
INHALTSVERZEICHNIS

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

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

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

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

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