	-0,30	0,09	-0,47	0,09
Glu12	0,09	0,09	-	-
Lys13	0,12	0,09	-0,02	0,09
Arg14	0,72	0,09	-0,61	0,09
Arg15	-	-	-0,03	0,09
Leu17	0,00	0,09	-	-
Glu19	0,00	0,09	-	-
Lys20	-0,00	0,09	-	-
His98	0,08	0,09	-	-
Glu100	0,07	0,09	-	-
Glu101	-0,2	0,09	-0,13	0,09
Asp102	-	-	-0,11	0,09
Phe103	-0,07	0,09	-	-
Phe104	-0,05	0,09	-0,09	0,09
Leu105	-	-	-0,03	0,09



**Abbildung A.1:** Berechnete SSP auf Grundlage der chemischen Verschiebungen von CO- und  $C^\alpha$ -Kernen des zu 56% populierte Zustands (blau) und des zu 44% populierte Austauschzustands (rot). Positive Werte weisen auf eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur hin, während negative Werte typisch für  $\beta$ -Stränge sind. Zur Berechnung wurde das Programm ssp verwendet [56]. Das Schema oberhalb der Abbildung zeigt die tatsächliche Sekundärstruktur von GABARAP (PDB-Eintrag 1GNU).

## Fitparameter der CPMG-RD-Experimente

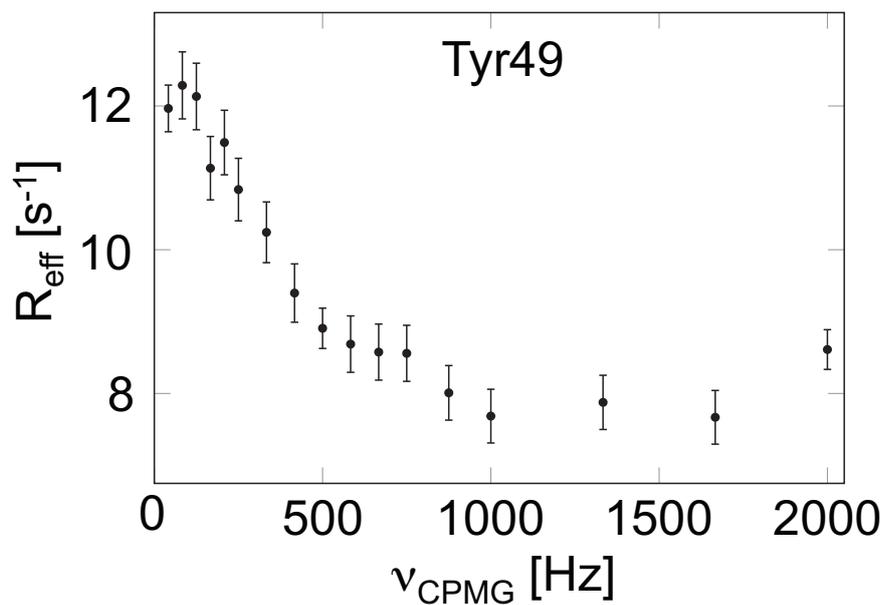
### $^{15}\text{N}$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP

**Tabelle A.4:** Fitparameter der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven des langsameren Austauschprozesses von GABARAP bei Temperaturen von 15 °C bis 35 °C.

reduziertes $\chi^2 = 3,1$		
Temperatur [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]
15	44	-
25	44	-
35	44	-
Temperatur [°C]	$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
15	66	3
25	127	4
35	389	12
Aminosäure	$ \Delta\omega $ [ppm]	$\delta\Delta\omega$ [ppm]
Glu7	0,44	0,01
Glu8	0,60	0,03
His9	0,78	0,03
Arg14	0,64	0,01
Arg15	0,55	0,02
Val29	0,35	0,01
Val31	0,22	0,01
Ile41	0,25	0,01
Val51	0,36	0,01
Glu100	0,51	0,01
Glu102	0,56	0,01
Phe103	0,30	0,01
Phe104	0,27	0,01

**Tabelle A.5:** Fitparameter der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven des schnelleren Austauschprozesses im Proteinkern von GABARAP bei Temperaturen von 15 °C bis 40 °C.

reduziertes $\chi^2 = 1,52$		
Temperatur [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]
15	0,76	0,04
25	0,80	0,02
35	1,0	0,02
40	1,30	0,03
Temperatur [°C]	$k_{ex}$ [s $^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [s $^{-1}$ ]
15	607	57
25	725	42
35	1304	42
40	2005	34
Aminosäure	$\Delta\omega$ [ppm]	$\delta\Delta\omega$ [ppm]
Val33	1,01	0,03
Glu34	1,26	0,03
Lys35	1,39	0,03
Ala36	1,87	0,03
Ala39	1,10	0,03
Leu44	1,69	0,03
Asp45	1,87	0,15
Lys46	1,42	0,03
Lys48	2,23	0,04
Tyr49	2,57	0,05
Leu50	2,97	0,13
Ser53	1,33	0,03
Leu55	1,03	0,03
Gly58	1,99	0,04
Gln59	1,71	0,03
Phe60	1,89	0,04
Tyr61	1,12	0,03
Phe62	2,04	0,04
Leu63	3,99	0,08
Lys66	1,32	0,03
Arg67	1,81	0,03
Ile68	2,99	0,05
Arg 71	1,77	0,03
Glu73	2,00	0,05
Asp74	2,10	0,03
Leu76	1,89	0,03
Phe77	1,70	0,04
Phe78	1,95	0,04
Phe79	1,33	0,03
Asp111	1,00	0,04



**Abbildung A.2:** Anstieg von CPMG-RD-Kurven für  $\nu_{\text{CPMG}} > 1000$  Hz aufgenommen an einem Bruker Spektrometer mit einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz bei 40 °C am Beispiel von Tyr49. Dieser Anstieg ist auf einen Hardwarefehler zurückzuführen. Für den Fit der CPMG-RD-Kurven wurden die Datenpunkte für  $\nu_{\text{CPMG}} > 1000$  Hz nicht berücksichtigt, wenn die effektiven Raten einen Anstieg aufweisen.

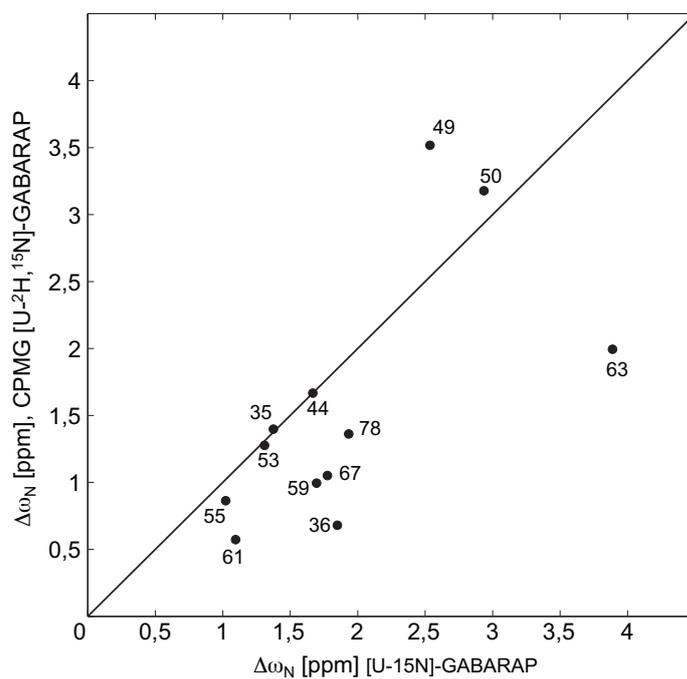
$^1\text{H}^N$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP

**Tabelle A.6:** Fitparameter der  $^1\text{H}^N$ -CPMG-RD-Kurven des langsamen Austauschprozesses bei 25 °C. Die  $^1\text{H}^N$ -CPMG-RD-Kurven wurden zusammen mit  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven gemessen. Die Aufnahme erfolgte jeweils an der gleichen Probe bei einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz und 900 MHz.

reduziertes $\chi^2 = 3,2$				
$p_B$ [%]		$\delta p_B$ [%]		
44		-		
$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]		$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]		
251		7		
Aminosäure	$ \Delta\omega_N $ [ppm]	$\delta\Delta\omega_N$ [ppm]	$ \Delta\omega_H $ [ppm]	$\delta\Delta\omega_H$ [ppm]
Tyr5	0,24	0,04	0,08	0,01
Glu7	0,41	0,01	0,04	0,01
Lys13	0,12	0,01	0,11	0,01
Glu17	0,11	0,01	0,08	0,01
Gly18	0,06	0,01	0,03	0,01
Glu19	0,00	0,01	0,04	0,01
Val29	0,27	0,01	0,02	0,01
His99	0,28	0,01	0,04	0,01
Glu100	0,42	0,01	0,02	0,01
Asp102	0,49	0,01	0,02	0,01
Phe103	0,26	0,01	0,02	0,01
Phe104	0,26	0,01	0,03	0,01
Leu105	0,04	0,06	0,05	0,08

**Tabelle A.7:** Fitparameter der  $^1\text{H}^N$ -CPMG-RD-Kurven des schnelleren Austauschprozesses bei 25 °C. Die  $^1\text{H}^N$ -CPMG-RD-Kurven wurden zusammen mit  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven gemessen. Die Aufnahme erfolgte jeweils an der gleichen Probe bei einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz und 900 MHz.

reduziertes $\chi^2 = 1,82$				
$p_B$ [%]		$\delta p_B$ [%]		
0,53		0,02		
$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]		$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]		
1087		56		
Aminosäure	$ \Delta\omega_N $ [ppm]	$\delta\Delta\omega_N$ [ppm]	$ \Delta\omega_H $ [ppm]	$\delta\Delta\omega_H$ [ppm]
Lys35	1,40	0,10	0,13	0,02
Ala36	0,68	0,10	0,17	0,02
Gly42	1,87	0,10	0,20	0,02
Leu44	1,87	0,10	0,22	0,02
Asp45	1,567	0,12	0,15	0,04
Tyr49	3,52	0,19	0,25	0,02
Leu50	3,18	0,17	0,47	0,05
Ser53	1,28	0,09	0,18	0,02
Leu55	0,86	0,10	0,23	0,02
Thr56	0,87	0,10	0,20	0,02
Gln59	0,99	0,10	0,23	0,03
Tyr61	0,57	0,13	0,26	0,02
Leu63	1,99	0,11	0,41	0,03
Arg65	0,27	0,03	0,27	0,02
Lys66	0,71	0,12	0,33	0,02
Arg67	1,05	0,02	0,26	0,02
Phe78	1,36	0,10	0,38	0,03
Val83	1,40	0,10	0,42	0,03

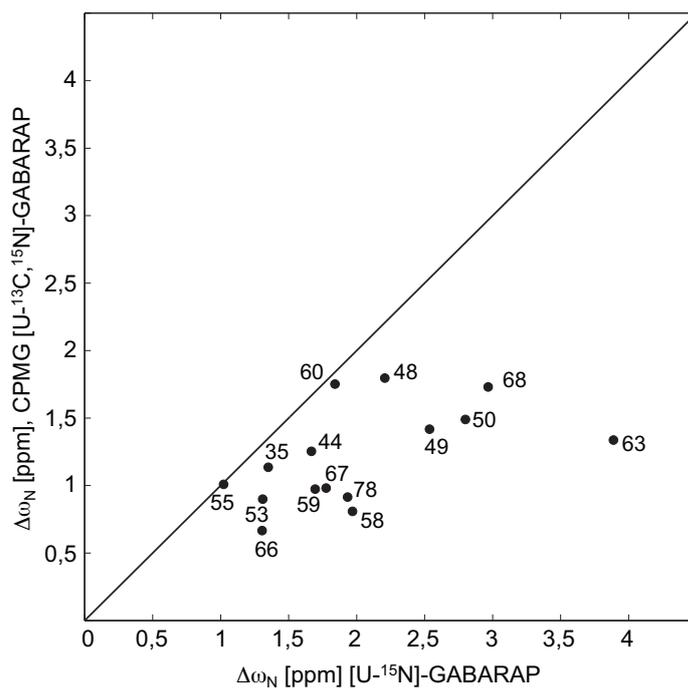


**Abbildung A.3:** Korrelation der gefitteten  $\Delta\omega_N$  von  $[\text{U-}^{15}\text{N}, ^2\text{H}]$ -GABARAP aufgetragen gegen die ermittelten  $\Delta\omega_N$  aus den Experimenten von  $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -GABARAP bei verschiedenen Temperaturen. Gezeigt sind die Aminosäuren, die für beide Proben übereinstimmend dem schnellen Austauschprozess zugeordnet werden konnten. Die Diagonale ist durch die durchgezogene Linie gekennzeichnet.

**$^{13}\text{CO}$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP**

**Tabelle A.8:** Fitparameter der  $^{13}\text{CO}$ -CPMG-RD-Kurven des schnelleren Austauschprozesses bei 25 °C. Die  $^{13}\text{CO}$ -CPMG-RD-Kurven wurden zusammen mit  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven gemessen. Die Aufnahme erfolgte jeweils an der gleichen Probe bei einer Protonenlarmorfrequenz von 600 MHz und 800 MHz.

reduziertes $\chi^2 = 2,3$				
$p_B$ [%]		$\delta p_B$ [%]		
1,20		0,08		
$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]		$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]		
903		55		
Aminosäure	$ \Delta\omega_N $ [ppm]	$\delta\Delta\omega_N$ [ppm]	$ \Delta\omega_{CO} $ [ppm]	$\delta\Delta\omega_{CO}$ [ppm]
Glu35	1,14	0,07	0,31	0,08
Leu44	1,25	0,07	0,55	0,06
Lys48	1,80	0,10	0,57	0,08
Tyr49	1,42	0,09	0,58	0,14
Leu50	1,49	0,09	0,52	0,11
Ser53	0,90	0,08	0,32	0,05
Leu55	1,03	0,06	0,39	0,06
Gly58	0,81	0,07	0,40	0,06
Gln59	0,97	0,07	1,35	0,16
Phe60	1,75	0,11	0,81	0,07
Leu63	1,34	0,14	1,39	0,14
Lys66	0,67	0,08	0,85	0,09
Arg67	0,98	0,07	0,58	0,09
Arg68	1,73	0,11	0,42	0,06
Phe78	0,91	0,06	0,43	0,10



**Abbildung A.4:** Korrelation der gefitteten  $\Delta\omega_N$  von [U- $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-GABARAP aufgetragen gegen die ermittelten  $\Delta\omega_N$  aus den Experimenten von [U- $^{15}\text{N}$ ]-GABARAP bei verschiedenen Temperaturen. Gezeigt sind die Aminosäuren, die für beide Proben übereinstimmend dem schnellen Austauschprozess zugeordnet werden konnten. Die Diagonale ist durch die durchgezogene Linie gekennzeichnet.

$^{15}\text{N}$ -CPMG-Fitparameter von GABARAP $\Delta$ 117**Tabelle A.9:** Fitparameter der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven des langsameren Austauschprozesses von GABARAP $\Delta$ 117 bei Temperaturen von 15 °C bis 35 °C.

$\chi^2 = 2,8$		
Temperatur [°C]	$p_B$	$\delta p_B$
15	44	-
25	44	-
35	44	-
Temperatur [°C]	$k_{ex}$ [s $^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [s $^{-1}$ ]
15	48	1
25	119	3
35	366	10
Aminosäure	$ \Delta\omega $ [ppm]	$\delta\Delta\omega$ [ppm]
Glu7	0,43	0,01
Glu8	0,66	0,02
His9	0,94	0,02
Arg14	0,69	0,02
Arg15	0,56	0,02
Val29	0,32	0,01
Val31	0,16	0,01
Val51	0,32	0,01
Glu100	0,52	0,01
Glu102	0,57	0,01
Phe103	0,28	0,01
Phe104	0,27	0,01

**Tabelle A.10:** Fitparameter der  $^{15}\text{N}$ -CPMG-RD-Kurven des schnelleren Austauschprozesses von GABARAP $\Delta$ 117 bei Temperaturen von 15 °C bis 35 °C.

$\chi^2 = 1,7$		
Temperatur [°C]	$p_B$ [%]	$\delta p_B$ [%]
15	0,50	0,03
25	0,78	0,05
35	1,11	0,08
Temperatur [°C]	$k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$\delta k_{ex}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
15	899	113
25	1116	71
35	1610	70
Aminosäure	$ \Delta\omega $ [ppm]	$\delta\Delta\omega$ [ppm]
Val33	0,57	0,12
Glu34	1,33	0,07
Lys35	1,12	0,06
Ala36	1,53	0,08
Ala39	0,73	0,08
Leu44	1,69	0,08
Lys46	1,14	0,06
Lys48	2,20	0,10
Tyr49	1,66	0,08
Leu50	1,85	0,10
Ser53	1,09	0,06
Leu55	0,65	0,08
Gly58	1,59	0,07
Gln59	1,17	0,06
Phe60	1,10	0,07
Tyr61	0,88	0,06
Phe62	1,66	0,08
Leu63	2,43	0,12
Lys66	0,85	0,06
Arg67	1,46	0,07
Ile68	2,49	0,12
Arg71	1,42	0,08
Glu73	1,46	0,09
Asp74	1,37	0,06
Leu76	1,51	0,07
Phe77	1,25	0,08
Phe78	1,32	0,06
Phe79	1,07	0,06
Asp111	0,74	0,08

Vorzeichen von  $\Delta\omega_N$  des schnelleren Austauschprozesses

**Tabelle A.11:** Berechnung der erwarteten Differenzen von chemischen Verschiebungen  $\sigma_N$  aus dem Vergleich von HSQC-Spektren bei 600 MHz und 900 MHz. Die Berechnung erfolgte gemäß Gleichung 3.30 bei Temperaturen von 15 °C bis 40 °C auf Grundlage der ermittelten  $\Delta\omega_N$  des Fits der CPMG-RD-Kurven (s. Tab. A.5.)

Aminosäure	$\sigma_N$ [ppm] 15 °C	$\sigma_N$ [ppm] 25 °C	$\sigma_N$ [ppm] 35 °C	$\sigma_N$ [ppm] 40 °C
Val33	0,00055	0,00138	0,00146	0,00056
Glu34	0,00102	0,00196	0,00194	0,00102
Lys35	0,00132	0,00223	0,00213	0,00133
Ala36	0,00273	0,00292	0,00253	0,00273
Ala39	0,00071	0,00160	0,00165	0,00071
Leu44	0,00214	0,00271	0,00243	0,00214
Asp45	0,00276	0,00293	0,00254	0,00276
Lys46	0,00138	0,00227	0,00216	0,00138
Lys48	0,00403	0,00318	0,00262	0,00403
Tyr49	0,00528	0,00328	0,00260	0,00528
Leu50	0,00686	0,00327	0,00251	0,00686
Ser53	0,00116	0,00209	0,00203	0,00116
Leu55	0,00059	0,00143	0,00150	0,00059
Gly58	0,00314	0,00303	0,00258	0,00314
Gln59	0,00220	0,00274	0,00244	0,00220
Phe60	0,00269	0,00291	0,00253	0,00269
Tyr61	0,00071	0,00160	0,00165	0,00071
Phe62	0,00332	0,00307	0,00260	0,00332
Leu63	0,01023	0,00302	0,00220	0,01023
Lys66	0,00114	0,00207	0,00202	0,00114
Arg67	0,00249	0,00285	0,00250	0,00249
Ile68	0,00701	0,00327	0,00250	0,00701
Arg71	0,00242	0,00282	0,00249	0,00242
Glu73	0,00318	0,00304	0,00258	0,00318
Asp74	0,00354	0,00311	0,00260	0,00354
Leu76	0,00279	0,00294	0,00255	0,00279
Phe77	0,00217	0,00272	0,00244	0,00217
Phe78	0,00300	0,00300	0,00257	0,00300
Phe79	0,00118	0,00211	0,00205	0,00118
Asp111	0,00056	0,00138	0,00146	0,00056

# Abkürzungen

---

---

3D	dreidimensional
ATG	Autophagy-related
a. u.	arbitrary units
BMRB	BioMagResBank
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSA	Chemical Shift Anisotropy
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DSS	4,4-Dimethyl-4-silapentan-5-Sulfonsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FID	Free Induction Decay
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	Rezeptor für $\gamma$ -Aminobuttersäure Typ A
GABARAP	GABA <sub>A</sub> -Rezeptor assoziiertes Protein
HHU	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
INEPT	Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer

## Abkürzungen

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
MD	Molekulardynamik
MPB-PE	11,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide]
ms	Millisekunden
MSP	Membrane Scaffold Protein
N-Terminus	Amino-Terminus
NHD	N-terminale helikale Subdomäne
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ns	Nanosekunden
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	Preautophagosomal Structure
PDB	Protein Data Bank
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PG-SLED	Pulse Gradient Stimulated Echo Longitudinal Encode-Decode
PI	Phosphatidylinositol
PRE	Paramagnetische Relaxationsverstärkung
ps	Pikosekunden
RD	Relaxationsdispersion

## Abkürzungen

---

red.	reduziert
RF	Radiofrequenz
RMSD	Root Mean Square Deviation
SP	Sulfopropyl
SSP	Secondary Structure Propensity
Temp	Temperatur
TROSY	Transverse relaxation optimized spectroscopy
UAD	Ubiquitin-artige Subdomäne
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

Für Aminosäuren wurde der Ein- und Dreibuchstabencode verwendet:

---

---

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Aspartat	Asp	D	Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutamat	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

---

# Publikationen und Präsentationen

## Publikationen

1) C. Möller, J. Kubiak, O. Schillinger, R. Kühnemuth, D. Della Corte, G. Schröder, D. Willbold, B. Strodel, C. A. M. Seidel, and P. Neudecker: Dynamics of the Autophagy-related Protein GABARAP on the Pico- to Nanosecond Time-scale by NMR and Fluorescence Spectroscopy in Concert with Molecular Dynamics Simulations – in Bearbeitung

2) A. Boeske, M. Schwarten, P. Ma , M. Tusche , J. Mötter , N. Diehl, P. Neudecker, C. Möller, C. Hoppen, J. Sanwald, W. Kaisers, H. Schaal, S. Hoffmann, D. Willbold: GABARAPs not LC3s are essential for HIV-1 Nef anterograde transport and secretion: insights into ATG8 protein mediated unconventional protein secretion – eingereicht

## Präsentationen

### Posterpräsentationen

C. Möller, Jakub Kubiak, Peixiang Ma, Melanie Schwarten, Claus Seidel, Dieter Willbold, Philipp Neudecker: Conformational Dynamics of the Autophagy-related Protein GABARAP on Multiple Time-Scales, EUROMAR Konferenz, 5. - 10. Juli 2015, Prag, Tschechien

C. Möller, Peixiang Ma, Melanie Schwarten, Dieter Willbold, Philipp Neudecker: Conformational Dynamics of the Autophagy-related Protein GABARAP on Multiple Time-Scales, EMBO Workshop Structure Determination of Biological Macromolecules by Solution NMR, 20. - 27. Juli 2013, Basel, Schweiz

C. Möller, Peixiang Ma, Melanie Schwarten, Dieter Willbold, Philipp Neudecker: Conformational Dynamics of the Autophagy-related Protein GABARAP on Multiple Time-Scales, 54<sup>th</sup> Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference (ENC), 14. - 19. April 2013, Pacific Grove, Kalifornien, USA

### Vortrag

Präsentation eines Vortrags auf dem bio-N<sup>3</sup>MR Meeting, 19. September 2014, Essen

# Literaturverzeichnis

- [1] W. H. Yu, A. M. Cuervo, A. Kumar, C. M. Peterhoff, S. D. Schmidt, J.-H. Lee, P. S. Mohan, M. Mercken, M. R. Farmery, L. O. Tjernberg, Y. Jiang, K. Duff, Y. Uchiyama, J. Näslund, P. M. Mathews, A. M. Cataldo, R. A. Nixon. Macroautophagy - a novel  $\beta$ -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.*, 171(1), (2005) 87–98.
- [2] B. Levine. Cell Biology: Autophagy and Cancer. *Nature*, 446, (2007) 745–747.
- [3] N. Mizushima. Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), (2007) 2861–2873.
- [4] M. Schwarten, J. Mohrlüder, P. Ma, M. Stoldt, Y. Thielmann, T. Stangler, N. Hersch, B. Hoffmann, R. Merkel, D. Willbold. Nix directly binds to GABARAP. *Autophagy*, 5, (2009) 690–698.
- [5] M. R. Slobodkin, Z. Elazar. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays In Biochemistry*, 55, (2013) 51–64.
- [6] S. Subramani, J.-C. Farré. A Ubiquitin-like Protein Involved in Membrane fusion. *Cell*, 130, (2007) 18–20.
- [7] H. Wang, F. K. Bedford, N. J. Brandon, S. J. Moss, R. W. Olsen. GABA<sub>A</sub>-receptor-associated protein links GABA<sub>A</sub> receptors and the cytoskeleton. *Nature*, 397(6714), (1999) 69–72.
- [8] T. A. Leil, Z.-W. Chen, C.-S. S. Chang, R. W. Olsen. GABA<sub>A</sub> Receptor-Associated Protein Traffics GABA<sub>A</sub> Receptors to the Plasma Membrane in Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 24(50), (2004) 11429–11438.

- [9] H. Wang, R. W. Olsen. Binding of the GABA<sub>A</sub> Receptor-Associated Protein (GABARAP) to Microtubules and Microfilaments Suggests Involvement of the Cytoskeleton in GABARAP GABA<sub>A</sub> Receptor Interaction. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), (2000) 644–655.
- [10] O. H. Weiergräber, J. Mohrlüder, D. Willbold. *Atg8 Family Proteins — Autophagy and Beyond*. in *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* (2013).
- [11] D. Knight, R. Harris, M. McAlister, J. Phelan, S. Geddes, S. Moss, P. Driscoll, N. Keep. The X-ray crystal structure and putative ligand-derived peptide binding properties of  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor type A receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.*, 277(7), (2002) 5556–5561.
- [12] J. Mohrlüder, M. Schwarten, D. Willbold. Structure and potential function of  $\epsilon$ -aminobutyrate type A receptor-associated protein. *FEBS Journal*, 276, (2009) 4989–5005.
- [13] P. Ma, M. Schwarten, L. Schneider, A. Boeske, N. Henke, D. Lisak, S. Weber, J. Mohrlüder, M. Stoldt, B. Strodel, A. Methner, S. Hoffmann, O. H. Weiergräber, D. Willbold. Interaction of Bcl-2 with the Autophagy-related GABA<sub>A</sub> Receptor-associated Protein (GABARAP): BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS. *J. Biol. Chem.*, 288(52), (2013) 37204–37215.
- [14] F. Green, T. O'Hare, A. Blackwell, C. A. Enns. Association of human transferrin receptor with GABARAP. *FEBS Letters*, 518, (2002) 101–106.
- [15] J. L. Cook, R. N. Re, D. L. deHaro, J. M. Abadie, M. Peters, J. Alam. The trafficking protein GABARAP binds to and enhances plasma membrane expression and function of the angiotensin AT(1) receptor. *Circulation research*, 102(12), (2008) 1539–1547.

- [16] C. Chen, Y. Wang, P. Huang, L.-Y. Liu-Chen. Effects of C-terminal Modifications of GEC1 Protein and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A (GABA<sub>A</sub>) Receptor-associated Protein (GABARAP), Two Microtubule-associated Proteins, on  $\kappa$ -Opioid Receptor Expression. *J. Biol. Chem.*, 286(17), (2011) 15106–15115.
- [17] H. Nakatogawa, Y. Ichimura, Y. Ohsumi. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell*, 130, (2007) 165–178.
- [18] H. Weidberg, T. Shpilka, E. Shvets, A. Abada, F. Shimron, Z. Elazar. LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. *Developmental Cell*, 20, (2011) 444–454.
- [19] J. E. Coyle, S. Qamar, K. R. Rajashankar, D. B. Nikolov. Structure of GABARAP in Two Conformations: Implications for GABA<sub>A</sub> Receptor Localization and Tubulin Binding. *Neuron*, 33, (2002) 63–74.
- [20] M. Schwarten, M. Stoldt, J. Mohrlüder, D. Willbold. Solution structure of Atg8 reveals conformational polymorphism of the N-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 395, (2010) 426–431.
- [21] Y. Paz, Z. Elazar, D. Fass. Structure of GATE-16, Membrane Transport Modulator and Mammalian Ortholog of Autophagocytosis Factor Aut7p. *J. Biol. Chem.*, 275(33), (2000) 25445–25450.
- [22] T. Kouno, K. Miura, T. Kanematsu, M. Shirakawa, M. Hirata, K. Kawano. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments of GABARAP, GABA<sub>A</sub> receptor associated protein. *J. Biomol. NMR*, 22(1), (2002) 97–98.
- [23] T. Stangler, L. Mayr, D. Willbold. Solution structure of human GABA(A) receptor-associated protein GABARAP: implications for biological function and its regulation. *J. Biol. Chem.*, 277(16), (2002) 13363–6.

- [24] T. H. Bayburt, Y. V. Grinkova, S. G. Sligar. Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Letters*, 2, (2002) 853–856.
- [25] F. Hagn, M. Etzkorn, T. Raschle, G. Wagner. Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(5), (2013) 1919–1925.
- [26] A. Nath, W. Atkins, S. Sligar. Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry*, 46(8), (2007) 2059–2069.
- [27] A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95(1), (1980) 1–6.
- [28] K. Wüthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun. Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.*, 155(3), (1982) 311–319.
- [29] T. Havel, K. Wüthrich. A distance geometry program for determining the structures of small proteins and other macromolecules from nuclear magnetic resonance measurements of intramolecular  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  proximities in solution. *Bulletin of Mathematical Biology*, 46(4), (1984) 673–698.
- [30] K. Wüthrich, G. Wagner. Internal motion in globular proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 3(4), (1978) 227–230.
- [31] A. Mittermaier, L. E. Kay. New Tools Provide New Insights in NMR Studies of Protein Dynamics. *Science*, 312, (2006) 224–228.
- [32] M. Zeeb, J. Balbach. Protein folding studied by real-time NMR spectroscopy. *Methods*, 34(1), (2004) 65–74.

- [33] A. Palmer. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chem. Rev.*, 104(8), (2004) 3623–3640.
- [34] R. Ishima, D. Torchia. Protein dynamics from NMR. *Nat. Struct. Biol.*, 7(9), (2000) 740–743.
- [35] I. R. Kleckner, M. P. Foster. An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814(8), (2011) 942–968.
- [36] H. Hogben, M. Krzystyniak, G. Charnock, P. Hore, I. Kuprov. Spinach – A software library for simulation of spin dynamics in large spin systems. *J. Mag. Res.*, 208(2), (2011) 179–194.
- [37] H. Y. Carr, E. M. Purcell. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.*, 94, (1954) 630–638.
- [38] S. Meiboom, D. Gill. Modified Spin Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.*, 29, (1958) 688–691.
- [39] Z. Luz, S. Meiboom. Nuclear Magnetic Resonance study of the protolysis of trimethylammonium ion in aqueous solution—order of the reaction with respect to solvent. *J. Chem. Phys.*, 39, (1963) 366–370.
- [40] P. Loria, M. Rance, A. Palmer. A Relaxation-Compensated Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequence for Characterizing Chemical Exchange by NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, (1999) 2331–2332.
- [41] P. Neudecker, P. Lundström, L. E. Kay. Relaxation dispersion NMR spectroscopy as a tool for detailed studies of protein folding. *Biophysical Journal*, 96, (2009) 2045–2054.
- [42] P. Neudecker, P. Robustelli, A. Cavalli, P. Walsh, P. Lundström, A. Zarrine-Afsar, S. Sharpe, M. Vendruscolo, L. E. Kay. Structure of an Intermediate State in Protein Folding and Aggregation. *Science*, 336, (2012) 362–366.

- [43] D. D. Boehr, D. McElheny, H. J. Dyson, P. E. Wright. The dynamic energy landscape of dihydrofolate reductase catalysis. *Science*, 313, (2006) 1638–1642.
- [44] P. M. Hwang, L. E. a. Kay. Solution Structure and Dynamics of Integral Membrane Proteins by NMR: A Case Study Involving the Enzyme PagP. *Methods Enzymol.*, 394, (2005) 335–350.
- [45] A. G. r. Palmer, C. D. Kroenke, J. P. Loria. Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods Enzymol.*, 339, (2001) 204–238.
- [46] J.-P. Demers, A. Mittermaier. Binding Mechanism of an SH3 Domain Studied by NMR and ITC. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, (2009) 4355–4367.
- [47] V. Orekhov, I. Ibraghimov, M. Billeter. MUNIN: a new approach to multi-dimensional NMR spectra interpretation. *J. Biomol. NMR.*, 20(1), (2001) 49–60.
- [48] D. M. Korzhnev, I. V. Ibraghimov, M. Billeter, V. Y. Orekhov. MUNIN: application of three-way decomposition to the analysis of heteronuclear NMR relaxation data. *J. Biomol. NMR*, 21(3), (2001) 263–268.
- [49] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR*, 6, (1995) 277–293.
- [50] B. Johnson, R. Blevins. NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR*, 4, (1994) 603–614.
- [51] E. J. d’Auvergne, P. R. Gooley. The use of model selection in the model-free analysis of protein dynamics. *J. Biomol. NMR*, 25(1), (2003) 25–39.
- [52] E. J. d’Auvergne, P. R. Gooley. Model-free model elimination: A new step in the model-free dynamic analysis of NMR relaxation data. *J. Biomol. NMR*, 35(2), (2006) 117–135.

- [53] E. J. d’Auvergne, P. R. Gooley. Set theory formulation of the model-free problem and the diffusion seeded model-free paradigm. *Mol. BioSyst.*, 3(7), (2007) 483–393.
- [54] E. J. d’Auvergne, P. R. Gooley. Optimisation of NMR dynamic models I. Minimisation algorithms and their performance within the model-free and Brownian rotational diffusion spaces. *J. Biomol. NMR*, 40(2), (2008) 107–119.
- [55] E. J. d’Auvergne, P. R. Gooley. Optimisation of NMR dynamic models II. A new methodology for the dual optimisation of the model-free parameters and the Brownian rotational diffusion tensor. *J. Biomol. NMR*, 40(2), (2008) 121–133.
- [56] J. A. Marsh, V. K. Singh, Z. Jia, J. D. Forman-Kay. Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between alpha- and gamma-synuclein: implications for fibrillation. *Protein Sci.*, 15(12), (2006) 2795–2804.
- [57] P. Dosset, J.-C. Hus, M. Blackledge, D. Marion. Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J. Biomol. NMR*, 16, (2000) 23–28.
- [58] J. Sambrook, E. F. E. F. Fritsch, T. Maniatis, C. S. H. Laboratory. *Molecular cloning : a laboratory manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). First ed. by T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook.
- [59] M. Pavlidou, K. Hänel, L. Möckel, D. Willbold. Nanodiscs allow phage display selection for ligands to non-linear epitopes on membrane proteins. *PLoS One*, 8(9), (2013) e72272.
- [60] M. Findeisen, T. Brand, S. Berger. A  $^1\text{H}$ -NMR thermometer suitable for cryoprobes. *Magn. Reson. Chem.*, 45, (2007) 175–178.
- [61] D. K. Wilkins, S. B. Grimshaw, V. Receveur, C. M. Dobson, J. A. Jones, L. J. Smith. Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry*, 38(50), (1999) 16424–16431.

- [62] W.-Y. Choy, F. A. A. Mulder, K. A. Crowhurst, D. R. Muhandiram, I. S. Millett, S. Doniach, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay. Distribution of molecular size within an unfolded state ensemble using small-angle X-ray scattering and pulse field gradient NMR techniques. *J. Mol. Biol.*, 316(1), (2002) 101–112.
- [63] A. S. Altieri, D. P. Hinton, R. A. Byrd. Association of Biomolecular Systems via Pulsed Field Gradient NMR Self-Diffusion Measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(28), (1995) 7566–7567.
- [64] P. Neudecker. Strukturbestimmung von Birkenpollenallergenen und birkenpollenassoziierten Nahrungsmittelallergenen mit NMR-Spektroskopie. *Dissertation, Universität Bayreuth*.
- [65] J. H. Cho, J. Urquidi, S. Singh, G. W. Robinson. Thermal Offset Viscosities of Liquid H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O, and T<sub>2</sub>O. *J. Phys. Chem.*, 103, (1999) 1991–1994.
- [66] A. Ortega, D. Amorós, J. G. de la Torre. Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophysical Journal*, 101, (2011) 892–898.
- [67] G. M. Clore, A. Szabo, A. Bax, L. E. Kay, P. C. Driscoll, A. M. Gronenborn. Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 112(12), (1990) 4989–4991.
- [68] G. Lipari, A. Szabo. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.*, 104(17), (1982) 4559–4570.
- [69] G. Lipari, A. Szabo. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.*, 104(17), (1982) 4546–4559.
- [70] N. Farrow, R. Muhandham, A. Singer, S. Pascal, C.M.Kay, G.Gish, S.E.Shoelson, T. Pawson, J. Forman-Kay, L. Kay. Backbone Dynamics of a Free and a

- Phosphopeptide-Complexed Src Homology 2 Domain Studied by  $^{15}\text{N}$  NMR Relaxation. *Biochemistry*, 33, (1994) 5984–6003.
- [71] D. Korzhnev, N. Skrynnikov, O. Millet, D. Torchia, L. Kay. An NMR Experiment for the Accurate Measurement of Heteronuclear Spin-Lock Relaxation Rates. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, (2002) 10743–10753.
- [72] L. E. Kay, D. A. Torchia, A. Bax. Backbone dynamics of proteins as studied by  $^{15}\text{N}$  inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 28(23), (1989) 8972–8979.
- [73] A. K. Mittermaier, L. E. Kay. Observing biological dynamics at atomic resolution using NMR. *Trends Biochem. Sci.*, 34(12), (2009) 601–611.
- [74] N. A. Farrow, O. Zhang, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay. A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of  $^{15}\text{N}$  longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium. *J. Biomol. NMR*, 4, (1994) 727–734.
- [75] R. Ishima, D. A. Torchia. Extending the range of amide proton relaxation dispersion experiments in proteins using a constant-time relaxation-compensated CPMG approach. *J. Biomol. NMR*, 25, (2003) 243–248.
- [76] P. Lundström, D. F. Hansen, L. E. Kay. Measurement of carbonyl chemical shifts of excited protein states by relaxation dispersion NMR spectroscopy: comparison between uniformly and selectively  $^{13}\text{C}$  labeled samples. *J. Biomol. NMR*, 42, (2008) 35–47.
- [77] F. A. A. Mulder, N. R. Skrynnikov, B. Hon, F. W. Dahlquist, L. E. Kay. Measurement of Slow ( $\mu\text{s}$ -ms) Time Scale Dynamics in Protein Side Chains by  $^{15}\text{N}$  Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy: Application to Asn and Gln Residues in a Cavity Mutant of T4 Lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, (2001) 967–975.

- [78] N. R. Skrynnikov, F. W. Dahlquist, L. E. Kay. Reconstructing NMR Spectra of Invisible Excited Protein States Using HSQC and HMQC Experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, (2002) 12352–12360.
- [79] T. Stangler, L. Mayr, A. Dingley, C. Luge, D. Willbold. Sequence-specific  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  resonance assignments of human GABA receptor associated protein. *J. Biomol. NMR*, 21(2), (2001) 183–184.
- [80] N. Pawley, C. Wang, S. Koide, L. Nicholson. An improved method for distinguishing between anisotropic tumbling and chemical exchange in analysis of  $^{15}\text{N}$  relaxation parameters. *J. Biomol. NMR*, 20(2), (2001) 149–65.
- [81] D. E. Woessner. Nuclear Spin Relaxation in Ellipsoids Undergoing Rotational Brownian Motion. *J. Chem. Phys.*, 37(3), (1962) 647–654.
- [82] C. R. Cantor, P. R. Schimmel. *Biophysical Chemistry*. Abschnitt 10.2, New York (1980).
- [83] L. Moeckel. Strukturelle Charakterisierung des Vpr-Proteins aus dem humanen Immundefizienz Virus vom Typ-2. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [84] J. Mohrlüder. Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen. *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [85] M. J. Stone, K. Chandrasekhar, A. Holmgren, P. E. Wright, H. J. Dyson. Comparison of backbone and tryptophan side-chain dynamics of reduced and oxidized *Escherichia coli* thioredoxin using  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation measurements. *Biochemistry*, 32(2), (1993) 426–435.
- [86] R. N. Day, F. Schaufele. Fluorescent protein tools for studying protein dynamics in living cells: a review. *J. Biomed. Opt.*, 13(3), (2008) 031202.

- [87] P. Ma, O. Schillinger, M. Schwarten, J. Lecher, R. Hartmann, M. Stoldt, J. Mohrlüder, O. Olubiyi, B. Strodel, D. Willbold, O. H. Weiergraber. Conformational Polymorphism in Autophagy-Related Protein GATE-16. *Biochemistry*, 54(35), (2015) 5469–5479.
- [88] T. Shpilka, H. Weidberg, S. Pietrokovski, Z. Elazar. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol.*, 12(7), (2011) 226.
- [89] S. C. Sahu, A. K. Bhuyan, A. Majumdar, J. B. Udgaonkar. Backbone dynamics of barstar: a  $^{15}\text{N}$  NMR relaxation study. *Proteins*, 41(4), (2000) 460–474.
- [90] C. Li, G. J. Pielak. Using NMR to distinguish viscosity effects from nonspecific protein binding under crowded conditions. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(4), (2009) 1368–1369.
- [91] P. Damberg, J. Jarvet, P. Allard, U. Mets, R. Rigler, A. Gräslund.  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  NMR relaxation and fluorescence anisotropy decay study of tyrosine dynamics in motilin. *Biophysical Journal*, 83(5), (2002) 2812–2825.
- [92] V. Pacheco, P. Ma, Y. Thielmann, R. Hartmann, O. H. Weiergräber, J. Mohrlüder, D. Willbold. Assessment of GABARAP self-association by its diffusion properties. *J. Biomol. NMR*, 48, (2010) 49–58.
- [93] A. S. Parmar, M. Muschol. Hydration and Hydrodynamic Interactions of Lysozyme: Effects of Chaotropic versus Kosmotropic Ions. *Biophysical Journal*, 97(2), (2009) 590–598.
- [94] J. García De La Torre, M. L. Huertas, B. Carrasco. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophysical Journal*, 78(2), (2000) 719–730.
- [95] T. M. Logan, E. T. Olejniczak, R. X. Xu, S. W. Fesik. A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments. *Journal of Biomolecular NMR*, 3(2), (1993) 225–231.

- [96] S. Grzesiek, A. Bax. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 3(2), (1993) 185–204.
- [97] D. S. Wishart, B. D. Sykes. The  $^{13}\text{C}$  chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using  $^{13}\text{C}$  chemical-shift data. *J. Biomol. NMR*, 4(2), (1994) 171–180.
- [98] Y. Wang, O. Jardetzky. Probability-based protein secondary structure identification using combined NMR chemical-shift data. *Protein Sci.*, 11(4), (2002) 852–861.
- [99] G. M. Clore, J. Iwahara. Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes. *Chem. Rev.*, 109(9), (2009) 4108–4139.
- [100] G. M. Clore. Practical Aspects of Paramagnetic Relaxation Enhancement in Biological Macromolecules. *Methods Enzymol.*, 564, (2015) 485–497.
- [101] S.-y. Kawaguchi, T. Hirano. Sustained structural change of GABA(A) receptor-associated protein underlies long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *Journal of Neuroscience*, 27(25), (2007) 6788–6799.
- [102] P. Vallurupalli, G. Bouvignies, L. E. Kay. Increasing the exchange time-scale that can be probed by CPMG relaxation dispersion NMR. *J. Phys. Chem. B.*, 115(49), (2011) 14891–14900.
- [103] R. Schneider, D. Maurin, G. Communie, J. Kragelj, D. F. Hansen, R. W. H. Ruigrok, M. R. Jensen, M. Blackledge. Visualizing the molecular recognition trajectory of an intrinsically disordered protein using multinuclear relaxation dispersion NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, 137(3), (2015) 1220–1229.

- [104] O. H. Weiergräber, T. Stangler, Y. Thielmann, J. Mohrlüder, K. Wiesehan, D. Willbold. Ligand Binding Mode of GABA<sub>A</sub> Receptor-Associated Protein. *J. Mol. Biol.*, 381, (2008) 1320–1331.
- [105] Y. Thielmann, J. Mohrlüder, B. W. König, T. Stangler, R. Hartmann, K. Becker, H.-D. Höltje, D. Willbold. An Indole-Binding Site is a Major Determinant of the Ligand Specificity of the GABA Type A Receptor-Associated Protein GABARAP. *ChemBioChem*, 9, (2008) 1767–1775.
- [106] M. Schwarten, M. Stoldt, J. Mohrlüder, D. Willbold. Sequence-specific <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignment of the autophagy-related protein Atg8. *Biomol. NMR Assign.*, 3(1), (2009) 137–139.
- [107] H. Kumeta, M. Watanabe, H. Nakatogawa, M. Yamaguchi, K. Ogura, W. Adachi, Y. Fujioka, N. N. Noda, Y. Ohsumi, F. Inagaki. The NMR structure of the autophagy-related protein Atg8. *J. Biomol. NMR*, 47(3), (2010) 237–241.
- [108] S. S. Mann, J. A. Hammarback. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.*, 269(15), (1994) 11492–11497.
- [109] T. Lang, E. Schaeffeler, D. Bernreuther, M. Bredschneider, D. H. Wolf, M. Thumm. Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *The EMBO Journal*, 17(13), (1998) 3597–3607.
- [110] S. Nath, J. Dancourt, V. Shteyn, G. Puente, W. M. Fong, S. Nag, J. Bewersdorf, A. Yamamoto, B. Antony, T. J. Melia. Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nature Cell Biology*, 16(5), (2014) 415–424.
- [111] A. Jotwani, D. N. Richerson, I. Motta, O. Julca-Zevallos, T. J. Melia. Approaches to the study of Atg8-mediated membrane dynamics in vitro. *Methods Cell Biol.*, 108, (2012) 93–116.

- [112] J. M. Glück, M. Wittlich, S. Feuerstein, S. Hoffmann, D. Willbold, B. W. König. Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(34), (2009) 12060–12061.
- [113] A. W. Shaw, M. A. McLean, S. G. Sligar. Phospholipid phase transitions in homogeneous nanometer scale bilayer discs. *{FEBS} Letters*, 556(1–3), (2004) 260–264.
- [114] G. S. Rule, T. K. Hitchens. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*. Springer Netherlands (2006).
- [115] P. Ma, J. Mohrlüder, M. Schwarten, M. Stoldt, S. K. Singh, R. Hartmann, V. Pacheco, D. Willbold. Preparation of a functional GABARAP-lipid conjugate in nanodiscs and its investigation by solution NMR spectroscopy. *Chembiochem*, 11(14), (2010) 1967–1970.
- [116] Y. Ichimura, Y. Imamura, K. Emoto, M. Umeda, T. Noda, Y. Ohsumi. In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *J. Biol. Chem.*, 279(39), (2004) 40584–40592.
- [117] A. G. Palmer, M. J. Grey, C. Wang. Solution NMR spin relaxation methods for characterizing chemical exchange in high-molecular-weight systems. *Methods Enzymol.*, 394, (2005) 430–465.
- [118] M. J. C. Audin, G. Dorn, S. A. Fromm, K. Reiss, S. Schutz, M. K. Vorlander, R. Sprangers. The archaeal exosome: identification and quantification of site-specific motions that correlate with cap and RNA binding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 52(32), (2013) 8312–8316.

# Danksagungen

Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich ganz besonders für die Möglichkeit im ICS-6 zu promovieren. Nur durch die Bereitstellung der sehr gut ausgestatteten Labore und der leistungsstärksten NMR-Spektrometer war die erfolgreiche Bearbeitung des Promotionsprojektes möglich.

Ein außerordentlicher Dank gilt Dr. Philipp Neudecker dafür, dass er mir als NMR-Neuling die komplexe Welt der NMR-Spektroskopie schnell nahe gebracht hat. Dies ist nicht zuletzt seinem unerschöpflichen Wissen zu verdanken, ohne das die Messung und Auswertung der Fülle an NMR-Experimenten in der Zeit nicht möglich gewesen wäre. Bei Problemen oder Herausforderungen mit dem Spektrometer war Dr. Philipp Neudecker immer zu helfen bereit, auch wenn dies bedeutete um 23 Uhr noch eine Pulssequenz zu programmieren.

Meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Claus Seidel, Jun. Prof. Dr. Birgit Strodel, Dr. Jakub Kubiak, Oliver Schillinger, Dr. Ralf Kühnemuth und Dennis Della Corte danke ich für die freudige und erfolgreiche Zusammenarbeit und viele interessante Diskussionen.

Ohne Dr. Justin Lecher und die von ihm aufgebaut IT-Infrastruktur wäre das Datenmanagement sicherlich nicht so reibungslos erfolgt. Vielen Dank dafür!

Ich bedanke mich bei Dr. Rudolf Hartmann und Dr. Matthias Stoldt dafür, dass die NMR-Spektrometer immer einsatzbereit waren bzw. Reparaturen oder sogar die Umrüstung schnellstmöglich umgesetzt wurden.

Dr. Manuel Etzkorn danke ich für die Unterstützung und die konstruktive Kritik während des Schreibens der Arbeit.

Meinen Kollegen danke ich für viele schöne Erinnerungen und abwechslungsreiche Abende im Liebevoll.

Icaro Putinhon Caruso danke ich für die Herstellung der GABARAP-E100A-Variante, während meiner intensiven Schreibphase dieser Arbeit. So konnte kurz vor Schluss noch ein interessantes Ergebnis erzielt werden.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich den Graduiertenschulen Biostruct und iGRASPseed, die neben den wissenschaftlichen Aspekten auch die persönliche Weiterbildung und den Zusammenhalt der Gruppe durch die regelmäßigen Seminare und Retreats gefördert haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Luis Möckel bedanken, meinem persönlichen Motivationscoach, der mich auch bei Rückschlägen immer wieder aufgeheitert hat. Gerade in dem letzten Jahr danke ich für sein Verständnis dafür, dass ich mich von sämtlichen Freizeitbeschäftigungen entzogen habe, um die Wochenenden lieber mit dem NMR-Spektrometer oder dem Computer zu verbringen.

Auch meinen lieben Eltern und Geschwistern Jens und Marina danke ich für ihre Rücksicht und ganz besonders dafür, dass sie immer für mich da sind.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Ort, Datum

Unterschrift