

**Strukturelle Charakterisierung des N-Terminus von UBXD1
und
seine Regulation der ATPase-Aktivität von p97**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

Fakultät für Biologie der Universität Duisburg-Essen
Campus Essen

vorgelegt von
Franziska Trusch
aus Potsdam

Februar 2014

Die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung Strukturelle und Medizinische Biochemie am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Bayer
2. Gutachter: Prof. Meyer
3. Gutachter: Prof. Stoll

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Pfanz

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2014

DANKSAGUNG

Ein großes Dankeschön für all die Wissenschaftler, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit in dieser Art und mit diesem Ergebnis in so kurzer Zeit durchführen zu können.

Besten DANK an Prof. Peter Bayer für die Vergabe dieser Arbeit, für seine Geduld, für sein Vertrauen, für seine Ehrlichkeit, für sein Interesse, für die Weitergabe seiner Erfahrung und für die lustigen Geschichten.

Besten DANK an Prof. Hemmo Meyer für das Überlassen des N-Terminus von UBXD1, für seine logische Herangehensweise und für seinen Einsatz.

Besten DANK an Prof. Paul Freemont für den Hinweis zur Regulation der ATPase-Aktivität.

Besten DANK an Prof. Thomas Schrader für seine supramolekulare Chemie.

Besten DANK an Dr. Daniel Grum für die Einarbeitung meiner Person als Doktorandin und zahlreiche UBXD1-Diskussionen.

Besten DANK an Robert Pöhler für die Eiweiß-reiche Unterstützung.

Besten DANK an Klaus Kowski für die Durchführung der ITC-Messungen mit der Pinzette.

Und nun all die Leute, die mir das Leben einfacher gemacht haben als es der gegenwärtigen Meinung nach schon ist. Menschen, die nachts für mich aufstehen, hunderte von Kilometern fahren, mich bekochen und füttern, mich bespaßen, sich meine Sorgen anhören (auch wenn sie sich dafür auf Toilette einsperren müssen), mich aufbauen, wenn ich mal wieder eins meiner unwichtigen Probleme nicht lösen kann, mit mir meckern, wenn ich mich mal wieder daneben benommen habe, sich die Zeit nehmen mich kennen zu lernen und mich zu respektieren so wie ich bin, einschließlich der zynischen und negativen Sekunden, die hier und da vielleicht ein oder zwei Mal aufgetreten sind. DANKE!

Besten DANK an Frau Doktor.

Besten DANK an mein kleines Schwesterlein und ihren frisch erworbenen Mann.

Besten DANK an den besten Hundesitter der Welt.

Besten DANK an die Frau, die dafür sorgt, dass ich nicht wie die letzte Pennerin rumrenne.

Besten DANK an die normale, nicht zickige, vernünftige und fleißige Schwäbin von nebenan.

Besten DANK an meinen liebsten Tischnachbarn für seine wundervolle Erscheinung.

Besten DANK an den Meister.

Besten DANK an den liebsten Ersatzvater der Welt.



Am Ende wird alles GUT.

Und wenn es noch nicht gut ist,
dann ist es auch noch nicht das Ende.

Oscar Wilde (1854-1900)

FÜR SAM

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP-AIF	ATP-ADP-Übergangszustandanalogen
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AMP-PNP	nicht hydrolysierbares ATP-Analogen
AS	Aminosäure
CD	Circularer Dichroismus
Co-IP	Co-Immunoprecipitation
D1D2p97	D1D2-Domäne von p97
ERAD	ER Associated Protein Degradation
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektrum
Hx	Helix
IBMPFD	Inclusion Body Myopathy associated with Padgett disease of bone and Fronto-temporal Dementia
IDP	Intrinsically Disordered Protein
IDR	Intrinsically Disordered Region
ITC	Isothermale Kalorimetrie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K _A	Assoziationskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
Lx	Linker
MD-Simulation	Molecular Dynamic-Simulation
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
Np97	N-Domäne von p97
OD	optische Dichte von <i>E. coli</i>
p47	p97-Kofaktor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PUB-Domäne	PNGase/Ubiquitin-associated domain
Shift	chemische Verschiebung in der NMR-Spektroskopie
Sx	β-Strang
U	Units, Aktivitätseinheit von Enzymen
UBXD1	UBX Domain containing protein 1
UBX-Domäne	Ubiquitin regulatory X domain
Ufd1-Npl4	heterodimerer p97-Kofaktor
UPD	Ubiquitin Dependent Proteolysis
VCP/p97	Valosin Containing Protein
VIM-Motiv	VCP/p97 Interacting Motif
wt	Wildtyp

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Funktionen von p97.	13
Abb. 2 Struktur von p97.	14
Abb. 3 Konsensussequenz des Np97-bindenden VIM-Motivs.	20
Abb. 4 Kristallstruktur des VIM-Motivs von gp78 und der N-Domäne von p97.	21
Abb. 5 Bindung verschiedener Domänen von Kofaktoren an die N-Domäne von p97.	22
Abb. 6 Struktur der PUB-Domäne (PNGase).	22
Abb. 7 Struktur der UBX-Domäne (p47).	23
Abb. 8 Domänenstruktur von UBXD1 und p97 sowie deren interagierende Domänen.	24
Abb. 9 DNA- und Protein-Marker.	30
Abb. 10 Vektorkarte des modifizierten pET-41b(+).	34
Abb. 11 Prinzip der sequentiellen Zuordnung von Proteinen mittels 3D-NMR-Spektroskopie.	50
Abb. 12 Reaktionsgleichung des NADH-gekoppelten ATPase-Assays.	55
Abb. 13 Agarosegel nach der PCR zur Vervielfältigung des UBXD1 32-133-Inserts.	58
Abb. 14 Kolonie-PCR zur Überprüfung positiver UBXD1 32-133-Klone.	59
Abb. 15 Expressionstest für GST-UBXD1 1-133.	59
Abb. 16 GST-Affinitätschromatographie von GST-UBXD1 1-133.	60
Abb. 17 Gelfiltration von UBXD1 1-133.	61
Abb. 18 ¹ H- ¹⁵ N-HSQC von ¹⁵ N-markiertem UBXD1 1-133.	62
Abb. 19 Prozentualer Anteil der zugeordneten Atome von UBXD1 1-133.	62
Abb. 20 CD-spektroskopische Untersuchung von UBXD1 1-133.	63
Abb. 21 Sekundärstrukturanalyse von UBXD1 1-133.	64
Abb. 22 Mutationsstudien des N-Terminus von UBXD1 1-133.	65
Abb. 23 Mutationsstudien in der VIM-Helix (H3) von UBXD1 1-133.	66
Abb. 24 CD-spektroskopische Untersuchung der UBXD1-Mutanten.	67
Abb. 25 Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz von UBXD1 1-133 nach Temperaturänderung.	68
Abb. 26 D ₂ O-Austauschexperiment von UBXD1 1-80 und 32-133.	69
Abb. 27 Spektrum-Ausschnitt zur Auswertung eines hetNOE-Spektrums.	70
Abb. 28 Auswertung der hetNOE-Spektren verschiedener UBXD1-Konstrukte.	71
Abb. 29 CD-spektroskopische Untersuchung der UBXD1-Konstrukte.	72
Abb. 30 Auswertung der Shifts verschiedener UBXD1-Konstrukte im Vergleich zu UBXD1 1-133.	73
Abb. 31 NMR-Resonanzen-basiertes Strukturmodell von UBXD1 1-120 mit cs23d.	74
Abb. 32 Strukturmodell und MD-Simulation von UBXD1 1-120.	74
Abb. 33 Bestätigung der Komplexbildung von UBXD1 1-133 und Np97.	77
Abb. 34 Titration von ¹⁵ N-markiertem UBXD1 1-133 mit Np97.	78
Abb. 35 Mit Np97 interagierende Aminosäuren von UBXD1 1-133.	79
Abb. 36 Einfluss verschiedener UBXD1-Mutationen auf die Bindung mit Np97.	80
Abb. 37 Bestimmung der Affinität zwischen UBXD1-Konstrukten und Np97 mittels Fluoreszenz-Anisotropie.	81
Abb. 38 Expressionstest für 6xHis-Np97.	82
Abb. 39 Anionenaustauschchromatographie von 6xHis-Np97.	83
Abb. 40 Ni-NTA-Affinitätschromatographie von 6xHis-Np97.	83
Abb. 41 ¹ H- ¹⁵ N-HSQC-Spektrum von ¹⁵ N-markiertem Np97.	84
Abb. 42 Position der N-Domäne in einem p97-Monomer.	85
Abb. 43 Mit UBXD1 interagierende Aminosäuren von Np97 (weiß) inklusive D1-Linker (grau).	85
Abb. 44 Aminosäuren von Np97, die mit UBXD1 wt und UXBD1 RL62/63AA interagieren.	86
Abb. 45 Mit UBXD1 RL62/63AA interagierende Aminosäuren von Np97 (weiß) inklusive D1-Linker (grau).	87
Abb. 46 Bindung der Phosphat-Pinzette an die Seitenkette eines Lysins.	88
Abb. 47 Mit der Phosphat-Pinzette interagierende Aminosäuren von Np97.	88
Abb. 48 ITC zur Bindung zwischen einer Phosphat-Pinzette und Np97.	89
Abb. 49 Affinität zwischen UBXD1 1-133 und Np97 in Gegenwart der Phosphat-Pinzette.	90
Abb. 50 Position der D1D2-Domäne in einem p97-Monomer.	91
Abb. 51 Agarosegel nach der PCR zur Vervielfältigung des D1D2p97-Inserts.	91
Abb. 52 Kolonie-PCR zur Überprüfung positiver D1D2p97-Klone.	92
Abb. 53 Expressionstest für GST-D1D2p97.	92
Abb. 54 GST-Affinitätschromatographie von GST-D1D2p97.	93

Abb. 55 Gelfiltration von D1D2p97.	94
Abb. 56 Analytische Gelfiltration von D1D2p97.	94
Abb. 57 Titration von ¹⁵ N-markiertem UBXD1 1-133 mit Np97 und D1D2p97.	95
Abb. 58 Interaktion von UBXD1 1-133 mit Np97 und D1D2p97.	96
Abb. 59 Titration von ¹⁵ N-markiertem UBXD1 1-133 und UBXD1 RL62/63AA mit D1D2p97.	97
Abb. 60 Interaktion von UBXD1 1-133 und UBXD1 1-133 RL62/63AA mit D1D2p97.	97
Abb. 61 Affinität von UBXD1 1-133 und UBXD1 1-133 RL62/63AA zu D1D2p97.	98
Abb. 62 Analytische Gelfiltration von D1D2p97 mit und ohne UBXD1 1-133.	98
Abb. 63 Affinität von UBXD1 1-133 zu verschiedenen Konstrukten von p97.	100
Abb. 64 Limitierte Proteolyse von p97 in Anwesenheit verschiedener Kofaktoren.	101
Abb. 65 Analytische Gelfiltration von p97 mit und ohne UBXD1 1-133.	102
Abb. 66 Analytische Gelfiltration von p97 mit verschiedenen UBXD1-Konstrukten.	102
Abb. 67 Einfluss von ATPγS und UBXD1 1-133 auf die thermische Stabilität von p97.	103
Abb. 68 Struktur von p97 sowie die Bindestelle von UBXD1 1-133.	104
Abb. 69 Inhibition der ATPase-Aktivität von p97 durch verschiedene UBXD1-Konstrukte.	104
Abb. 70 Analytische Gelfiltration zur Interaktion zwischen ATP und UBXD1.	105
Abb. 71 CD-spektroskopische Untersuchung von UBXD1 1-133 in Anwesenheit von ATP.	106
Abb. 72 Bindung zwischen UBXD1 1-133 und Np97 in Anwesenheit von ATP.	106
Abb. 73 Affinität von UBXD1 1-133 zu Np97 in Gegenwart von ATP.	107
Abb. 74 Modell zur Struktur von UBXD1.	109
Abb. 75 Wheelprojektion von H4 von UBXD1 1-133.	110
Abb. 76 Modelle zur Struktur des N-Terminus von UBXD1.	112
Abb. 77 Wheelprojektion von H2 von UBXD1 1-133.	114
Abb. 78 Interagierende Aminosäuren von Np97 mit dem N-Terminus von UBXD1.	117
Abb. 79 Kontaktstelle zwischen Np97 und D1p97 während des ATPase-Zyklus von p97.	117
Abb. 80 Zeitweilige Helix im ND1-Linker.	118
Abb. 81 Modell zur Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und Np97.	119
Abb. 82 Binderegionen der N- und der D1D2-Domäne auf UBXD1 1-133.	122
Abb. 83 Konformation der N-Domäne in Anwesenheit von Ufd1-Npl4 und p47.	125
Abb. 84 Hypothetisches Modell zur Regulation der ATPase-Aktivität von p97 durch UBXD1.	129
Abb. 85 Offene Fragen im Modell zur Regulation von p97 durch UBXD1.	130

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Struktur von p97 während eines ATP-Hydrolyse-Zyklus.	16
Tab. 2 Mit p97 interagierende Domänen der Kofaktoren.	18
Tab. 3 Gruppierung der Kofaktoren von p97 anhand der UBX-Domäne.	18
Tab. 4 Einteilung der Kofaktoren mit UBX-Domäne und ähnlichen Motiven.	19
Tab. 5 Verwendete Chemikalien.	28
Tab. 6 Verwendete Bakterienstämme.	34
Tab. 7 Verwendete Enzyme.	35
Tab. 8 Verwendete Antikörper.	35
Tab. 9 Verwendete Verbrauchsmaterialien.	35
Tab. 10 Verwendete Kits.	36
Tab. 11 Verwendete Geräte und Software.	36
Tab. 12 PCR-Ansatz zur Insert-Amplifizierung.	37
Tab. 13 Programm für den PCR-Cycler zur Amplifizierung des Inserts.	38
Tab. 14 Ansatz zum Verdau des Inserts und des Vektors.	38
Tab. 15 Ansatz zur Ligation von verdautem Insert und Vektor.	39
Tab. 16 PCR-Ansatz zur Überprüfung richtiger Klone mittels Kolonie-PCR.	39
Tab. 17 Automatisiertes Programm zur Durchführung einer GST-Affinitätschromatographie.	43
Tab. 18 Automatisiertes Programm zur Durchführung einer Anionenaustauschchromatographie.	44
Tab. 19 Automatisiertes Programm zur Durchführung einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie.	45
Tab. 20 Ansatz für die Herstellung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.	46
Tab. 21 Ansatz für die limitierte Proteolyse von p97 mit Trypsin.	47
Tab. 22 Ansätze zur Messung der ATPase-Aktivität von p97 mittels NADH-gekoppeltem ATPase-Assay.	55
Tab. 23 Parameter für das UBXD1-Strukturmodell mit YASARA.	57
Tab. 24 Affinitäten für das VIM-Motiv verschiedener p97-Kofaktoren.	115

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	13
1.1. VALOSIN CONTAINING PROTEIN (VCP): P97	13
1.1.1. FUNKTION VON P97	13
1.1.2. STRUKTUR VON P97	14
1.1.3. ATPASE-AKTIVITÄT VON P97	15
1.1.4. KOFAKTOREN VON P97	17
1.1.5. AUSGEWÄHLTE P97-BINDENDE DOMÄNEN	20
1.2. UBXD1	24
1.3. ZIELSETZUNG	26
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1. MATERIALIEN	28
2.1.1. CHEMIKALIEN	28
2.1.2. DNA- UND PROTEINMARKER	30
2.1.3. PUFFER UND LÖSUNGEN	30
2.1.4. NÄHRMEDIEN UND ANTIBIOTIKA	33
2.1.5. BAKTERIENSTÄMME	33
2.1.6. PLASMIDE	34
2.1.7. ENZYME UND ANTIKÖRPER	34
2.1.8. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND KITS	35
2.1.9. GERÄTE UND SOFTWARE	36
2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	37
2.2.1. KLONIERUNG	37
2.2.2. SITE-DIRECTED MUTAGENESE	40
2.3. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	40
2.3.1. HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN	40
2.3.2. TRANSFORMATION KOMPETENTER ZELLEN	41
2.3.3. EXPRESSIONSTEST	41
2.3.4. EXPRESSION	42
2.4. BIOCHEMISCHE METHODEN	43
2.4.1. ZELLAUFSCHLUSS	43
2.4.2. PROTEINREINIGUNG	43
2.4.3. PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	45
2.4.4. SDS-PAGE	46
2.4.5. LIMITIERTE PROTEOLYSE	46
2.4.6. LIPOSOMENBINDUNGSASSAY	47
2.5. IMMUNOLOGISCHE METHODEN	47
2.5.1. CO-IMMUNOPRÄZIPITATION	47
2.5.2. WESTERN BLOT	48
2.6. SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	49
2.6.1. NMR-SPEKTROSKOPIE	49
2.6.2. CD-SPEKTROSKOPIE	53
2.6.3. FLUORESCENZ-SPEKTROSKOPIE	53
2.6.4. UV/VIS-SPEKTROSKOPIE	55

2.7.	BIOINFORMATISCHE METHODEN	56
2.7.1.	NMR-RESONANZEN-BASIERTES STRUKTURMODELL MIT CS23D	56
2.7.2.	STRUKTURMODELL MIT YASARA	57
3.	ERGEBNISSE	58
3.1.	STRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN DES N-TERMINUS VON UBXD1	58
3.1.1.	VORARBEITEN ZUR STRUKTURELLEN UNTERSUCHUNG	58
3.1.2.	SEQUENTIELLE ZUORDNUNG VON UBXD1 1-133	61
3.1.3.	STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DES N-TERMINUS VON UBXD1	63
3.1.4.	ANALYSE DER FLEXIBILITÄT DES N-TERMINUS VON UBXD1 1-133	67
3.1.5.	ANALYSE DER TERTIÄRSTRUKTUR DES N-TERMINUS VON UBXD1	73
3.2.	INTERAKTIONSSUDIEN VON UBXD1 MIT MEMBRANEN UND UBIQUITIN	76
3.3.	INTERAKTIONEN ZWISCHEN UBXD1 UND DER N-DOMÄNE VON P97	77
3.4.	BINDUNGSSTELLE DES N-TERMINUS VON UBXD1 AUF NP97	82
3.4.1.	VORARBEITEN ZU DEN INTERAKTIONSSUDIEN VON UBXD1 MIT NP97	82
3.4.2.	UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN UBXD1 UND NP97	85
3.4.3.	INTERAKTION ZWISCHEN NP97 UND EINER PHOSPHAT-PINZETTE	87
3.5.	INTERAKTION ZWISCHEN UBXD1 UND DER D1D2-DOMÄNE VON P97	91
3.5.1.	VORARBEITEN ZU DEN INTERAKTIONSSUDIEN VON UBXD1 MIT D1D2P97	91
3.5.2.	UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN UBXD1 UND D1D2P97	95
3.6.	INTERAKTION ZWISCHEN UBXD1 UND P97	100
3.7.	REGULATION DER ATPASE-AKTIVITÄT VON P97 DURCH UBXD1	104
4.	DISKUSSION	108
4.1.	DER N-TERMINUS VON UBXD1 IST EIN IDP	108
4.2.	DER N-TERMINUS VON UBXD1 INTERAGIERT MIT DER N-DOMÄNE VON P97	114
4.3.	DIE PHOSPHAT-PINZETTE VERSCHLECHTERT DIE BINDUNG VON NP97 UND UBXD1 1-133	119
4.4.	DER N-TERMINUS VON UBXD1 INTERAGIERT MIT DER D1D2-DOMÄNE VON P97	121
4.5.	DER N-TERMINUS VON UBXD1 HÄLT DIE N-DOMÄNE VON P97 IN EINER AB-KONFORMATION	123
4.6.	DER N-TERMINUS VON UBXD1 DESTABILISIERT DAS P97-HEXAMER	125
4.7.	DER N-TERMINUS VON UBXD1 INHIBIERT DIE ATPASE-AKTIVITÄT VON P97 UND BINDET ATP	126
4.8.	HYPOTHETISCHES MODELL ZUR REGULATION DER ATPASE-AKTIVITÄT VON P97 DURCH UBXD1	128
5.	AUSBLICK	130
6.	ZUSAMMENFASSUNG	131
7.	LITERATURVERZEICHNIS	133
8.	ANHANG	143
8.1.	DOMÄNENSTRUKTUR DER KOFAKTOREN VON P97	143
8.2.	WEITERE VERWENDETE PLASMIDE	144
8.3.	VERWENDETE PRIMER FÜR KLONIERUNGEN UND SITE-DIRECTED MUTAGENESEN	145
8.4.	MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE DATEN ZU DEN VERWENDETEN KONSTRUKTEN	146
8.5.	PARAMETER FÜR VERWENDETE NMR-SPEKTREN	147
8.6.	ARBEITSDIAGRAMM FÜR CS23D	148

8.7.	ÜBERSICHT SHIFT-RESONANZEN UBXD1 1-133	149
8.8.	¹ H- ¹⁵ N-HSQC-SPEKTREN VERSCHIEDENER UBXD1-KONSTRUKTE	151
8.9.	2D-NOESY-SPEKTRUM VON UBXD1 1-80	152
8.10.	SHIFT-MAPS DER TITRATION DER UBXD1-MUTANTEN MIT Np97	153
8.11.	SHIFT-MAPS DER TITRATION DER UBXD1-KONSTRUKTE MIT Np97	154
8.12.	ÜBERSICHT SHIFT-RESONANZEN Np97	155
8.13.	SHIFT-MAPS DER TITRATION VON Np97 MIT UBXD1-KONSTRUKTEN	157
8.14.	INTENSITÄTENAUSWERTUNG DER TITRATION VON Np97 MIT UBXD1-KONSTRUKTEN	158
8.15.	TITRATION VON Np97 MIT DER PHOSPHAT-PINZETTE	159
8.16.	KALIBRATION SUPERDEX 200 10/300 GL	160
8.17.	NMR-TITRATION VON UBXD1 1-133 MIT ATP	161
<hr/>		
9.	<u>LEBENS LAUF</u>	162
<hr/>		
10.	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNGEN</u>	163

1. EINLEITUNG

1.1. VALOSIN CONTAINING PROTEIN (VCP): P97

1.1.1. Funktion von p97

p97, auch VCP (*valosin containing protein*), gehört zur Familie der AAA-ATPasen (*ATPasen associated with diverse cellular activities*), welche hoch konserviert in allen Bereichen des Lebens vorkommen (1). p97 gehört zum Typ II der AAA-ATPasen, die zwei konservierte AAA-Domänen (typischerweise als D1- und D2-Domäne bezeichnet) besitzen. Die ATPase-Domänen sind wahrscheinlich durch Genduplikation während der Evolution entstanden und weisen daher eine hohe Homologie auf (2; 3). Jede dieser Domänen beinhaltet ein Walker A-Motiv (P-Loop, GxxxxGKT), ein Walker B-Motiv (DExx Box), sowie ein SRH-Motiv (*second region of homology*), das p97 von anderen Walker-Typ-ATPasen abgrenzt (1; 4). Das Säuger-p97 wurde fälschlicherweise erstmals als Vorläuferprotein bei Schweinen beschrieben, welches das biologisch aktive Peptid Valosin enthält (VCP, *valosin containing protein*; (5; 6)). Bis heute sind zudem zahlreiche Homologe in *Xenopus laevis* (7), *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc48, (8; 9)), *Arabidopsis thaliana* (10), Trypanosomen (11) oder auch in Archaeen, wie dem *Thermoplasma acidophilum* (VAT, (12)), beschrieben worden. Damit wird auch die starke Konservierung und damit einhergehend die essentielle funktionelle Bedeutung von p97 unterstrichen (Abb. 1, (13)).

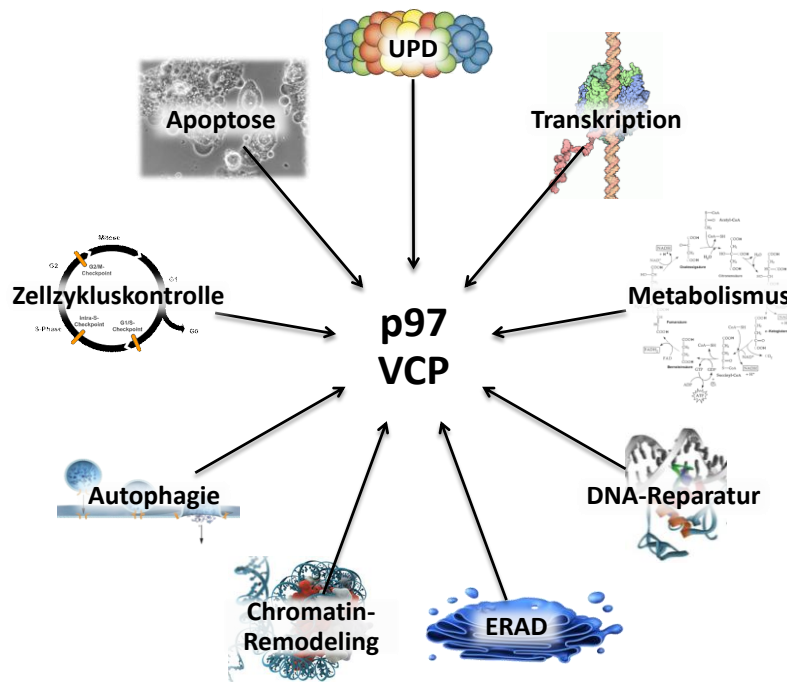


Abb. 1 Funktionen von p97. p97 ist an zahlreichen Zellprozessen beteiligt. UPD: Ubiquitin-abhängige Proteolyse. ERAD: ER-assoziiierter Proteinabbau.

Zudem ist p97 ubiquitär in der Zelle verteilt und daher im Nukleus, im Cytoplasma sowie in perimembranären Subkompartimenten lokalisiert (6; 14). Dementsprechend viele Funktionen werden p97 in den unterschiedlichsten Zellprozessen zugeschrieben wie Zellzykluskontrolle (15–17), Chromatin-Remodeling (18–20), Metabolismus (21; 22), UPD (Ubiquitin-abhängige

Proteolyse, (23–25)), Transkription (26–28), DNA-Reparatur (29–31), Autophagie (32–34), ERAD (35–38) sowie Apoptose (39; 40).

Da p97 vor allem an der Qualitätskontrolle und dem Abbau von Proteinen beteiligt ist, führen Störungen in diesem System zu Anhäufungen missgefalteter Proteine in Vesikeln, was zur Ausbildung neurodegenerativer Krankheiten führt (40; 41). Eine dieser degenerativen Krankheiten ist die autosomal-dominant vererbte *Inclusion body Myopathie*, assoziiert mit der Padgett-Knochenkrankheit und frontotemporaler Demenz (IBMPFD, (42)). Ursache dieser Krankheit sind *Missense*-Mutationen von Aminosäuren im Interface zwischen der N-Domäne und der D1-Domäne von p97 (Kap. 1.1.2). Dadurch kommt es zur Beeinflussung der ATPase-Aktivität (Kap. 1.1.3) und damit zur Einschränkung zahlreicher Zellprozesse (43–46). Im Gegensatz zur ATPase-Aktivität ist die Interaktion mit den meisten Kofaktoren durch die IBMPFD-assoziierten Mutationen in p97 nicht beeinflusst. Eine Ausnahme bilden UBXD1 und PLAA, deren Interaktion mit p97 gestört ist (47–49).

1.1.2. Struktur von p97

Typischerweise bildet p97 symmetrische Hexamere mit einer pilzartigen Struktur und einem Durchmesser von 140-160 Å sowie einer Höhe von etwa 80 Å. Dabei liegen die jeweiligen Domänen der einzelnen Protomere leicht versetzt in Ringen vor, sodass mittig eine Pore mit einem Durchmesser von etwa 10 Å entsteht (Abb. 2, A; (2; 50; 51)).

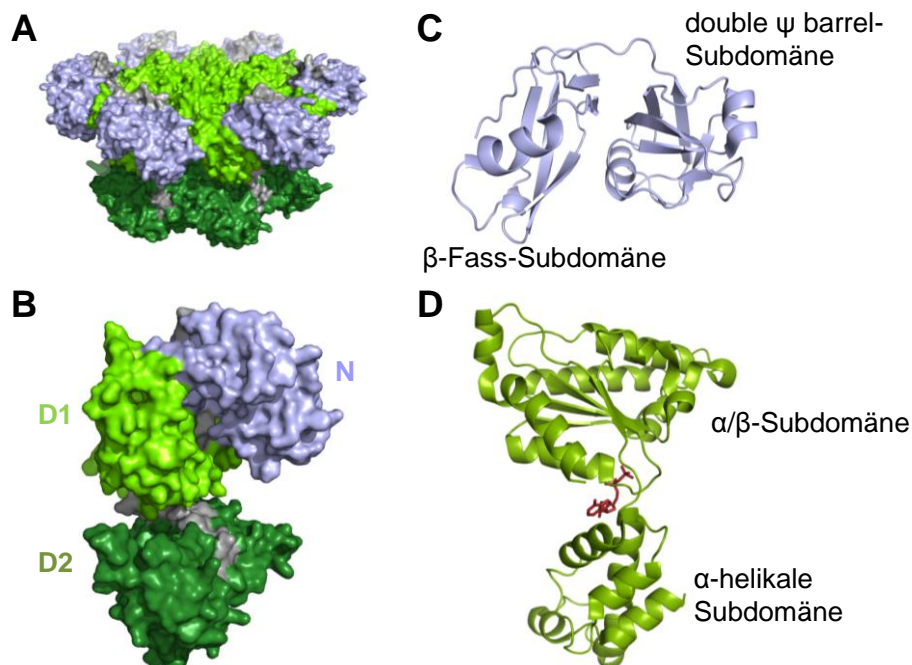


Abb. 2 Struktur von p97. PDB-ID: 3CF1. Markiert sind die N-Domäne (hellblau), die D1-Domäne (hellgrün), die D2-Domäne (dunkelgrün) sowie die Linker zwischen der N- und der D1-Domäne (ND1-Linker, grau) und der D1- und D2-Domäne (D1D2-Linker, grau). A: pilzartige Struktur des p97-Hexamers. Die D1- und D2-Domänen bilden jeweils Ringe, die N-Domäne liegt peripher oberhalb der Ringe. B: p97-Monomer. C: Struktur der N-Domäne mit den Sekundärstrukturelementen und Subdomänen. D: Struktur der D1-Domäne mit den Sekundärstrukturelementen und Subdomänen, einschließlich gebundenem ADP (rot).

In der Pore befindet sich, komplexiert von sechs umliegenden Histidinen, ein Zink-Ion. Für die Bildung stabiler Hexamere sind Nukleotide notwendig (52).

Jedes p97-Monomer besteht aus einer N-Domäne und zwei D1- bzw. D2-Domänen sowie einem unstrukturierten C-Terminus (Abb. 2, B). Während die N-Domäne und der C-Terminus für die Interaktion mit Kofaktoren verantwortlich sind, besitzen die D1- und die D2-Domäne mit den Walker A- (ATP-Bindung) und Walker B-Motiven (ATP-Hydrolyse) die ATPase-Aktivität. Die einzelnen Domänen sind über flexible Linker miteinander verbunden, die die Bewegung der Domänen in Relation zueinander ermöglichen (50; 53).

Die N-Domäne besteht aus zwei Subdomänen, von denen die N-terminale eine *double ψ barrel*-Faltung und die C-terminale Domäne ein viersträngiges β -Fass bildet (Abb. 2, C). Zwischen beiden Domänen liegt eine hydrophobe Furche (2). Durch den flexiblen Linker zwischen der N-Domäne und der D1-Domäne kann sich die N-Domäne in Relation zum p97-Hexamer in einer auf- oder einer ab-Konformation in Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von p97 befinden (Kap. 1.1.3, (51; 50)). Die Position einer N-Domäne in Relation zum Hexamer ist zudem abhängig von der Position der umliegenden N-Domänen (43; 50; 54). In der Linkerregion zwischen der N- und der D1-Domäne befinden sich zwei hoch konservierte Glycine (Gly 186 und Gly 208), welche als Drehpunkt der Bewegung der N-Domäne dienen (2). Die Funktion dieser Bewegung ist wahrscheinlich auf das richtige Positionieren der p97-Substrate zurückzuführen (52).

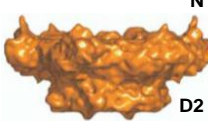
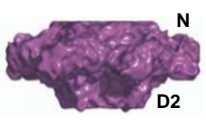
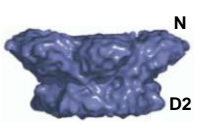
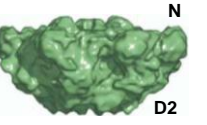
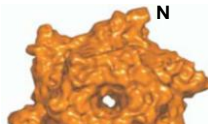
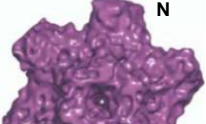
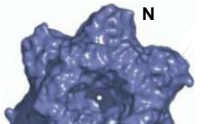
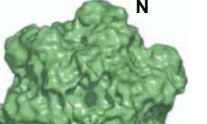
Die ATPase-Domänen (D1- bzw. D2-Domänen) bestehen aus einer N-terminalen α/β -Subdomäne, die die Walker-Motive beinhalten und deren Aminosäuren stark konserviert sind, sowie einer C-terminalen α -helikalen Subdomäne mit vier Helices, deren Aminosäuren weniger konserviert sind (Abb. 2, D; (2; 53)). Die D1- und die D2-Domäne sind quasi in Reihe zueinander angeordnet, sodass der D1D2-Linker die α -Subdomäne der D1-Domäne mit der α/β -Subdomäne der D2-Domäne verbindet (50; 52). Der Linker zwischen der D1- und der D2-Domäne scheint wesentlich flexibler als jener zwischen der N- und der D1-Domäne zu sein und begünstigt somit die Rotationsbewegung der α -helikalen Subdomänen bei der ATPase-Domäne zueinander bei Bindung verschiedener Nukleotide (Kap. 1.1.3, (50)). Die interprotomeren Kontakte zur Hexamerisierung von p97 werden hauptsächlich innerhalb der D1- bzw. der D2-Domänen von der α -helikalen Subdomäne des einen Protomers und der α/β -Subdomäne des Nachbarmonomers vermittelt (2; 52).

1.1.3. ATPase-Aktivität von p97

p97 besitzt als hexamerer Multimer neben seiner Segregase-Aktivität auch eine ATPase-Aktivität, um die für die Entfaltung oder Demultimerisierung von Komplexen notwendige Energie zur Verfügung zu stellen. p97 besitzt eine Aktivität von 14 $\mu\text{mol ATP/mg p97/h}$ bei 37 °C und einem pH von 7,4 und ist im Vergleich zu seinen Homologen in *Xenopus laevis* und *Saccharomyces cerevisiae* um ein zwei- bzw. fünffaches weniger aktiv (3; 55; 56). Für die Aktivität ist die Bindung von Magnesium-Ionen notwendig (Mangan- und Cobalt-Ionen sind ebenfalls möglich), wohingegen hohe Salzkonzentrationen die Aktivität inhibieren (3).

Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass der D2-Domäne die hauptsächliche ATPase-Aktivität zugeschrieben wird und die D1-Domäne nur eine sehr basale Aktivität aufweist (3). Für die ATPase-Aktivität ist vor allem die Bewegung der α -helikalen Subdomäne notwendig, die in der D1-Domäne durch ihre mittige Lage zwischen N- und D2-Domäne eingeschränkt ist. Der Linker zwischen der N- und der D1-Domäne liegt wesentlich dichter am Walker A-Motiv der D1-Domäne als der Linker zwischen der D1- und der D2-Domäne am Walker A-Motiv der D2-Domäne. Somit ist die Einschränkung der D2-Domäne geringer, was zu einer erhöhten ATPase-Aktivität führt. Zusätzlich bildet die N-Domäne Kontakte mit der α -helikalen Subdomäne der D1-Domäne aus. Desweiteren ist der Linker zwischen der N-Domäne und der D1-Domäne (Asp 205 und Gly 207) an der Nukleotidbindung in der D1-Domäne beteiligt und stabilisiert sowohl die Position der α -helikalen Subdomäne als auch die Bindung des Nukleotids (2; 50; 52; 54). Aufgrund der eingeschränkten ATPase-Aktivität der D1-Domäne weist diese in den meisten Strukturen gebundenes, nicht austauschbares ADP auf (2; 3; 43; 53; 57). Dennoch scheint zwischen den beiden Nukleotidbindestellen der D1- und D2-Domäne eine Kooperativität zu bestehen (2; 3; 50; 54). Obwohl ein p97-Hexamere insgesamt 12 hypothetische Bindestellen für Nukleotide hat (6 Stellen pro Ring), sind davon maximal 2 bis 3 Stellen innerhalb des D2-Rings während eines Zyklus aktiv (43; 53; 57; 58–60). Während der Hydrolyse von ATP unterliegen die einzelnen Domänen teilweise großen Veränderungen (Tab. 1, nach (57))

Tab. 1 Struktur von p97 während eines ATP-Hydrolyse-Zyklus. Das p97-Hexamere unterliegt während der ATP-Hydrolyse besonders großen konformationellen Veränderungen im Bereich der N-Domäne und des D2-Rings. Strukturen aus (57). AMP-PNP: nicht hydrolysierbares ATP-Analogon, ATP# (ADP-AIF_x): Übergangszustandsanalogon.

	ohne Nukleotid	ATP (AMP-PNP)	ATP# (ADP-AIF)	ADP
Struktur von der Seite				
Struktur von unten				
Konformation	offen	kompakt	große Bewegung	Übergangszustand
Position der N-Domäne	coplanar mit D1-Ring	unter D1-Ring, über D1-Ring (43; 54)	leicht über D1-Ring	leicht über D1-Ring bzw. flexibel
D1-Ring	offen	leicht offen	leicht offen	leicht offen
D2-Ring	offen (3x D1)	Verengung (1,5xD1)	Erweiterung (7xD1)	Verengung (1,5xD1)
Rotation D2-Ring in Relation zum D1-Ring	keine	20° im Uhrzeigersinn	10° im Uhrzeigersinn	15° gegen den Uhrzeigersinn

Die Bindung von Nukleotiden führt zu einer insgesamt kompakteren Struktur der ATPase-Domänen. Sowohl die auf- und ab-Konformation der N-Domäne in Relation zum Hexamer als auch die Bewegung der D2-Domäne in Relation zur D1-Domäne werden durch die Bindung der Nukleotide beeinflusst. In Abwesenheit von Nukleotiden lockert sich die Struktur durch den flexiblen D1D2-Linker, indem die α -helikale Subdomäne der D2-Domäne flexibler wird und sich damit die zentrale Pore vergrößert (2; 50-54). Damit ist die Struktur für neue Nukleotide in einem weiteren ATPase-Zyklus besser zugänglich. Während vor allem die α -helikale Subdomäne der D2-Domäne während des ATP-Hydrolyse-Zyklus relativ großen Veränderungen unterliegt, ist die α/β -Subdomäne der D1-Domäne sehr starr (43; 53). Die N-Domäne unterliegt der stärksten Bewegung, da sie nicht wie die ATPase-Domänen ringförmig angeordnet ist, sondern peripher das zylindrische Hexamer umgibt und damit wesentlich flexibler ist. Die für die Bewegung der N-Domäne verantwortliche Kraft wird durch die ATP-Hydrolyse in der D2-Domäne bereit gestellt und über die Linker übertragen. Es wird vermutet, dass die Bewegung der N-Domäne dafür sorgt, Proteine aus der Membran zu entfernen oder aus Komplexen herauszulösen (57). Die ATPase-Aktivität von p97 wird durch zahlreiche Faktoren reguliert; zum einen durch die Konzentration von p97 selbst, einschließlich seines Multimerisierungsgrades und zum anderen durch seine regulierenden Kofaktoren wie bspw. p47 (3; 43). Außerdem ist die Aktivität abhängig von der ATP-Konzentration (physiologische Konzentration: 0,5 bis 2 mM), sowie von der Konzentration des bei dieser Hydrolyse entstehenden inhibierenden Produkts ADP. Desweiteren haben ein hoher pH-Wert (9,0) und hohe Temperaturen (50-55 °C) eine stimulierende Wirkung auf die ATPase-Aktivität, während Salz, Ethanol und Wasserstoffperoxid eine hemmende Wirkung haben (3).

Desweiteren wurde für den p97/p47-Komplex eine konzentrationsabhängige Inhibition der ATPase-Aktivität beschrieben. Die ATPase-Aktivität eines p97-Hexamers ist in Gegenwart eines p47-Trimers um 75 % reduziert (55). Eine kompetitive Inhibition konnte ausgeschlossen werden, sodass die Reduktion der ATPase-Aktivität auf eine konformationelle Änderung von p97 zurückgeführt werden kann (55; 61). Zum einen könnte die Inhibition der ATPase-Aktivität durch die Oligomerisierung von p47 bei Bindung an p97 und damit der Fixierung der N-Domäne entstehen. Zum anderen könnte die Inhibition durch die zusätzliche Bindung des D1-Linkers durch die BS1-Bindestelle zustande kommen, da die UBX-Domäne von p47 alleine keine Inhibition zur Folge hat (62). Obwohl Ufd1-Npl4 und p47 die gleiche Bindestelle an p97 haben (Kap. 1.1.5), inhibiert das Heterodimer Ufd1-Npl4 die ATPase-Aktivität von p97 *in vitro* nicht.

1.1.4. Kofaktoren von p97

p97 ist eine ubiquitäre ATPase, die an zahlreichen unterschiedlichen Zellprozessen beteiligt ist (Kap. 1.1.1). Um die Funktion in so zahlreichen, unabhängig voneinander funktionierenden Zellprozessen erfüllen zu können, interagiert p97 mit einer Vielzahl an Kofaktoren, deren Anzahl durch neue Entdeckungen stetig steigt (Anhang 8.1, (63)). Für die Interaktion mit p97 existieren in den Kofaktoren vier Bindedomänen (PUB, PUL, UBX, UBD) und drei weitere Bindemotive (VIM, VBM, SHP/BS1) (Tab. 2; (64-67)).

Tab. 2 Mit p97 interagierende Domänen der Kofaktoren. Aufgeführt sind p97-bindende Domänen und Motive, sowie deren Bindungsstellen an p97. Desweiteren werden strukturelle Eigenschaften und ihre Häufigkeit unter den Kofaktoren aufgezeigt.

Domäne/Motiv	Bindung	Struktur/Konsensussequenz	Häufigkeit
PUB-Domäne (<i>PNGase/ubiquitin-associated domain</i>)	Cp97	110 Aminosäuren, 5 α -Helices, 3 β -Stränge	2
PUL-Domäne (<i>PLAP, Ufd3p, and Lub1p domain</i>)	Cp97	85 Aminosäuren, 18 α -Helices, 6 Armadillo-Motive (je 3 α -Helices)	1
UBX-Domäne (<i>ubiquitin regulatory X domain</i>)	Np97	80 Aminosäuren, 2 α -Helices, 5 β - Stränge, Ubiquitin-ähnliche Faltung	13
UBD-Domäne (<i>Ubiquitin fold domain</i>)	Np97	80 Aminosäuren, 2 α -Helices, 4 β - Stränge	6
VIM-Motiv (<i>VCP interacting motif</i>)	Np97	12 Aminosäuren, α -Helix, RxxxxxAxR	7
VBM-Motiv (<i>VCP-binding motif</i>)	Np97	7 Aminosäuren, α -Helix, ExRxxRR	3
SHP-Motiv (auch BS1: <i>binding site 1</i>)	Np97	8 Aminosäuren, Loop, FxGxGQRu	6

Die p97-bindenden Motive bestehen hauptsächlich aus α -Helices (63). Die Interaktionen der Kofaktoren mit einer PUL- oder PUB-Domäne werden über die letzten zehn Aminosäuren des C-Terminus (Cp97) vermittelt und sind unter den bekannten Kofaktoren von p97 eher selten zu finden (3 Domänen in 30 Kofaktoren). Im Gegensatz dazu überwiegen die Np97-bindenden Domänen, die mit der N-Domäne von p97 interagieren. Dabei werden in etwa genauso viele Interaktionen über Domänen wie über Motive vermittelt. Die meisten Interaktionen zwischen p97 und seinen Kofaktoren werden über die ähnlich dem Ubiquitin gefaltete UBX-Domäne vermittelt (Kap. 1.1.5). Anhand dieser Domäne können die Kofaktoren auch in funktionell verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Tab. 3, (68–70)).

Tab. 3 Gruppierung der Kofaktoren von p97 anhand der UBX-Domäne. Es gibt Kofaktoren, die sowohl eine UBA-(Ubiquitinbindung) als auch eine UBX-Domäne (p97-Interaktion) besitzen. Einige Kofaktoren besitzen nur eine UBX-Domäne und andere Kofaktoren besitzen keine UBX-Domäne, dafür aber andere p97-bindende Motive oder Domänen. Die entsprechende Literatur verweist auf den funktionellen Zusammenhang des Kofaktors.

UBX-/UBA-Adaptoren	UBX-Adaptoren	sonstige Adaptoren
Ufd1-Npl4 (71)	p37 (72)	PLAA-1 (73)
p47 (74)	UBXD1 (75)	Ataxin 3 (76)
FAF1 (77)	UBXD2 (78)	ANKZF1
SAKS (79)	UBXD3	NGLY1 (PNGase) (80)
UBXD7 (81)	UBXD4 (82)	UBE4B (83)
UBXD8 (84)	UBXD5 (85)	SVIP (86)
NUB1L (87)	UBXD6 (88)	VIMP (89)
	VCIP135 (90)	ZFAND2b/AIRAPL (91)
	YOD1 (92)	DVC1 (93)
	UBXD9 (94)	Hrd1 (95)
		AMFR (96)
		Derlin1 (97)

So unterscheidet man zwischen UBX-/UBA-Kofaktoren, UBX-Kofaktoren und sonstigen Kofaktoren, die andere p97-bindende Domänen besitzen. Die UBX-/UBA-Kofaktoren besitzen sowohl eine UBX- als auch eine UBA-Domäne. Mit der UBX-Domäne wird die Interaktion zu p97 hergestellt, während die UBA-Domäne Ubiquitin bzw. ubiquitinylierte Substrate erkennt. Kofaktoren, welche nur eine UBX-Domäne besitzen, binden an p97. Desweiteren gibt es eine Vielzahl an Adaptoren, die keine UBX-Domäne besitzen und deren Interaktion mit p97 über andere Domänen oder Motive vermittelt wird (Tab. 2, Anhang 8.1). Die Funktionen der Kofaktoren, die keine UBA-Domäne besitzen werden meistens über zusätzliche Domänen bestimmt.

Da p97 ein Hexamer bildet (Kap. 1.1.2), besteht theoretisch die Möglichkeit, dass p97 von jedem Kofaktor sechs Moleküle oder sechs verschiedene Kofaktoren simultan bindet. Tatsächlich ist die Anzahl der gebundenen Moleküle eines Kofaktors jedoch von seinem Bindungsmechanismus bezüglich der Affinität, der Bindungsstelle an p97 und den zusätzlich in dem Kofaktor vorliegenden Domänen abhängig. Aufgrund der zahlreichen Kofaktoren, die ähnlich an p97 binden, sind nur bestimmte Kombinationen in einem multimeren Komplex möglich. Die Regulation dieser Komplexbildung erfolgt durch die sterische Hinderung durch andere Kofaktoren oder durch konformationelle Änderungen in p97, die die Bindung weiterer Kofaktoren sowohl verhindern als auch begünstigen kann (43; 61; 90; 98–100). Zudem ist die Bindung der verschiedenen Kofaktoren nicht immer einfach nur kompetitiv, sondern kann auch kooperativ erfolgen und wird zusätzlich vom ATP-Hydrolyse-Zyklus des p97-Hexamers beeinflusst (50; 54).

Es gibt einige Kofaktoren wie UBXD1 (Kap. 1.2), die Domänen beinhalten, die sowohl die N-Domäne als auch den C-Terminus von p97 binden können. Studien haben gezeigt, dass eine simultane Bindung *in vitro* durchaus möglich ist, die Funktion eines solchen Bindemechanismus ist jedoch ungeklärt (66; 101).

Insgesamt wird die Funktion der Kofaktoren dabei nicht durch ihre Bindestelle an p97 bestimmt, sondern hauptsächlich durch die Kombination bestimmter Domänen und den zusätzlichen Domänen oder enzymatischen Aktivitäten (Tab. 4).

Tab. 4 Einteilung der Kofaktoren mit UBX-Domäne und ähnlichen Motiven. aus (69).

Typ	Bsp. für Kofaktoren	Binde-Motiv	Funktion
Substrat-rekrutierend (Hauptadaptoren)	Ufd1-Npl4, p47, p37, UBXD4, UBXD5	UBX <u>und</u> SHP (keine gleichzeitige Bindung)	Einteilung Hauptfunktionen von p97
Substrat-rekrutierend (zusätzlich)	UBXD8, UBXD2, VIMP, SAKS1, FAF1	UBX <u>oder</u> SHP (gleichzeitige Bindung möglich)	Regulation der Hauptfunktion
Substrat-prozessierend	VCIP135, NGLY1, Ataxin-3, AMFR	beliebiges Binde-Motiv (kombinatorische Bindung)	Substratregulation über enzymatische Aktivität
sonstige	SVIP	beliebiges Binde-Motiv	Regulation der Lokalisation und Multimerisierung

Obwohl p97 selber mit ungefalteten Proteinen und Ubiquitin *in vitro* interagiert (3), wird diese Interaktion *in vivo* durch sogenannte Adaptoren (Substrat-rekrutierende Kofaktoren) vermittelt. Üblicherweise besitzen diese Kofaktoren neben einer UBA-Domäne zur Bindung von ubiquitinylierten, falsch gefalteten Proteinen eine UBX-Domäne sowie ein SHP-Motiv zur Interaktion mit der N-Domäne von p97 (79; 102; 103). Es gibt Hauptadaptoren, die die Funktion von p97 in den jeweiligen Zellprozess lenken. Zudem gibt es spezifische Adaptoren, die die Funktion von p97 auf verschiedenste Arten regulieren. Diese Adaptoren besitzen entweder eine UBX-Domäne oder ein SHP-Motiv und können gleichzeitig an p97 binden. Die Substrat-prozessierenden Kofaktoren besitzen meist eine zusätzliche enzymatische Aktivität, mit der sie nach Rekrutierung der Kofaktoren diese so modifizieren (PNGase: Deglykosylierung (80; 104; 105), Atx-3: Deubiquitinierung (106; 107)), dass das Protein im Proteasom abgebaut werden kann (69).

1.1.5. Ausgewählte p97-bindende Domänen

Wie bereits erwähnt nimmt UBXD1 eine Sonderstellung unter den Kofaktoren ein. Zum einen besitzt UBXD1 eine UBX-Domäne, die nicht mit der N-Domäne von p97 interagiert und zum anderen besitzt UBXD1 N-terminal das VIM-Motiv und mittig die PUB-Domäne. Damit ist UBXD1 zumindest theoretisch in der Lage beide Bindestellen von p97 (N-Domäne und C-Terminus) gegenüber anderen Kofaktoren zu blockieren. Da UBXD1 in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielen wird, werden im Folgenden die Struktur und Bindung des VIM-Motivs, der PUB-Domäne sowie der UBX-Domäne näher erläutert.

VIM-Motiv:

Das VIM-Motiv (*p97/VCP-interacting motif*) wurde erstmals bei den Proteinen gp78 und SVIP beschrieben, deren Interaktion mit p97 bereits bekannt war (108–110). Die bioinformatische Suche nach weiteren Proteinen mit einer ähnlichen Sequenz führte schließlich zu der minimalen Konsensus-Sequenz RX_5AAX_2R . Diese gilt heute allgemein als VIM-Motiv (Abb. 3, (111)). Potentiell können diese Proteine damit auch als Kofaktoren für p97 dienen.

gp78	VTLR R RML AAA E RRL QK
SVIP	LEE KRA KL AA E ERR QKE
VIMP	VV VKR Q EAL AA R LKM QE
ANKZF1	ALSD REKR AA E ERR LAA
	RxxxxxAAxxR
UBXD1	PTNEAQ MAAA AA L AR LEQ
ZFAND2b	EGHPT SRAGL AA I SRA QA

Abb. 3 Konsensussequenz des Np97-bindenden VIM-Motivs. Dargestellt sind die Sequenzen der VIM-Motiv-besitzenden humanen Proteine, deren konservierte Aminosäuren (rot) sowie die daraus abgeleitete Konsensussequenz RX_5AAX_2R .

Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass die konservierten flankierenden Arginine sowie die zentralen Alanine ausschlaggebend für die Bindung an Np97 sind (108; 111). Das

vordere Arginin ist jedoch für die Bindung von UBXD1 und ZFAND2b nicht essentiell. Für alle Sequenzen der VIM-Motive wird eine α -Helix vorhergesagt, wobei sich die konservierten Aminosäuren in einer Radprojektion auf einer Seite dieser Helix befinden (111). Die Konformation der Helices für UBXD1 und ZFAND2b ist durch das fehlende vordere Arginin von der übrigen Kofaktoren verschieden. Diese veränderte Konformation hat wahrscheinlich einen veränderten Bindemechanismus und eine schwächere Bindung zur Folge. Die Affinität der Bindung der VIM-Motive an die N-Domäne von p97 ist trotz hoher Sequenzähnlichkeit sehr unterschiedlich im Bereich von nanomolar (gp78) bis mikromolar (UBXD1) (112).

Desweiteren konnten die an der Bindung des VIM-Motivs beteiligten Aminosäuren der N-Domäne von p97 mittels Mutationsstudien und später mit Hilfe einer Kristallstruktur bestimmt werden (Abb. 4, (111; 112)).

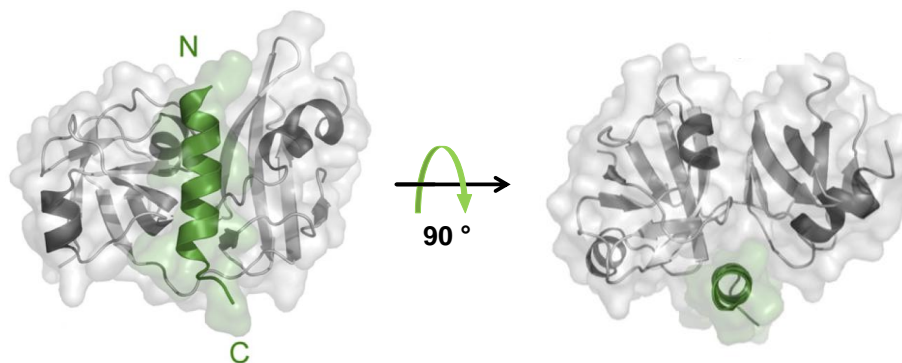


Abb. 4 Kristallstruktur des VIM-Motivs von gp78 und der N-Domäne von p97. PDB-ID: 3TIW. aus (112). Das α -helikale VIM-Motiv von gp78 (grün) bindet in die hydrophobe Furche der beiden Subdomänen von Np97 (grau). Die Bindung wird über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt.

Die Kristallstruktur zeigt ein α -helikales VIM-Motiv, welches in die Furche zwischen den beiden Subdomänen (Val 38, Ile 70, Leu 72, Tyr 110, Tyr 143 und Ile 175) sowie dem diese Subdomänen verbindenden Linker (Asp 107 bis Lys 112) der N-Domäne von p97 bindet (111; 112). Die Bindung zwischen dem VIM-Motiv und der N-Domäne wird sowohl über hydrophobe als auch elektrostatische Wechselwirkungen vermittelt (112). Die Interaktion mit der VIM-Furche von p97 wird durch die geladenen Aminosäuren am Ende der VIM-Helix (Arg 625, Arg 636) begünstigt (65). Für die effektive Bindung des VIM-Motivs ist bei einigen Kofaktoren wie SVIP neben der N-Domäne zusätzlich der Linker zur D1-Domäne notwendig (66; 112). Trotz des gleichen VIM-Motivs in verschiedenen Kofaktoren ist die Stöchiometrie für die Bindung an die N-Domäne von p97 unterschiedlich. So bindet SVIP im Verhältnis 1:1, während drei Moleküle von UBXD1 an ein p97-Hexamere binden. Im Falle von UBXD1 kann dies auch auf die zusätzliche Bindung der PUB-Domäne an den C-Terminus von p97 zurückzuführen sein.

Desweiteren verhindert SVIP (mit einem VIM-Motiv) die Bindung von Ufd1 und Faf1 (UBX-Domäne), Npl4 (UBD-Domäne) oder gp78 (VIM-Motiv) an p97, was ebenfalls auf einen kompetitiven Bindungsmechanismus bzw. zumindest überlappende Bindestellen der Proteine hinweist (108). Spätere Kristallstrukturen haben gezeigt, dass trotz fehlender Sequenz- oder Strukturähnlichkeit sowohl UBX-Domänen und UBX-ähnliche-Domänen als auch das VIM-Motiv in die Furche zwischen den beiden Subdomänen der N-Domäne von p97 binden (Abb. 5, 66; 112)).

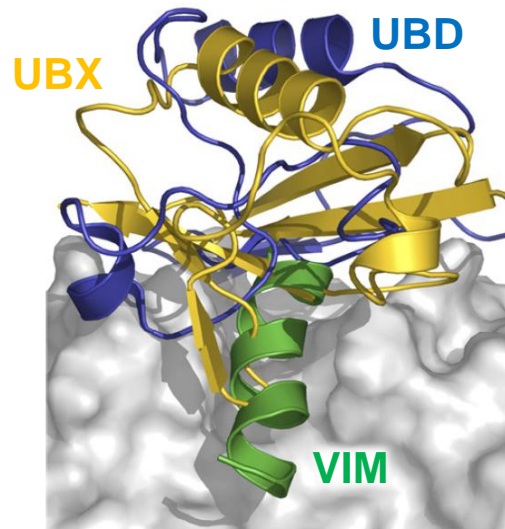


Abb. 5 Bindung verschiedener Domänen von Kofaktoren an die N-Domäne von p97. Trotz fehlender Sequenz- oder Strukturähnlichkeit binden die UBX-Domäne von Faf1 (gelb), die Ubiquitin D-Domäne von Npl4 (UBD, blau) und das VIM-Motiv von gp78 (grün) in die hydrophobe Furche der N-Domäne von p97 (grau).

Ein verwandtes, an p97-bindendes Motiv mit zahlreichen Argininen und Lysinen ist das VBM-Motiv in Hrd1 oder Atx3. Proteine mit einem VBM-Motiv scheinen ebenfalls mit einem ähnlichen Mechanismus wie Proteine mit einem VIM-Motiv an die N-Domäne von p97 zu binden, jedoch eine zehnfach geringere Affinität zu Np97 zu haben (65; 76).

PUB-Domäne:

Die PUB-Domäne (*Peptide:N-glycanase/UBA or UBX-containig protein domain*) wurde erstmals bioinformatisch im N-Terminus des p97-Kofaktors PNGase entdeckt und als hoch konserviert beschrieben (104). Die PUB-Domäne der PNGase besteht aus einem Bündel von fünf α -Helices und einem verdrehten antiparallelen β -Faltblatt aus drei Strängen (Abb. 6, A).

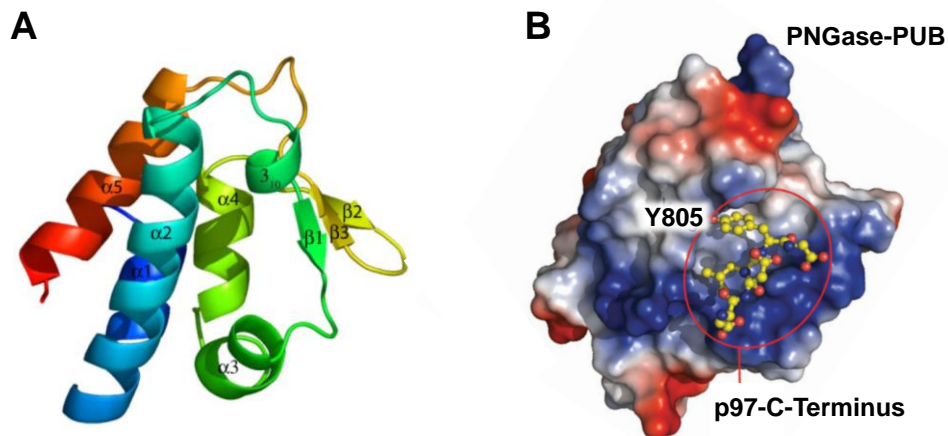


Abb. 6 Struktur der PUB-Domäne (PNGase). PDB-ID: 2HPJ. A: Kristallstruktur der PUB-Domäne der PNGase mit den 5 α -Helices und dem antiparallelen β -Faltblatt (aus (101)). B: Interaktionsstelle zwischen der PUB-Domäne und dem C-Terminus von p97. Diese Bindung wird über die Phosphorylierung des Tyr 805 reguliert (aus (66)).

Neben einigen strukturell wichtigen Aminosäuren wie Gly 79 und Phe 80, sind vor allem die an der Bindung des C-Terminus von p97 beteiligten Aminosäuren Leu 35, Asn 41, Lys 50, Tyr 51, Arg 55, Asn 58 und Glu 73 hoch konserviert. Sie bilden eine basische Tasche (α -Helix 2-4 und β -Strang 1), in welche die letzten zehn unstrukturierten und hauptsächlich sauren Aminosäuren

des C-Terminus von p97 (Sequenz: TEDNDDDLYG) binden (Abb. 6, B; (66; 75; 101; 113)). Diese Interaktion wird hauptsächlich durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen vermittelt und hat einen K_D von 11 μM (113). Die Hauptrolle bei der Bindung des C-Terminus von p97 übernimmt dabei das vorletzte Tyrosin 805 im C-Terminus, welches in die hydrophobe Tasche in der PUB-Domäne bindet. Diese Bindung wird unter anderem durch die Phosphorylierung dieses Tyrosins reguliert, wobei die Interaktion durch eine Phosphorylierung unterbrochen wird (66; 75; 113). Das stöchiometrische Verhältnis der Bindung zwischen PNGase und unphosphoryliertem p97 liegt bei 1:3, wohingegen sechs Moleküle der isolierten PUB-Domäne an ein p97-Hexamer binden können (79; 113).

UBX-Domäne:

Die UBX-Domäne (*Ubiquitin regulatory X domain*) wurde erstmals bei dem p97-Kofaktor SAKS1 beschrieben und ist seitdem bei 12 weiteren p97-Kofaktoren gefunden worden (81; 100; 114). Bis heute sind zahlreiche Kofaktoren bekannt, die eine UBX- oder UBX-ähnliche Domäne (UBD-Domäne) besitzen, sodass diese die größte Gruppe an p97-Kofaktoren bilden (69). Die UBX-Domäne liegt in 80 % der Kofaktoren am C-Terminus der Proteine, jedoch ist weder eine Sequenzähnlichkeit noch sind funktionelle Gemeinsamkeiten der Proteine zu erkennen (115–117). Die UBX-Domäne ist mit ihren 80 Aminosäuren ein strukturelles Homolog von Ubiquitin. Sie besitzt einen *β -grasp fold* mit der Sekundärstrukturelementanordnung $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, wobei die fünf β -Stränge ein gemischtes β -Faltblatt ergeben (Abb. 7, A; (68; 100; 117)).

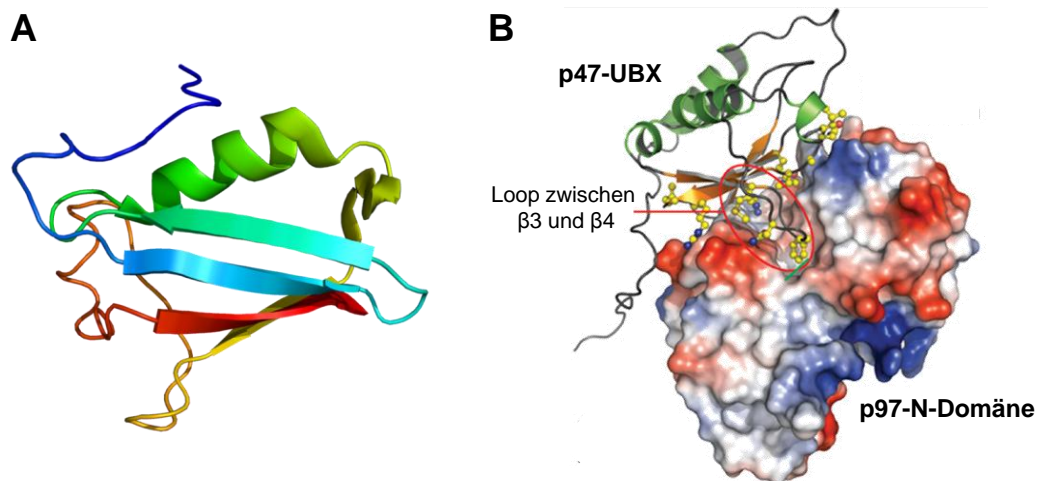


Abb. 7 Struktur der UBX-Domäne (p47). PDB-ID: 1142. A: NMR-Struktur der UBX-Domäne von p47 mit den fünf β -Strängen, die ein gemischtes β -Faltblatt bilden und den zwei α -Helices (aus (117)). B: Interaktionsstelle zwischen der UBX-Domäne und der N-Domäne von p97 (aus (101)).

Die Faltblattstruktur ist auch ausschlaggebend für die Interaktion der UBX-Domäne mit der N-Domäne von p97. Die eigentliche Bindung wird über eine Loop-Region (FPR) zwischen dem dritten und vierten β -Strang sowie einem weiteren hoch konservierten Arginin im β -Strang 1 vermittelt (Abb. 7, B; (68)). Das dort lokalisierte Phenylalanin bindet durch die *cis*-Konformation des Prolins mit seiner aromatischen Seitenkette in die hydrophobe Furche der Subdomänen der N-Domäne (Asp 35, Ser 37, Val 38, Phe 52, Arg 53, Gly 54, Ile 70, Pro 106, Val 108, Tyr 110, Glu 141, Tyr 143) (66; 75; 90; 100; 112; 118; 119). Die Bindung der UBX-Domäne führt jedoch

zu keiner wesentlichen konformationellen Änderung von p97 (118). Zusätzlich wird die Interaktion durch ionische Wechselwirkungen durch einen positiven Patch um das R...FPR-Motiv der UBX-Domäne und den negativen Ladungen im Bereich der Furche der Subdomänen von p97 verstärkt (117). Aufgrund des nicht in Ubiquitin-enthaltenen Motivs R...FPR und dem daraus resultierenden verkürzten Loop bindet p97 Proteine mit einer UBX-Domäne deutlich besser als Ubiquitin selber (102; 120).

Einen ähnlichen Bindemechanismus wie Proteine mit einer UBX-Domäne haben auch Proteine mit einer UBD-Domäne (*Ubiquitin fold domain*, bspw. Npl4). Trotz fehlender Sequenzähnlichkeit, weisen diese Domänen eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Tertiärstruktur auf, sodass auch hier die Bindung zur N-Domäne von p97 über den Loop zwischen dem dritten und vierten β -Strang vermittelt wird (62). Daher kommt es auch zu einer kompetitiven Bindung zwischen UBX- und UBD-Domänen-enthaltenden Proteinen (62; 71).

1.2. UBXD1

Das UBXD1-Gen mit einer Länge von 1659 Nukleotiden befindet sich auf Chromosom 19p13. Es besitzt zwei Spleißvarianten, von denen die eine 388 Aminosäuren lang ist und ein Gewicht von 43,8 kDa besitzt und die längere Variante aus 441 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 49,8 kDa aufweist (Swiss-Prot: Q9BZV1). Das UBXD1-Gen ist hoch konserviert unter Eukaryonten (außer Fungi und Hefen, (75; 121)), sodass zwischen dem humanen und dem Maus-Gen eine Sequenzidentität von 80 % und eine Sequenzähnlichkeit von 87 % besteht. UBXD1 wird ubiquitär exprimiert und besitzt in den stark regenerativen Testes und in Hirngewebe ein hohes Expressionsniveau (75; 115). UBXD1 kommt zur Hälfte in löslicher Form in Cytoplasma vor, während die andere Hälfte Membran-assoziiert im Mikrosomen-Pellet vorliegt (121). Desweiteren ist UBXD1 in Centrosomen lokalisiert und könnte somit an der Formierung von Aggresomen (perinukleare Kompartimente, die missgefaltete Proteine beinhalten) beteiligt sein (75). Die Struktur von UBXD1 besteht aus drei Bereichen: dem N-Terminus in dem sich das VIM-Motiv befindet, der PUB-Domäne und der UBX-Domäne am C-Terminus (Abb. 8, (75)).

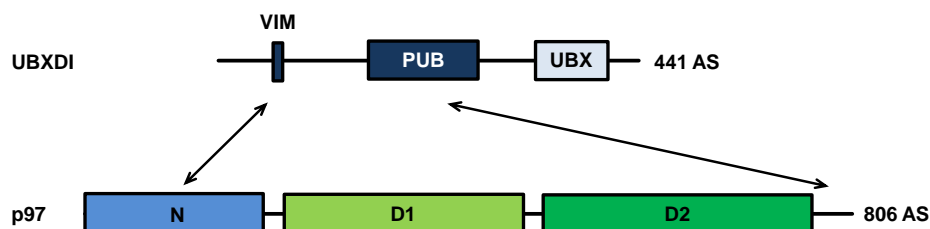


Abb. 8 Domänenstruktur von UBXD1 und p97 sowie deren interagierende Domänen. Oben: UBXD1 (441 Aminosäuren) besitzt drei Domänen: das VIM-Motiv (52-63 AS), die PUB-Domäne (150-264 AS) sowie die UBX-Domäne (335-411 AS). Unten: p97 (806 Aminosäuren) besitzt ebenfalls drei Domänen: die N-Domäne (1-187 AS), die D1-Domäne (209-460 AS) und die D2-Domäne (481-763 AS). Die Interaktion zwischen UBXD1 und der N-Domäne von p97 wird über das VIM-Motiv vermittelt, während die PUB-Domäne von UBXD1 an den C-Terminus von p97 bindet (Pfeile).

UBXD1 und p97:

Die Interaktion zwischen UBXD1 und p97 wird von dem VIM-Motiv und der PUB-Domäne vermittelt (75; 122). Das VIM-Motiv von UBXD1 (AQMAAAAALAR) bindet an die N-Domäne von p97 (111; 122). Die Bindung ist jedoch aufgrund des fehlenden vorderen Arginins (durch ein Alanin ersetzt) schwächer als für die übrigen VIM-Motiv-enthaltenen Kofaktoren, da die Interaktion hauptsächlich nur noch über Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt wird (112). Die PUB-Domäne von UBXD1 interagiert wie die übrigen Kofaktoren von p97 mit den letzten zehn Aminosäuren des C-Terminus von p97.

Mutationen des VIM-Motivs und der PUB-Domäne führen zum Bindungsverlust an p97. Dies deutet darauf hin, dass beide Interaktionsstellen unabhängig voneinander funktionieren (111). Die Bindung der PUB-Domäne von UBXD1 an den C-Terminus ist dabei höher affin als die Bindung über das VIM-Motiv an die N-Domäne von p97 (112). Im Gegensatz zu den übrigen PUB-Domänen ist das Arg 55, welches die Interaktion der Carboxylgruppe des C-Terminus vermittelt, in UBXD1 nicht konserviert und durch ein Lysin ersetzt. Dieses Lysin könnte aufgrund der fehlenden Aminogruppe sterisch zu einer besseren Bindung der PUB-Domäne an p97 führen (113).

Die UBX-Domäne von UBXD1 interagiert nicht mit der N-Domäne von p97, da in der Bindestelle das Phenylalanin durch ein Glycin substituiert ist und das darauf folgende Prolin fehlt (75).

Das molare Verhältnis von UBXD1 und dem p97-Hexamer-Protein beträgt in HeLa-Zellen etwa 1:1 (12 nM UBXD1 zu 11,5 nmol p97-Hexamer, (75)). Wohingegen *in vitro*-Studien ein Komplexverhältnis von drei Molekülen UBXD1 an ein p97-Hexamer gezeigt haben.

Über die Auswirkung der Bindung von UBXD1 an p97 ist bis heute wenig bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die Bindung von UBXD1 weder Auswirkungen auf das Expressionsniveau von p97 hat noch die ATPase-Aktivität von p97 beeinflusst (75). UBXD1 hat wahrscheinlich einen regulatorischen Einfluss auf das ERAD-System (ER-assoziiertes Proteinabbau, Proteasom-unabhängig), da sowohl die Überexpression als auch *knock down*-Studien Störungen in diesem System hervorrufen (121). Desweiteren interagiert UBXD1 mit ER-ständigen Proteinen wie ERGIC-53 (123) und reguliert die endolysosomale Sortierung von Proteinen in einem ternären Komplex mit p97 und Caveolin-1 (49).

UBXD1 und weitere Kofaktoren:

Desweiteren ist bekannt, dass UBXD1 und p47, ein weiterer gut untersuchter p97-Kofaktor, einen ternären Komplex mit p97 bilden können. Die direkte Interaktion zwischen UBXD1 und p47 wurde bereits ausgeschlossen (75; 121). Diese Komplexbildung ist jedoch nur möglich, da UBXD1 neben dem Np97-bindenden VIM-Motiv auch die PUB-Domäne besitzt, die den C-Terminus von p97 bindet. Damit ist die Bindestelle in der N-Domäne für p47 weiterhin zugänglich (122).

Im Gegensatz zu p47 scheint der Kofaktor Ufd1(-Npl4) mit UBXD1 um die gleiche Bindungsstelle an p97 zu konkurrieren, da gezeigt werden konnte, dass die Bindung zwischen Ufd1 und p97 mit steigender UBXD1-Expression reduziert werden konnte (121). Es scheint demnach keine Kooperativität zwischen Ufd1(-Npl4) und UBXD1 zu geben wie es für FAF1 und Ufd1-Npl4

bekannt ist (100). Eine direkte Interaktion zwischen Ufd1 und UBXD1 ist ausgeschlossen (121), wohingegen beispielsweise eine direkte Interaktion zwischen Ufd1 und dem VIM-Motiv-enthaltenden gp78 gezeigt werden konnte (21; 124).

Desweiteren wurde eine Interaktion zwischen dem ER-Membranprotein ERGIC-53 und UBXD1 beschrieben, die Ubiquitin-unabhängig ist, jedoch der enzymatischen Aktivität von p97 bedarf. ERGIC-53 bildet ein ER-ständiges Hexamer, dessen Hauptteil ins Lumen des ER zeigt. Die Interaktion zu UBXD1 soll über die 12 cytosolischen C-terminal gelegenen Aminosäuren von ERGIC-53 sowie den ersten zehn N-terminalen Aminosäuren von UBXD1 erfolgen. Eine Interaktion von ERGIC-53 mit anderen UBX-Domänen-enthaltenen Kofaktoren von p97 konnte nicht nachgewiesen werden (123).

Neben ERGIC-53 bildet UBXD1 auch mit N-terminal ubiquityliertem Caveolin-1 und p97 einen ternären Komplex, der für UBXD1 spezifisch ist und weder mit p47 noch mit Ufd1-Npl4 zustande kommt (25; 49). Die Bildung dieses ternären Komplexes kann durch die IBMPFD-assoziierten Mutationen in p97 oder einem *knock down* von UBXD1 gestört werden. Als Folge dessen kommt es zu leeren Vesikeln, die nicht angesäuert sind und der Stagnierung von unmodifiziertem Caveolin-1 in Endosomen, was dem Phänotyp von IBMPFD-Patienten entspricht (25; 49).

1.3. ZIELSETZUNG

p97 ist eine ubiquitäre ATPase mit zahlreichen diversen Funktionen, die durch ein großes Netzwerk an Kofaktoren ermöglicht werden (Kap. 1.1.1). Es ist bekannt, dass p97-Missense-Mutationen im Interface zwischen der N- und der D1-Domäne in Menschen IBMPFD (*Inclusion body* Myopathie assoziiert mit der Padget-Knochenkrankheit und einer frontotemporalen Demenz) verursachen (42). Obwohl p97 eine so wichtige Rolle in der Zelle übernimmt, entwickeln sich IBMPFD-Patienten bis zu ihrem 40./50. Lebensjahr normal und haben eine Lebenserwartung von 50 bis 60 Jahren. Die Ursache besteht in der geringen Veränderung der Kofaktoreninteraktion sowie der ATPase-Aktivität von p97 trotz der *Missense*-Mutationen. Während die zellulären Defekte bereits gut beschrieben worden sind (34; 48; 125; 126), ist der molekulare Mechanismus dieser Krankheit noch wenig verstanden. Neueste Studien haben gezeigt, dass die Interaktion zwischen p97 und den meisten seiner Kofaktoren durch die IBMPFD-assoziierten Mutationen nicht beeinträchtigt ist, mit Ausnahme von UBXD1 und PLAA (49). UBXD1 ist an der Ubiquitin-abhängigen Membransortierung und am Proteinabbau in Lysosomen beteiligt. Eine Störung der Interaktion zwischen p97 und UBXD1 führt folglich zu vergrößerten Endosomen mit Fehlfunktionen. Dadurch kommt es zur Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen, die neurodegenerative Erkrankungen verursachen (40; 41). Obwohl UBXD1 offenbar eine Rolle in der Pathogenese von IBMPFD-Patienten spielt, ist die Interaktion zwischen p97 und UBXD1 unzureichend verstanden. UBXD1 bindet über seine PUB-Domäne an den C-Terminus von p97 (75; 122). Zusätzlich besitzt UBXD1 ein VIM-Motiv im N-Terminus, das die N-Domäne von p97 bindet (111; 122). UBXD1 nimmt eine Sonderstellung unter den p97-Kofaktoren ein, weil es theoretisch die N-Domäne und den C-Terminus von p97 gleichzeitig

binden kann. Die übrigen Kofaktoren besitzen meistens eine Bindedomäne für die N-Domäne oder den C-Terminus von p97. Für die PUB-Domäne von UBXD1 ist die Interaktion mit p97 bereits hinreichend beschrieben worden (66; 111; 113). Für den N-Terminus von UBXD1 hingegen gibt es lediglich einige *pull down*-Assays und Kristallstrukturen von Proteinen mit ähnlichen VIM-Motiven (75; 111; 112). Der N-Terminus von UBXD1 ist unter seinen Homologen zwar stark konserviert (75), was die Wichtigkeit des N-Terminus von UBXD1 unterstreicht. Andererseits gibt es keine homologen Sequenzen in anderen Kofaktoren von p97, was für eine sehr individuelle Funktion des N-Terminus von UBXD1 spricht. Desweiteren besitzt UBXD1 zwar ein VIM-Motiv, Studien haben jedoch gezeigt, dass das vordere Arginin der Konsensussequenz durch ein Alanin (Ala 52) ersetzt ist und die Affinität des VIM-Motivs von UBXD1 schlechter ist als die Affinität der VIM-Motive anderer Kofaktoren (111; 112). Anhand dessen lässt sich vermuten, dass es für den N-Terminus einen veränderten Bindemechanismus als für die übrigen VIM-Motiv-enthaltenen Kofaktoren von p97 geben könnte. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit statt des isolierten VIM-Peptids der Einfluss des gesamten N-Terminus von UBXD1 (1-133 AS) auf p97 untersucht werden.

In einem ersten Schritt sollen dazu verschiedene UBXD1-Konstrukte des N-Terminus kloniert sowie dessen Expression und Reinigung etabliert werden. Anschließend soll ein Strukturmodell mit Hilfe von NMR-Studien (Analyse der Flexibilität und Wasserstoffbrückenbindungen), CD-Spektren und Mutationsstudien entwickelt werden. Dieses Strukturmodell soll durch das Erstellen von Sequenz-basierten und NMR-Shift-basierten Modellen verglichen und ergänzt werden. Desweiteren soll die Interaktion des gesamten N-Terminus mit der N-Domäne von p97 NMR-spektroskopisch auf atomarer Ebene untersucht werden, um eine mögliche Ursache für die geringe Affinität des VIM-Motivs von UBXD1 zur N-Domäne von p97 aufklären zu können. Darüber hinaus soll ebenfalls NMR-spektroskopisch geprüft werden, ob der N-Terminus auch mit weiteren Domänen von p97 interagiert. Neben der atomaren Untersuchung sollen Fluoreszenz-spektroskopische Messungen zur Bestimmung der Affinität der Interaktionen durchgeführt werden. Nachdem die Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und den einzelnen Domänen von p97 untersucht worden ist, soll der Einfluss des N-Terminus von UBXD1 auf die Konformation und den Multimerisierungsgrad von p97 geklärt werden. Die aus diesen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse sollen Aufschlüsse darüber geben, wie der N-Terminus von UBXD1 die ATPase-Aktivität von p97 reguliert, was mit einem NADH-gekoppelten ATPase-Assay überprüft werden soll. Langfristig sollen die unterschiedlichen Rollen beider Bindestellen (VIM-Motiv, PUB-Domäne) von UBXD1 bei der Regulation von p97 auf zellulärer Ebene geklärt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN

2.1.1. Chemikalien

Im Folgenden werden alle während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet (Tab. 5). Die verwendeten Abkürzungen müssen nicht der üblichen Nomenklatur entsprechen.

Tab. 5 Verwendete Chemikalien.

NOMENKLATUR	ABKÜRZUNG	HERSTELLER
2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonat	DSS	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol		Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat	ATP	Roth, Karlsruhe
Agar		Roth, Karlsruhe
Agarose, NEO Ultra		Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid, ¹⁵ N	¹⁵ NH ₄ Cl	Cambrige Isotope Laboratories, Andover
Ammoniumpersulfat	APS	Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Amp	Roth, Karlsruhe
Aqua bidestillatus	A. bidest.	
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	Bis-Tris	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	H ₃ BO ₃	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau		Roth, Karlsruhe
Buffer green® DNA-Polymerase, 10x		Thermo Scientific, Darmstadt
Buffer green® Restriktionsenzyme, 10x		Fermentas, St. Leon-Rot
Thiaminchlorid-Hydrochlorid	Vitamin B ₁	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	Fluka, Buchs
Cholesterol		Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blue G250		Fluka, Buchs
Desoxynukleosidtriphosphate, 10 mM	dNTP	Metabion, Martinsried
deutერიertes Wasser, 99 %	D ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	DTT	Roth, Karlsruhe
Eisen(III)-citrat	C ₆ H ₅ FeO ₇	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure		Caldic, Düsseldorf
Ethanol		Caldic, Düsseldorf
Ethylendiamintetraessigsäure, Eisensalz-Dihydrat	EDTA	Roth, Karlsruhe
Fleischextrakt		Fluka, Buchs
Glukose		Roth, Karlsruhe

Glukose, ¹³ C		Cambridge Isotope Laboratories, Andover
Glutathion, reduziert	GSH	Roth, Karlsruhe
Glycerin, 87 %		AppliChem, Darmstadt
Glycin, molecular biology grade		AppliChem, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	GuCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt		AppliChem, Darmstadt
Imidazol		Fluka, Buchs
Isopropanol		Caldic, Düsseldorf
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat		Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)-chlorid	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	Sigma, Steinheim
Liposomenextrakt aus Rinderhirn, Folch Fraction I		Sigma, Steinheim
Lysin, L-Form		Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ · H ₂ O	Fluka, Buchs
Mangan(II)-chlorid	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	Fluka, Buchs
Midori Green		Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Milchpulver		Grema Reform
Natriumbicarbonat	NaHCO ₃	Fluka, Buchs
Natriumcholat		AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat, ultra pure	SDS	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Natriumselenit	Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	Fluka, Buchs
Nickel(II)-chlorid	NiCl ₂ · 6 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Nicotinamidadenindinukleotid, Dinatriumsalz	NADH	Roth, Karlsruhe
Oleoylpalmitoylglycerophosphocholin	POPC	Sigma, Steinheim
Oleoylpalmitoylglycerophosphoglycerol- ammoniumsalz	POPG	Sigma, Steinheim
Pepton		Fluka, Buchs
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	Serva, Heidelberg
Phosphoenolpyruvat, Kaliumsalz	PEP	Sigma, Steinheim
Primer	Sequenzen siehe Anhang	Metabion, Martinsried
Reaktionspuffer, T4-Ligase		Metabion, Martinsried
Rotiphorese® Gel 30	AA/Bis	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	RbCl ₂	Sigma, Steinheim
Salzsäure, 37 %	HCl	AppliChem, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin	TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,	Tris	AppliChem, Darmstadt

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,	Tris	AppliChem, Darmstadt
Trypton		AppliChem, Darmstadt
Tween 20		Roth
Wasser, Nuklease-frei		
Zinksulfat	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	Roth, Darmstadt

2.1.1. DNA- und Proteinmarker

Als DNA-Marker für die Agarosegele wurden der mi-100 bp+ DNA Marker Go (Metabion, **Abb. 1, A**) und der mi-1 kb(-) DNA Marker Go (Metabion, **Abb. 1, B**) verwendet. Als Marker für die SDS-PAGE wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, **Abb. 1, C**) und der Mark 12™ Unstained Standard (life technologies, **Abb. 1, D**) verwendet.

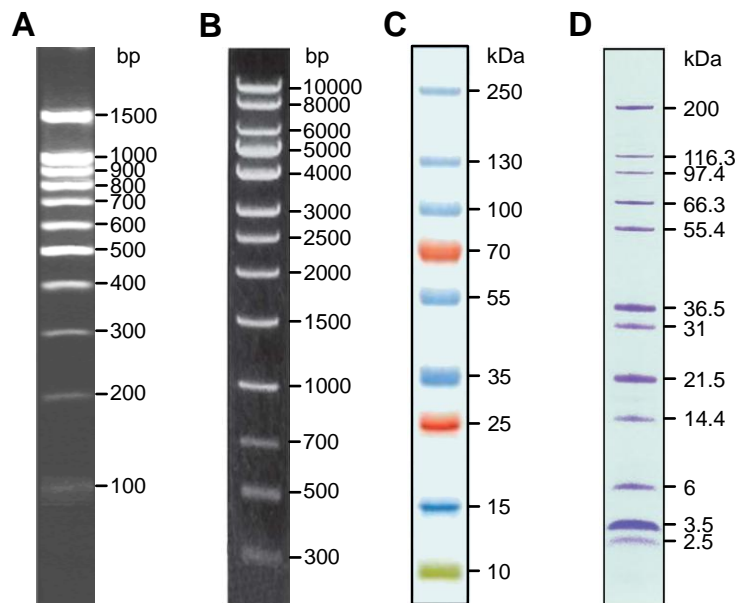


Abb. 1 DNA- und Protein-Marker. Der mi-100 bp+ DNA Marker Go (A) und der mi-1 kb(-) DNA Marker Go (B) wurden für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (C) und der Mark 12™ Unstained Standard (D) wurden für die SDS-PAGE verwendet.

2.1.2. Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die verwendeten Puffer und Lösung aufgelistet. Sofern nicht anders angegeben beziehen sich die Angaben zum pH bei Raumtemperatur.

Anionenaustausch- Startpuffer	20 mM Bis-Tris	pH 6,6 (4 °C)
Anionenaustausch- Elutionspuffer	20 mM Bis-Tris 500 mM NaCl	pH 6,6 (4 °C)

Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung	1,25 g Coomassie Brillant Blue G250 227 ml Ethanol 227 ml A. bidest. 46 ml Essigsäure	
Coomassie-Entfärber	50 ml Essigsäure 75 ml Ethanol 875 ml A. bidest.	
Calcium-Lösung	10 mM Tris-HCl 50 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin	pH 8,0
Gelfiltrationspuffer	50 mM KH ₂ PO ₄ 50 mM K ₂ HPO ₄ 150 mM KCl	pH 6,5
GST-Waschpuffer	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl	pH 7,4
GST-Hochsalzpuffer	20 mM Tris-HCl 500 mM NaCl	pH 7,4
GST-Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 20 mM GSH	pH 7,4
His-Äquilibrationspuffer	10 mM Imidazol 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl	pH 8,0
His-Elutionspuffer	500 mM Imidazol 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl	pH 8,0
His-Waschpuffer	20 mM Imidazol 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl	pH 8,0
Liposomenbindepuffer	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 3 mM DTT	pH 7,6
Niedrigsalzpuffer	20 mM Tris-HCl 50 mM NaCl	pH 7,4

Puffer und Lösungen

NMR-Puffer (50 mM KPi)	50 mM KH_2PO_4 50 mM K_2HPO_4	pH 6,5 (UBXD1-Konstrukte) pH 7,2 (p97-Konstrukte)
NMR-Standard	50 mM KPi 30 mM DSS	pH 6,5
PBST-Puffer	1,5 mM KH_2PO_4 8,1 mM Na_2HPO_4 2,7 mM KCl 137 mM NaCl 0,05 % Tween	pH 7,4
PMSF-Lösung	100 mM PMSF	
Sammelgelpuffer	500 mM Tris-HCl	pH 6,8
SDS-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris-HCl 50 % Glycerin 10 % SDS 14 mM β -Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau	
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl 0,1 % SDS 250 mM Glycin	
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA	
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl	pH 8,8
Tris-Puffer	100 mM Tris-HCl	pH 8,0
TS2 (50x)	700 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 30 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 300 mg H_3BO_3 200 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 200 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 10 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 900 mg Na_2MoO_4 20 mg Na_2SeO_3	<i>ad</i> 1000 ml A. bidest.

2.1.4. Nährmedien und Antibiotika

Sofern nicht anders angegeben beziehen sich folgende Angaben auf 1 Liter des jeweiligen Mediums. Alle Medien wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert.

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl	pH 7,0
LB-Platten	500 ml LB-Medium 7,5 g Agar	
M9-Medium	6.84 g Na ₂ HPO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g NaCl 1 g ¹⁵ NH ₄ Cl	→ autoklavieren
nach dem Autoklavieren:	2 ml MgSO ₄ (1 M) 2 ml TS2 (50x) 100 µl CaCl ₂ (1M) 1 mg Vitamin B ₁₂ 2,45 mg Fe(III)Citrat 4 g Glukose	
Nutrient-Medium	5 g Pepton 3 g Fleischextrakt	
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose	
Ampicillin-Stock	100 mg/ml in A. bidest.	
Kanamycin-Stock	50 mg/ml in A. bidest.	

2.1.5. Bakterienstämme

Für die Vervielfältigung von Plasmiden wurden Shox-Zellen verwendet. Zur Expression der UBXD1- und p97-Proteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)T1r verwendet (Tab. 6).

Tab. 6 Verwendete Bakterienstämme.

STAMM	GENOTYP	HERSTELLER
Shox-Zellen	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL(Str^R) nupG λ</i> ⁻	Bioline, Luckenwalde
BL21(DE3)T1r	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB ⁻) <i>gal dcm λ</i> (DE3) <i>tonA</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.6. Plasmide

Für die Klonierungen wurde der Vektor pET41b(+) verwendet (Merckbioscience). Dieser wurde so modifiziert, dass eine PreScission-Schnittstelle, einschließlich einer ApaI-Schnittstelle, nach dem GST-Tag in der *multiple cloning site* zwischen BamHI und SacII eingeführt wurde. Dies hat den Vorteil, dass die Proteine nach dem Schneiden mit der PreScission-Protease lediglich ein zusätzliches Glycin und ein Prolin am N-Terminus aufweisen. Die ursprüngliche ApaI-Schnittstelle in dem pET41b(+) bei 2135 bp wurde mutiert (Abb. 10).

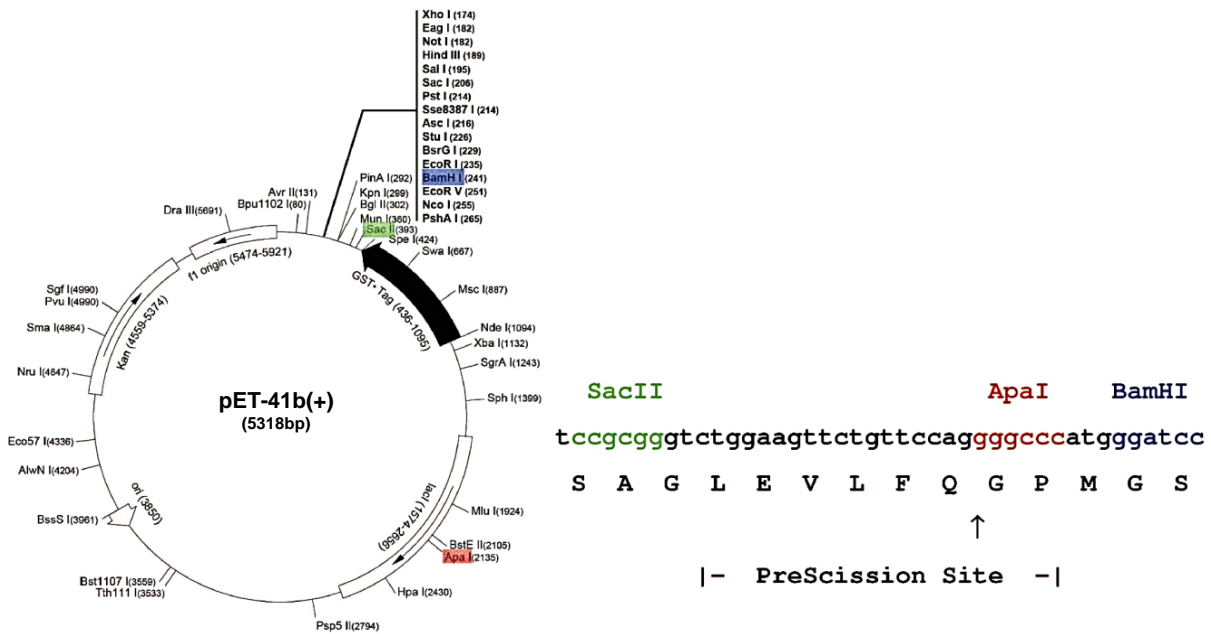


Abb. 10 Vektorkarte des modifizierten pET-41b(+). Die ApaI-eigene Schnittstelle des Vektors (rot markiert) wurde mutiert und zwischen SacII (grün markiert) und BamHI (blau markiert) eine PreScission-Schnittstelle eingefügt. Die Sequenz dieser Schnittstelle, einschließlich einer neuen ApaI-Schnittstelle ist rechts dargestellt.

Karten von Vektoren mit Konstrukten, die von P. Freemont (Imperial College, London) und H. Meyer (ZMB, Essen) ausgehändigt wurden, aber mit denen nicht kloniert worden ist, sind dem Anhang 8.2 zu entnehmen.

2.1.7. Enzyme und Antikörper

Im Folgenden sind alle verwendeten Enzyme (Tab. 7) und Antikörper (Tab. 8) aufgelistet. Alle Enzyme und Antikörper wurden bei -20 °C gelagert.

Tab. 7 Verwendete Enzyme.

ENZYM	HERSTELLER
Apal	Fermentas, St. Leon-Rot
DreamTaq™ Green DNA-Polymerase	Thermo Scientific über VWR, Darmstadt
Lysozym	Fluka, Buchs
PreScission-Protease	eigene Herstellung
Pyruvatkinase/Laktatdehydrogenase	Sigma-Aldrich, Steinheim
T4-Ligase	Metabion, Martinsried
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
XhoI	Fermentas, St. Leon-Rot

Tab. 8 Verwendete Antikörper.

ANTIKÖRPER	EIGENSCHAFTEN	HERSTELLER
Erstantikörper GST-Tag	Maus, monoklonal, 1:500	Sigma, Steinheim
Erstantikörper 6xHis-Tag	Maus, monoklonal, 1:1000	Qiagen, Hilden
Zweitantikörper Maus	anti-Maus IgG, monoklonal, 1:10.000	Amersham, London

2.1.8. Verbrauchsmaterialien und Kits

Im Folgenden sind wichtige Verbrauchsmaterialien und die verwendeten Kits aufgelistet (Tab. 9 und Tab. 10).

Tab. 9 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

VERBRAUCHSMATERIAL	HERSTELLER
Falkons, 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falkons, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
HiTrap Q HP	GE Healthcare, Uppsala
Nitrocellulose-Membran (Protran®)	Whatman, Dassl
NMR-Röhrchen	Schott Economics, Mainz
PCR-Reaktionsgefäße, 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Petri-Schalen	Waldeck, Münster
Pipettenspitzen, 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
Protino® Glutathione Agarose 4B	Macherey & Nagel, Düren
Protino® Ni-NTA-Agarose	Macherey & Nagel, Düren
Sterilfilter, 0,22 µm	Millipore, Tullagreen
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Uppsala
Superdex 75 16/600, 26/600	GE Healthcare, Uppsala
Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Greiner bio-one, Essen
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Greiner bio-one, Essen
Reaktionsgefäße, 2,0 ml	Greiner bio-one, Essen

Reaktionsgefäße, 1,5 ml (Ultrazentrifuge)	Beckman Coulter, Palo Alto
Röntgenfilm CL-Xposure	Thermo Scientific, Rockford
Amicon™ Ultra, 15 ml, 3k/10k/30k MWCO	Millipore, Tullagreen

Tab. 10 Verwendete Kits.

KIT	VERWENDUNG	HERSTELLER
Lightning QC site-directed Mutagenesis Kit	site-directed Mutagenese	Agilent, Santa Clara
Nucleo Spin Extract II Kit	DNA-Reinigung aus Gelen und PCR-Ansätzen	Macherey & Nagel, Düren
Nucleo Spin Plasmid Kit	Reinigung von Plasmid-DNA	Macherey & Nagel, Düren
Pierce ECL-Plus-Kit	Western Blot Substrat	Thermo Scientific, Rockford
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	site-directed Mutagenese	New England Biolabs, Ipswich

2.1.9. Geräte und Software

Im Folgenden sind alle verwendeten Geräte aufgelistet (Tab. 11). Kleingeräte, die nicht aufgelistet worden sind, gehören zur üblichen Laborausstattung.

Tab. 11 Verwendete Geräte und Software.

GERÄT/SOFTWARE	BEZEICHNUNG	HERKUNFT
Agarosegel-Analyzer	BioDoc Analyze	Biometra, Göppingen
Brutschrank	BD53	Binder, USA
CD-Spektrometer	J-710	Jasco, Gross-Umstadt
CD-Küvetten	Quarzküvetten Suprasil 110-QS, 0.1 mm	Hellma Analytics, Müllheim
Cleanbench	HERA safe	Thermo Scientific, Langenselbold
DNA-Gelapparatur	Mini Subcell GT	BioRad, Berkeley
Elektroporationsgerät	MicroPulser Electroporator	BioRad, Berkeley
Elektroporationsküvette	Elektroporationsküvetten, 0.2 cm	BioRad, Berkeley
Entwickler für Röntgenfilme	Cawomat 2000	Cawo, Schrobenhausen
Fluoreszenz-Spektrometer	Cary Eclipse	Agilent Technologies, Waldbronn
Fluoreszenz-Küvetten	Quarzküvette Suprasil 105.251-QS, 3×3 mm, 15 mm Zentrumshöhe	Hellma Analytics, Müllheim
FPLC	BioLogic DuoFlow F10	BioRad, Berkeley
SDS-Gel-Schüttler	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Großraumzentrifuge	Avanti JE, JLA 9.100	Beckmann, Palo Alto
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle		Sharp
Nanodrop	ND 1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
NMR-Spektrometer	Bruker Ultrashield 700-NMR	Bruker BioSpin, Fällanden
PCR-Cycler	T 3000 Thermocycler	Biometra, Göppingen
Rotor	Rotator SB2	Stuart, Staffordshire
Scanner	Scanjet 8200	hewlett packard, China
SDS-Gelapparatur	XCell Mini Protean 3	BioRad, Berkeley

Spannungsgeber	PowerPac basic	BioRad, Berkeley
Thermoschüttler	Thermoschüttler HT	Infors, Bottmingen
Tisch-Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin, Hamburg
Ultrazentrifuge	Ultrazentrifuge, 45Ti	Beckmann, Palo Alto
Ultrazentrifuge, Eppis	Optima Max-XP, SS-34	Beckmann, Palo Alto
UV/Vis-Spektrometer	Cary 100 Bio	Agilent Technologies, Waldbronn
UV/Vis-Küvetten	Quarzküvetten Suprasil 104-QS, 10 mm	Hellma Analytics, Müllheim
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Cary Eclipse	Bedienung Fluoreszenz-Spektrometer	
Cary WinUV	Bedienung UV/Vis-Spektrometer	
CCPN	Auswertung NMR-Spektren	
GraphPadPrism	Auswertung Fluoreszenz-Messungen	
Pymol	Darstellung Strukturen	
SpectraManager 1/2	Analyse CD-Spektren	
Topspin 3.0	Bedienung NMR-Spektrometer, Prozessierung NMR-Spektren	
What if-YASARA	Homologie-Modell und MD-Simulation	

2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1. Klonierung

Zur Untersuchung der Struktur des N-Terminus von UBXD1 sowie zur Charakterisierung der Interaktion zwischen UBXD1 und Np97 wurden DNA-Konstrukte verschiedener Größe mittels Klonierung hergestellt. Dazu wurde das gewünschte Konstrukt durch eine PCR amplifiziert, verdaut und anschließend in den mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelten Vektor ligiert.

Amplifizierung des Inserts mittels PCR:

Zuerst wurde ein PCR-Reaktionsgemisch unter der Cleanbench auf Eis angesetzt (Tab. 12, HERA safe, Thermo Scientific) und anschließend ein PCR-Programm durchgeführt (Tab. 13, T 3000 Thermocycler, Biometra).

Tab. 12 PCR-Ansatz zur Insert-Amplifizierung. Die verwendeten Primer und die Original-DNA für das jeweilige Konstrukt sind im Anhang 8.3 aufgeführt.

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Original-DNA	1	2 ng/ μ l
forward-Primer	5	1 μ M
reverse-Primer	5	1 μ M
dNTPs (10 mM)	2,5	0,5 mM
Buffer green (10x)	5	1x
DMSO	0,5	1 %
DreamTaq DNA-Polymerase	1	5 U
Nuklease-freies Wasser	30	
Gesamt	50	

Tab. 13 Programm für den PCR-Cycler zur Amplifizierung des Inserts. Die Annealing-Temperatur der verwendeten Primer ist dem Anhang 8.3 zu entnehmen. Die Elongationsdauer wurde der Größe des Konstruktes entsprechend angepasst.

Zyklen		Temperatur [°C]	Dauer [sec]
	initiale Denaturierung	95	120
3x	Denaturierung	95	30
	Annealing	T _m - 9 °C	30
	Elongation	72	30/500 bp
30x	Denaturierung	95	30
	Annealing	T _m - 6 °C	30
	Elongation	72	30/500 bp
	Terminale Elongation	72	600

Nach der PCR wurde das Gemisch auf ein 1,2 %iges Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen und bei 80 Volt so lange laufen gelassen (Mini Subcell GT und PowerPac basic, BioRad), bis die untere gelbe Bande (50 bp) des Buffer green® den Rand des Agarosegels erreicht hat. Die DNA wurde mit Midori Green sichtbar gemacht. Anschließend wurde die Bande ausgeschnitten und aus dem Gel gereinigt (Nucleo Spin Extract II Kit, Macherey & Nagel).

Restriktion:

Danach wurden sowohl das Insert (PCR-Produkt) als auch der Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen (Fast Digest, Fermentas) verdaut (Tab. 14).

Tab. 14 Ansatz zum Verdau des Inserts und des Vektors. Die verwendeten Restriktionsenzyme bei der entsprechenden Klonierung sind dem Anhang 8.4 zu entnehmen.

	Volumen [µl]	Endkonzentration
DNA	x	0,04 µg/µl
Restriktionsenzym A	1	1 FDU
Restriktionsenzym B	1	1 FDU
Buffer green (10x)	5	1x
Nuklease-freies Wasser	<i>ad 50</i>	
Gesamt	50	

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden die Restriktionsansätze mit beiden Restriktionsenzymen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf) und danach gereinigt (Nucleo Spin Extract II Kit, Macherey & Nagel).

Ligation:

Die benötigte Menge an Insert für eine Ligation im Verhältnis 1:3 (Vektor:Insert) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \cdot \text{Insert [bp]}}{\text{Vektor [bp]}} = \text{Insert [ng]} \cdot 3$$

Anschließend wurden der Vektor und das Insert für 1 Stunde bei 16 °C ligiert (Tab. 15, Thermomixer comfort, Eppendorf).

Tab. 15 Ansatz zur Ligation von verdaulichem Insert und Vektor.

	Volumen [µl]	Endkonzentration
Vektor	x	2,5 ng/µl
Insert	x	siehe Formel
T4-Ligase	0,5	125 U
Puffer (10x)	2	1x
Nuklease-freies Wasser	<i>ad 20</i>	
Gesamt	20	

Nach der Ligation wurde 1 µl des Ligationsansatzes in elektrisch kompetente Shox-Zellen transformiert (Kap. 2.3.2), auf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (BD53, Binder) inkubiert.

Kolonie-PCR: Überprüfung richtiger Klone

Zur Überprüfung, ob die entstandenen Kolonien auch ein Insert besaßen oder der Vektor nur religiert wurde, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden einzelne Kolonien in jeweils 20 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und davon eine PCR durchgeführt (Tab. 16).

Tab. 16 PCR-Ansatz zur Überprüfung richtiger Klone mittels Kolonie-PCR.

	Volumen [µl]	Endkonzentration
in Wasser gelöste Kolonie	10	
forward-Primer	2	0,5 µM
reverse-Primer	2	0,5 µM
dNTPs (10 mM)	2	0,5 mM
Buffer green (10x)	4	1x
DreamTaq DNA-Polymerase	0,5	2,5 U
Nuklease-freies Wasser	30	
Gesamt	40	

Das PCR-Programm wurde entsprechend der PCR zur Amplifizierung des Inserts durchgeführt (Tab. 13, T 3000 Thermocycler, Biometra). Anschließend wurden die PCR-Kolonieansätze auf ein 1,2 %iges Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen (Mini Subcell GT und PowerPac basic, BioRad) und begutachtet (BioDoc Analyze, Biometra). Die Färbung der DNA erfolgte mit Midori Green. Von Kolonie-Ansätzen, die eine Bande auf gleicher Höhe und mit gleicher Intensität hatten wie die Positivkontrolle (PCR zur Amplifizierung des Inserts aus dem Ursprungsvektor), wurde mit den übrigen 10 µl der gelösten Kolonie eine Flüssigkultur angelegt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (Thermoschüttler HT, Infors). Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA aus der Flüssigkultur isoliert (NucleoSpin Plasmid Kit, Macherey & Nagel) und zur Sequenzierung geschickt (GATC GmbH, Köln).

2.2.2. site-directed Mutagenese

Für den Austausch einzelner Aminosäuren wurde eine site-directed Mutagenese mit dem Ligthing QC site-directed Mutagenesis Kit von Agilent entsprechend des Manuals durchgeführt. Anschließend wurde 1 µl des Reaktionsansatzes in elektrisch kompetente Shox-Zellen transformiert, auf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (BD53, Infors) inkubiert. Von einigen der Kolonien wurden Flüssigkulturen zur Plasmid-DNA-Isolation angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (Thermoschüttler HT, Infors). Anschließend wurde zur Überprüfung 1 µg der DNA zur Sequenzierung geschickt (GATC GmbH, Köln).

Außerdem wurden einige Mutagenesen mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit von NEB durchgeführt. Das Design der Primer erfolgte online mit dem NEBaseChanger. Die Mutagenese sowie die Transformation der Kit-eigenen kompetenten Zellen wurde entsprechend der Anleitung durchgeführt. Zur Überprüfung wurden einzelne Kolonien in Flüssigmedium zur Plasmid-Isolation angeimpft und über Nacht bei 180 rpm und 37 °C inkubiert (Thermoschüttler HT, Infors). Die Sequenzierung wurde durch GATC GmbH durchgeführt.

2.3. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1. Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung elektrisch kompetenter Shox-Zellen wurde zunächst eine über Nacht-Kultur in Antibiotika- und Salz-freiem Nutrient-Medium angelegt (Thermoschüttler HT, Infors). Am nächsten Tag wurden 5 ml der über Nacht-Kultur auf 500 ml-Hauptkultur (Nutrient-Medium) überimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD von 0,8 wachsen gelassen (Thermoschüttler HT, Infors). Die folgenden Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen mit sterilen Lösungen unter der Cleanbench (HERA safe, Thermo Scientific). Die Zellen wurden für 15 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 15 Minuten bei 4000 xg und 4 °C abzentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Das Zellpellet wurde in 500 ml vorgekühltem A. bidest. resuspendiert und erneut für 15 Minuten bei 4000 xg und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Das dabei entstandene Zellpelett wurde nun in 250 ml kalten A. bidest. aufgenommen und erneut für 15 Minuten bei 4000 xg und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Das hierbei entstandene Pellet wurde in 20 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, erneut zentrifugiert (15 Minuten, 4000 xg, 4 °C, Centrifuge 5810R, Eppendorf) und darauf in 0,5 ml 10 %igem Glycerin gelöst. Diese Zellsuspension wurde zu je 50 µl aliquotiert und nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C bis zur Transformation gelagert.

Für die Herstellung chemisch kompetenter BL21(DE3)T1r-Zellen wurde zunächst eine über Nacht-Kultur ohne Antibiotikum angelegt (Thermoschüttler HT, Infors). Am nächsten Tag wurden 2 ml der über Nacht-Kultur auf 200 ml Hauptkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD von 0,6 schütteln lassen (Thermoschüttler HT, Infors). Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 3000 xg und 4 °C abzentrifugiert (Centrifuge 5810R,

Eppendorf). Sowohl das Anfahren als auch das Abbremsen der Zentrifuge erfolgten langsam (Stufe 1). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 45 ml kalter und steriler Calcium-Lösung vorsichtig resuspendiert. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und erneut für 5 Minuten bei 3000 xg und 4 °C mit langsamen Anfahren und Abbremsen abzentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet in 2 ml Calcium-Lösung vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zu je 50 µl aliquotiert, schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.3.2. Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation elektrisch kompetenter Shox-Zellen erfolgte mittels Elektroporation bei offener Flamme. Dafür wurde ein 50 µl-Aliquot Zellen für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 1 µl aus dem Ligationsansatz (2-4 ng), der site-directed Mutagenese (1 ng) oder reiner DNA (50 ng) für 1 Minute auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in eine gekühlte, sterile Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand, BioRad) überführt und mit dem EC2-Programm (MicroPulser Elektroporator, BioRad) gepulst. Nach erfolgter Elektroporation wurde die Zellsuspension in 200 µl SOC-Medium aufgenommen und die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C und 400 rpm inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). Danach wurden 100 µl der transformierten Zellen auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (BD53, Binder).

Die Transformation chemisch kompetenter BL21-Zellen erfolgte mittels Hitze-Schock bei offener Flamme. Dazu wurde ein 50 µl-Aliquot Zellen für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Danach wurden die Zellen mit 50 ng DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C im Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf). Nachdem die Zellen nach dem Hitze-Schock für weitere 2 Minuten auf Eis mit der DNA inkubiert wurden, wurden diese in 200 µl LB-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37 °C und 400 rpm inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). Im Anschluss wurde die gesamte Zellsuspension auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (BD53, Binder).

2.3.3. Expressionstest

Zur Optimierung der Expression wurde für einige Proteine ein Expressionstest durchgeführt, in dem Medium, Temperatur und Dauer der Expression untersucht wurden. Zuerst wurde eine über Nacht-Kultur des entsprechenden Konstrukts angelegt (Thermoschüttler HT, Infors). Am nächsten Tag wurden 200 ml LB-Medium mit einer OD von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD von 0,8 bei 37 °C und 160 rpm wachsen gelassen (Thermoschüttler HT, Infors). Anschließend wurde die Zellsuspension auf 3 Kolben mit je 50 ml für die Inkubation bei drei verschiedenen Temperaturen aufgeteilt. Ein vierter Kolben bei 37 °C diente als Referenz für die Expression

E. coli-eigener Proteine ohne Induktion. Die Induktion wurde mit 200 μ M IPTG durchgeführt. Nach Induktionsstart wurden nach 3 h, 6 h und über Nacht bei jeder Temperatur eine Probe mit je 5 ml entnommen. Die Zellen wurden für 20 min bei 4000 xg und 4 °C abzentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -20 °C gelagert. Zur Auswertung des Expressionstests wurden die Pellets aufgetaut und in 2 ml Niedrigsalzpuffer gelöst. Anschließend wurden die Zellen für 3 x 30 Sekunden mit 30 % Intensität beschallt (Sonoplus, Bandelin). Bei Proben, die danach weiterhin eine Trübung aufwiesen, wurden noch zwei weitere Male mit je 30 Sekunden und 30 % Intensität mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die lysierten Zellen für 60 Minuten bei 16.000 xg und 4 °C abzentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Danach wurden Überstand und Pellet separiert und die Pellets in 500 μ l Niedrigsalzpuffer resuspendiert. Für die Auswertung wurde von jedem Überstand und jedem Pellet jeder Probe 20 μ l abgenommen und für die SDS-PAGE (Kap. 2.4.4) verwendet.

2.3.4. Expression

Expression in LB-Medium:

Die Expression der UBXD1- und p97-Konstrukte erfolgte durch den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)T1r. Dazu wurde aus einer einzelnen Kolonie bzw. einer Glycerin-Dauerkultur eine über Nacht-Kultur (100 ml LB-Medium) bei 37 °C und 160 rpm angelegt (Thermoschüttler HT, Infors). Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (1-4 l LB-Medium) mit einer OD von 0,15 angeimpft. Die Zellen wurden nun so lange bei 37 °C und 160 rpm inkubiert (Thermoschüttler HT, Infors) bis diese eine OD von 0,8 erreicht hatten. Daraufhin wurde die Expression der UBXD1-Konstrukte mit 200 μ M IPTG für 6 Stunden bei 30 °C und 160 rpm induziert. Die Induktion der p97-Konstrukte (Np97 und D1D2p97) erfolgte mit 200 μ M IPTG mit einer anschließenden Expressionsdauer über Nacht für 16 Stunden bei 30 °C und 160 rpm. Nach der Expression wurden die Zellen für 20 Minuten bei 5.500 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Avanti JE, JLA 9.100, Beckmann). Das Pellet aus einem Liter Medium wurde in 25 ml Niedrigsalzpuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen einer Expression gepoolt, mit 1 mM PMSF versetzt und bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert.

Expression in M9-Medium:

Für NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden die Proteine in Minimalmedium (M9-Medium) mit den entsprechenden Isotopen exprimiert. Dazu wurde eine über Nacht-Kultur (100 ml LB-Medium) bei 37 °C und 160 rpm angelegt (Thermoschüttler HT, Infors). Am nächsten Morgen wurde eine Vorkultur (250 ml LB-Medium pro 1 l M9-Medium) mit einer OD von 0,15 angeimpft und bis zu einer OD von 0,8 bei 37 °C und 160 rpm (Thermoschüttler HT, Infors) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 3000 rpm und Raumtemperatur vorsichtig abzentrifugiert (Avanti JE, JLA 9.100, Beckmann). Das Pellet wurde in 20 ml M9-Medium vorsichtig resuspendiert und danach die M9-Medium-Hauptkultur mit einer OD von 0,2 angeimpft. Anschließend wurden die Zellen bis zu einer OD von 0,8 angezogen

(Thermoschüttler HT, Infors). Die Induktion der Expression der UBXD1- und p97-Konstrukte sowie die Weiterbehandlung der Zellen erfolgte wie in LB-Medium.

Für die Zuordnung der Lysine wurden diese unter anderem demarkiert. Dazu wurde 1 g/l Lysin dem Minimalmedium zugesetzt. Die Lysine werden daraufhin von *E. coli* unverändert in das Protein eingebaut und weisen demnach keine Isotopen-Markierung auf. Damit sind die Signale jener Lysine in einem ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum nicht mehr sichtbar.

2.4. BIOCHEMISCHE METHODEN

2.4.1. Zellaufschluss

Zum Aufschluss der BL21-Zellen nach der Expression wurde das eingefrorene Pellet unter Rühren (MR 3000, Heidolph) im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden 300 mg Lysozym der Zellsuspension hinzugegeben und diese für 1 Stunde bei 4 °C unter ständigem Rühren inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Ultraschall (Sonoplus, Bandelin) für 30 Sekunden bei 60 % Intensität behandelt. Insgesamt wurden 8 Zyklen durchlaufen mit jeweils 1 Minute Pause, um ein Aufheizen der Zellsuspension und der damit verbundenen Proteinaggregation zu verhindern. Anschließend wurden die lysierten Zellen für 70 Minuten bei 35.000 rpm und 4 °C ultrazentrifugiert (Ultrazentrifuge, 45Ti, Beckmann). Vor der folgenden Proteinreinigung wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und steril filtriert (0,22 µm, Millipore) um Schwebeteilchen und Aggregate zu entfernen.

2.4.2. Proteinreinigung

2.4.2.1. Reinigung der UBXD1-Konstrukte

Die Reinigung der GST-UBXD1-Fusionsproteine erfolgte in zwei Schritten über eine GSH-Affinitätschromatographie und einer anschließenden Gelfiltration an einer FPLC-Anlage (BioLogic DuoFlow F10, BioRad). Nach Aufschluss der Zellen und Filtration der löslichen Proteine (Kap. 2.4.1) wurde eine GSH-Säule (Protino® Glutathione Agarose 4B, Macherey & Nagel) mit diesem Proteingemisch beladen. Die Durchführung der Affinitätschromatographie erfolgte wie in Tab. 17 beschrieben, wobei über den gesamten Lauf die Extinktion bei 280 nm für die aromatischen Aminosäuren gemessen wurde.

Tab. 17 Automatisiertes Programm zur Durchführung einer GST-Affinitätschromatographie. Der Probenauftrag variiert je nach Expressionsmenge (80 ml Probe/1 Liter Expressionsmedium).

Schritt (Puffer)	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Äquilibrierung	80	1
Probenauftrag	80-280	0,5
Waschen	30	1
Hochsalz-Waschschritt	50	1
Waschen	30	1
Elution	100	0,5

Die Fraktionen des Peaks aus dem Elutionsschritt wurden gesammelt und auf 2 ml konzentriert (Amicon, 10.000 MWCO, Millipore). Nach Gebrauch wurde die Säule mit 6 M GuCl von etwaigen Proteinrückständen gereinigt. Anschließend erfolgte die Entfernung des GST-Tags des Fusionsproteins durch Inkubation mit der PreScission-Protease (1 µg Protease auf 1 mg Fusionsprotein) für 5 Stunden bei 4 °C. Danach wurde die Probe für 10 Minuten bei 16.000 xg und 4 °C abzentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf), um nicht lösliche Proteinaggregate zu entfernen.

Anschließend wurde eine Gelfiltration mit 1 ml/min in Gelfiltrationspuffer durchgeführt (Superdex 16/600 oder 26/600, GE Healthcare). Dabei wurde der Gelfiltrationssäule eine GSH-Säule nachgeschaltet, um die bestmögliche Trennung zwischen GST und den UBXD1-Konstrukten zu gewährleisten. Es wurde über den gesamten Lauf die Extinktion bei 280 nm für die aromatischen Aminosäuren und zusätzlich bei 214 nm für die Peptidbindung gemessen.

Nach erfolgter Gelfiltration wurden die Fraktionen der verschiedenen Peaks mittels SDS-PAGE analysiert und jene Fraktionen konzentriert (3.000 MWCO, Millipore), die das entsprechende UBXD1-Konstrukt ohne GST und die minimale Menge an Abbauprodukten enthielt. Für die NMR-Spektroskopie wurden die Proben in 50 mM KPi-Puffer (pH 6,5) umgepuffert.

2.4.2.2. Reinigung der p97-Konstrukte

Die Reinigung der His-getagten N-Domäne von p97 erfolgte in zwei Schritten mittels Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP, GE Healthcare) und anschließender Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Protino® Ni-NTA-Agarose, Macherey & Nagel) an einer FPLC-Anlage (BioLogic DuoFlow F10, BioRad). Nach Aufschluss der Zellen und Filtration der löslichen Proteine (Kap. 2.4.1) wurde ein Anionenaustauscher mit diesem Proteingemisch beladen. Der Start-Puffer hatte einen pH von 6,6, sodass Np97 mit dem darunter liegendem pI an die Säule gebunden hatte und dadurch im Eluat wieder zu finden war. Bei der Anionenaustauschchromatographie wurde darauf geachtet, dass die maximale Bindekapazität von 50 mg Protein pro Säule (5 ml) nicht überschritten wurde, sodass pro Reinigung mehrere Durchläufe notwendig waren (1 Durchlauf pro Liter Medium mit 15 ml Säulenvolumen). Die Durchführung der Anionenaustauschchromatographie erfolgte wie in Tab. 18 beschrieben, wobei über den gesamten Lauf die Extinktion bei 280 nm für die aromatischen Aminosäuren gemessen wurde.

Tab. 18 Automatisiertes Programm zur Durchführung einer Anionenaustauschchromatographie. Der Probenauftrag wurde auf 45 ml Probe limitiert, um ein Überladen der Säule zu verhindern.

Schritt (Puffer)	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Äquilibrierung	60	1
Probenauftrag	max. 45 ml	1
Waschen	30	2
Elution	60	1,5
Reinigung (2 M NaCl)	30	2

Am Ende jeden Durchlaufs wurden die Anionenaustauscher-Säulen mit 2 M NaCl gewaschen, um etwaige Rückstände auf der Säule für den nächsten Durchlauf restlos zu beseitigen. Nach der Anionenaustauschchromatographie wurde der fraktionierte Elutionspeak im Verhältnis 1:7 mit dem His-Äquilibrationspuffer verdünnt, um den für die His-Reinigung notwendigen pH von > 7,0 zu gewährleisten. Daraufhin erfolgte eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit den in Tab. 19 aufgelisteten Schritten. Die Elution erfolgte über einen Gradienten. Während des gesamten Laufs wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen.

Tab. 19 Automatisiertes Programm zur Durchführung einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Der Probenauftrag variiert je nach Eluatmenge aus der Anionenaustauschchromatographie.

Schritt (Puffer)	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Äquilibration	50	1
Probenauftrag	200-350	1
Waschen	50	1
Elutionsgradient:		
Äquilibrationspuffer 100 % → 0 %	200	1
Elutionspuffer 0 % → 100 %		
Reinigung (0,5 M NaOH)	30	1

Der fraktionierte Elutionspeak der His-Reinigung wurde mittels SDS-PAGE auf Verunreinigungen untersucht und anschließend konzentriert (Amicon, 10.000 MWCO, Millipore). Für die NMR-Spektroskopie wurden die Proben in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,2) umgepuffert. Nach jeder Reinigung wurde die Ni-NTA-Säule entsprechend des Handbuchs von Macherey & Nagel neu mit Ni-Ionen beladen (127).

2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Nach jeder Reinigung wurde die Proteinkonzentration nach Lambert-Beer bestimmt. Dazu wurde jeweils mit 2,2 µl der Proteinlösung die Extinktion (E) am Nanodrop (ND 1000 Spectrophotometer, Peqlab) bei 280 nm gemessen. Der Blank erfolgte gegen den entsprechenden Puffer. Anschließend wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz die Molarität sowie die Konzentration bestimmt.

$$c [\mu M] = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \cdot 10^6$$

$$c \left[\frac{mg}{ml} \right] = c[M] \cdot MW[Da]$$

Der Extinktionskoeffizient (ϵ) und das Molekulargewicht (MW) des jeweiligen Proteins sind dem Anhang 8.4 zu entnehmen. Die Schichtdicke der Küvette betrug $d = 1$ cm.

2.4.4. SDS-PAGE

Zur Analyse der Fraktionen aus den Reinigung sowie zur Überprüfung der Reinheit eines Proteins wurde eine SDS-PAGE (15 %) durchgeführt. Die dafür notwendigen Gele wurde entsprechend Tab. 20 selbst hergestellt.

Tab. 20 Ansatz für die Herstellung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE.

	Trenngel (4x)	Sammelgel (4x)
AA/Bis	10 ml	850 μ l
A. bidest.	5,2 ml	3,5 ml
Trenngelpuffer	4,4 ml	0 ml
Sammelgelpuffer	0 ml	400 μ l
SDS (10 %)	200 μ l	40 μ l
APS (10 %)	200 μ l	40 μ l
TEMED	8 μ l	4 μ l

Dazu wurde zuerst das Trenngel gegossen und während der einstündigen Aushärtung mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel gegossen. Nach dem Aufsetzen eines 15-Taschen-Kamms wurde das Sammelgel für eine weitere Stunde trocknen gelassen. Bis zur Verwendung wurden die Gele feucht in Papiertücher eingewickelt bei 4 °C gelagert.

Zur Beladung einer SDS-PAGE wurden die Proben zuvor mit 2x Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt (Thermomixer comfort, Eppendorf). Die verwendeten Marker sind dem Kapitel 2.1.2 zu entnehmen.

Alle Gele wurden bei 120 Volt so lange laufen gelassen (XCell Mini Protean 3 und PowerPac basic, BioRad), bis die Coomassie-Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel von den Glasscheiben vorsichtig abgelöst und mit der Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurde das Gel in der Lösung für 1 Minute in der Mikrowelle (Sharp) erhitzt und danach 15 Minuten geschüttelt (Duomax 1030, Heidolph). Zur Entfärbung wurde zuerst die Färbelösung entfernt und die Schale mit A. bidest. ausgespült und danach die Entfärber-Lösung hinzugegeben. Auch hier wurde das Gel in der Entfärber-Lösung für 1 Minute in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Der Vorgang des Entfärbens wurde so lange wiederholt bis das Gel ausreichend entfärbt war. Zur Dokumentation wurde das Gel eingescannt (Scanjet 8200, hp).

2.4.5. Limitierte Proteolyse

Um den Einfluss der Bindung des N-Terminus von UBXD1 auf die Konformation eines p97-Hexamers zu untersuchen, wurde eine limitierte Proteolyse mit Trypsin durchgeführt (128). Dazu wurden folgende Reaktionsgemische (Tab. 21) angesetzt und bei 37 °C für 120 Minuten inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf).

Tab. 21 Ansatz für die limitierte Proteolyse von p97 mit Trypsin.

	Volumen [µl]	Endkonzentration
p97	40	1 mg/ml
Kofaktor	x	1 mg/ml
Trypsin	10	10 µg/ml
KPi-Puffer (pH 6.5)	<i>ad</i> 100	
Gesamt	100	

Neben UBXD1 wurde auch der Einfluss von p47 und ATPγS auf die p97-Konformation untersucht. Zur Analyse der Proteolyse wurde nach 120 Minuten 10 µl eines Ansatzes entnommen, mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Anschließend wurde der Verdau von p97 in Gegenwart von UBXD1 mit einer SDS-PAGE (Kap. 2.4.4) analysiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz von p97 ohne einen seiner Kofaktoren.

2.4.6. Liposomenbindungsassay

Eine eventuelle Bindung des N-Terminus von UBXD1 an Membranen wurde mittels bovinen Liposomenextrakt aus Rinderhirn untersucht. Dazu wurden verschiedene Liposomenkonzentrationen (0,02 mg/ml bis 2 mg/ml) mit 2 mg/ml UBXD1 1-133 für 15 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). Jeder Ansatz wurde mit Liposomenpuffer auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 50 Minuten bei 100.000 xg bei 4 °C abzentrifugiert (Optima Max-XP, Beckman Coulter). Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl Liposomenpuffer für die Analyse mittels SDS-PAGE resuspendiert. Jeweils 20 µl des Überstandes und des resuspendierten Pellets wurden mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Anschließend wurde die Liposomenbindung von UBXD1 1-133 mit einer SDS-PAGE (Kap. 2.4.4) analysiert. Bindet UBXD1 1-133 an Liposomen ist mit steigender Liposomenkonzentration das Protein in den Pelletfraktionen zu finden.

2.5. IMMUNOLOGISCHE METHODEN

2.5.1. Co-Immunopräzipitation

Für die Co-Immunopräzipitation wurden ein BL21(DE3)T1r-Expressionsstamm sowohl mit 1 µl GST-UBXD1 1-133 als auch 1 µl 6xHis-Np97 transformiert (Kap 2.3.2). Die Selektion erfolgte mit Ampicillin für 6xHis-Np97 und Kanamycin für GST-UBXD1 1-133. Anschließend wurden beide Proteine simultan in 100 ml LB-Medium exprimiert (Kap. 2.3.4). Das Pellet wurde in 5 ml Niedrigsalzpuffer resuspendiert und die Zellen durch Lyse und Ultraschall aufgeschlossen (Kap. 2.4.1). Im Anschluss wurden die aufgeschlossenen Zellen ultrazentrifugiert und der Überstand für die Co-IP verwendet. Vor der Beladung der Protein G-Agarose wurde diese äquilibriert. Dazu wurden 100 µl der Protein G-Agarose 5 mal im Wechsel mit 500 µl

Niedrigsalzpuffer gewaschen und bei 800 xg für 2 Minuten abzentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Danach wurde die Protein G-Agarose in 100 µl Niedrigsalzpuffer aufgenommen und 25 µl davon mit dem Überstand aus der Ultrazentrifugation für 45 Minuten bei 4 °C auf einem Rotor (Stuart, Staffordshire) inkubiert. Dabei werden unspezifisch an die Protein G-Agarose bindende Proteine aus dem Überstand entfernt. Anschließend wurde die Protein G-Agarose für 2 Minuten bei 800 xg (Centrifuge 5415R, Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand für die weitere Co-IP verwendet. Dazu wurde dieser mit 2,5 µg 6xHis-Antikörper versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde für 2 Stunden 75 µl der äquilibrierten Protein G-Agarose dem Überstand-Antikörper-Gemisch hinzugesetzt, damit sich der Agarose-Antikörper-Protein-Komplex bilden konnte. Anschließend wurden überschüssige Proteine durch fünfmaliges Waschen mit 500 µl Niedrigsalzpuffer und dem darauffolgenden Abzentrifugieren für 2 Minuten bei 800 xg (Centrifuge 5415R, Eppendorf) entfernt. Das Lösen der Proteinkomplexe von der Protein G-Agarose erfolgte mittels SDS. Dazu wurde die Protein G-Agarose mit 2x SDS-Probenlaufpuffer versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend bei 5.000 xg für 20 Sekunden abzentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Die Proteinkomplexe im Überstand wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 2.4.4) und die darin enthaltenen Proteine mittels Western Blot detektiert (Kap. 2.5.2).

2.5.2. Western Blot

Die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation (Kap. 2.5.1) wurden mittels Western Blot analysiert. Dazu wurde ein SDS-Gel mit Proben vom Überstand, dem Waschschrift und dem Überstand nach der Co-IP beladen und laufen gelassen (Kap. 2.4.4). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteinbanden für 45 Minuten bei 120 mA auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (Biometra, Dassel). Danach wurde die Membran zum Blocken ungebundener Stellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 2 % Milchpulver in PBST-Puffer inkubiert. Das restliche Blockmittel wurde durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBST-Puffer entfernt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Erstantikörper gegen den GST- und 6xHis-Tag über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der überschüssige nicht gebundene Antikörper mit dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBST-Puffer entfernt. Anschließend wurde der Zweitantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetragen und nicht gebundener Antikörper danach wieder durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBST-Puffer entfernt. Zur Detektion der Banden wurde das Pierce ECL Plus-Kit verwendet (Thermo Scientific, Rockford). Danach wurde ein Röntgenfilm für 5 Minuten auf der Membran inkubiert und daraufhin entwickelt (Cawomat, Schrobhausen).

2.6. SPEKTROSKOPISCHE METHODEN

2.6.1. NMR-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Bindung zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und der N-Domäne sowie der D1D2-Domäne von p97 auf atomarer Ebene wurde die NMR-Spektroskopie herangezogen.

Probenvorbereitung:

Für die Aufnahme der verschiedenen Spektren wurden die Proben unmarkiert, ^{15}N - oder ^{15}N - ^{13}C -markiert exprimiert (Kap. 2.3.4). Die Proben wurden mit den entsprechenden Konzentrationen nach der Reinigung in den NMR-Puffer umgepuffert, schockgefroren und bei -20 °C in Aliquots zu je $540\text{ }\mu\text{l}$ gelagert. Bei Bedarf wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und mögliche Aggregate für 10 min bei 16.000 xg und 4 °C abzentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Anschließend wurde die Probe mit $60\text{ }\mu\text{l}$ D_2O als internen Feldfrequenz-Lock und mit $1\text{ }\mu\text{l}$ DSS als externen Standard versetzt und in ein NMR-Röhrchen ($\varnothing 5\text{ mm}$) überführt.

Messbedingungen und Prozessierung:

Die Messungen wurden mit einem Bruker Ultrashield 700-NMR (Bruker BioSpin, Fällanden) bei einer Protonenfrequenz von $700,22\text{ Hz}$ durchgeführt. Das NMR-Spektrometer ist mit einem inversen Tripleresonanz-Cryo-Probenkopf mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen sowie einer Temperatur-Kontrolleinheit (BVT3000, Bruker) ausgestattet.

Alle verwendeten Pulsprogramme wurden der Standardbibliothek von Bruker entnommen. Die wichtigsten Parameter der verwendeten Spektren sind dem Anhang 8.5 zu entnehmen.

Das Programm Topspin 3.0 (Bruker BioSpin, Rheinstetten) wurde sowohl zur Aufnahme als auch zur Prozessierung der Spektren verwendet. Die Prozessierung (Transformation von der Zeit- in die Frequenzdomäne) der 2D-Spektren erfolgte mit `xfb` (enthält Dimension F1 und F2), die der 3D-Spektren mit `tf3/tf2/tf1` (entsprechend F3, F2 und F1). Für die entsprechenden Dimensionen wurde eine Fourier-Transformation und eine abschließende Phasenkorrektur durchgeführt. Desweiteren erfolgte eine automatische Basislinienkorrektur der Frequenzdaten mit `abs1/abs2.water` bei den 2D-Spektren und `tabs3/tabs2/tabs1` bei den 3D-Spektren jeweils in der entsprechenden Dimension.

$\pi/4$ -verschobene Sinusfunktionen wurden als Filterfunktion verwendet. Die hetNOE-Spektren wurden vor der eigentlichen Prozessierung mit `split 2` in das jeweilige Spektrum mit und ohne Vorsättigung aufgeteilt.

Sequentielle Zuordnung:

In einem ^1H - ^{15}N -HSQC entspricht jedes ^1H - ^{15}N -Signal einer NH-Gruppe im Peptidrückgrat des Proteins. Desweiteren gibt es Signale, die in N-Richtung doppelt auftreten und durch die NH-Gruppen der Seitenketten von Glutamin und Asparagin entstehen, für die sequentielle Zuordnung aber nicht von Bedeutung sind. Es ist allerdings nicht direkt ersichtlich bei welchem Signal es sich um welche Aminosäure des Proteins handelt, sodass diese erst den einzelnen

Aminosäuren zugeordnet werden müssen (*backbone assignment*). Diese Zuordnung der einzelnen Signale zu den entsprechenden Aminosäuren wurde für den N-Terminus von UBXD1 mit Hilfe des HNCACB-Spektrums in Ergänzung durch das CBCACONH-Spektrum vorgenommen (Abb. 11).

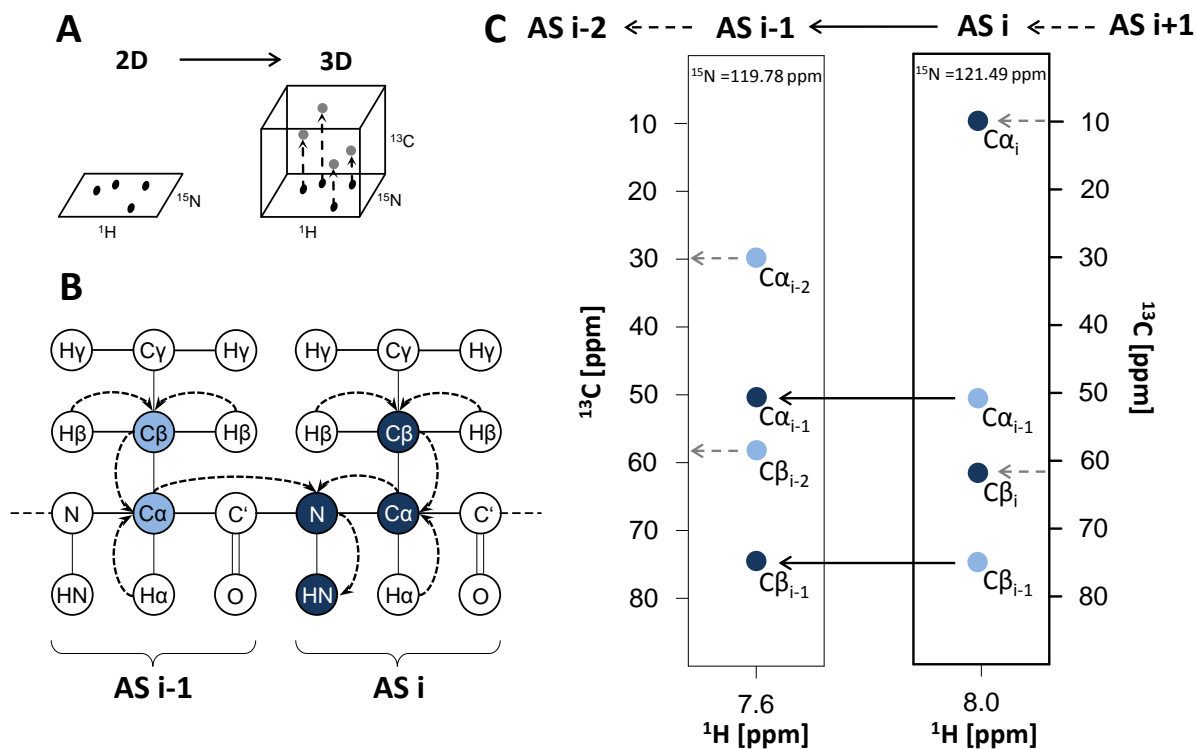


Abb. 11 Prinzip der sequentiellen Zuordnung von Proteinen mittels 3D-NMR-Spektroskopie. Die dritte Dimension führt zu einer besseren Auflösung der Signale im Vergleich zu zweidimensionalen Spektren und ist besonders nützlich bei großen oder unstrukturierten Proteinen, deren Signale sehr stark überlappen können (A). Die sequentielle Zuordnung wird standardmäßig mit dem HNCACB- und dem CBCACONH-Spektrum durchgeführt. Dabei erfolgt der Magnetisierungstransfer von den $\text{H}\beta$ -Atomen der Seitenkette über die $\text{C}\beta$ - und $\text{C}\alpha$ -Atome zum N- und HN-Atom des Proteinrückgrats, von wo das Signal dann detektiert werden kann (B). In den HNCACB- und dem CBCACONH-Spektren sind demnach die $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Resonanzen einer Aminosäure bei der entsprechenden N- und HN-Resonanz zu sehen (C). Der Magnetisierungstransfer erfolgt auf diese Weise in der eigenen Aminosäure und in der vorherigen Aminosäure, sodass in einem HNCACB-Spektrum die Signale der eigenen und die vorherigen zu sehen sind und in einem CBCACONH lediglich die $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Atome der vorherigen Aminosäure bei den N- und HN-Resonanzen der eigenen Aminosäure.

Im Vergleich zu einem HSQC-Spektrum, das eine ^1H - und eine ^{15}N -Richtung aufweist, besitzen das HNCACB- und das CBCACONH-Spektrum in der dritten Dimension die ^{13}C -Resonanzen der Kohlenstoffatome. Vorteil dieser Spektren ist zum einen, dass stark überlappende Signale in 2D-Spektren mit sehr schwacher Dispersion durch die Verlagerung in den Raum separiert werden können und zum anderen helfen die charakteristischen ^{13}C -Resonanzen zusätzlich bei der Zuordnung der Signale zu den Aminosäuren (Abb. 11, A).

Für den N-Terminus von UBXD1 wurde ein HNCACB-Spektrum aufgenommen (Anhang 8.5). Anhand der Bezeichnung dieses 3D-Spektrums lässt sich der Magnetisierungstransfer erkennen (Abb. 11, B). Dabei wird innerhalb der Aminosäure i (AS i) über die Protonen der Kohlenstoffatome die Magnetisierung über das Stickstoffatom zum Proton am Stickstoffatom transferiert und von dort detektiert. Da die Magnetisierung sowohl über die $\text{C}\alpha$ - als auch über die $\text{C}\beta$ -Atome erfolgt, sind für eine Aminosäure zwei entsprechende Signale im HNCACB-

Spektrum zu sehen. Die dazugehörigen ^1H - und ^{15}N -Resonanzen entsprechen jenen im HSQC-Spektrum. Wie aus Abb. 11, B ersichtlich wird in einem HNCACB-Spektrum zusätzlich die Magnetisierung der $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Atome von der vorhergehenden Aminosäure (AS i-1) auf das Stickstoffatom der Aminosäure i und dem daran gebundenen Proton transferiert. Deshalb sind neben den Signalen für die Aminosäure i bei der entsprechenden ^1H - und ^{15}N -Resonanz auch Signale für das $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Atom der Aminosäure i-1 mit einer etwas schwächeren Intensität durch den längeren Magnetisierungsweg zu sehen. Die Gesamtheit aller Signale bei einer bestimmten ^1H - und ^{15}N -Resonanz besteht somit in der Regel aus vier Signalen (zwei starke Signale für $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ der Aminosäure i und zwei schwächere Signale für $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ der Aminosäure i-1) und ist ein Teil des Spinsystems, das die Gesamtheit aller miteinander wechselwirkenden Kernspins in einer Aminosäure beinhaltet. Neben dem Spinsystem mit den Kohlenstoff-Resonanzen für die Aminosäure i und für die Aminosäure i-1, gibt es in dem HNCACB-Spektrum zwei weitere starke Signale mit exakt den gleichen Kohlenstoff-Resonanzen von Aminosäure i-1, aber mit unterschiedlichen ^1H - und ^{15}N -Resonanzen (Abb. 11, C). Das Spinsystem der Aminosäure i-1 beinhaltet wiederum Signale der vorherigen Aminosäure (jetzt i-2), sodass der Suchvorgang erneut fortgesetzt werden kann. Auf diese Weise wird von einer definierten Aminosäure i in Richtung des N-Terminus entlang der Sequenz des Proteins zugeordnet. Wird ausgehend von Aminosäure i nach schwachen Signalen mit den gleichen Kohlenstoff-Resonanzen in einem anderen Spinsystem gesucht (bedeutet unterschiedliche ^1H - und ^{15}N -Resonanzen), werden die Signale der Aminosäure i+1 sichtbar und das Assignment erfolgt damit in Richtung des C-Terminus des Proteins. Diese Methode der sequentiellen Zuordnung wird auch als *chain tracing* bezeichnet. Je disperser die Signale verteilt und je diverser die Aminosäuresequenz ist, desto besser ist die sequentielle Zuordnung möglich. Ein Kettenabbruch erfolgt bei einem Prolin, da hier keine Kopplung über das Stickstoffproton vorhanden ist. Außerdem kann der Magnetisierungstransfer zu schwach gewesen sein, sodass die Signale für die Aminosäure i-1 nicht zu detektieren sind. Neben dem HNCACB-Spektrum wurde für die sequentielle Zuordnung des N-Terminus von UBXD1 zusätzlich ein CBCACONH-Spektrum aufgenommen. In diesem Spektrum besteht ein Spinsystem bei der ^1H - und ^{15}N -Resonanz der Aminosäure i lediglich aus zwei Signalen (bei einem Glycin nur ein Signal) der vorhergehenden Aminosäure i-1. Die beiden Signale für das $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Atom der Aminosäure i sind nicht zu sehen. Dieses Spektrum dient damit der Ergänzung des HNCACB-Spektrums, da es die Einteilung der vier Signale zu der Aminosäure i oder i-1 erleichtert bzw. fehlende Signale aus dem HNCACB-Spektrum kompensiert.

Analyse nach Wishart:

Zur Analyse der Sekundärstrukturverteilung mittels NMR-Resonanzen wurde eine Wishart-Analyse durchgeführt. Dazu werden die Resonanzen der $\text{H}\alpha$ -, $\text{C}\alpha$ -, $\text{C}\beta$ - und CO-Atome verwendet, wobei das HNCACB-Spektrum, das HNCOSY-Spektrum und ein ^1H -Spektrum nach IUPAC geeicht wurden (129). Anschließend wurden die Resonanzen der einzelnen Atome jeder zugeordneten Aminosäuren mit Referenzen verglichen und nach Wishart ausgewertet (130–132). Als Referenzen wurden unstrukturierte Tripeptide verwendet, die mittig die entsprechende

Aminosäure von Interesse tragen und welche von zwei Alaninen flankiert wird. Während die H α -, C α - und CO-Atome zur Bewertung von α -Helices, β -Strängen und unstrukturierten Regionen verwendet wurden, lässt sich die C β -Referenz lediglich für die zuverlässige Unterscheidung zwischen β -Strängen und unstrukturierten Regionen verwenden. Für die Auswertung wurde aufgrund der zahlreichen Proline, einiger nicht zugeordneter Aminosäuren und dem relativ großen Anteil unstrukturierter Bereiche im N-Terminus von UBXD1 von der standardisierten Wishart-Analyse abgewichen. Dazu wurde aus den verglichenen Resonanzen der H α -, C α -, C β - und CO-Atome einer Aminosäure eine Tendenz zu einer bestimmten Sekundärstruktur dieser Aminosäure abgeleitet.

Auswertung der NMR-Titrationsexperimente:

Nach erfolgter Zuordnung des N-Terminus von UBXD1 wurden Titrationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die verschiedenen UBXD1-Konstrukte und -Mutanten ^{15}N -markiert gereinigt und vorgelegt. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen von der unmarkierten N-Domäne von p97 (Np97) oder der unmarkierten D1D2-Domäne von p97 (D1D2p97) dazugegeben. In weiteren Experimenten wurde Np97 ^{15}N -markiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener unmarkierter UBXD1-Konstrukte titriert. Findet eine Bindung zwischen den beiden Proteinen in Lösung statt, kann es zu sogenannten Shifts (Verschiebung der Signale in Abhängigkeit von der Konzentration des Bindepartners) kommen, die durch die Änderung der chemischen Umgebung der Aminosäure durch die Bindung bedingt sind. Die Analyse dieser Shifts erfolgte nach (133):

$$\Delta Shift_{total} = \sqrt{(\Delta \text{ } ^1\text{H})^2 + (0,154 \cdot \Delta \text{ } ^{15}\text{N})^2}$$

Neben der Auswertung der Shifts wurde auch die Abnahme der Intensitäten einzelner Signale untersucht. Dazu wurden die absoluten Intensitäten aller Signale mit der Intensität des Signals von Gly 95 (UBXD1) oder Ile 82 (Np97) normalisiert und anschließend die Differenz zwischen dem Ausgangsspektrum ohne Bindungspartner und den Spektren der einzelnen Titrationsschritte mit Bindungspartner gebildet:

$$\Delta \text{Intensität} = \frac{\text{Intensität } AS_{\text{ohne Ligand}}}{\text{Intensität Referenz} - AS_{\text{ohne Ligand}}} - \frac{\text{Intensität } AS_{\text{mit Ligand}}}{\text{Intensität Referenz} - AS_{\text{mit Ligand}}}$$

Daraus folgt, dass bei einer Intensitätsdifferenz von 0 die Aminosäure dieses Signals durch den Bindepartner nicht beeinflusst wird. Im Umkehrschluss bedeutet das, je größer die Intensitätsdifferenz, desto stärker wird die Aminosäure des entsprechenden Signals durch den Liganden beeinflusst.

2.6.2. CD-Spektroskopie

Der Einfluss einiger Alanin-Mutationen im N-Terminus von UBXD1, unterschiedliche Konstrukte und ATP auf den Anteil verschiedener Sekundärstrukturelemente wurde CD-spektroskopisch untersucht. Dazu wurden CD-Spektren im Nahbereich zwischen 190 nm und 260 nm (J-710, Jasco) mit 1 mm dicken Quarzküvetten aus Suprasil aufgenommen (Hellma Analytics). Die Messung wurde in 50 mM KPi-Puffer (pH 6,5) bei einer Temperatur von 27 °C durchgeführt, um vergleichbare Bedingungen wie am NMR-Spektrometer zu erzielen. Für jedes Summenspektrum wurden 20 einzelne Spektren aufgenommen (Scanrate: 50 nm/min) und für die Auswertung gemittelt. Vor jeder Protein-Messung wurde ein Spektrum mit Puffer ohne Protein aufgenommen und später in der Auswertung als Blank von den Spektren mit Protein abgezogen. Sowohl die Messung des reinen Puffers als auch die Protein-Messung wurden in der gleichen Küvette durchgeführt. Die Protein-Konzentration betrug 0,15 mg/ml. Die Messung wurde mit dem SpectraManager 1 (Jasco) durchgeführt. Die Analyse der Sekundärstrukturanteile erfolgte mittels SpectraManager 2 (Jasco). Zur Analyse der Sekundärstrukturanteile wurde das CDSSTR-Tool (134–136) verwendet, welches das gemessene CD-Spektrum mit den CD-Spektren von Proteinen aus einer Referenzdatenbank abgleicht und anhand derer eine Vorhersage für die Sekundärstrukturen des gemessenen Proteins ausgegeben wird. Das von dem Programm kalkulierte Spektrum sollte dem gemessenen möglichst nah kommen. Als Maß für die Abweichung wird der NRMSD-Wert (*normalized root mean square deviation*) herangezogen. Die maximale Abweichung der im Rahmen dieser Arbeit angefertigten CD-Spektren liegt bei 0,12 und deutet auf eine sehr gute Übereinstimmung mit den kalkulierten Spektren hin (137; 138). Als Referenz wurde das Set SMP56 gewählt mit 56 Proteinen, von denen 13 Membranproteine sind (139–142). Die gemessenen Daten mit der Einheit θ (Theta *machine Units*, in mdeg) wurden mit folgender Gleichung in die mittlere molare Elliptizität umgerechnet:

$$\text{mittlere molare Elliptizität} = \frac{MRW \cdot mdeg}{10 \cdot c \cdot d} \quad \text{mit } MRW = \frac{\text{Molekulargewicht [Da]}}{\text{Anzahl}_{\text{Aminosäuren}} - 1}$$

Zur besseren Vergleichbarkeit der Kurvenverläufe wurden die Spektren der Mutanten und der Konstrukte mit verschiedenen Größen durch Multiplikation auf das Spektrum von UBXD1 1-133 wt normiert.

2.6.3. Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluoreszenz-Anisotropie:

Da die Bindungsaffinitäten über Titrations in der NMR-Spektroskopie nur näherungsweise und bei schwachen Bindungen nur unzureichend bestimmt werden konnten, wurden zusätzlich Anisotropie-Messungen durchgeführt.

Dazu wurden die Lysine verschiedener UBXD1-Konstrukte mit dem Farbstoff ATTO 594 über einen NHS-Ester entsprechend der Anleitung markiert (143). Dabei wurde der Farbstoff in

zweifachem Überschuss eingesetzt. Die Labeling-Effizienz wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetz ermittelt:

$$\text{Labeling – Effizienz} = \frac{A_{\text{ATTO } 601 \text{ nm}} \cdot \varepsilon_{\text{ATTO}}}{A_{\text{UBXD1}} \cdot \varepsilon_{\text{Protein}}} \cdot \frac{A_{\text{ATTO } 601 \text{ nm}} \cdot \varepsilon_{\text{Protein}}}{(A_{\text{ATTO } 280 \text{ nm}} - A_{\text{ATTO } 601 \text{ nm}} \cdot CF_{280}) \cdot \varepsilon_{\text{ATTO}}}$$

Dazu wurden die Absorptionen des ATTO-Farbstoffs (280 nm für die Korrektur der Proteinkonzentration und 601 nm für die Farbstoffkonzentration) und des markierten Proteins (280 nm) am Nanodrop (Peqlab) gemessen. Der Extinktionskoeffizient für das markierte Protein ist Anhang 6.1 zu entnehmen, der Extinktionskoeffizient für den Farbstoff ATTO 594 beträgt $1,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und der Korrekturfaktor für die Proteinkonzentration $CF_{280} = 0,51$.

Die Messungen wurden in 50 mM KPi (pH 7,2) mit 0,05 % Tween bei 21 °C an einem Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektrometer (Agilent Technologies, Waldbronn) vorgenommen. Für die Titrationen wurde der G-Faktor mit einer 1 µM-Lösung des gelabelten UBXD1-Konstrukts bestimmt und anschließend mit einer Verdünnungsreihe in separaten Ansätzen die verschiedenen Konzentrationen der unterschiedlichen p97-Konstrukte (N-Domäne, D1D2-Domäne, p97) gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Küvetten mit Hellmanex II und A. bidest. gereinigt. Die Auswertung der Datenpunkte erfolgte mit GraphPadPrism. Dazu wurde von jedem Titrationsschritt der Nullwert subtrahiert (Anfangswert der Titration ohne Bindepartner) und durch die gemessenen Punkte eine Kurve des Modells "*one site specific binding*" gelegt. Anhand deren Verlauf wurde der K_D -Wert und dessen Standardabweichung ermittelt.

Fluoreszenz-Schmelzkurven:

Zusätzlich wurde mittels intrinsischer Tryptophan-Fluoreszenz-Schmelzkurven der stabilisierende Einfluss von UBXD1 und ATPγS auf p97 untersucht. Dazu wurden 2 µM p97 in 60 µl KPi-Puffer (pH 6,5) verdünnt und anschließend 2 µM UBXD1 1-133 oder 1 mM ATPγS hinzugesetzt.

Für die Schmelzkurve wurde ein Temperaturgradient von 20 °C bis 95 °C mit 1 °C/min durchgeführt. Für den Vergleich des Zustandes des Proteins wurde sowohl vor dem Temperaturgradienten als auch nach dem Abkühlen auf 20 °C ein Trp-Absorptionsspektrum aufgenommen. Für die Analyse der Schmelzkurve wurden die Emissionen bei 330 nm und 376 nm bei jedem Temperaturschritt gemessen und mittels folgender Gleichung zueinander ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{Intensität}_{\text{norm}} = \frac{I_{330 \text{ nm}} - I_{376 \text{ nm}}}{I_{330 \text{ nm}} + I_{376 \text{ nm}}}$$

Bei der daraus entstehenden Kurve wurde am Anfang und am Ende des Temperaturgradienten manuell ein Plateau gewählt mit dem geringsten Anstieg über fünf Messpunkte und der darin liegende Mittelpunkt auf 0 bzw. 1 gesetzt. Anschließend wurde die Intensität des 0-Wertes von allen übrigen subtrahiert und die sich daraus ergebenden Werte auf den 1-Wert normiert. Die ungefähre Schmelztemperatur kann dann bei dem Wert 0,5 (entspricht dem Wendepunkt der sigmoiden Kurve) abgelesen werden.

2.6.4. UV/Vis-Spektroskopie

Die ATPase-Aktivität von p97 und D1D2-p97 wurde mit Hilfe eines NADH-gekoppelten ATPase-Assays gemessen (Abb. 12).

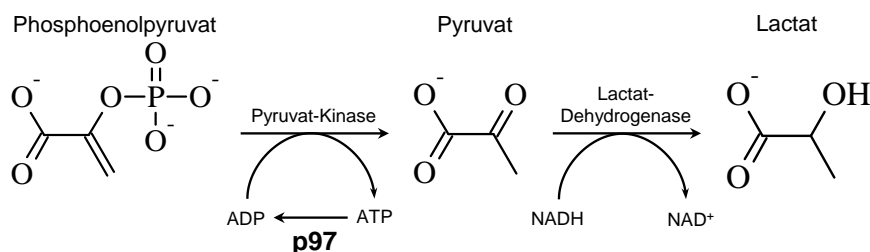


Abb. 12 Reaktionsgleichung des NADH-gekoppelten ATPase-Assays. Phosphoenolpyruvat wird durch die Pyruvatkinase unter Regenerierung von ATP aus ADP zu Pyruvat umgesetzt. Das Pyruvat wiederum dient der Lactat-Dehydrogenase als Substrat. Dabei entstehen Lactat und aus NADH NAD⁺, dessen Umsetzung UV/Vis-spektroskopisch quantitativ bestimmt werden kann.

Dabei wird das durch p97 generierte ADP mit Hilfe der Pyruvatkinase in Gegenwart von Phosphoenolpyruvat wieder zu ATP generiert. Als Produkt entsteht dabei auch Pyruvat, welches von der Lactatdehydrogenase unter Hydrolyse von NADH zu NAD⁺ zu Lactat umgesetzt wird (Abb. 12). Die Oxidation des NADH zu NAD⁺ kann photometrisch bei 340 nm verfolgt werden. Die Absorption bei 340 nm ist dabei mit sinkendem Anteil an NADH abnehmend. Der Assay wurde bei einer Temperatur von 37 °C in 100 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit einem Endvolumen von 300 µl durchgeführt. Die Konzentrationen der einzelnen Reaktionsbestandteile sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (Tab. 22).

Tab. 22 Ansätze zur Messung der ATPase-Aktivität von p97 mittels NADH-gekoppeltem ATPase-Assay. Die Konzentration der einzelnen Kofaktoren ist an entsprechender Stelle im Ergebnisteil zu entnehmen.

	Volumen	Endkonzentration
p97	6,25 µl	500 nm
NADH	3 µl	0,35 mM
PEP	3 µl	3 mM
MgCl ₂	15 µl	20 mM
Pyruvatkinase/LDH	9,4 µl	7/8 U
ATP	3 µl	3 mM
p97-Kofaktoren	x µl	0-8 µM
Tris-Puffer	ad 300 µl	
Gesamt	300 µl	

Die Messungen wurden in 10 mm Quarzküvetten aus Suprasil (Hellma Analytics) vorgenommen. Die Messung erfolgte in Echtzeit mit über 5 Sekunden gemittelten Messpunkten. Vor jeder Messung wurde ein Blank über 5 Minuten mit einem Reaktionsansatz ohne ATP durchgeführt. Anschließend wurde die ATP-Hydrolyse durch Zugabe von 7 mM ATP gestartet. Die verschiedenen Konzentrationen der p97-Kofaktoren wurden für mindestens 30 Sekunden gemessen (entspricht sechs Datenpunkten).

Die absolute Menge an umgesetzten ATP in $\mu\text{M}/\text{min}$ wurde mit dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$\Delta c [\mu\text{M}/\text{min}] = \frac{\Delta E}{c \cdot d} \cdot 10^6$$

Der Extinktionskoeffizient ϵ für NADH beträgt $6220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. ΔE beschreibt den Anstieg der NADH-Absorptionskurve über 30 Sekunden. Für die Berechnung der halbmaximalen Inhibition wurde die ATPase-Aktivität von p97 unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen eines Kofaktors bestimmt. Die daraus resultierenden Punkte wurden mit GraphPadPrism (Fit: *one site specific binding*) ausgewertet, um einen entsprechenden IC_{50} -Wert ausgegeben zu bekommen.

2.7. BIOINFORMATISCHE METHODEN

2.7.1. NMR-Resonanzen-basiertes Strukturmodell mit cs23d

Mit Hilfe des Webservers cs23d wurde ein NMR-Shift-basiertes Strukturmodell von UBXD1 1-133 erstellt (144). Ein Arbeitsdiagramm kann dem Anhang 8.6 entnommen werden. Für das *Modeling* wurde die Sequenz und die NMR-Shifts eingelesen. Zuerst wurden mit BLAST kurze Sequenzfragmente aus bereits bekannten Proteinen, die eine hinreichende Sequenzidentität besitzen, in der PPT-DB gesucht. Anschließend wurden die NMR-Shifts ausgewertet. Dazu wurde eine Umbasierung mittels RefCor, eine Sekundärstrukturberechnung mittels CSI und eine Berechnung der Torsionswinkel sowohl des Proteinrückgrats als auch der Seitenketten mit PREDITOR vorgenommen. Die Berechnung der Torsionswinkel erfolgte ebenfalls durch den Vergleich mit Winkeln von bekannten Proteinen, die ähnliche Sequenzfragmente besitzen. Anschließend wurden die NMR-Shifts-basierten Torsionswinkel von THRIFTY mit einer Referenzdatenbank mit ca. 18.500 nicht redundanten PDB-Strukturen verglichen. Danach wurden mit BLAST solche Sequenzfragmente aus dem Vergleich ermittelt, deren Torsionswinkel die größte Ähnlichkeit mit den durch PREDITOR berechneten Torsionswinkeln des Zielproteins haben. Zusätzlich führt THRIFTY ein Sekundärstruktur-*Alignment* durch, um die ausgewählten Fragmente für die anstehende Assemblierung zu einer 3D-Struktur zu evaluieren. Das Zusammenfügen zu einer 3D-Struktur und der Prüfung auf Richtigkeit mit den eingegebenen Daten erfolgte durch SFassembler. Lücken im Proteinrückgrat wurden durch die *cyclic coordinate descent*-Technik, Lücken in den Seitenketten mittels Homologiemodellierung gefüllt. Anschließend wurden die berechneten und eingegebenen NMR-Shifts mit SHIFTX evaluiert. Zum Abschluss wurde eine Torsionswinkel-basierte Energieminimierung mittels GAFolder durchgeführt. Können für die eingegebene Sequenz weder Sequenz- noch NMR-Shift-Homologe zu finden sein, greift cs23d auf Rosetta zurück. Rosetta arbeitet wie der FSassembler ebenfalls Fragment-basiert, jedoch ist der Schwellenwert für die Sequenzidentität geringer und die Fragmente kürzer. Die aus Rosetta berechnete Struktur würde ebenfalls einer Energieminimierung mit GAFolder unterzogen werden. Die von cs23d ausgegebene Struktur kann auch für weitere NOE-basierte Strukturberechnungen verwendet werden.

2.7.2. Strukturmodell mit YASARA

Mit Hilfe von YASARA wurde ein Strukturmodell von UBXD1 1-120 erstellt. Die Modellierungsparameter sind folgender Tabelle zu entnehmen (Tab. 23).

Tab. 23 Parameter für das UBXD1-Strukturmodell mit YASARA.

Parameter	Wert
Sequenz	MKKFFQEFKADIKFKSAGPGQKLKESVGEKAHKEKPNQPA PRPPRQGPNTNEAQMAAAALARLEQKQSRWGPSTSQDTIR NQVRKELQAEATVSGSPEAPGTNNVSEPREEGSAHLAVPG
Geschwindigkeit	langsam
Suche nach Template	1x
Oligomerisierungsgrad	monomerisch
Konformation pro Loop	max. 50
terminale Erweiterung	max. 50
verwendetes Template	Methylmalonyl-CoA Mutase (PDB-ID: 7REQ-A)
Abdeckung (Cover)	72 %
Zielsequenz	14,4 % Sequenzidentität, 32,2 % Sequenzähnlichkeit

Da vom N-Terminus von UBXD1 bis heute keine Struktur vorliegt, wurde auf einen Sequenzähnlichen Bereich in der Methylmalonyl-CoA-Mutase zurückgegriffen. Dieser Bereich der Methylmalonyl-CoA-Mutase komplexiert ein Vitamin B12, was für den N-Terminus von UBXD1 ausgeschlossen wird. Daher wurde das Vitamin B12 aus der Struktur der Methylmalonyl-CoA-Mutase entfernt und ein Strukturmodell für den N-Terminus von UBXD1 berechnet. Anschließend wurden zuerst eine Energieminimierung und darauffolgend eine MD-Simulation bei 25 °C durchgeführt. Als Kraftfeld wurde dazu YASARA2 verwendet und die Schrittweite auf 1 fs gesetzt. Die MD-Simulation wurde so lange fortgesetzt bis weder signifikante Veränderungen in den Sekundärstrukturelementen noch in deren Position zu erkennen waren. Aufgrund der geringen Sequenzidentität und -ähnlichkeit der Zielsequenz mit der Sequenz von UBXD1, kann das Strukturmodell jedoch lediglich zum Vergleich mit anderen Ergebnissen herangezogen werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. STRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN DES N-TERMINUS VON UBXD1

UBXD1 besteht aus einem uncharakterisierten N-Terminus (1-149 AS) sowie einer PUB- (150-264 AS) und einer C-terminal gelegenen, nicht funktionellen UBX-Domäne (335-411 AS). Während für die PUB- und die UBX-Domäne bereits strukturelle Studien von Homologen vorliegen, ist die Struktur des N-Terminus von UBXD1 bis auf das VIM-Motiv (52-62 AS) weitestgehend unbekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zuerst das Proteinrückgrat von UBXD1 1-133 zugeordnet. Die anschließende CD-spektroskopische Analyse, die NMR-basierte Wishart-Auswertung zur Sekundärstrukturverteilung sowie die hetNOE-Auswertung zeigen ein sehr flexibles Protein mit einem hohen Anteil an unstrukturierten Bereichen und einigen α -Helices. Da aufgrund der fehlenden NOE-Signale keine Tertiärstruktur berechnet werden konnte, wurden zuerst Mutationsstudien und Studien mit verschiedenen großen Konstrukten durchgeführt, um eine Vorstellung der räumlichen Anordnung der einzelnen Sekundärstrukturelemente zu erhalten. Zum Schluss wurde ein Homologie-Modell erstellt und mit diesem eine MD-Simulation durchgeführt.

3.1.1. Vorarbeiten zur strukturellen Untersuchung

Zur Untersuchung der Struktur des N-Terminus von UBXD1 wurden verschiedene Konstrukte hergestellt, exprimiert und gereinigt (Anhang 8.3 und 8.4). Die Klonierung wird exemplarisch anhand des Konstruktes von UBXD1 32-133 dargestellt. Bei dem Gesamtkonstrukt für UBXD1 1-133 handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Gen. Der Großteil der Experimente wurde mit dem Protein UBXD1 1-133 durchgeführt. Daher sollen die Expression und Reinigung beispielhaft daran erläutert werden.

Klonierung von UBXD1 32-133:

Für die Klonierung des Gens von UBXD1 32-133 in den mit einer PreScission-Schnittstelle modifizierten pET41b wurde als Template das Gen UBXD1 1-133 (BC1031) und das Primer-Paar 1051F/1052R verwendet. Zur Amplifizierung der DNA für das Gen UBXD1 32-133 wurde eine zweistufige PCR durchgeführt und mit einem Agarosegel analysiert (Abb. 13).

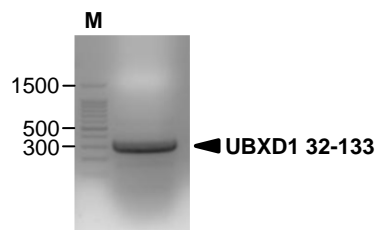


Abb. 13 Agarosegel nach der PCR zur Vervielfältigung des UBXD1 32-133-Inserts. Die PCR wurde mit dem Template BC1031 und dem Primer-Paar 1051F/1052R bei einer Annealing-Temperatur von 61 °C durchgeführt. Die in dem Agarosegel zu sehende Bande hat die für UBXD1 32-133 erwartete Größe von ca. 300 bp.

Es konnte eine Bande bei ca. 300 bp (erwartete Größe für das Gen UBXD1 32-133: 327 bp) detektiert werden. Die Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA isoliert. Anschließend wurden sowohl das Insert aus der PCR (UBXD1 32-133) als auch der Vektor (pET41b) in separaten Ansätzen mit *Apa*I und *Xho*I simultan verdaut. Nachdem die verdaute DNA des Inserts und des Vektors abermals gereinigt wurde, wurden Insert und Vektor in einem Verhältnis von 3 zu 1 mit 8 ng Insert ligiert. Daraufhin wurde 1 µl des Ligationsansatzes in *Shox*-Zellen transformiert und am nächsten Tag eine Kolonie-PCR zur Überprüfung richtiger Klone durchgeführt. Das Ergebnis der PCR wurde erneut mit einem Agarosegel überprüft (Abb. 14).

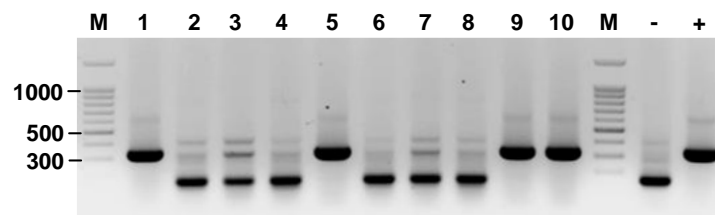


Abb. 14 Kolonie-PCR zur Überprüfung positiver UBXD1 32-133-Klone. Nach der Ligation von UBXD1 32-133 und pET41b wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Klone 1, 5, 9 und 10 mit einer Bande bei ca. 300 bp enthalten das gewünschte UBXD1 32-133-Konstrukt.

Aus den Kolonien 1 und 10, deren PCR-Ansätze eine Bande bei einer Größe von ca. 300 bp auf der Höhe der Positivkontrolle (PCR mit BC031) aufwiesen, wurde die Plasmid-DNA isoliert und zur Sequenzierung geschickt. Die Plasmid-DNA von Klon 10 wurde daraufhin nach Kontrolle der richtigen Sequenz in den *E. coli*-Expressionsstamm Bl21(DE3)T1r transformiert.

Expressionstest von UBXD1 1-133:

Um die möglichst besten Protein-Ausbeuten zu erhalten, wurde vor der eigentlichen Expression mit einem Expressionstest überprüft, unter welchen Bedingungen GST-UBXD1 1-133 (42,4 kDa) am meisten im Überstand vorliegt sowie die wenigsten Abbauprodukte aufweist. Getestet wurden drei verschiedene Temperaturen (25 °C, 30 °C und 37 °C) sowie drei verschiedene Zeitpunkte (3 h, 6 h und über Nacht) in LB-Medium. Als Referenz für *E. coli*-eigene Proteine wurde eine nicht induzierte Probe über Nacht kultiviert (Abb. 15).

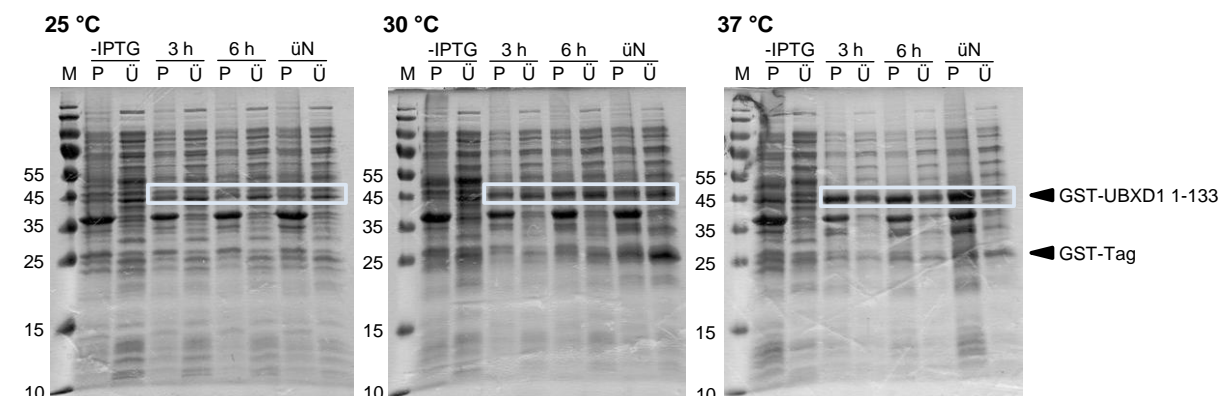


Abb. 15 Expressionstest für GST-UBXD1 1-133. Getestet wurde LB-Medium bei den Temperaturen 25 °C, 30 °C und 37 °C sowie zu den Zeitpunkten 3 Stunden, 6 Stunden und über Nacht. Verglichen wurde jeweils der Überstand (Ü) und die Membranfraktion (P). Die beste Expression von GST-UBXD1 1-133 (42,4 kDa) erfolgt bei 30 °C für 6 Stunden.

GST-UBXD1 1-133 ist unter den getesteten Bedingungen lediglich zu maximal 50 % im Überstand zu finden. Außerdem ergab der Expressionstest, dass mit steigender Temperatur die Expression an löslichem GST-UBXD1 1-133 steigt. Zudem kann die Menge an löslichem Protein bei 25 °C und 30 °C auch mit längerer Expressionsdauer erhöht werden, allerdings nimmt dabei auch gleichzeitig die Menge an Abbauprodukten bei etwa 25 kDa zu, was dem GST-Tag ohne UBXD1 1-133 entsprechen würde. Im Vergleich zu der Referenz ohne Induktion (-IPTG) ist ein zusätzliches *E. coli*-eigenes Protein im Pellet mit einer Größe zwischen 35 und 45 kDa zu finden, dass jedoch deutlich von der GST-UBXD1 1-133-Bande unterschieden werden kann.

Unter den getesteten Bedingungen ergaben sich die besten Expressionsbedingungen für GST-UBXD1 1-133 für 6 h bei 30 °C. Diese Bedingungen wurden auch für die UBXD1-Mutanten (DI11/12AA, QK21/22AA, RQ45/46AA und RL62/63AA) und die Konstrukte anderer Größe verwendet (UBXD1 1-80, 32-133, 1-154).

Reinigung von UBXD1 1-133:

Nach erfolgter Expression wurden die Zellen in Niedrigsalzpuffer gelöst, mit Ultraschall aufgeschlossen und ultrazentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und steril filtriert, um größere Proteinaggregate und Zellreste für die anschließende GST-Affinitätschromatographie zu entfernen. Um den Fortschritt der Reinigung beobachten zu können, wurden Proben vom Auftrag, dem Durchfluss der GST-Affinitätschromatographie, dem Affinitätschromatographie-Eluat, nach der Behandlung mit der PreScission-Protease sowie von den Hauptpeaks der Gelfiltration genommen und für die SDS-PAGE-Analyse verwendet.

Durch die GST-Affinitätschromatographie konnte das GST-UBXD1 1-133-Fusionsprotein (42,4 kDa) erfolgreich von den meisten *E. coli*-eigenen Proteinen separiert werden (Abb. 16). Außerdem enthalten die Fraktionen des Elutionspeaks (E) einen erheblichen Anteil an GST-Tag ohne UBXD1, wie es bereits im Expressionstest zu sehen war.

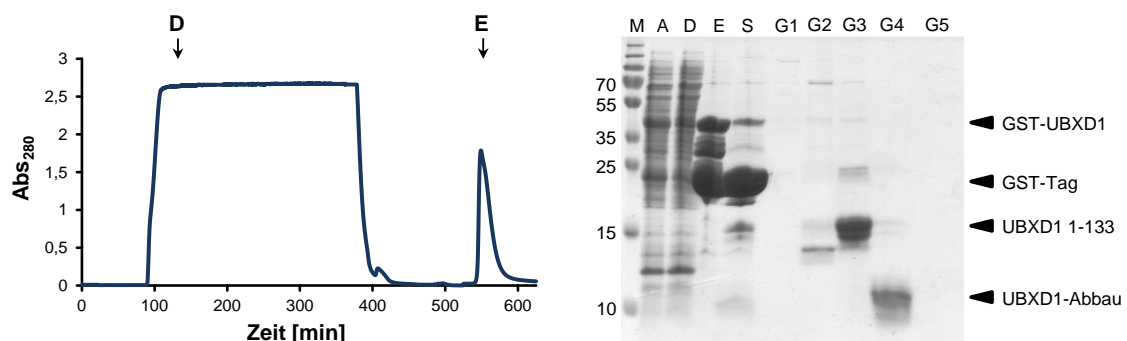


Abb. 16 GST-Affinitätschromatographie von GST-UBXD1 1-133. Nach verschiedenen Schritten wurden Proben für die Analyse mittels SDS-PAGE genommen, um den Reinigungsfortschritt zu kontrollieren (rechts). Der Auftrag (A) bestätigt die Expression des Proteins. Das Chromatogramm der GST-Affinitätschromatographie (links) zeigt den Durchfluss (D) nicht an die Säule gebundenen Proteins sowie das Eluat (E), das zum größten Teil GST-UBXD1 1-133 und GST-Protein enthält. Die PreScission-Protease hat über 95 % des Fusionsproteins geschnitten (S), mit dem anschließend eine Gelfiltration durchgeführt wurde (G1-G5, siehe Abb. 17).

Die Fraktionen des Elutionspeaks der GST-Affinitätschromatographie (E) wurden auf 1 ml pro 1 l Expressionsmedium konzentriert und der GST-Tag mit einer PreScission-Protease entfernt (Abb. 16, SDS-PAGE "S"). Anschließend erfolgte eine Gelfiltration mit einer Superdex 75-Säule mit nachgeschalteter GST-Säule, um UBXD1 1-133 von dem GST-Tag und möglichen Abbauprodukten zu trennen (Abb. 17).

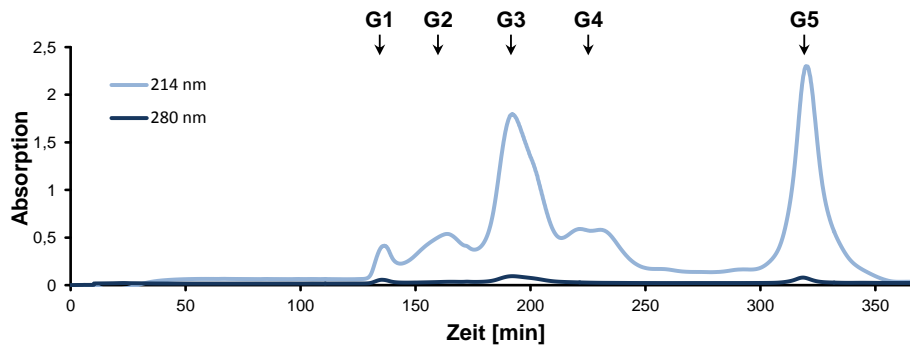


Abb. 17 Gelfiltration von UBXD1 1-133. Von den Fraktionen der einzelnen Peaks (G1-G5) wurden Proben für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen (Abb. 16). Für die weiteren Experimente wurden lediglich die Fraktionen des Peaks G3 verwendet, der weder Abbau- (G4) noch GST-Protein-Verunreinigungen (G2) enthält.

Die Proteinmenge im Ausschlussvolumen (G1) ist sehr gering und hat im SDS-Gel eine unspezifische Bande bei etwa 70 kDa. Die Fraktionen des darauf folgende Peaks (G2) enthalten das GST-UBXD1-Fusionsprotein, das nicht an die GST-Säule gebunden hat und einige weitere unspezifische Proteine bei 15 kDa. Anschließend folgt das Signal, dessen Fraktionen das Protein UBXD1 1-133 enthalten (G3). Im SDS-Gel ist bei G3 zusätzlich neben der Bande für UBXD1 eine weitere Bande bei 25 kDa zu sehen, die auf eine Dimerisierung von UBXD1 1-133 hinweist. Außerdem konnten einige Abbauprodukte (Bande bei ca. 13 kDa) mittels Gelfiltration nicht separiert werden. Die größte Menge an Abbauprodukten (ca. 10 kDa) von UBXD1 1-133 wurde darauf folgend eluiert (G4). Das größte Signal der Gelfiltration bei 320 ml Elutionsvolumen (G5) zeigt eine sehr starke Absorption bei 214 nm und eine geringe Absorption bei 280 nm. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel ist für Fraktion G5 keine Bande zu sehen, sodass es sich hierbei wahrscheinlich um GSH handelt. Die Fraktionen des Peaks um G3 wurden konzentriert und für weitere Analysen verwendet.

3.1.2. Sequentielle Zuordnung von UBXD1 1-133

Zur Ermittlung einer Struktur mittels NMR-Spektroskopie wurden die Proteine Isotopenmarkiert exprimiert und gereinigt. Anschließend wurden verschiedene Spektren zur Zuordnung der einzelnen Atome jeder Aminosäure aufgenommen (Kap. 2.6.1). In einem ersten Schritt wurde ein $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC von UBXD1 1-133 aufgenommen (Abb. 18). Die insgesamt 109 Signale der einzelnen Aminosäuren verteilen sich auf weniger als 1 ppm in der ^1H -Dimension (7,8-8,5 ppm), was darauf hindeutet, dass UBXD1 1-133 ein flexibles Protein mit unstrukturierten Regionen ist. Das Fehlen einer Akkumulation der Glycin-Signale im oberen Teil des Spektrums (> 112 ppm) spricht für das Vorliegen von UBXD1 1-133 in intakter und nicht aggregierter Form.

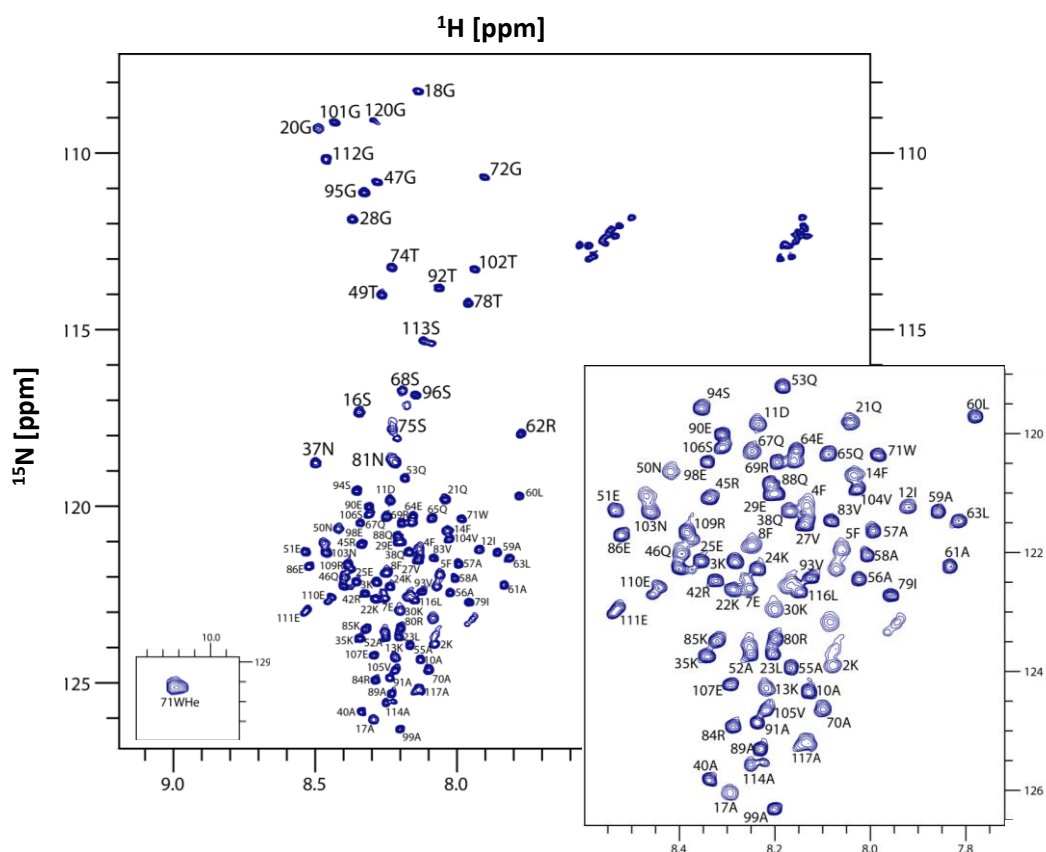


Abb. 18 ^1H - ^{15}N -HSQC von ^{15}N -markiertem UBXD1 1-133. Zu sehen sind 109 Signale mit einer geringen Dispersion. Der kleine Ausschnitt links zeigt das He des Trp 71 und der Ausschnitt rechts den zentralen Teil des Spektrums in einer Vergrößerung. Es konnten 88 % der Signale zugeordnet werden.

Mit Hilfe des HNCACB- und CBCACONH-Spektrums wurden die α - und β -Atome der Aminosäuren zugeordnet (Kap. 2.6.1). Die Zuordnung der C=O-Atome erfolgte über das HNCO-Spektrum und die Seitenketten-Wasserstoffe wurden mit Hilfe des ^1H - ^{15}N -TOCSY -Spektrums zugeordnet (Abb. 19, Anhang 8.7). Zur Identifizierung der Lysine wurde zusätzlich ein ^1H - ^{15}N -SOFAS-FAST-HSQC aufgenommen, für welches die Aminosäure Lysin durch Zugabe von L-Lysin in das Minimalmedium bei der Expression demarkiert wurde. Aufgrund dessen bleiben die Signale der Lysine im ^1H - ^{15}N -SOFAS-FAST-HSQC aus.

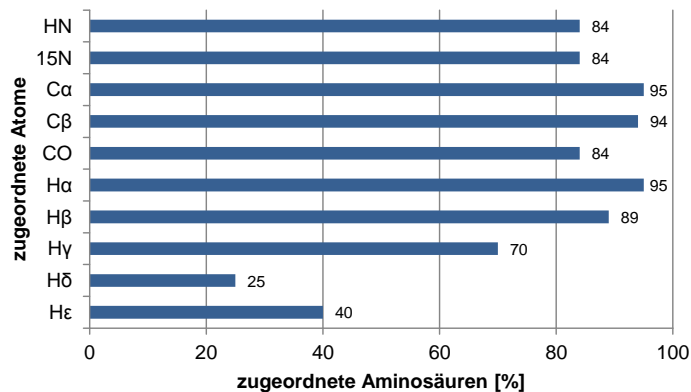


Abb. 19 Prozentualer Anteil der zugeordneten Atome von UBXD1 1-133. Zugeordnet wurde mit einem HNCACB-, CBCACONH-, HNCO- und ^{15}N - ^1H -HSQC-TOCSY-Spektrum.

Das Proteinrückgrat (HN, NH, C α , H α , CO) von UBXD1 1-133 konnte zu 88 % sequentiell zugeordnet werden. Die Zuordnung der Seitenketten-Wasserstoffe ist jedoch lückenhaft, sodass die H γ -Atome zu 70 %, die H δ -Atome zu 25 % und die H ϵ -Atome zu 40 % zugeordnet werden konnten.

Insbesondere drei Bereiche von UBXD1 1-133 konnten, auch nach Verwendung der Konstrukte 1-80 und 32-133, nicht zugeordnet werden. (I) Viele der Signale der N-terminalen Aminosäuren von UBXD1 1-133 sind sehr schwach (bis Lys 30). Aminosäure Met 1, Gln 6, Lys 9 und Lys 15 konnten nicht zugeordnet werden. (II) Ein weiterer nicht zugeordneter Bereich befindet sich zwischen Ala 31 und Glu 34. (III) Zudem konnten die Signale der Aminosäuren ab Val 121 nicht zugeordnet werden. Deshalb werden bei der folgenden Charakterisierung die Aminosäuren 1 bis 120 betrachtet.

3.1.3. Strukturelle Charakterisierung des N-Terminus von UBXD1

Da die Zuordnung von UBXD1 1-133 besonders in den Seitenketten sehr lückenhaft ist und damit eine Berechnung der Tertiärstruktur ungenau sein würde, wurden weitere Experimente zur strukturellen Charakterisierung des N-Terminus von UBXD1 vorgenommen.

CD-spektroskopische Analyse:

Die Analyse der Sekundärstrukturelemente wurde mit Hilfe eines CD-Spektrums im Fern-UV-Bereich vorgenommen (Abb. 20).

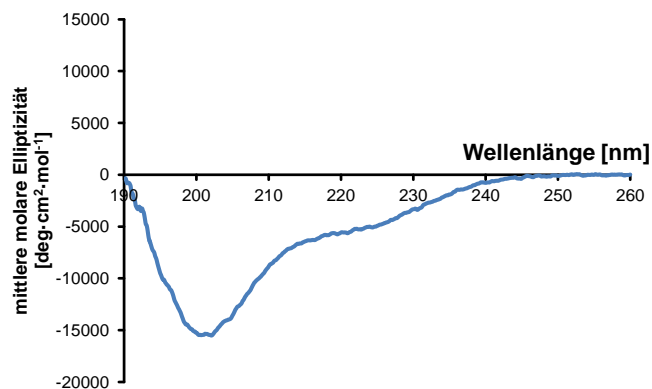


Abb. 20 CD-spektroskopische Untersuchung von UBXD1 1-133. Das Spektrum besitzt ein Minimum bei 200 nm und ca. 220 nm. Die Sekundärstrukturanalyse ergab einen α -helikalen Anteil von 48 %.

Das CD-Spektrum besitzt ein Minimum bei 200 nm und ein Plateau bei ca. 220 nm, was auf ein unstrukturiertes Protein hinweist. Die Sekundärstrukturanalyse ergab, dass es sich bei UBXD1 1-133 um ein α -helikales Protein (48 %) mit sehr vielen flexiblen Bereichen (Turn: 15 %, random coil: 18 %) handelt. Der Anteil an β -Strängen ist mit 18 % geringer als der α -helikale Anteil.

Wishart-Analyse und Sekundärstrukturvorhersage:

Neben der CD-spektroskopischen Analyse wurde die Verteilung von Sekundärstrukturelementen mittels Wishart-Analyse der NMR-Resonanzen untersucht. Die daraus resultierende Verteilung der Sekundärstrukturelemente wurde mit Sequenz-basierten Sekundärstrukturvorhersagen verglichen (Abb. 21).

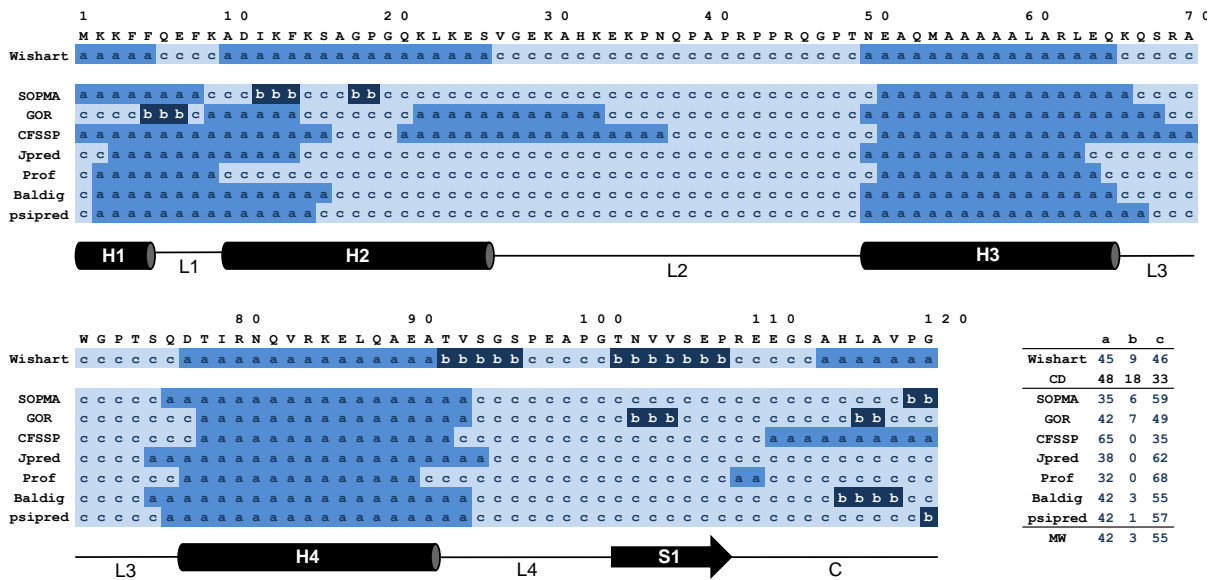


Abb. 21 Sekundärstrukturanalyse von UBXD1 1-133. a = α -Helix (blau), b = β -Strang (dunkelblau), c = random coil (hellblau). Die Wishart-Analyse der NMR-Daten zeigt zwei α -Helices am N-Terminus (H1 und H2) und zwei weitere α -Helices in der Mitte des Proteins (H3 und H4). Das bereits bekannte VIM-Motiv befindet sich in H3. Der C-Terminus besteht aus zwei kurzen β -Strängen (S) und am Ende aus einer kurzen α -Helix. Die Sequenz-basierten Strukturvorhersagen zeigen ähnliche Sekundärstrukturverteilungen. Jeweils darunter: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = Linker).

Die Wishart-Analyse der $H\alpha$ -, $C\alpha$ -, $C\beta$, sowie CO-Atome zeigt eine ähnliche prozentuale Verteilung der Sekundärstrukturanteile (45 % α -Helix, 9 % β -Strang, 46 % random coil) wie die Analyse des CD-Spektrums. UBXD1 1-133 ist ein α -helikales Protein, das insgesamt 4 Helices (H1: Met 1 bis Phe 5, H2: Ala 10 bis Ser 26, H3: Asn 50 bis Gln 65 und H4: Asp 77 bis Ala 91) und einen β -Strang (S1: Thr 102 bis Pro 108) am Ende der Sequenz besitzt. Die einzelnen Sekundärstrukturelemente sind über unstrukturierte Linker-Regionen (L1 bis L4) verbunden. Da die Analyse nach Wishart aufgrund der unvollständigen Zuordnung und zahlreicher Proline teilweise uneindeutig war, wurden zum Vergleich verschiedene Programme (SOPMA und GOR (145), CFSSP (146; 147), Jpred (148), Prof (149), Baldig Spro8 (150) und psipred (151)) zur Sequenz-basierten Sekundärstrukturvorhersage herangezogen. Laut Wishart-Analyse ist der vordere Bereich von UBXD1 1-133 bis Ser 26 α -helikal (H1 und H2), wird jedoch von L1 (Gln 6 bis Lys 9) unterbrochen. Die Programme sagen für die ersten 15 Aminosäuren eine α -Helix vorher, mit Ausnahme von SOPMA und GOR, die in diesem Bereich auch einige kurze β -Stränge vorschlagen. Bei den Programmen GOR und CFSSP folgt kurz darauf eine weitere Helix (Gly 20 bis Lys 34). H3 mit dem VIM-Motiv (Asn 50 bis Gln 65) besteht sowohl laut Wishart-Analyse als auch laut Sekundärstrukturvorhersage aller hier verwendeten Programme aus einer α -Helix. Gleichermäßen verhält es sich mit H4 (Asp 77 bis Ala 91). In der Wishart-Analyse folgt H4 ein kurzer β -Strang (bis Ser 96), der jedoch von keinem der Programme bestätigt wird. Die

Sekundärstruktur des C-Terminus von UBXD1 1-133 ist uneindeutig. Die Wishart-Analyse ergibt einen β -Strang S1 (Val 102 bis Pro 108), der jedoch lediglich durch das GOR-Programm bestätigt wird. CFSSP sagt eine α -Helix am Ende von UBXD1 1-133 (Ala 114 bis Gly 120) vorher, während die übrigen Programme eine unstrukturierte Region bisweilen mit kurzen β -Strängen vorhersagen. Die Vorhersage der Programme des α -helikalen Anteils ist mit den Werten aus der CD-Spektroskopie und der Wishart-Analyse vergleichbar, wohingegen der Anteil an β -Elementen geringer ausfällt (Abb. 21, Tabelle).

Die Auswertung der Dispersion und der Lage der Signale der NMR-Spektroskopie sowie des CD-Spektrums zusammen mit der Wishart-Analyse ergaben, dass der N-Terminus von UBXD1 1-133 wahrscheinlich vier α -Helices besitzt, die über große Linker-Bereiche miteinander verbunden sind.

Mutationsstudien zur Analyse der räumlichen Anordnung der Helices:

In einem weiteren Schritt wurde die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente zueinander näherungsweise mit Mutationsstudien untersucht. Dazu wurden geladene Aminosäuren gegen Alanine ausgetauscht. Bei diesen Mutationen sind in einem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von UBXD1 1-133 Signalverschiebungen für diese Signale und die der umliegenden Aminosäure im Vergleich zum Wildtyp aufgrund der Änderung der chemischen Umgebung der Aminosäuren zu erwarten. Befinden sich Sekundärstrukturelemente in räumlicher Nähe, würde neben den Shifts der umliegenden Aminosäuren auch Shifts in Sequenz-fernen Regionen zu sehen sein. Zur Untersuchung von H2 wurde am Anfang der Helix eine Doppelmutation eingefügt (DI11/12AA). Die Mutation von Asp 11 und Ile 12 führt zu Shifts dieser Aminosäuren sowie den umliegende Aminosäuren einschließlich H1 und L1 (Lys 2 bis Ala 17) (Abb. 22, rot).

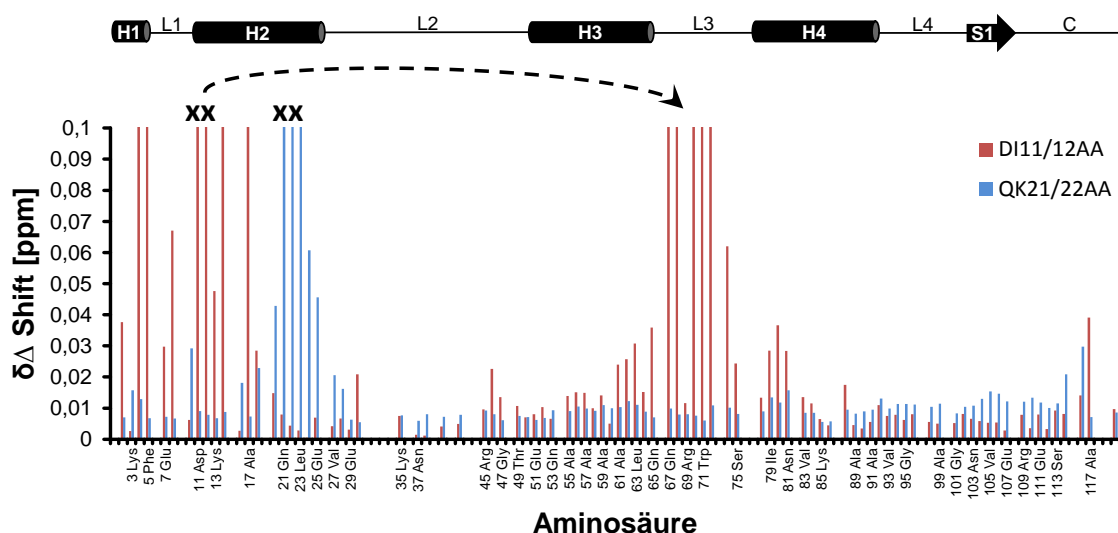


Abb. 22 Mutationsstudien des N-Terminus von UBXD1 1-133. Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: NMR-Shift-Auswertung der Mutanten in Relation zu den Signalen des Wildtyps. Die Mutante DI11/12AA (rot) weist neben den Shifts in dem Bereich der Mutation (Kreuz) auch Shifts in L3 auf (Pfeil), was auf die räumliche Nähe von Asp11/Ile12 und L3 hinweist. Die Mutante QK21/22AA (blau) hat keinen Einfluss auf Sequenz-ferne Aminosäuren.

Zusätzlich shiften auch Signale in L3 sowie am Ende von H3 und am Anfang von H4 (Ala 61 bis Asn 81). Demzufolge scheint sich H2 in räumlicher Nähe sowohl zu H1 als auch zu L3 zu

befinden. Um feststellen zu können, ob es sich bei diesen Shifts um ein generelles Phänomen handelt, wurde eine weitere Doppelmutante am Ende von H2 (QK21/22AA) untersucht (Abb. 22, blau). Diese Mutante verursacht im Gegensatz zu DI11/12AA lediglich Shifts der mutierten Signale (Gln 21 und Lys 22) und der umliegenden Signale (Gly 20, Leu 23, Lys 24 und Glu 25). Das Mutationsexperiment von DI11/12AA wurde auch in umgekehrter Weise durchgeführt, indem Mutationen im Bereich von H3 eingefügt wurden (Abb. 23).

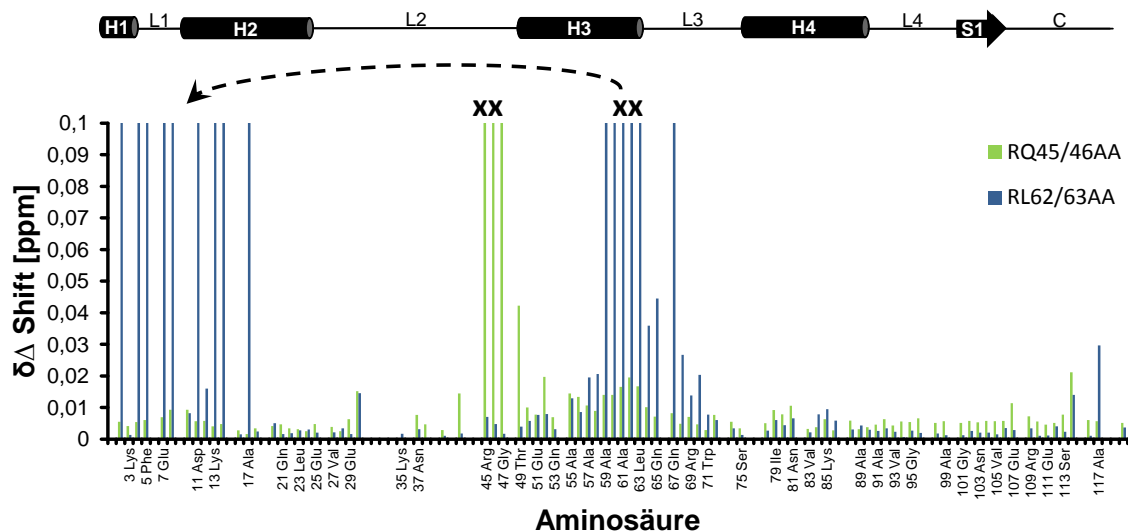


Abb. 23 Mutationsstudien in der VIM-Helix (H3) von UBXD1 1-133. Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: NMR-Shift-Auswertung der Mutanten in Relation zu den Signalen des Wildtyps. Die Mutante RQ45/46AA (grün) hat nur einen Einfluss auf die mutierten (Kreuz) und umliegende Aminosäuren. Die Mutante RL62/63AA (blau) weist neben den Shifts in dem mutierten Bereich (Kreuz) auch Shifts im N-terminalen Bereich (H1/H2, Pfeil) auf, was die räumliche Nähe von H1/H2 und H3/L3 aus Abb. 22 bestätigt.

Dazu wurde am Ende von H3 eine Doppelmutation eingeführt (RL62/63AA, Abb. 23, blau), die Shifts in den umliegenden Aminosäuren verursacht (Ala 59 bis Gln 67). Zusätzlich zu diesen Shifts, shiften auch Aminosäuren im vorderen N-Terminus von UBXD1 1-133 in H1, L1 und zum Teil H2 (Lys 2 bis Ala 17). Damit werden die Ergebnisse der Mutationsstudien in H2 bestätigt (siehe Abb. 22), was auf eine Interaktion zwischen H1/H2 und H3/L3 hinweist. Um auch in diesem Experiment zu zeigen, dass es sich bei der Mutation von Arg 62 und Leu 63 um eine spezifische Interaktion handelt, wurde am Ende von L2 eine Doppelmutante eingefügt (RQ45/46AA, Abb. 23, grün). Diese Mutationen hat im Gegensatz zur RL62/63AA-Mutante lediglich einen Einfluss auf die mutierten Aminosäuren und deren umliegende Aminosäuren (Arg 45 bis Thr 49).

In einem weiteren Experiment wurde versucht, den genauen Interaktionsbereich zwischen H1/H2 und H3/L3 zu definieren. Dazu wurde ^{15}N -markiertes UBXD1 32-133 (200 μM) mit unmarkiertem UBXD1 1-32 (1 mM) titriert. Allerdings konnte in diesem Experiment keine Interaktion mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.

Um unterscheiden zu können, ob die Verschiebungen in der NMR-Spektroskopie bei den Mutationsstudien durch strukturelle Änderungen wie beispielsweise den Verlust einer α -Helix hervorgerufen werden oder lediglich auf die Änderung der chemischen Umgebung der einzelnen

Aminosäuren durch das Entfallen von benachbarten geladenen Aminosäuren zurückzuführen ist, wurden von den vier Mutanten (DI11/12AA, QK21/22AA, RQ45/46AA, RL62/63AA) CD-Spektren aufgenommen, deren Sekundärstrukturanteile berechnet und mit dem Wildtyp von UBXD1 1-133 verglichen (Abb. 24).

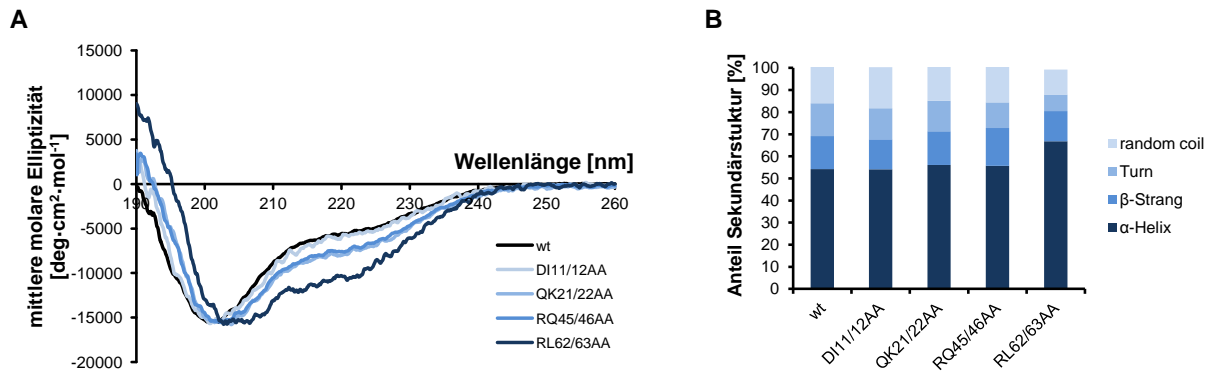


Abb. 24 CD-spektroskopische Untersuchung der UBXD1-Mutanten. A: Die Spektren aller Mutanten besitzen jeweils ein Minimum bei 200 nm und ein Plateau bei 220 nm. B: Die Sekundärstrukturanalysen zeigen, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Sekundärstrukturverteilung im Vergleich zum Wildtyp haben. Die RL62/63AA-Mutante weist jedoch im Gegensatz zu den anderen Mutanten einen erhöhten α -helikalen Anteil auf.

Durch den Austausch hoch chiraler Aminosäuren wie Arginin oder Isoleucin gegen die im Vergleich dazu schwach chirale Aminosäure Alanin kommt es zu einem Intensitätsverlust des CD-Signals. Deswegen wurden zur besseren Vergleichbarkeit die CD-Spektren der Mutanten auf das CD-Spektrum des Wildtyps bezüglich ihrer Intensität am Minimum bei 200 nm genormt. Die CD-Spektren der Mutanten haben einen ähnlichen Verlauf wie der Wildtyp. Alle Mutanten besitzen wie der Wildtyp ein Minimum bei 200 nm (Minimum für random coil: 200 nm). Lediglich die Mutante RL62/63AA besitzt ein leicht verschobenes Minimum bei 203 nm (Minimum für helikale Proteine: 208 nm). Das Plateau liegt bei allen Mutanten vergleichbar mit dem Wildtyp bei 220 nm (zweites Minimum für helikale Proteine: 220 nm), jedoch mit unterschiedlichen Elliptizitäten. Die Mutante DI11/12AA ist mit dem Wildtyp vergleichbar, während die Mutanten QK21/22AA und RQ45/46 in ähnlicher Weise das Plateau bei einer geringeren Elliptizität haben. Die negativste Elliptizität am Plateau bei 220 nm besitzt die Mutante RL62/63AA.

Die Mutanten DI11/12AA, QK21/22AA und RQ45/46AA besitzen eine nahezu identische Sekundärstrukturverteilung wie der Wildtyp (α -Helix: 49 %, β -Strang: 18 %, random coil: 18 %, Turn: 15 %). Die Mutante RL62/63AA hingegen weist im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Anteil helikaler Strukturen von 69 % auf, während sich gleichzeitig die übrigen Strukturelemente verringern (β -Strang: 10 %, random coil: 14 %, Turn: 6 %).

3.1.4. Analyse der Flexibilität des N-Terminus von UBXD1 1-133

Nachdem UBXD1 1-133 genauer hinsichtlich seiner Sekundärstrukturelemente sowie deren Wechselwirkung untereinander und deren räumliche Anordnung beschrieben worden ist, wurde in einem weiteren Schritt die Flexibilität von UBXD1 1-133 und seine Faltung untersucht.

Tryptophan-Fluoreszenz-Schmelzkurve:

In einem ersten Versuch wurde mittels Tryptophan-Fluoreszenz-Schmelzkurve (Trp 71) untersucht, ob das Tryptophan in dem Loop zwischen H3 und H4 oberflächenexponiert und lösungsmittelzugänglich vorliegt oder innenliegend in die Struktur von UBXD1 1-133 eingebunden ist (Abb. 25). Ist das Tryptophan innenliegend, kommt es zu einer Verschiebung des Fluoreszenz-Maximums in größere Wellenlängenbereiche bei thermischer Denaturierung des Proteins. Ist das Tryptophan oberflächenexponiert oder befindet sich in flexiblen Bereichen, verändert sich das Fluoreszenz-Maximum bei Erhitzen nicht signifikant.

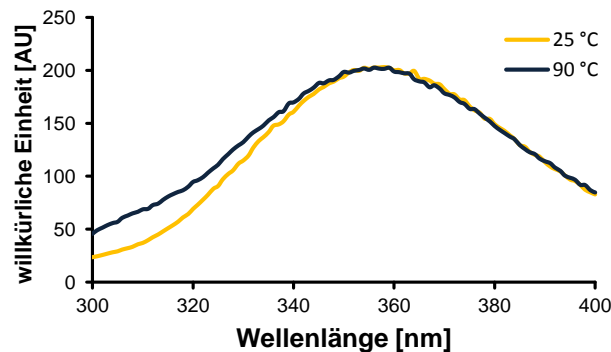


Abb. 25 Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz von UBXD1 1-133 nach Temperaturänderung. Nach thermischer Denaturierung von UBXD1 1-133 auf 90 °C verschiebt sich das Maximum der Tryptophan-Fluoreszenz nicht. Damit liegt Trp 71 nicht in einem kompakten Kern. Um die Maxima besser vergleichen zu können, wurde die Kurve nach Erhitzen (90 °C, dunkelblau) mit dem Faktor 4,8 multipliziert.

Das Maximum der Tryptophan-Fluoreszenz von UBXD1 1-133 befindet sich bei 25 °C bei 356 nm. Nach Erhitzen von UBXD1 1-133 auf 90 °C und wieder Abkühlen, befindet sich das Maximum bei 358 nm und die Fluoreszenz-Intensität ist um den Faktor 4,8 gesunken. Daher ist das Tryptophan schon vor der Schmelzung oberflächenexponiert oder es befindet sich in einem flexiblen Bereich, der nicht nach innen in die Struktur zeigt.

D₂O-Austausch-Experiment:

Um zu überprüfen, ob das Tryptophan lediglich oberflächenexponiert in einer rigiden Struktur vorliegt oder es sich um ein flexibles Protein handelt, wurde ein D₂O-Austausch-Experiment durchgeführt. Dazu wurden die Konstrukte 1-80 und 32-133 jeweils in 100 % D₂O-basiertem Puffer umgepuffert und nach 16 Stunden ein ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum aufgenommen. Die an die Stickstoff-gebundenen Wasserstoffatome, die fest in eine Sekundärstruktur eingebunden sind, werden nicht gegen die Deuterone im Puffer ausgetauscht und deren Signale bleiben im Spektrum sichtbar. Wasserstoffatome in Loop- oder unstrukturierten-Regionen hingegen werden sehr schnell ausgetauscht, wodurch die Signale in einem ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum nicht mehr sichtbar sind. Nachdem die Signale der Spektren in ~100 % D₂O von UBXD1 1-80 und 32-133 auf das Spektrum von UBXD1 1-133 in 10 % D₂O normiert wurden, sind die Signale der Wasserstoffatome mit besonders hohen Intensitäten (> 0,5 Intensität_{norm. wt}) sehr stabil und damit in Sekundärstrukturen eingebunden. Das D₂O-Austausch-Experiment ergab, dass sowohl in den Sekundärstrukturelementen als auch einigen Loop-Regionen stabile Wasserstoffbrückenbindungen existieren, die auch nach 16 Stunden gegen den Austausch gegen Deuterone geschützt sind (Abb. 26).

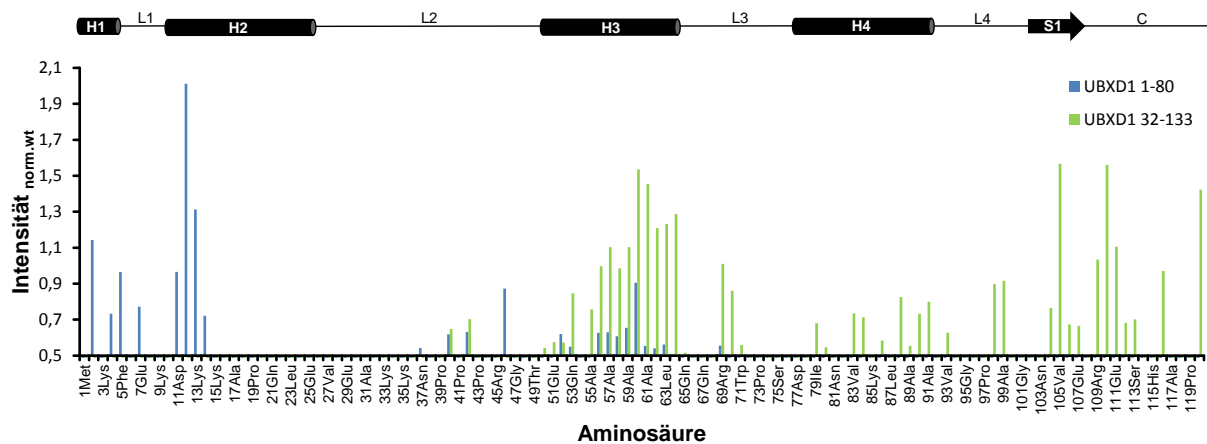


Abb. 26 D₂O-Austauschexperiment von UBXD1 1-80 und 32-133. Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: Intensitätsdifferenzen der Signale in einem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum in 10 % D₂O und ~100 % D₂O zur Sichtbarmachung von stabilen Wasserstoffbrückenbindungen. Je höher der Quotient der genormten Intensitäten aus den beiden Spektren, desto stabiler ist die Wasserstoffbrücke. Demnach befinden sich Wasserstoffbrückenbindungen im Bereich der vier Helices sowie gehäuft am C-Terminus.

In H1 und L1 bilden Lys 2, Phe 4, Phe 5 und Gln 7 stabile Wasserstoffbrückenbindungen aus. Darauf folgt ein kleiner Bereich stabiler Wasserstoffbrückenbindungen am Anfang von H2 (Asp 11 bis Phe 14). In L2 zwischen H2 und H3 bilden sich in einer sehr Prolin-reichen Region (Pro 39, Pro 41, Pro 43, Pro 44) ebenfalls vereinzelt Wasserstoffbrückenbindungen in geladenen Aminosäuren (Arg 42, Gln 46), die nicht durch D₂O beeinflusst werden. Die Aminosäuren der VIM-Motiv-enthaltenen H3 (Gln 53 bis Glu 64), die bereits durch Sequenz-basierte Sekundärstrukturvorhersagen sehr definiert ist (Kap. 3.1.3), gehen alle Wasserstoffbrückenbindungen ein. Die Intensitäten der Wasserstoffbrückenbindungen der Aminosäuren in H3 fallen schwächer aus als in H1/H2 (Abb. 26, blau). Neben L2 bilden auch einige Aminosäuren in L3 Wasserstoffbrückenbindungen aus (Arg 69 bis Ala 70). In H4 werden ebenfalls von zahlreichen geladenen Aminosäuren Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet (Ile 79, Arg 80, Val 83, Arg 84, Glu 86, Gln 88 bis Ala 91 und Val 93). Diese besitzen jedoch im Vergleich zum VIM-Motiv eine geringere Intensität und liegen nicht zusammenhängend vor (Abb. 26, grün). In der Wishart-Analyse und der Sekundärstrukturvorhersage ist der C-terminale Bereich von UBXD1 1-133 wenig definiert und flexibel (Kap. 3.1.3), sodass nur sehr wenige Wasserstoffbrückenbindungen zu erwarten wären. Es gibt jedoch einige Wasserstoffbrückenbindungen im Bereich von S1 und darauf folgend (Val 104 bis Ser 113), sowie vereinzelte Wasserstoffbrückenbindungen in L4 (Glu 98 und Ala 99) und am Ende von UBXD1 1-133 (Leu 116 und 120 Gly).

hetNOE-Studien:

Obwohl die Dispersion der NMR-Signale von UBXD1 1-133 sehr gering ist und das CD-Spektrum ein relativ unstrukturiertes Protein vermuten lässt, ergeben die Mutationsstudien und das D₂O-Austausch-Experiment dennoch Hinweise auf strukturierte Bereiche, die in definierter Weise miteinander wechselwirken. Um hinreichend zu klären, ob UBXD1 1-133 eine kompakte Struktur besitzt oder flexibel in Lösung vorliegt wurde ein hetNOE-Spektrum aufgenommen. Mit

diesem Spektrum wird die Flexibilität der $^{\text{N}}\text{H}$ -Bindungsvektoren einzelner Aminosäuren gemessen. Zum Vergleich wurden auch der Einfluss der Deletion des C-Terminus ($\Delta\text{H4/C}$, UBXD1 1-80) und der Einfluss der Deletion des N-Terminus ($\Delta\text{H1/H2}$, UBXD1 32-133) untersucht.

Bei einem hetNOE-Spektrum werden prinzipiell simultan zwei Spektren aufgenommen: Bei dem einen wird durch Sättigung (Einstrahlen eines Dauersignals während der Relaxationsperiode der Protonen) ein heteronuklearer NOE aufgebaut (I_{sat}). Aufgrund des gyromagnetischen Verhältnisses für ^{15}N -Kerne, kann das NOE-Signal theoretisch sowohl positive Werte als auch negative Werte annehmen. In flexiblen Bereichen führt die erhöhte Relaxationsfähigkeit zu einer unvollständigen Sättigung, was zur Umkehrung des Signalvorzeichens führt. Das andere Spektrum hingegen wird im Äquilibrium der H_N -N-Kopplung über den Raum ohne Sättigung aufgenommen (I_{equ}). Das Verhältnis der Intensitäten aus beiden Spektren einer Aminosäure ($I_{\text{sat}}/I_{\text{equ}}$) gibt Aufschluss darüber, wie starr die H_N -N-Kopplung ist und dementsprechend auch darüber wie starr oder flexibel das Protein in diesem Bereich ist (Abb. 27).

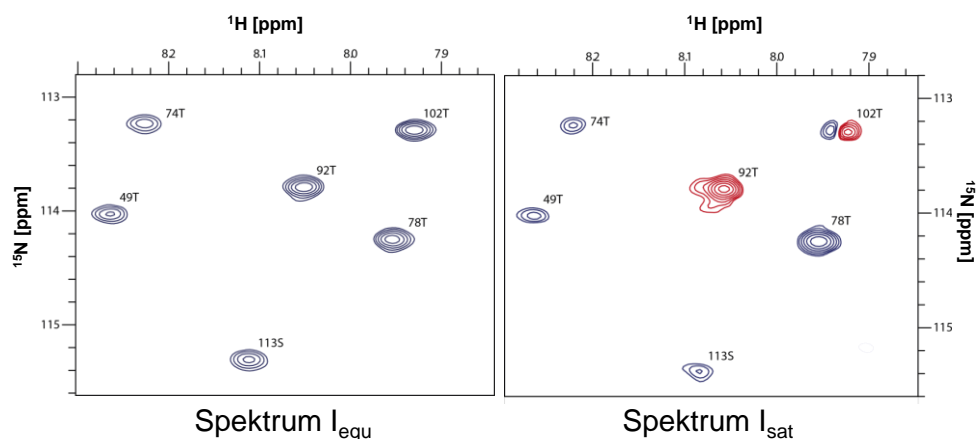


Abb. 27 Spektrum-Ausschnitt zur Auswertung eines hetNOE-Spektrums. Links: Spektrum im Äquilibrium (I_{equ}). Alle Signale besitzen das gleiche negative Vorzeichen (blau), jedoch unterschiedliche Intensitäten. Rechts: Spektrum bei Sättigung (I_{sat}). Die Signale besitzen unterschiedliche Vorzeichen (rot: positiv, blau: negativ) und Intensitäten.

Befindet sich eine Aminosäure in einem flexiblen Bereich eines Proteins, so besitzen die Intensitäten des Signals aus den beiden Spektren entgegengesetzte Vorzeichen. Ist gleichzeitig die Intensität im I_{sat} -Spektrum hoch, so ist der Bereich um diese Aminosäure flexibel (Abb. 27, Thr 92). Haben beide Intensitäten das gleiche Vorzeichen, so handelt es sich eher um eine unflexiblere Struktur in dem Bereich der Aminosäure. Je höher die Intensität im I_{sat} -Spektrum ist, desto rigider ist die Aminosäure eingebettet (Abb. 27, Thr 78 vs. Thr 49). Die hetNOE-Analyse wurde separat für jede Aminosäure von UBXD1 1-133 (RQ45/46AA stellvertretend für den Wildtyp), UBXD1 1-80 und UBXD1 32-133 durchgeführt (Abb. 28). Das Profil der hetNOE-Analyse unterscheidet sich zwischen den einzelnen Konstrukten nicht wesentlich. Somit hat sowohl die Deletion des C-Terminus (UBXD1 1-80) als auch die Deletion des N-Terminus (UBXD1 32-133) von UBXD1 1-133 keinen Einfluss auf die Flexibilität. Lediglich bei den Aminosäuren am Anfang (bis Asn 37) von UBXD1 32-133 und am Ende (ab Ser 68) von UBXD1 1-80 kommt es zu Abweichungen, was auf die Separierung der einzelnen Sekundärstrukturelemente zurückzuführen ist.

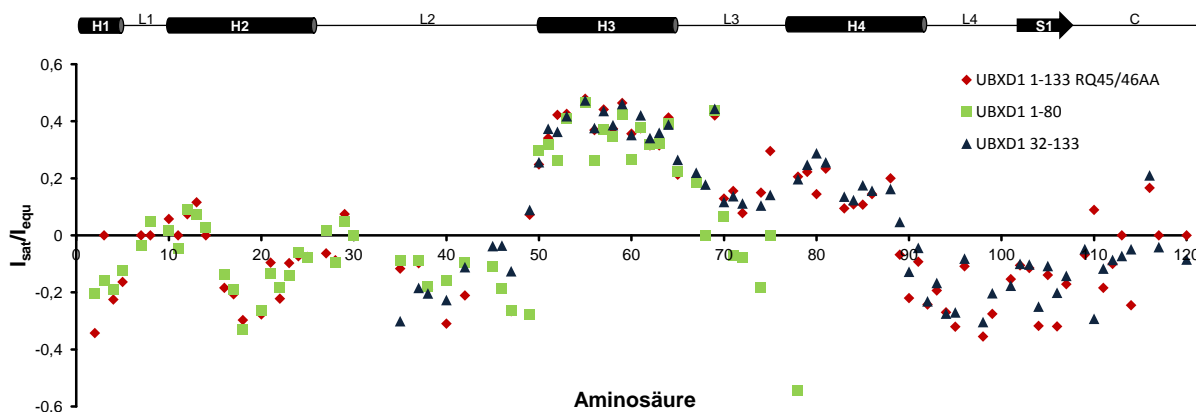


Abb. 28 Auswertung der hetNOE-Spektren verschiedener UBXD1-Konstrukte. Getestet wurden UBXD1 1-133 RQ45/46AA (rot), UBXD1 1-80 (grün) und UBXD1 32-133 (blau). Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: Auswertung der Flexibilität jeder Aminosäure mittels $I_{\text{sat}}/I_{\text{equ}}$. Der größte Teil des N-Terminus von UBXD1 1-133 ist aufgrund der negativen Werte flexibel. Rigidere Bereiche liegen zwischen H3 und H4.

H1 (Met 1 bis Phe 5) besitzt negative hetNOE-Werte, was auf einen flexiblen Bereich hinweist. L2 und der Anfang von H2 (Glu 7 bis Phe 14) hingegen haben leicht positive Werte, sodass dieser Bereich etwas rigider sein muss als H1. Danach sinken die hetNOE-Werte auf -0,4 für Gly 18 im hinteren Teil von H2 und steigen zum Anfang von L2 wieder auf Werte knapp über 0 (0,04 für Glu 29). Der Rest dieses Linkers ist wie zu erwarten eher flexibel (hetNOE-Werte < 0 bis Gly 47). Sowohl H3 mit dem VIM-Motiv, H4 als auch der verbindende L3 (Thr 49 bis Ala 89) besitzen hetNOE-Werte zwischen 0,1 und 0,47 und weisen damit eine gewisse Rigidität gegenüber dem Rest von UBXD1 1-133 auf. Der Kern der VIM-Motiv-enthaltenen H3 besitzt hetNOE-Werte > 0,3 (Glu 51 bis Glu 61). Der darauf folgende Linker L3 ist rigider als die übrigen Linker in UBXD1 1-133, da er positive hetNOE-Werte zwischen 0,1 und 0,25 besitzt. H4 ist etwas flexibler als H3, da hier die hetNOE-Werte im Schnitt bei 0,17 liegen (Thr 78 bis Gln 88). Der C-Terminus ab Arg 80 von UBXD1 1-133 besitzt bis auf Ala 116 negative hetNOE-Werte. Der vorhergesagte β -Strang bildet damit kein rigides Sekundärstrukturelement aus.

Trotz zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen, bestätigt die hetNOE-Analyse von UBXD1 1-133 das Ergebnis der geringen Signal-Dispersion im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum sowie das des CD-Spektrums eines sehr flexiblen Proteins mit einigen definierten Sekundärstrukturelementen, die in kleinen Bereichen miteinander interagieren zu scheinen.

CD-spektroskopische Analyse verschiedener UBXD1-Konstrukte:

Dass der N-Terminus von UBXD1 keine rigide Struktur besitzt konnte auch durch CD-spektroskopische Analysen bestätigt werden. Bei rigiden Proteinen stabilisieren sich die einzelnen Sekundärstrukturelemente untereinander. Das Entfernen eines Elements würde die gesamte Struktur beeinflussen und folglich ein anderes CD-Spektrum ergeben. Im Gegensatz dazu hat die Deletion einzelner Sekundärstrukturen in flexiblen Proteinen keinen signifikanten Effekt auf den Verlauf eines CD-Spektrums, da sich die einzelnen Elemente in sich stabilisieren. Im Gegensatz dazu werden die einzelnen Sekundärstrukturen in einem rigiden Protein auch von anderen Bereichen des Proteins stabilisiert.

Zur Verifizierung der Flexibilität von UBXD1 1-133 wurden verschiedene Konstrukte des N-Terminus von UBXD1 CD-spektroskopisch untersucht (Abb. 29).

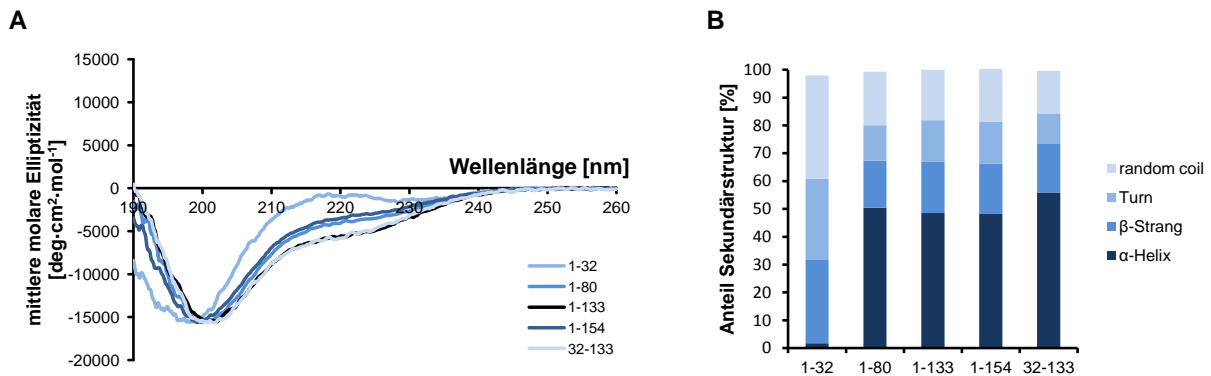


Abb. 29 CD-spektroskopische Untersuchung der UBXD1-Konstrukte. Links: Die CD-Spektren aller Konstrukte besitzen jeweils ein Minimum bei 200 nm und ein Plateau bei 220 nm. Rechts: Die Sekundärstrukturanalysen zeigen, dass die Größe der Konstrukte keinen Einfluss auf die Sekundärstrukturverteilung im Vergleich zum Wildtyp hat mit Ausnahme des Konstruktes 1-32. Dieses besteht fast gänzlich aus β -Strukturen und unstrukturierten Bereichen.

Ähnlich wie bei den Mutationsstudien (Kap. 3.1.3) haben die Deletionen einzelner Elemente keinen großen Effekt auf das CD-Spektrum des jeweiligen Konstrukts mit Ausnahme von UBXD1 1-32. Alle Spektren haben wie der Wildtyp (definiert als UBXD1 1-133) ein Minimum bei 200 nm sowie ein Plateau bei ca. 220 nm. UBXD1 1-32 hingegen hat ein verschobenes Minimum bei 198 nm und ein Maximum bei 218 nm, was für ein unstrukturiertes Peptid spricht. Die Elliptizität des Plateaus von UBXD1 32-133 ist mit UBXD1 1-133 vergleichbar, wohingegen die Elliptizität der Konstrukte 1-80 als auch 1-154 etwas höher ausfällt. Die Analyse der Sekundärstrukturanteile zeigt, dass sowohl die Deletion der vierten Helix und des gesamten C-Terminus (Δ H4 bis C, 1-80), die Hinzunahme einer weiteren Helix weiter C-terminal im Protein (+H6, 1-154), sowie die Deletion der ersten beiden Helices (Δ H1/H2, 32-133) keinen Einfluss auf die Anteile der Sekundärstrukturen besitzt (α -Helix: 49 %, β -Strang: 18 %, random coil: 18 %, Turn: 15 %). Lediglich das Konstrukt UBXD1 1-32 (H1/H2) führt zu einer Verschiebung der Anteile der Sekundärstrukturen hin zu unstrukturierten Bereichen auf Kosten der helikalen Strukturen (α -Helix: 2 %, β -Strang: 30 %, random coil: 37 %, Turn: 29 %).

Signal-Dispersion verschiedener UBXD1-Konstrukte in der NMR-Spektroskopie:

Dass die Sekundärstrukturelemente des N-Terminus von UBXD1 unabhängig voneinander vorliegen, wird auch durch den Vergleich der ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren der Konstrukte UBXD1 1-80 (Δ H4/C), 32-133 (Δ H1/H2) und 1-154 (+H6) mit dem Spektrum von UBXD1 1-133 bestätigt (Abb. 30, Anhang 8.8). Werden H4 und C deletiert (UBXD1 1-80), sind keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zu UBXD1 1-133 zu erkennen. Am N-Terminus in H1 und L2 gibt es einige Shifts (Phe 4, Phe 5, Gln 7). Zum Ende des Konstruktes 1-80 sind ebenfalls einige größere Shifts im Vergleich zu UBXD1 1-133 zu verzeichnen, die wahrscheinlich auf die erhöhte Flexibilität von L3 durch die fehlende H4 zurückzuführen sind.

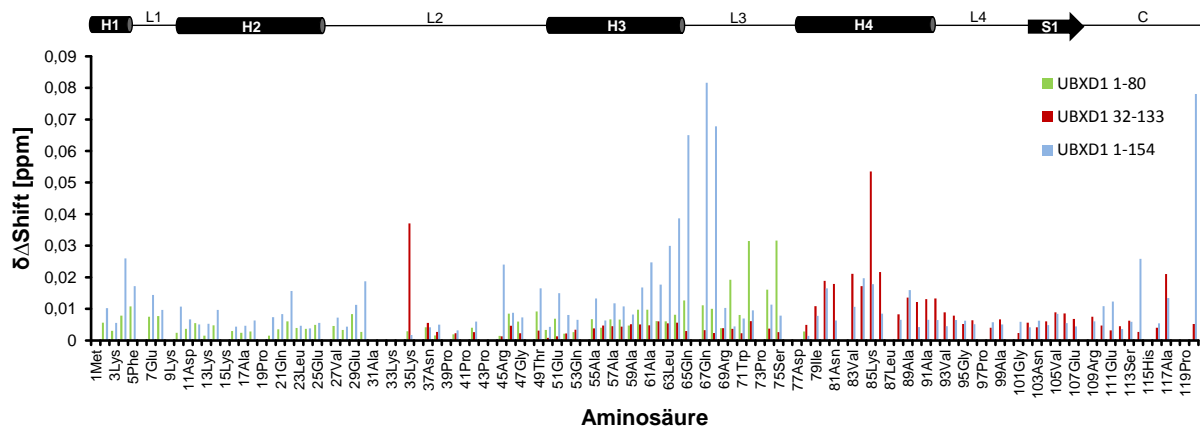


Abb. 30 Auswertung der Shifts verschiedener UBXD1-Konstrukte im Vergleich zu UBXD1 1-133. Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: Shifts zwischen UBXD1 1-133 und UBXD1 1-80 (grün), UBXD1 32-133 (rot) und UBXD1 1-154 (blau). Im Wesentlichen scheinen die einzelnen Helices untereinander keine festen Strukturen auszubilden. Das Hinzufügen einer C-terminalen Helix (UBXD1 1-154) hat eine leichte Verschiebung der Signale aus H3/L3 zur Folge.

Wird der N-Terminus mit den ersten beiden Helices entfernt (UBXD1 32-133), so treten gehäuft Shifts zwischen Ile 79 bis Thr 92 im Bereich von H4 (Asp 77 bis Ala 91) auf. Wird hingegen eine zusätzliche Helix mit dem Konstrukt UBXD1 1-154 (Helix laut Sekundärstrukturvorhersage zwischen Lys 134 und Phe 149) hinzugefügt, so entstehen Shifts im Bereich von H3 und L3 (Ala 61 bis Ser 68). Eine strukturelle Änderung des VIM-Motivs durch die fünfte Helix in UBXD1 1-133 ist jedoch aufgrund der Ergebnisse der CD-Spektroskopie nicht zu erwarten, die eine nahezu identische Verteilung der Sekundärstrukturelemente in den Konstrukten UBXD1 1-133 und 1-154 vorhersagt (Abb. 29). Somit bestätigt die NMR-spektroskopische Analyse der verschiedenen UBXD1-Konstrukte im Vergleich zu UBXD1 1-133 das Bild eines flexiblen Proteins, dessen einzelne Sekundärstrukturelemente weitestgehend unabhängig voneinander vorzuliegen scheinen.

3.1.5. Analyse der Tertiärstruktur des N-Terminus von UBXD1

Nachdem die Sekundärstruktur des N-Terminus ausführlich mittels CD- und NMR-Spektroskopie sowie einiger Mutationsstudien analysiert worden ist, wird in einem nächsten Schritt die Tertiärstruktur genauer untersucht. Für die Berechnung einer NMR-basierten Protein-Struktur werden die Resonanzen aller Atome der einzelnen Aminosäuren, eine Resonanzen-basierte Winkelvorhersage und die Abstände zwischen den einzelnen Aminosäuren anhand ihrer Protonen benötigt. Die Winkel- und Abstandsinformationen geben darüber Aufschluss wie sich die Aminosäuren im Raum zueinander befinden. Wie bereits gezeigt, handelt es sich bei dem N-Terminus von UBXD1 um ein sehr flexibles Protein mit wenigen Sekundärstrukturelementen und zahlreichen Linker-Regionen. Je flexibler und unstrukturierter ein Protein ist, umso weniger Abstandsinformationen sind einem Spektrum zu entnehmen. Dadurch wird auch die Berechnung einer UBXD1 1-133-Struktur erschwert. In dem aufgenommenen 2D-NOESY-Spektrum sind neben den Aminosäure-eigenen Signalen nur sehr

wenige weitere NOESY-Signale zu sehen (Anhang 8.9). Zusätzlich können die wenigen NOESY-Signale aufgrund der geringen Signal-Dispersion nicht mehr eindeutig einem Spinsystem zugeordnet werden. Die Aufnahme eines ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektrums führte zu keinen zusätzlichen Informationen, weil hierdurch die geringere Sensitivität trotz erhöhter Proteinkonzentration (540 μM) nur vereinzelt NOESY-Signale zu messen waren. Aufgrund dessen wurde ein NMR-Resonanzen-basierte Strukturmodell mit cs23d (Kap. 2.7.1) erstellt (Abb. 31).

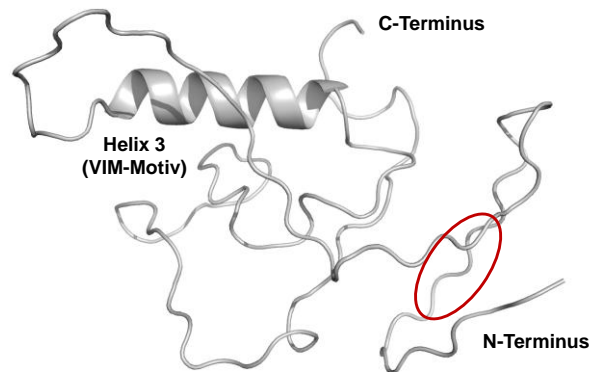


Abb. 31 NMR-Resonanzen-basiertes Strukturmodell von UBXD1 1-120 mit cs23d. Entsprechend dieses Modells ist UBXD1 1-120 unstrukturiert ohne rigiden Kern bis auf die Helix im Bereich des VIM-Motivs. Zusätzlich besitzen der N- und der C-Terminus Windungen (roter Kreis).

Das auf NMR-Resonanzen-basierte Strukturmodell zeigt ein sehr flexibles Protein mit vielen unstrukturierten Bereichen und einer Helix. Diese Helix entspricht im Wesentlichen H3 mit dem VIM-Motiv aus der Wishart-Analyse (Kap. 3.1.3) und befindet sich zwischen Glu 51 und Glu 64. Zusätzlich gibt es zahlreiche Windungen, die Vorstadien von Helices darstellen könnten, aber offensichtlich nicht als solche angezeigt werden. Da dieses Modell unter anderem aufgrund des geringen Helixanteils wahrscheinlich nicht der realen Struktur entspricht, wurde zusätzlich mit UBXD1 1-120 ein Strukturmodell mit YASARA erstellt und anschließend MD-simuliert (Kap. 2.7.2, Abb. 32, A).

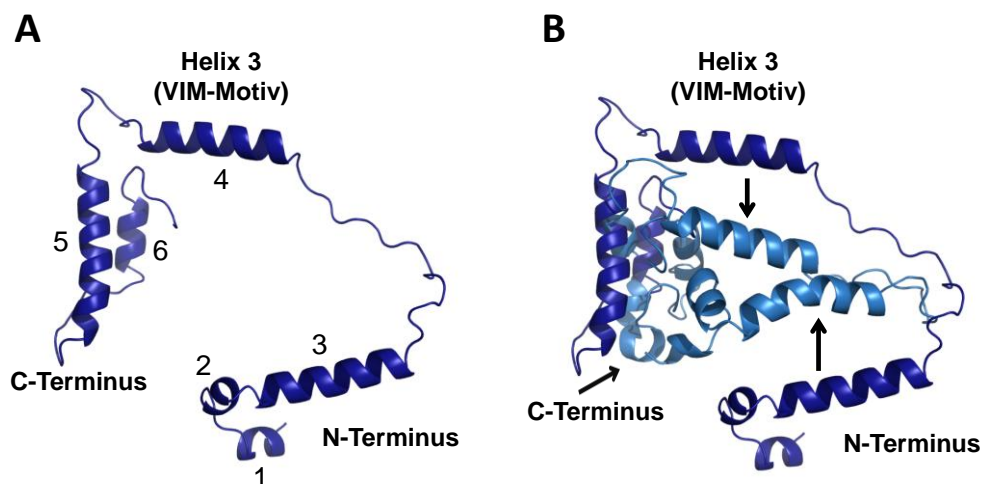


Abb. 32 Strukturmodell und MD-Simulation von UBXD1 1-120. A: Strukturmodell mit YASARA (dunkelblau), wonach UBXD1 1-120 insgesamt 6 Helices besitzt, die denen aus der Sekundärstrukturvorhersage (Abb. 21) ähneln. B: Die MD-Simulation des Strukturmodells (hellblau) über 75 ps führt zu einer Kompression der Struktur, wobei die Verteilung der Helices gleich bleibt.

Das Strukturmodell zeigt deutlich mehr Sekundärstrukturanteile als das NMR-Resonanzenbasierte Modell mit cs23d. So befinden sich am N-Terminus 3 Helices: Met 1 bis Gln 7 (Helix 1), Ile 12 bis Ser 16 (Helix 2) und Gly 18 bis Lys 33 (Helix 3). Desweiteren befindet sich in der Mitte des UBXD1-N-Terminus eine weitere Helix (Helix 4), die das VIM-Motiv beinhaltet (Ala 52 bis Glu 67). Anschließend folgt eine weitere Helix wie in der Wishart-Analyse von Thr 78 bis Gly 95 (Helix 5), die von Helix 4 durch einen kleinen Linkerbereich separiert ist. Im C-Terminus befindet sich statt eines β -Stranges eine weitere Helix (Helix 6, Ser 106 bis Ser 113) in räumlicher Nähe zur Helix 5.

Da für UBXD1 keine homologen Proteinstrukturen existieren, wurde eine Sequenz aus der Methylmalonyl-CoA-Mutase dem Strukturmodell zugrunde gelegt. Dieses Enzym komplexiert jedoch Vitamin B₁₂, sodass die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturen wahrscheinlich nicht der in der realen Struktur des N-Terminus von UBXD1 entspricht. Deswegen wurde mit dem Strukturmodell eine MD-Simulation durchgeführt (Abb. 32, B). Nach 75 ps Simulationszeit verändert sich die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente nicht mehr und bleibt stabil. Im Vergleich zum Strukturmodell ohne MD-Simulation ist die Struktur kompakter, da sich die einzelnen Helices aufeinander zu bewegen. Dennoch hat sich keine stark rigide Konformation gebildet.

3.2. INTERAKTIONSTUDIEN VON UBXD1 MIT MEMBRANEN UND UBIQUITIN

Die vorhergehenden Studien haben gezeigt, dass es sich bei dem N-Terminus von UBXD1 um ein α -helikales Protein mit sehr flexiblen Bereichen handelt. Daher könnte der N-Terminus von UBXD1 eine Interaktion zu anderen Kofaktoren, kleinen Signalmolekülen oder neben der PUB-Domäne auch zu dem p97-Hexamer vermitteln und damit als Adapter-Protein fungieren.

Da UBXD1 zusammen mit p97 an den Endosomen lokalisiert ist (25) und es Hinweise gibt, dass UBXD1 als peripheres Membran-Protein vorliegt (75; 123), wurde untersucht, ob der N-Terminus von UBXD1 die Membranlokalisation verursacht. Dazu wurde eine NMR-Titration von ^{15}N -markiertem UBXD1 1-133 mit einem unmarkierten Lipidgemisch durchgeführt. Das Gemisch besteht homolog zu eukaryotischen Membranen aus POPC, POPG und Cholesterol im Verhältnis 3:1:4. Anschließend wurden über mehrere Schockgefrierzyklen (3 x jeweils 5 Minuten in Flüssigstickstoff und bei 37 °C im Heizblock) Micellen hergestellt. Die Zugabe von 100 μl des Lipidgemisches führte jedoch zu keiner Änderung der Signale im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von UBXD1 1-133. Damit kann eine Bindung von UBXD1 1-133 an die Micellenmembranen unter den getesteten Bedingungen ausgeschlossen werden. Die Bindung von UBXD1 1-133 könnte jedoch durch die zahlreichen Lysine und Arginine auch ladungsvermittelt an bspw. Phosphatidylserin stattfinden, welches dem Lipidgemisch nicht beigelegt worden ist. Daher wurde zudem ein Liposomenbindungsassay mit bovinen Gehirnlipidextrakt durchgeführt (Kap. 2.4.6). Mit diesem Test konnte jedoch auch nach mehrmaliger Wiederholung und sowohl mit Erhöhung der Proteinkonzentration als auch mit Erhöhung der Lipidkonzentration keine Bindung von UBXD1 1-133 an eukaryotische Liposomen festgestellt werden.

Desweiteren bildet UBXD1 mit N-terminal ubiquitinyliertem Caveolin-1 und p97 einen ternären Komplex, der für UBXD1 spezifisch ist (25; 49). Daher wurde geprüft, ob UBXD1 über die Bindung des Ubiquitins am N-Terminus von Caveolin-1 diesen Komplex begünstigt. Dazu wurde ^{15}N -markiertes UBXD1 1-133 mit unmarkiertem Mono-Ubiquitin titriert. Die Auswertung der Shifts und der Intensitäten der NMR-Signale ergab, dass Ubiquitin unter den getesteten Bedingungen an den N-Terminus von UBXD1 allein nicht bindet. Die mögliche Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und Polyubiquitinketten wurde nicht weiter verfolgt, da ansonsten theoretisch bei Mono-Ubiquitin zumindest eine geringe Affinität zu erwarten gewesen wäre.

Zusammengefasst kann mit den vorhergehenden Versuchen eine Interaktion zwischen UBXD1 1-133 mit Lipiden (definierte Lipidgemische oder Lipidextrakte aus Gehirn) und Mono-Ubiquitin ausgeschlossen werden.

Eine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem VIM-Motiv im N-Terminus von UBXD1 und der N-Domäne von p97 wurde bereits beschrieben (111; 112). Jedoch ist noch unbekannt, ob und wie der gesamte N-Terminus von UBXD1 mit p97 interagiert. Daher haben die folgenden Interaktionsstudien von UBXD1 1-133 den Fokus auf die Interaktion mit separaten Domänen von p97.

3.3. INTERAKTIONEN ZWISCHEN UBXD1 UND DER N-DOMÄNE VON P97

Analytische Gelfiltration und Co-Immunopräzipitation:

Eine Bindung zwischen dem VIM-Motiv im N-Terminus von UBXD1 und der N-Domäne wurde bereits mittels ITC und *pull down*-Assays beschrieben (112; 111). Für die ITC-Studien wurde das gesamte UBXD1 und für die *pull down*-Assays ein GST-UBXD1 1-150-Fusionsprotein verwendet. Daher wurde in einem ersten Schritt das Bindungsverhalten zwischen dem isolierten N-Terminus von UBXD1 1-133 ohne Tag und der N-Domäne mittels analytischer Gelfiltration untersucht (Abb. 33, A).

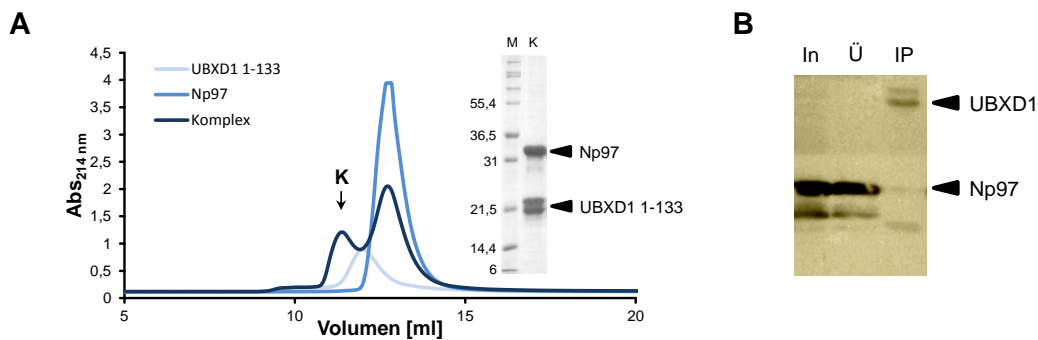


Abb. 33 Bestätigung der Komplexbildung von UBXD1 1-133 und Np97. A: analytische Gelfiltration von UBXD1 1-133 (200 µg, hellblau), Np97 (200 µg, blau) und einem Gemisch aus UBXD1 1-133 und Np97 (jeweils 200 µg, dunkelblau) mit einer Superdex 75 10/300 GL. Bei Zugabe beider Proteine kommt es zu einem zweiten Peak, mit verringertem Elutionsvolumen, der weder UBXD1 1-133 noch Np97 allein entspricht und in der SDS-PAGE sowohl Np97 als auch UBXD1 1-133 aufweist (K). B: Die Co-Immunopräzipitation (IP) über einen GST-Antikörper zeigt sowohl eine Bande für GST-UBXD1 1-133 als auch für 6xHis-Np97. Der eingesetzte Überstand (In) enthält die Banden für GST-UBXD1 und 6xHis-Np97, während in dem Waschschritt (Ü) lediglich nicht gebundenes 6xHis-Np97 zu erkennen ist. Beide Experimente weisen auf eine Komplexbildung zwischen UBXD1 1-133 und Np97 hin.

Das Profil der analytischen Gelfiltration zeigt eine kürzere Laufzeit für UBXD1 1-133 (12 ml, hellblau) als es für sein Molekulargewicht von 14,4 kDa zu erwarten wäre. Das annähernd doppelt so schwere Np97 (26 kDa) besitzt eine längere Laufzeit als UBXD1 1-133 (12,75 ml, blau). Bei der analytischen Gelfiltration von UBXD1 1-133 und Np97 zusammen, werden zwei Fraktionen beobachtet. Die eine entspricht reinem Np97, das im Überschuss hinzugegeben worden ist. Die andere Fraktion besitzt eine kürzere Laufzeit (11,4 ml, "K") als UBXD1 1-133 allein, was auf ein erhöhtes Molekulargewicht hindeutet. Die Analyse dieser Fraktion mittels SDS-PAGE zeigt in dieser Fraktion sowohl UBXD1 1-133 als auch Np97, was die Interaktion dieser beiden Proteine bestätigt.

Desweiteren wurde die Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und der N-Domäne mittels Co-Immunopräzipitation untersucht (Kap. 2.5.1, Abb. 33, B). Dazu wurde der Expressionsstamm mit einem GST-UBXD1- und einem 6xHis-Np97-Konstrukt cotransformiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und ultrazentrifugiert, der Überstand wurde als Input für die Co-Immunopräzipitation verwendet. Dabei konnte sowohl eine sehr schwache Bande für GST-UBXD1 (42,4 kDa) als auch eine Bande für 6xHis-Np97 (28 kDa) detektiert werden. Im Überstand ist nur eine Bande für nicht gebundenes Np97 zu detektieren. In der Co-Immunopräzipitation ist sowohl eine Bande für GST-UBXD1 als auch für 6xHis-Np97 zu erkennen. Die übrigen zwei Banden sind auf die Spezies-eigenen Antikörper-Fragmente von

20 kDa und 55 kDa zurückzuführen. Durch die Expression in Interaktion in *E. coli* scheint damit die Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und Np97 unabhängig von posttranslationalen Modifikationen zu sein.

Titration mittels NMR-Spektroskopie:

Nachdem die Bindung des N-Terminus von UBXD1 und der N-Domäne von p97 bestätigt worden ist, wurden weitere Bindungsstudien mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt. Die Untersuchung des Bindungsverhaltens auf atomarer Ebene könnte weitere Aufschlüsse über das Bindungsverhalten von p97-Kofaktoren geben.

Um zu untersuchen mit welchen Aminosäuren im N-Terminus von UBXD1 die N-Domäne von p97 (Np97) interagiert, wurde ¹⁵N-markiertes UBXD1 1-133 mit unmarkiertem Np97 (Expression und Reinigung von Np97 siehe Kap. 3.4) titriert (Abb. 34).

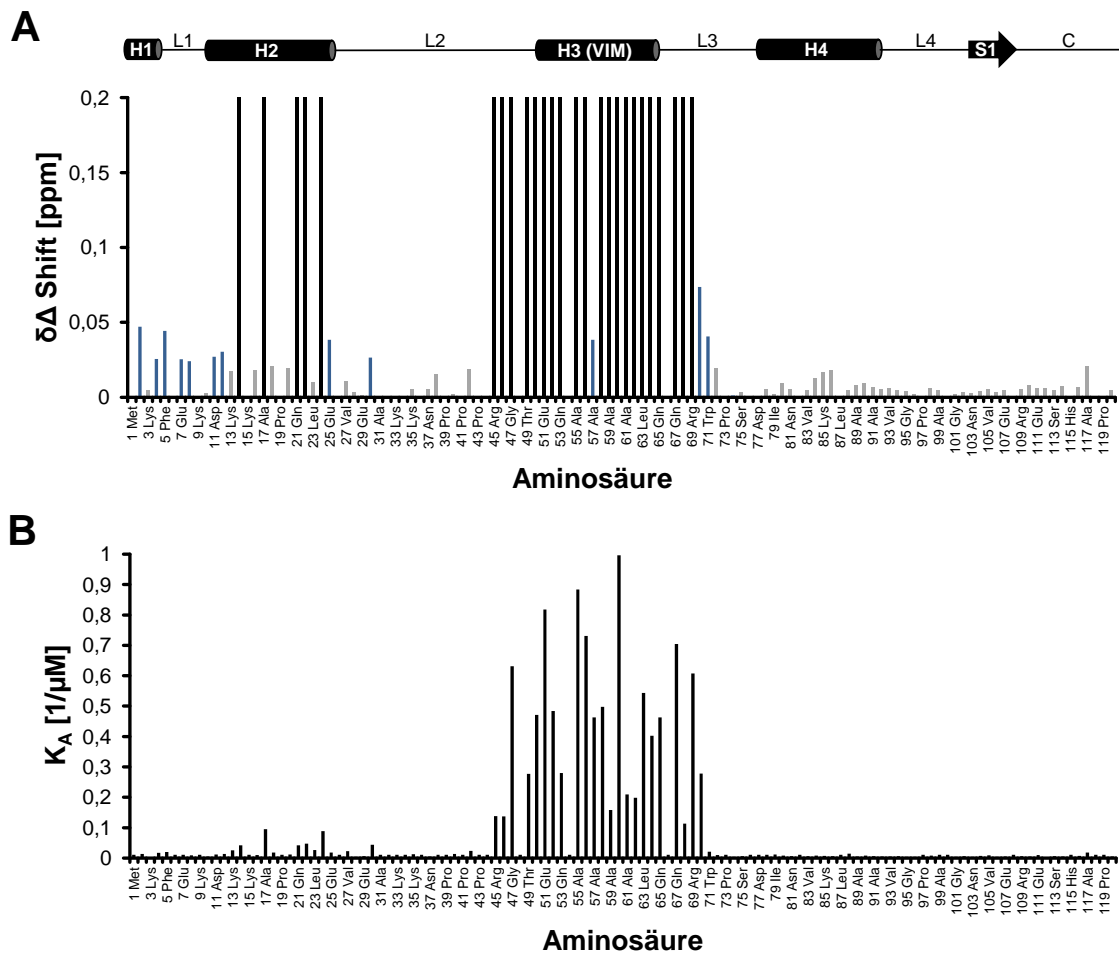


Abb. 34 Titration von ¹⁵N-markiertem UBXD1 1-133 mit Np97. Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). A: Shift-Analyse der einzelnen Aminosäuren von UBXD1 1-120 (100 μM) nach Zugabe von 500 μM Np97. Es gibt zahlreiche Aminosäuren, die nach Zugabe von Np97 verschwinden (schwarz), shiften (blau) oder die keine Veränderungen zeigen (grau). UBXD1 1-133 und Np97 interagieren über das bereits bekannte VIM-Motiv in H3 und zusätzlich mit H1/H2. B: Die aus den Intensitäten ermittelte Assoziationskonstante K_A jeder Aminosäure von UBXD1 1-133 nach Titration mit verschiedenen Np97-Konzentrationen (0 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM , 250 μM , 500 μM). Das Fitting erfolgte mit "one site specific binding" (GraphpadPrism). Die Interaktion von H1/H2 mit Np97 hat eine geringere Affinität ($K_A < 0,1$, K_D : 10-55 μM) als H3 (VIM-Motiv) mit Np97 ($0,1 < K_A < 1,0$, K_D : 1-7 μM).

Bei der Titration von UBXD1 1-133 mit Np97 lassen sich zwei Arten von interagierenden Aminosäuren unterscheiden. Das sind zum einen Aminosäuren, deren NMR-Signale schon bei geringen Konzentrationen von Np97 (10 μM) an Intensität verlieren bis sie schließlich verschwinden (Abb. 34, schwarz markierte Aminosäuren), was auf eine starke Bindung hinweist, da sich die Bindung im *slow exchange*-Bereich befindet. Zum anderen weisen einige Aminosäuren erst bei sehr hohen Konzentrationen an Np97 (100 μM) leichte Shifts auf (Abb. 34, blau markierte Aminosäuren), was auf eine schwache Bindung hinweist, da sich die Bindung im *fast exchange*-Bereich befindet. Die verschwindenden Aminosäuren liegen in H2 (Phe 14, Ala 17, Gln 21, Lys 22, Lys 24) und konzentrieren sich in größerer Anzahl in H3 mit dem VIM-Motiv, einschließlich der umliegenden L2/L3 (Arg 45 bis Ala 56, Ala 58 bis Arg 69). Die leicht shiftenden Aminosäuren hingegen konzentrieren sich in H1/L1 (Lys 2, Phe 4, Phe 5, Glu 7, Phe 8, Asp 11, Ile 12), sowie einigen weiteren Aminosäuren (Glu 25, Lys 30, Ala 57, Ala 70 und Trp 71), die sich in Sequenz-Nähe zu den verschwindenden Aminosäuren befinden. Die Auswertung der Intensitäten der einzelnen Aminosäuren von UBXD1 1-133 nach Zugabe von Np97 lässt eine grobe Abschätzung der Affinität der einzelnen Aminosäuren von UBXD1 1-133 zu. Die Unterscheidung zwischen dem N-terminalen, schwach bindenden Bereich (*fast exchange*) und dem stark bindenden Bereich der VIM-Helix (H3, *slow exchange*) wird durch die Analyse der K_A -Werte der einzelnen Aminosäuren bestätigt (Abb. 34, B). Der maximale K_A -Wert für H2 liegt bei $< 0,095 \mu\text{M}^{-1}$, was einer schwachen Affinität entspricht (K_D : 10 bis 55 μM). Die K_A -Werte für H3 (einschließlich umliegender AS) liegen zwischen $0,11$ und $1,0 \mu\text{M}^{-1}$, was für eine hohe Affinität spricht (K_D : 1 bis 7 μM). Somit ist die Affinität zu Np97 von H1/H2 um eine Größenordnung kleiner als von H3 (VIM-Motiv) von UBXD1. Zur Veranschaulichung wurden die mit Np97 interagierenden Aminosäuren von UBXD1 1-133 auf dem MD-simulierten Strukturmodell markiert (Abb. 35).

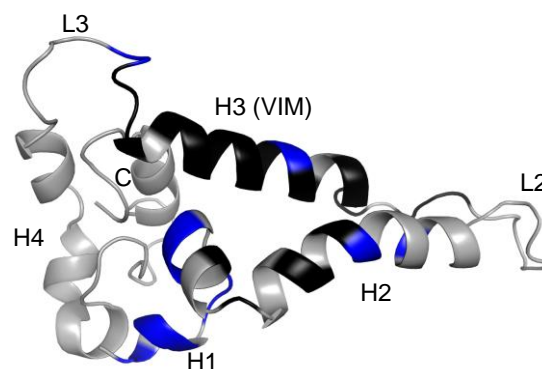


Abb. 35 Mit Np97 interagierende Aminosäuren von UBXD1 1-133. Die aus der NMR-Titration von UBXD1 1-133 mit Np97 interagierenden Aminosäuren (Abb. 34) wurden auf dem MD-simulierten Strukturmodell von UBXD1 1-133 markiert (hoch affine Aminosäuren: schwarz, schwach affine Aminosäuren: blau, keine Interaktion: grau). Die Helices sind entsprechend der Wishart-Analyse bezeichnet.

Wie bereits erwähnt gibt es einen schwach mit Np97 interagierenden Bereich im N-Terminus (H1/H2) und die Np97 hoch affin bindende VIM-Helix (H3). In dem Strukturmodell liegen H1/H2 und H3 in räumlicher Nähe, sodass die mit Np97 interagierenden Aminosäuren von UBXD1 1-133 auf einen relativ kleinen Bereich beschränkt sind. Im Gegensatz dazu zeigen L2 und H4/C in der Titration keine Bindung und befinden sich auch in dem Strukturmodell nicht in der Nähe von den mit Np97 interagierenden Bereichen.

Mutationsstudien:

Desweiteren wurde der Einfluss einiger Mutationen in den Np97-bindenden Bereichen von UBXD1 1-133 untersucht. Als Mutanten wurden dieselben verwendet wie auch schon zu den Mutationsstudien zur Interaktion der einzelnen Sekundärstrukturelemente (Kap. 3.1.3)

Für die Interaktionsstudien wurden die einzelnen Mutanten ¹⁵N-markiert und mit lyophilisiertem Np97 titriert (Anhang 8.10). Zur Veranschaulichung wurden die shiftenden und verschwindenden Signale der Aminosäuren während der Titration auf dem MD-simulierten Strukturmodell des Wildtyps von UBXD1 1-133 markiert (Abb. 36).

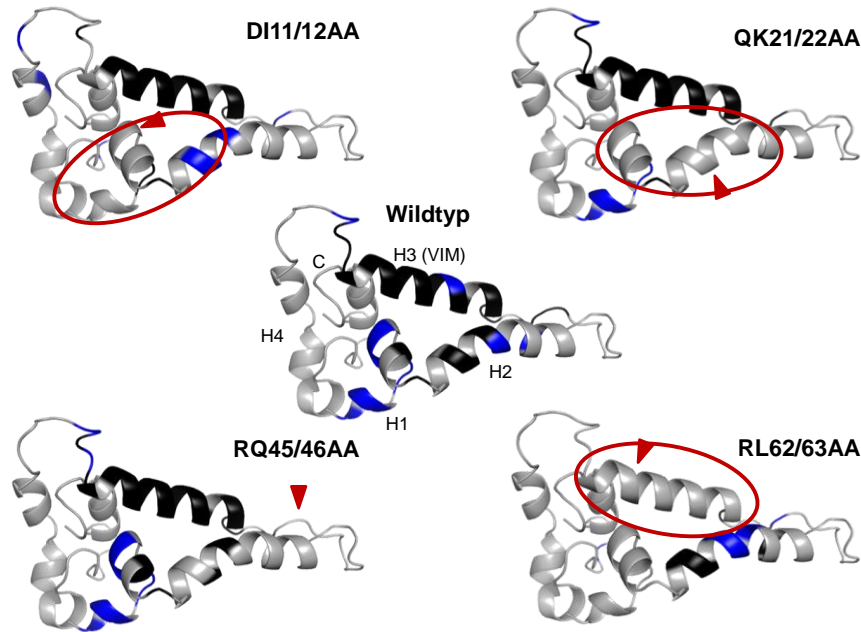


Abb. 36 Einfluss verschiedener UBXD1-Mutationen auf die Bindung mit Np97. Dargestellt sind die MD-simulierten Strukturmodelle von UBXD1 1-120. Markiert sind jeweils die verschwindenden Aminosäuren (schwarz) und die shiftenden Aminosäuren (blau) sowie Aminosäuren ohne Interaktion (grau). Die jeweilige Mutation ist über der Struktur angegeben, die rote Pfeilspitze zeigt die Position der mutierten Aminosäuren in dem Modell. Mittig: Titration von UBXD1 1-133 mit Np97 (detaillierte Analyse siehe Abb. 34). Oben links: Titration von UBXD1 DI11/12AA (120 μ M) mit Np97 (200 μ M). Die Bindung von H3 ist mit dem Wildtyp vergleichbar, die Bindung über H1/H2 entfällt fast gänzlich (roter Kreis). Oben rechts: Titration von UBXD1 QK21/22AA (160 μ M) mit Np97 (200 μ M). Die Bindung über H3 ist unbeeinflusst, während die Bindung über H1/H2 reduziert ist (roter Kreis, vgl. UBXD1 DI11/12AA). Unten links: Titration von UBXD1 RQ45/46AA (220 μ M) mit Np97 (200 μ M). Die Interaktion mit Np97 ist unverändert. Unten rechts: Titration von UBXD1 RL62/63AA (200 μ M) mit Np97 (200 μ M). Die Interaktion über H1/H2 ist nur leicht verändert, während die Bindung von H3 mit dem VIM-Motiv zerstört ist (roter Kreis).

Bei einer DI11/12AA-Mutation in H2 ist die Interaktion im Vergleich zum Wildtyp besonders von H1/H2 erheblich abgeschwächt. Es interagieren nur noch vereinzelt Aminosäuren mit Np97 (Glu 7, Phe 8, Ala 17, Gln 21 bis Lys 24). Die Interaktion mit dem VIM-Motiv in H3 besteht weiterhin jedoch mit weniger interagierenden Aminosäuren in den Randbereichen (Arg 45 bis Thr 49 und Gln 67 bis Arg 69). Die Mutation von QK21/22AA am Ende von H2 führt zum Verlust der Bindung von H2 an Np97, wobei die Interaktion mit H1/L1 bestehen bleibt (Lys 2 bis Phe 8). Die Interaktion über H3 mit dem VIM-Motiv ist von dieser Mutation unbeeinflusst. Im Gegensatz zu den übrigen Mutanten hat die Mutation RQ45/46AA in L2 keinen wesentlichen Einfluss auf die Bindung von UBXD1 1-133 an Np97. Desweiteren wurde der Einfluss der Mutation des VIM-Motivs in H3 (RL62/63AA) auf die Bindung von Np97 untersucht. Für diese Mutation ist eine Unterbindung der Interaktion von UBXD1 1-150 und der N-Domäne von p97 in *pull down*-

Assays gezeigt worden (112). Die NMR-Titration hat den völligen Verlust der UBXD1-Bindung über das VIM-Motiv in H3 an Np97 bestätigt. Die Bindung über H2 bleibt jedoch erhalten (Gly 20 bis Lys 30).

Neben den Titrationsen der Mutanten wurden auch verschiedene UBXD1-Konstrukte (1-80, 32-133 und 1-154) mit Np97 titriert (Anhang 8.11). Im Wesentlichen bleibt die Bindung über H1/H2 und H3 mit dem VIM-Motiv in allen getesteten Konstrukten zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und Np97 unverändert. Bei UBXD1 1-80 und 1-154 verschwinden die bindenden Aminosäuren in H2 nicht mehr wie bei UBXD1 1-133, sondern zeigen nur noch leichte Shifts (bis 0,05 ppm). Der bindende Bereich um das VIM-Motiv in H3 fällt bei UBXD1 1-80 (Asn 50 bis Ala 70) und bei UBXD1 1-154 (Asn 50 bis Gln 65) auch etwas kleiner aus als bei UBXD1 1-133 oder UBXD1 32-133 (45 Arg bis Trp 71).

Fluoreszenz-Anisotropie:

Desweiteren wurde zur Bestimmung der Affinität der Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und Np97 Fluoreszenz-Anisotropie gemessen (Kap. 2.6.3, Abb. 37).

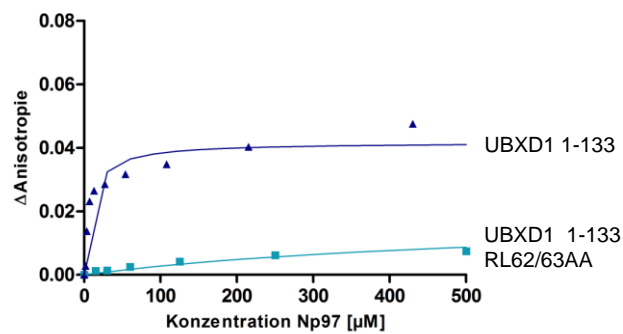


Abb. 37 Bestimmung der Affinität zwischen UBXD1-Konstrukten und Np97 mittels Fluoreszenz-Anisotropie. Die Bindung zwischen UBXD1 1-133 und Np97 (dunkelblaue Kurve, K_D : 8 μ M) wird um den Faktor 70 durch die Mutation des VIM-Motivs verschlechtert (hellblaue Kurve, K_D : 580 μ M).

Die Messung von UBXD1 1-133 wt und Np97 ergab einen K_D von 8,6 μ M. Desweiteren wurde zusätzlich die Affinität von Np97 zur RL62/63AA-Mutante von UBXD1 bestimmt. Dabei wird die Interaktion über das VIM-Motiv zerstört, sodass die ermittelte Affinität in Annäherung der Bindung des N-Terminus (H2) von UBXD1 1-133 an Np97 entspricht. Der ermittelte K_D liegt bei 580 μ M und ist damit um den Faktor 70 schwächer als der des Wildtyps.

3.4. BINDUNGSSTELLE DES N-TERMINUS VON UBXD1 AUF NP97

Nachdem in Kap. 3.3 die mit der N-Domäne von p97 interagierenden Aminosäuren von UBXD1 1-133 bestimmt worden sind, soll auch geklärt werden, welche Aminosäuren der N-Domäne an der Interaktion mit dem N-Terminus von UBXD1 beteiligt sind. Dadurch wären die interagierenden Aminosäuren beider Interaktionspartner bekannt, was Rückschlüsse auf die an dieser Interaktion ausschlaggebenden Wechselwirkungen gibt sowie einen weiteren Eindruck von der Struktur des N-Terminus von UBXD1 vermitteln kann.

3.4.1. Vorarbeiten zu den Interaktionsstudien von UBXD1 mit Np97

Für die Interaktionsstudien des N-Terminus von UBXD1 mit der N-Domäne von p97 wurde auch die N-Domäne exprimiert und gereinigt. Das Expressionskonstrukt der N-Domäne 1-213 mit einem N-terminalen 6xHis-Tag und einer TEV-Protease-Schnittstelle in einem pProEx-Vektor wurde freundlicherweise von P. Freemont (Imperial College, London) zur Verfügung gestellt.

Expressionstest der N-Domäne:

Die optimale Expressionstemperatur von 30 °C wurde aus den Arbeitsprotokollen von P. Freemont übernommen. Daher wurde nur die Expressionsdauer noch einmal hinsichtlich möglicher Abbauprodukte untersucht (Abb. 38). Als Referenz für *E. coli*-eigene Proteine diente ein Ansatz, der nicht mit IPTG behandelt worden ist.

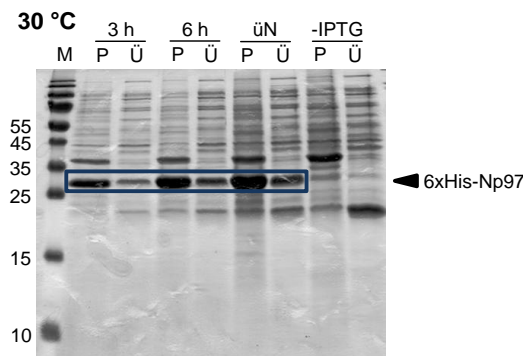


Abb. 38 Expressionstest für 6xHis-Np97. Getestet wurde lediglich die Expressionsdauer zu den Zeitpunkten 3 Stunden, 6 Stunden und über Nacht. Verglichen wurde jeweils der Überstand (Ü) und die Membranfraktion (P). Die beste Expression von 6xHis-Np97 (26 kDa) zeigte sich über Nacht.

Der Expressionstest bei 30 °C in LB-Medium mit den Zeitpunkten 3 h, 6 h und über Nacht ergab, dass mit steigender Expressionsdauer die Menge an Np97 im Überstand zunimmt. Außerdem nimmt mit steigender Expressionsdauer auch der nicht lösliche Anteil von Np97 im Pellet zu. Desweiteren gibt es eine markante Bande zwischen 15 und 25 kDa. Ein Vergleich mit der Referenz ohne IPTG-Induktion lässt vermuten, dass es sich um ein *E. coli*-eigenes Protein handelt und nicht um Abbauprodukte von Np97.

Da das Verhältnis zwischen löslichem Np97 und Np97 im Pellet über die Zeit konstant bleibt, aber die absolute Menge an Np97 mit steigender Expressionsdauer zunimmt, wurden die folgenden Expressionen von Np97 über Nacht bei 30 °C vorgenommen.

Reinigung der N-Domäne:

Nach der Expression wurden die Zellen in Niedrigsalzpuffer gelöst und mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach der Ultrazentrifugation des Zelllysats wurde der Überstand abgenommen und filtriert, um größere Proteinaggregate und Zellreste zu entfernen. Die Reinigung der N-Domäne von p97 beginnt mit einer Anionenaustauschchromatographie, um für die anschließende His-Affinitätschromatographie weniger Verunreinigungen zu haben. Bei einem pH von 6,6 des Anionenaustauschpuffers liegt Np97 (pI 5,64) als Anion vor und wird daher von der Anionenaustauschsäule gebunden und das Protein ist im Eluat zu erwarten (Abb. 39).

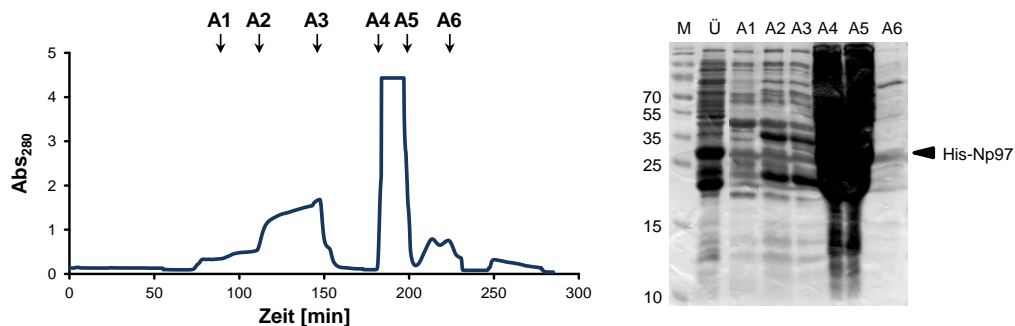


Abb. 39 Anionenaustauschchromatographie von 6xHis-Np97. Nach verschiedenen Schritten wurden Proben für die SDS-PAGE genommen, um den Reinigungsfortschritt zu kontrollieren (rechts). Der Überstand nach der Ultrazentrifugation (Ü) bestätigt die Expression des Proteins. Das Chromatogramm des Anionenaustauschers (links) zeigt den Durchfluss nicht an die Säule gebundenen Proteins (A1-A3), das Eluat (A4 und A5) sowie den Verlust an Np97 im Reinigungsschritt (A6). Der Großteil des Np97-Proteins befindet sich im Eluat.

Bei der Analyse des Durchfluss mittels SDS-PAGE (Abb. 39, A1-A3) ist nur eine geringe Menge an Np97 zu finden. Während der folgenden Elution entstehen zwei Peaks. Die Fraktionen des ersten Elutionspeaks enthalten sehr große Mengen an Protein, da nicht über einen Gradienten eluiert worden ist (A4, A5). In diesen Fraktionen befindet sich auch das Np97 (in Abb. 39 schlecht zu erkennen). Die Fraktionen des zweiten, kleineren Elutionspeaks enthalten nur noch einen geringen Anteil an Np97 (A6). Für die folgende Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden daher die Fraktionen des ersten Hauptpeaks gepoolt und als Auftrag (HA) verwendet (Abb. 40).

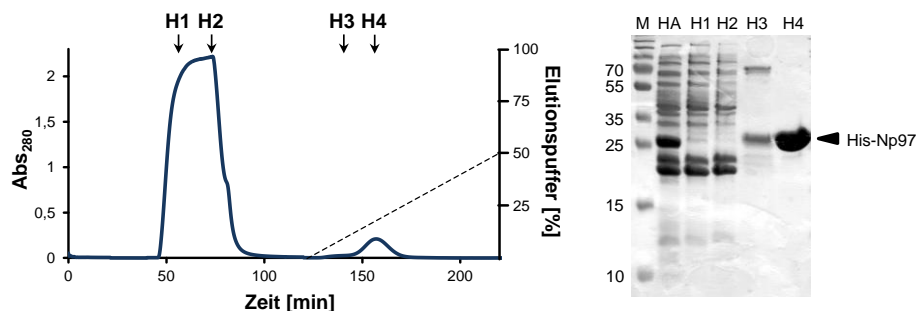


Abb. 40 Ni-NTA-Affinitätschromatographie von 6xHis-Np97. Das Chromatogramm der Ni-NTA-Affinitätschromatographie zeigt den Durchlauf und einen Elutionspeak (links). Vom Auftrag (HA), vom Durchlauf mit nicht gebundenen Protein (H1 und H2) und auch vom Elutionspeak (H3 und H4) wurden Proben mittels SDS-PAGE analysiert (rechts). Die Fraktionen der Schulter des Elutionspeaks weisen einige Verunreinigungen von 70 kDa auf (H3), während die Fraktionen des Hauptpeaks reines Np97 enthalten (H4).

Der Auftrag für die Ni-NTA-Säule (Abb. 40, HA) hat im Vergleich zum Gesamtprotein (Abb. 39, Ü) ein deutlich größeren Anteil von Np97 im Verhältnis zu den übrigen *E. coli*-Proteinen. Bei der Untersuchung des Durchflusses (H1, H2) der His-Affinitätschromatographie ist keine Bande mehr für Np97 zu sehen. Bei den Banden zwischen 15 und 25 kDa ist eine starke Doppelbande im Auftrag und dem Durchfluss zu beobachten. Im Chromatogramm ist während der Elution über einen Gradienten ein Peak mit einer davor liegenden Schulter zu sehen (Abb. 40, links). Die Schulter (H3) beinhaltet Np97 mit einer Verunreinigung bei etwa 70 kDa. Der Hauptpeak (H4) beinhaltet laut SDS-PAGE Np97 mit nur wenigen Abbauprodukten. Daher wurde für die folgenden Experimente der Hauptpeak mit Np97 ohne Schulter konzentriert.

In gleicher Weise wurde auch die Expression und Reinigung der ^{15}N -markierten Probe für die Titrations und der ^{15}N - ^{13}C -markierten Probe für die sequentielle Zuordnung verfahren.

Sequentielle Zuordnung:

Um NMR-spektroskopische Bindungsstudien auf atomarer Ebene auch mit der N-Domäne von p97 durchzuführen, wurde zuerst ein ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von markiertem Np97 aufgenommen und die einzelnen Signale entsprechend den Aminosäuren in der Sequenz zugeordnet (Abb. 41).

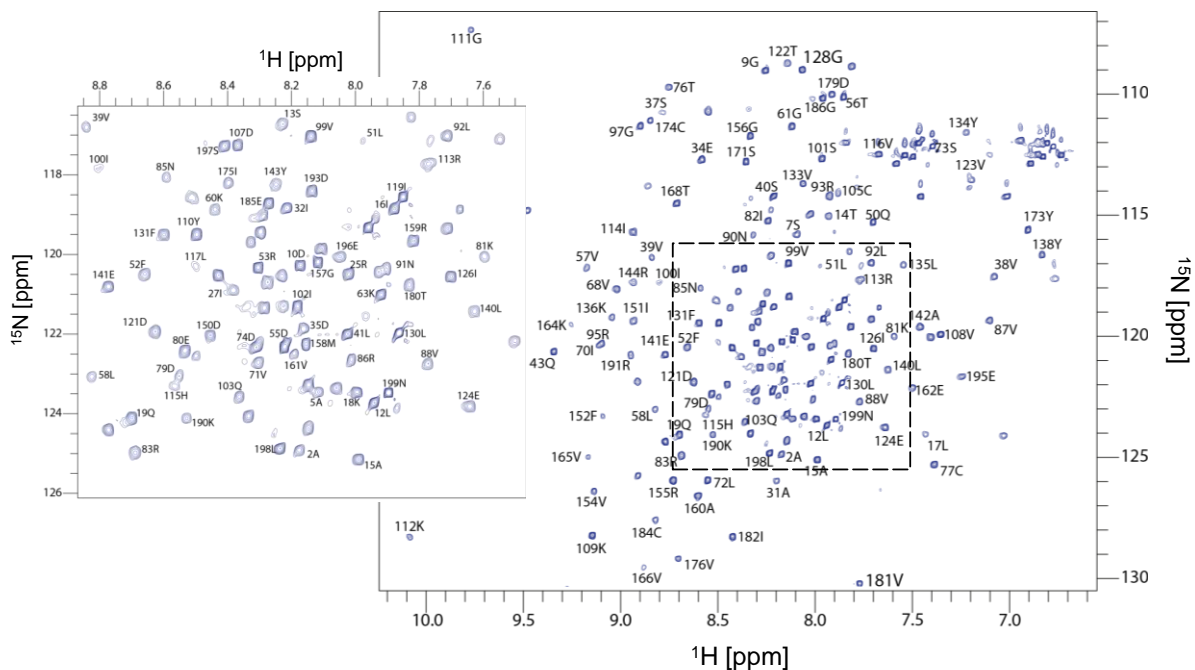


Abb. 41 ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -markiertem Np97. Zu sehen sind 165 Signale mit einer starken Dispersion. Der Ausschnitt links zeigt den zentralen Teil des Spektrums in einer Vergrößerung (siehe Markierung im rechten Spektrum). Es konnten 85 % der Signale mittels HNCACB und CBCACONH sowie anhand einer Publikation (98) zugeordnet werden.

Das verwendete Np97-Konstrukt besteht inklusive His-Tag und Linker aus 224 Aminosäuren, von denen 12 Aminosäuren Proline und somit nicht in einem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum sichtbar sind. Insgesamt sind in dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum jedoch nur 165 Signale auffindbar. Von diesen 165 Signalen konnten 111 Signale durch Übertragung des Assignments aus einem publizierten Spektrum zugeordnet werden (98). Desweiteren konnten besonders im N-Terminus von Np97 weitere 30 Aminosäuren durch die sequentielle Zuordnung mittels

HNCACB/CBCACONH (Kap. 2.6.1) ergänzt werden. Damit sind insgesamt 85 % der Signale in dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von Np97 zugeordnet (Anhang 8.12). Auf eine Zuordnung der Seitenketten-Atome wurde verzichtet, da die Zuordnung lediglich für die Auswertung der Interaktionsstudien und nicht zur Berechnung einer Struktur verwendet wurde.

3.4.2. Untersuchung der Interaktion zwischen UBXD1 und Np97

Nach Abschluss der sequentiellen Zuordnung des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von Np97 wurden Titrationsen durchgeführt, um die mit dem N-Terminus von UBXD1 interagierenden Aminosäuren von Np97 zu identifizieren (Abb. 42).

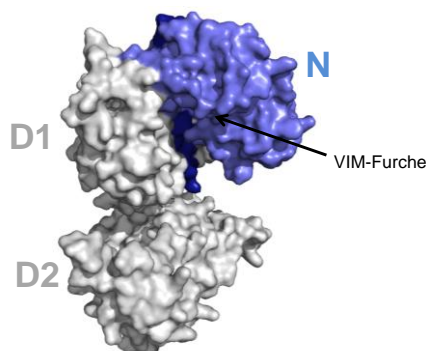


Abb. 42 Position der N-Domäne in einem p97-Monomer. PDB-ID: 3CF1. Zur Identifizierung der mit UBXD1 interagierenden Aminosäuren von Np97 (blau, einschließlich dem ND1-Linker), wurde diese separat exprimiert und gereinigt.

Als Titrand wurde anstelle von UBXD1 1-133 UBXD1 1-80 verwendet, da nur die ersten 71 Aminosäuren von UBXD1 mit Np97 interagieren (Kap. 3.3). Es wurde auf das verkürzte Konstrukt zurückgegriffen, um den entstehenden Komplex aus UBXD1 und Np97 möglichst klein zu halten. Damit wird die Rotationskorrelationszeit des Komplexes so klein wie möglich gehalten, um ein unselektives Verschwinden der Resonanzen im ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum bei Bindung von UBXD1 zu vermeiden. In einem ersten Schritt wurde ^{15}N -markiertes Np97 mit unmarkiertem UBXD1 1-80 titriert (Anhang 8.13 und 8.14). Zur Veranschaulichung wurden die mit UBXD1 1-80 interagierenden Aminosäuren auf der Struktur von Np97 markiert (Abb. 43).

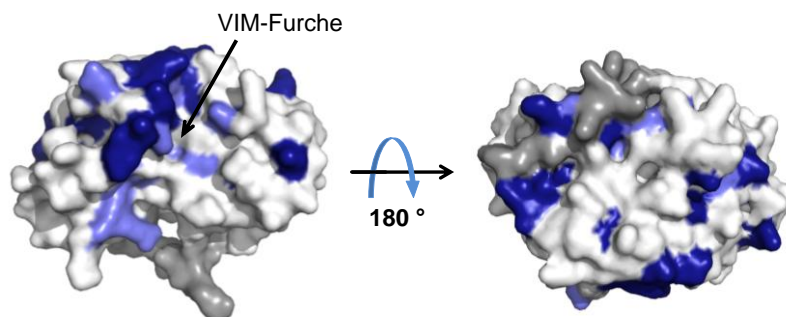


Abb. 43 Mit UBXD1 interagierende Aminosäuren von Np97 (weiß) inklusive D1-Linker (grau). PDB-ID: 1E32. Links: Blick auf die VIM-Motiv-bindende Furche der N-Domäne von p97, die der D1-Domäne zugewandt ist (siehe auch Kap 1.1.2). Rechts: Blick auf die gegenüberliegende Seite der VIM-Furche, abgewandt vom restlichen Hexamer. Mit UBXD1 1-80 stark (dunkelblau, verschwindende Signale) und schwach interagierende Aminosäuren (hellblau, kleine Verschiebungen) sind auf der Oberfläche markiert. Aminosäuren ohne Interaktion sind weiß/grau markiert. Neben der Bindung in der VIM-Furche, bindet UBXD1 1-80 auch im Bereich des Linkers zwischen der N- und der D1-Domäne von p97.

Ähnlich wie bei der Titration von markiertem UBXD1 mit Np97 kommt es auch bei der umgekehrten Titration häufiger zur Verringerung der Signalintensität als zu shiftenden Signalen. Für die Auswertung der Interaktion wurden daher sowohl die Veränderung der Lage als auch die Änderung ihrer Intensitäten herangezogen. Mit diesem Experiment konnten interagierende Aminosäuren in der VIM-Furche von Np97 (Val 38 bis Gln 43, Gly 54, Thr 56, Val 88, Val 87, Tyr 138 bis Tyr 143, Ile 151 bis Arg 155, Ile 175 bis Ile 182) und zusätzlich darüber liegende Aminosäuren (Cys 105 bis Gly 111) mit UBXD1 1-80 bestätigt werden (Abb. 43, links). Am oberen Ende der VIM-Furche verschwinden die interagierenden Aminosäuren (*slow exchange*), während sie am unteren Ende eher shiften (*fast exchange*). Das deutet darauf hin, dass die Interaktion mit UBXD1 1-80 im oberen Teil der VIM-Furche stärker als im unteren Teil ist. Zu den interagierenden Aminosäuren der VIM-Furche befinden sich auch auf der äußeren Seite (von der D1-Domäne abgewandten Seite, Abb. 43 rechts) von Np97 weitere mit UBXD1 1-133 interagierende Aminosäuren. Auf dieser Seite (gegenüber der VIM-Furche) von Np97 können zwei interagierende Bereiche separiert werden. Der eine Bereich enthält relativ stark interagierende Aminosäuren, die jedoch auf der Oberfläche nicht zusammenhängend liegen (Gln 50, Leu 58, Lys 60, Ser 101, Ile 100, Thr 168). Der zweite Bereich ist der Linker zur D1-Domäne mit auf der Oberfläche umliegenden Aminosäuren (Arg 93, Leu 117, Gly 156, Cys 184 bis Glu 195). Dieser zweite Bereich umfasst sowohl verschwindende (stark interagierend) als auch shiftende (schwach interagierend) Aminosäuren, die sehr konzentriert zusammen liegen. UBXD1 1-80 besitzt demnach zwei Interaktionsstellen auf Np97. Zum einen die bereits für VIM-Motive bekannte hydrophobe Tasche zwischen den beiden Subdomänen der N-Domäne (VIM-Furche, Abb. 43). Zum anderen den Linker zwischen der N- und D1-Domäne, der an der Konformation des p97-Hexamers maßgeblich beteiligt ist (Kap. 1.1.2). Die mit UBXD1 1-80 interagierenden Aminosäuren von Np97 zeigen keine besondere Präferenz für Sekundärstrukturelemente oder Loop-Bereiche (Abb. 44).

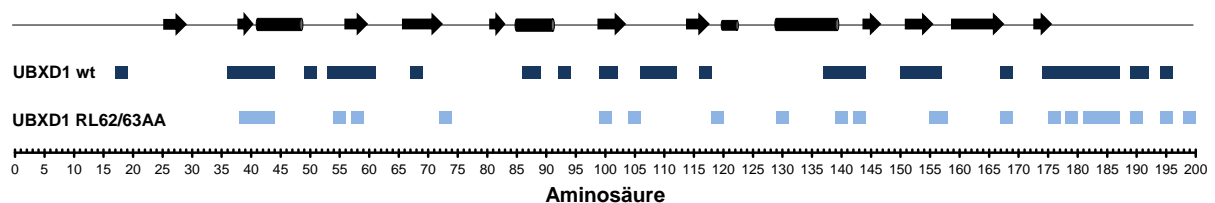


Abb. 44 Aminosäuren von Np97, die mit UBXD1 wt und UBXD1 RL62/63AA interagieren. Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der Np97-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: Mit UBXD1 1-80 (dunkelblau) und mit UBXD1 1-80 RL62/63AA (hellblau) interagierende Aminosäuren von Np97 entsprechend ihrer Position in der Sequenz. Die VIM-Mutante RL62/63AA von UBXD1 interagiert mit deutlich weniger Aminosäuren als der Wildtyp.

Wie bereits festgestellt werden konnte, gibt es im N-Terminus von UBXD1 1-133 zwei mit Np97 interagierende Bereiche (Kap. 3.3): Zum einen die N-terminal gelegenen H1/H2 und zum anderen H3 mit dem VIM-Motiv. Die Bindung des VIM-Motivs in die hydrophobe Furche der beiden Subdomänen der N-Domäne von p97 ist bereits für das VIM-Motiv in gp78 beschrieben worden (112). Um zu überprüfen, ob die in der VIM-Furche interagierenden Aminosäuren von Np97 in diesem Experiment auch tatsächlich mit dem VIM-Motiv in H3 von UBXD1 1-80 interagieren, wurde eine weitere Titration von Np97 mit UBXD1 RL62/63AA durchgeführt. Wie

bereits gezeigt (Kap. 3.3), interagiert diese Mutante nur noch über H1/H2 von UBXD1 mit Np97. Im Vergleich zum Wildtyp UBXD1 1-80 interagieren mit der VIM-Mutante nur noch 37 % der ursprünglichen Aminosäuren (Abb. 44). Dafür interagiert die Mutante aber mit 7 anderen Aminosäuren von Np97 (Asp 55, Ser 73, Cys 105, Ile 119, Leu 130, Gly 157 und Asn 199), mit denen der Wildtyp nicht interagiert. Die mit UBXD1 1-80 RL62/63AA interagierenden Aminosäuren von Np97 verändern ihre Intensitäten im Vergleich zur Interaktion mit dem Wildtyp nicht (Val 39 bis Gln 43, Asp 55, Ser 73, Leu 140, Ala 143, Val 176, Asp 179). Zur Veranschaulichung wurden die mit UBXD1 1-80 RL62/63AA interagierenden Aminosäuren von Np97 in dem Strukturmodell von Np97 markiert (Abb. 45).

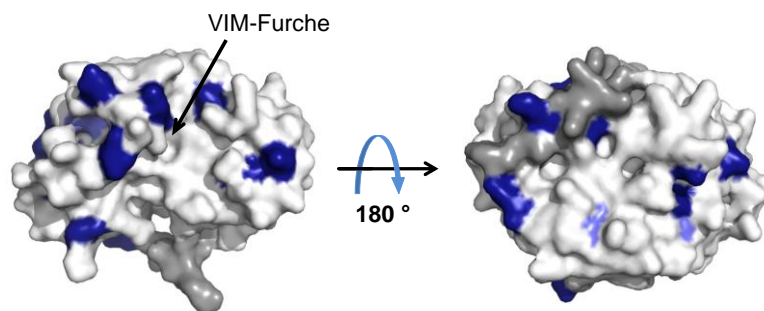


Abb. 45 Mit UBXD1 RL62/63AA interagierende Aminosäuren von Np97 (weiß) inklusive D1-Linker (grau). PDB-ID: 1E32. Links: Blick auf die VIM-Motiv-bindende Furche der N-Domäne von p97, die der D1-Domäne zugewandt ist (siehe auch Kap 1.1.2). Rechts: Blick auf die gegenüberliegende Seite der VIM-Furche, abgewandt vom restlichen Hexamer. Mit UBXD1 1-80 RL62/63AA stark (dunkelblau, verschwindende Signale) und schwach interagierende Aminosäuren (hellblau, kleine Shifts) sind auf der Oberfläche markiert. Aminosäuren ohne Interaktion sind weiß/grau markiert. Mit der VIM-Mutante von UBXD1 entfällt die Bindung in der VIM-Furche der N-Domäne von p97. Die Interaktion mit dem Linker zur D1-Domäne bleibt bestehen.

Die Anzahl der mit der VIM-Mutante von UBXD1 interagierenden Aminosäuren in der VIM-Furche von Np97 nimmt stark ab und die Aminosäuren liegen auch nicht mehr in einem zusammenhängenden Bereich (Abb. 45, links). Im Gegensatz dazu bleibt die Anzahl der interagierenden Aminosäuren auf der Seite mit dem Linker zur D1-Domäne (gegenüber der VIM-Furche) gleich (Abb. 45, rechts). Auf dieser Seite verschwinden nur vereinzelt Aminosäuren (Gln 50, Lys 60, Ser 101). In der Nähe des Linkers zur D1-Domäne interagieren im Vergleich zum Wildtyp (Arg 93, Leu 117, Gly 156, Cys 184 bis Glu 195) zusätzlich die Aminosäuren Ile 119, Asn 130 sowie Asn 199. Die Änderung der Intensitäten beim Wildtyp und bei der RL62/63AA-Mutante von UBXD1 1-80 erfolgt in gleichem Maße. Desweiteren wurde eine Negativkontrolle mit der Titration von Np97 mit UBXD1 32-133 RL62/63AA durchgeführt. Dieses Konstrukt besitzt weder H1/H2 noch ein intaktes VIM-Motiv. Es konnte keine wesentlichen Änderung der Resonanzen von Np97 in einem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum beobachtet werden (Anhang 8.13 und 8.14). Damit konnte nochmals bestätigt werden, dass die Bindung zwischen UBXD1 1-133 und Np97 allein über H1/H2 und H3 mit dem VIM-Motiv erfolgt.

3.4.3. Interaktion zwischen Np97 und einer Phosphat-Pinzette

Die Untersuchung der Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und der N-Domäne von p97 auf atomarer Ebene ergab, dass in den Interaktionsbereichen sowohl in der VIM-Furche

(Arg 53, Lys 109, Arg 144, Arg 155) als auch im Bereich des ND1-Linkers (Lys 62, Lys 63, Arg 64, Arg 64, Arg 93, Lys 164, Lys 190, Arg 191) zahlreiche Arginine und Lysine mit einer positiven Ladung vorkommen (Kap. 3.3 und 3.4). Diese Anhäufung positiv geladener Aminosäuren in den interagierenden Bereich von Np97 mit UBXD1 1-80 wurde zur Grundlage genommen, um diese Interaktion mit einer Phosphat-Pinzette, einem Werkzeug der supramolekularen Chemie, zu unterbrechen. Diese Phosphat-Pinzette bindet mit ihrem Ringsystem die Methylengruppen der Seitenketten geladener Aminosäuren (Lysin etwas stärker als Arginin) und stabilisiert diese Bindung mit den zwei negativ geladenen Phosphatgruppen über ionische Wechselwirkung mit der Amid- und der ϵ -NH-Gruppe (Abb. 46, (152)).

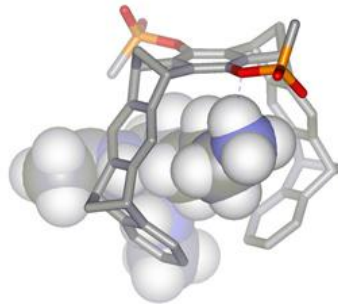


Abb. 46 Bindung der Phosphat-Pinzette an die Seitenkette eines Lysins. Die Interaktion zwischen der Phosphat-Pinzette und Lysinen bzw. weniger affinen Argininen wird vermittelt durch die negativ geladenen Phosphationen. Das Molekulargewicht der Phosphat-Pinzette beträgt 814,58 g/mol.

In einem ersten Versuch sollte die Bindung dieser Phosphat-Pinzette an die Lysine und Arginine der N-Domäne von p97 überprüft sowie deren inhibierender Einfluss auf den UBXD1-Np97-Komplex getestet werden.

NMR-Spektroskopie:

Zuerst wurde mittels NMR-Spektroskopie getestet, mit welchen Argininen und Lysinen von Np97 die Phosphat-Pinzette interagiert. Dazu wurde ein ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des ^{15}N -markierten Np97 aufgenommen und anschließend die Phosphat-Pinzette hinzutitriert (Anhang 8.15). Die dabei interagierenden Aminosäuren wurden anschließend auf dem Strukturmodell der N-Domäne von p97 markiert (Abb. 47).

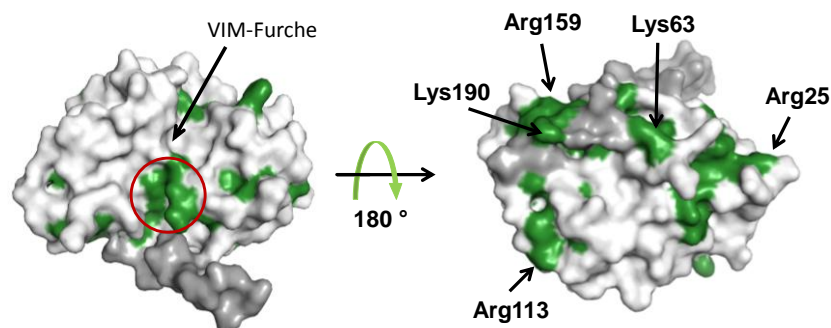


Abb. 47 Mit der Phosphat-Pinzette interagierende Aminosäuren von Np97. PDB-ID: 1E32. Links: Blick auf die VIM-Motiv-bindende Furche der N-Domäne von p97, die der D1-Domäne zugewandt ist (siehe auch Kap 1.1.2). Rechts: Blick auf die gegenüberliegende Seite der VIM-Furche, abgewandt vom restlichen Hexamer. Auf der Oberfläche von Np97 (200 μM) sind die mit der Phosphat-Pinzette (100 μM) interagierenden Aminosäuren grün markiert (nicht interagierende AS: weiß für die N-Domäne, grau für den ND1-Linker). Insgesamt scheint die Pinzette an 6 Lysine/Arginine von Np97 zu binden.

Nach Zugabe der Phosphat-Pinzette zur N-Domäne von p97 waren sowohl shiftende als auch verschwindende Signale in dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von Np97 zu beobachten. Neben einigen Lysinen und Argininen verändern sich auch die umliegenden Aminosäuren. Somit können insgesamt sechs mit der Pinzette interagierende Bereiche auf der Oberfläche von Np97 detektiert werden. Ein Bereich befindet sich um das Lys 18 (Ile 16, Leu 17 und Gln 19). Dieser Bereich ist aufgrund der Flexibilität des N-Terminus nicht in der Kristallstruktur zu sehen. Ein weiterer Bereich befindet sich bei Arg 25 (Gly 97, Val 99, Ile 100, Ser 101, Ile 102, Gln 103). Zudem shiften auch die Aminosäuren um Lys 63 (Lys 60, Gly 61, Arg 93). Die Veränderungen im Bereich von Arg 113 (Ile 114, His 115, Leu 117, Val 165, Thr 168) weisen ebenfalls auf eine Bindung der Phosphat-Pinzette hin. Ein sechster Bereich befindet sich im ND1-Linker mit der Bindung des Lys 190 (Ile 119, Asp 120, Asp 121, Val 123, Arg 191, Glu 195, Glu 196) durch eine Pinzette.

Im Gegensatz dazu befindet sich auf der Seite der VIM-Furche lediglich ein Bereich mit shiftenden Aminosäuren (Ala 31, Glu 34, Asp 35, Ser 37, Abb. 47, roter Kreis). In der Nähe dieses Bereiches liegt jedoch weder ein Lysin noch ein Arginin, dass die Pinzette binden könnte.

Neben den auf der Oberfläche interagierenden Aminosäuren, gibt es einige Aminosäuren im Inneren der Struktur, die ebenfalls einige Shifts aufweisen (Val 71, Ile 79, Val 87, Val 88, Leu 135, Ile 151, Phe 152, Leu 198).

Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC):

Die ITC-Studien wurden freundlicherweise von Klaus Kowski aus dem Institut für Organische Chemie (Prof. Schrader) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Es wurden 10 μM Np97 in 29 Schritten mit der Phosphat-Pinzette auf eine Endkonzentration von 1,02 mM bei einer Temperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$ titriert. Es wurden zwei Titrationsreihen durchgeführt, von denen eine exemplarisch dargestellt ist (Abb. 48), und die Mittelwerte der einzelnen Parameter gebildet.

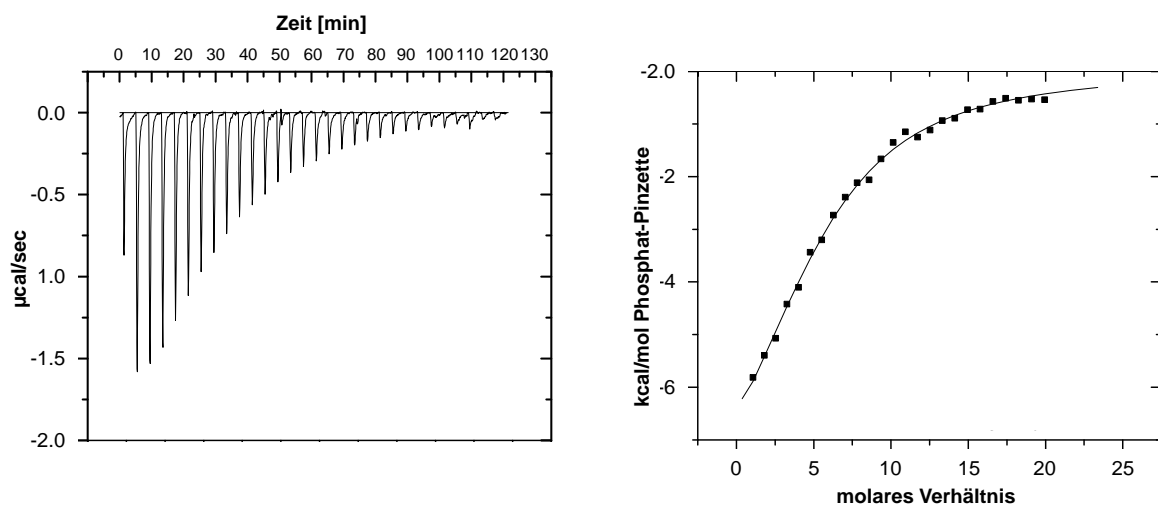


Abb. 48 ITC zur Bindung zwischen einer Phosphat-Pinzette und Np97. Es wurden 1,02 mM Phosphat-Pinzette gegen 10 μM Np97 titriert. Die freie Enthalpie beträgt -64 kcal/mol, die Stöchiometrie 1:6 (Np97:Phosphat-Pinzette) und die Affinität 6 μM für die Bindung zwischen Np97 und einer Phosphat-Pinzette. Fit-Parameter: $N = 0,190$, $K = 1,75\text{E}5$, $\text{DH} = -5,238$, $\text{DS} = -152$.

Aus den ITC-Thermogrammen wurde für $-T \cdot \Delta S$ ein Wert von 56,92 kcal/mol ermittelt. Desweiterem beträgt die Enthalpie ΔH der Bindung der Phosphat-Pinzetten an Np97 -64,11 kcal/mol. Insgesamt besitzt die Reaktion damit eine freie Bindungsenthalpie ΔG von -7,2 kcal/mol. Außerdem konnte eine Affinität von 6 μM ermittelt werden. Durch Fitten der kalorischen Daten gegen das molare Verhältnis von Np97 und der Phosphat-Pinzette ergibt sich eine Stöchiometrie von 6 Phosphat-Pinzetten auf ein Molekül Np97.

Fluoreszenz-Anisotropie:

Um zu überprüfen, ob die an Np97-bindende Phosphat-Pinzette die Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und der N-Domäne von p97 inhibiert, wurde die Affinität zwischen UBXD1 1-133 und Np97 mittels Anisotropie im Gegenwart der Phosphat-Pinzette erneut gemessen (Abb. 49).

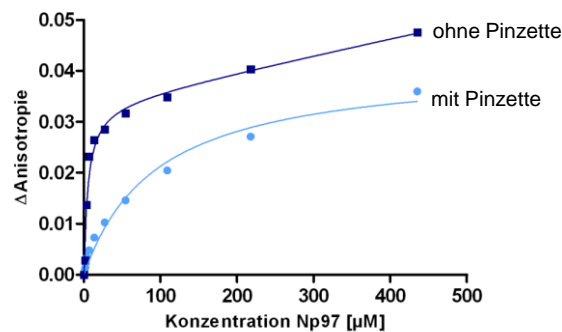


Abb. 49 Affinität zwischen UBXD1 1-133 und Np97 in Gegenwart der Phosphat-Pinzette. Die Affinität zwischen UBXD1 1-133 und Np97 (dunkelblaue Kurve, K_D : 8 μM) wird um den Faktor 27 schwächer, wenn die N-Domäne von p97 die Phosphat-Pinzette gebunden hat (hellblaue Kurve, K_D : 216 μM).

Die Phosphat-Pinzette wurde im Unterschuss (0,5:1) mit Np97 inkubiert, damit die Pinzette hauptsächlich an Np97 gebunden ist und nicht mehr mit UBXD1 1-133 interagieren kann. Die mit diesem Ansatz ermittelte Affinität zwischen UBXD1 1-133 und Np97 ist um den Faktor 27 schlechter als ohne Pinzette. Der K_D -Wert liegt in Anwesenheit der Phosphat-Pinzette bei 216 μM , im Gegensatz zu dem K_D -Wert von 9 μM in Abwesenheit der Phosphat-Pinzette.

3.5. Interaktion zwischen UBXD1 und der D1D2-Domäne von p97

Es konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von UBXD1 in die VIM-Furche der N-Domäne von p97 bindet. Diese hydrophobe Tasche ist der D1-Domäne zugewandt (Abb. 50).

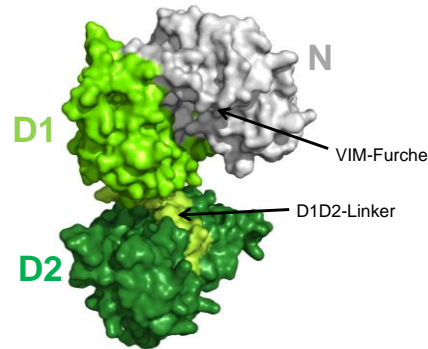


Abb. 50 Position der D1D2-Domäne in einem p97-Monomer. PDB-ID: 3CF1. Zur Identifizierung der mit D1D2p97 (grün) interagierenden Aminosäuren von UBXD1 1-133, wurde D1D2p97 ohne N-Domäne exprimiert und gereinigt.

Daher könnte aufgrund der räumlichen Nähe von N- und D1-Domäne von p97 UBXD1 1-133 auch an die D1-Domäne binden. Da die D1-Domäne nach dem Testen verschiedener Vektoren (pET41b, pET22b), Tags (GST-Tag, 6xHis-Tag) sowie Expressionsstämme (BL21(DE3)T1r, Rosetta) nicht löslich zu exprimieren war, wurde mit einem Konstrukt, das die D1- und die D2-Domäne enthält, gearbeitet. Im Folgenden wird die Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 1-133 und der D1D2-Domäne von p97 beschrieben. Dazu wird zuerst auf die Klonierung, Expression und Reinigung der D1D2-Domäne und anschließend auf die Analyse der NMR-spektroskopischen Titrations mit dem N-Terminus von UBXD1 eingegangen. Die Ergebnisse aus den NMR-Experimenten wurden mit analytischen Gelfiltrationen und Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen ergänzt.

3.5.1. Vorarbeiten zu den Interaktionsstudien von UBXD1 mit D1D2p97

Klonierung der D1D2-Domäne:

Für die Klonierung der D1D2-Domäne von p97 in den mit einer PreScission-Schnittstelle versehenen pET41b wurde als Template p97 full length (BC 1118) und das Primer-Paar 2062F/2063R verwendet. Zur Amplifizierung des D1D2-DNA-Konstrukts wurde eine zweistufige PCR durchgeführt und der gesamte PCR-Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 51).

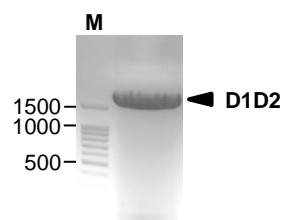


Abb. 51 Agarosegel nach der PCR zur Vervielfältigung des D1D2p97-Inserts. Die PCR wurde mit dem Template BC1118 und dem Primer-Paar 2062F/2063R bei einer Annealing-Temperatur von 54 °C durchgeführt. Die in dem Agarosegel zu sehende Bande hat die für D1D2p97 erwartete Größe von über 1500 bp.

Es konnte eine Bande > 1500 bp detektiert werden (erwartete Größe für D1D2: 1821 bp). Die Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA isoliert. Anschließend wurden sowohl das Insert (D1D2p97) als auch der Vektor (pET41b) in separaten Ansätzen mit *Apal* und *XhoI* gleichzeitig geschnitten. Nachdem die verdaut DNA des Inserts und des Vektors gereinigt wurde, wurden Insert und Vektor in einem Verhältnis von 3 zu 1 mit 47 ng Insert ligiert. Daraufhin wurde 1 µl des Ligationsansatzes in *Shox*-Zellen transformiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um richtige Klone zu selektieren. Das Ergebnis der Kolonie-PCR wurde mit einem Agarosegel überprüft (Abb. 52).

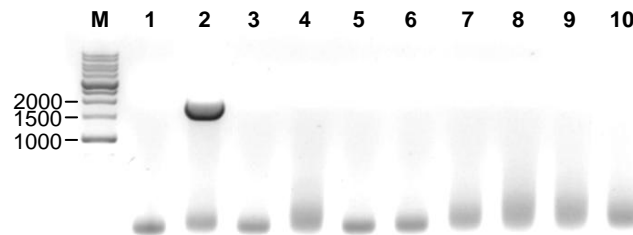


Abb. 52 Kolonie-PCR zur Überprüfung positiver D1D2p97-Klone. Nach der Ligation von D1D2p97 und pET41b wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Der Klon 2 mit einer Bande zwischen 1500 und 2000 bp enthält das gewünschte D1D2p97-Konstrukt.

Bei Kolonie 2 ist eine Bande zwischen 1500 bp und 2000 bp zu sehen. Alle anderen Kolonien sind negativ, da vermutlich die Größe des Inserts (1800 bp) eine korrekte Ligation erschwert. Die Plasmid-DNA der Kolonie 2 wurde isoliert, zur Sequenzierung geschickt und anschließend mit der richtigen Sequenz in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)T1r transformiert.

Expressionstest der D1D2-Domäne

Um die Ausbeute an löslichen GST-D1D2p97 (95 kDa) mit möglichst wenig Abbauprodukten zu maximieren, wurde ein Expressionstest in LB-Medium bei den Temperaturen 25 °C, 30 °C und 37 °C nach unterschiedlicher Expressionsdauer (3 h, 6 h, über Nacht) durchgeführt (Abb. 53). Als Referenz für *E. coli*-eigene Proteine wurde eine Probe, die über Nacht kultiviert, aber nicht induziert worden war, verwendet.

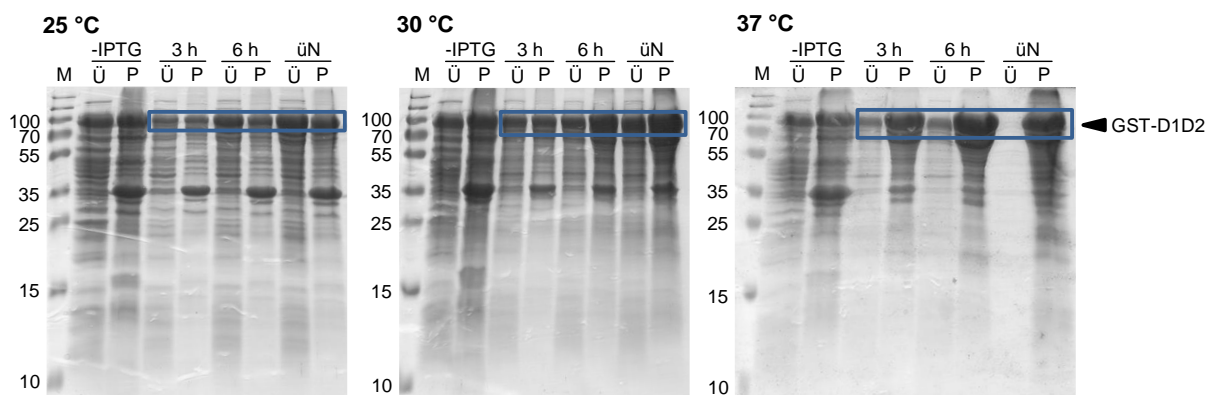


Abb. 53 Expressionstest für GST-D1D2p97. Getestet wurde in LB-Medium bei den Temperaturen 25 °C, 30 °C und 37 °C sowie zu den Zeitpunkten 3 Stunden, 6 Stunden und über Nacht. Verglichen wurde jeweils der Überstand (Ü) und die Membranfraktion (P). Die beste Expression von GST-D1D2p97 (95 kDa) erfolgt bei 25 °C über Nacht.

Der Anteil an löslichem GST-D1D2p97 im Überstand nimmt im Vergleich mit unlöslichem GST-D1D2p97 im Pellet bei einer Expressionstemperatur von 25 °C mit steigender Expressionsdauer zu. Wird die Expressionstemperatur auf 30 °C oder 37 °C erhöht, sinkt der Anteil an löslichem Protein im Überstand. Bei einer Expression bei 30 °C ist im Gegensatz zu 25 °C mehr unlösliches Protein zu finden und bei einer Expression bei 37 °C liegt bereits schon nach 3-stündiger Expression das meiste GST-D1D2p97 unlöslich im Pellet vor. Der Expressionstest zeigt auch, dass bei höheren Expressionstemperaturen (30 °C und 37 °C) vermehrt Abbauprodukte entstehen, während sie bei 25 °C am geringsten sind. Zudem ist ein weiteres Protein mit einer Größe von ca. 35 kDa zu sehen, welches auch ohne Induktion exprimiert wird (Abb. 53, -IPTG). Desweiteren ist bei der Referenz wie in den induzierten Proben eine Bande bei etwa 100 kDa zu sehen. Unter den getesteten Bedingungen ergaben sich die besten Expressionsbedingungen für GST-D1D2p97 bei einer Expression für 16 Stunden über Nacht bei 25 °C.

Reinigung der D1D2-Domäne

Nach erfolgter Expression wurden die Zellen in Niedrigsalzpuffer mit zusätzlichen 50 mM Natriumcholat gelöst und mit Lysozym aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschall für 1 Stunde mit 70 % Intensität behandelt (1 Sekunden-Zyklen: 1 Sekunde Schall und 1 Sekunde Pause im Wechsel, damit sich die Probe nicht zu stark erhitzt) und ultrazentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und steril filtriert, um größere Proteinaggregate und Zellreste für die anschließende GST-Affinitätschromatographie zu entfernen. Um den Fortschritt der Reinigung zu überprüfen, wurde eine Probe nach der Behandlung der konzentrierten Fraktionen der GST-Elution mit der PreScission-Protease und weitere Proben während der folgenden Gelfiltration für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Wie in Abb. 54 zu sehen, ist der Elutionspeak der GST-Affinitätschromatographie im Vergleich zum Auftrag relativ klein und entspricht einer geringen Ausbeute (Abb. 54, A).

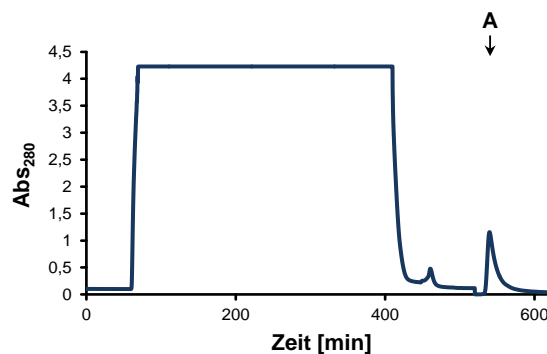


Abb. 54 GST-Affinitätschromatographie von GST-D1D2p97. Nach verschiedenen Reinigungsschritten wurden Proben für die SDS-PAGE genommen, um den Fortschritt zu kontrollieren (Abb. 55). Der Elutionspeak der GST-Affinitätschromatographie ist bei etwa 570 min zu sehen (A).

Die Fraktionen des Elutionspeaks der GST-Affinitätschromatographie wurden auf 1 Milliliter pro 1 l Expressionsmedium konzentriert und der GST-Tag des Konstrukts mit einer PreScission-Protease entfernt. Mit der GST-Affinitätschromatographie konnte das GST-D1D2p97 Fusionsprotein erfolgreich von den anderen *E. coli*-eigenen Proteinen getrennt und mittels PreScission-Protease nahezu 100 % geschnitten werden (Abb. 55, SDS-PAGE "AP").

Anschließend erfolgte eine Gelfiltration mit der Superdex 200, um D1D2p97 von dem GST-Tag zu trennen (Abb. 55).

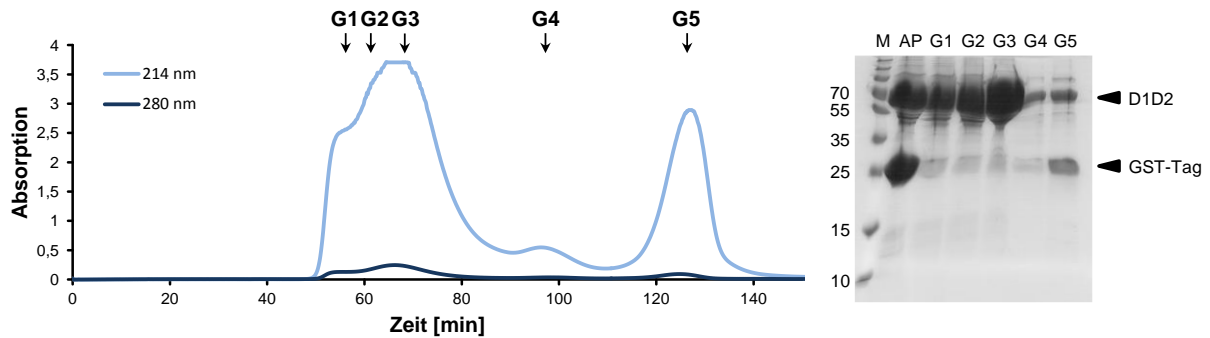


Abb. 55 Gelfiltration von D1D2p97. Von den Fraktionen der einzelnen Peaks wurden Proben für die SDS-PAGE entnommen, um den Reinheitsgrad zu kontrollieren (rechts). Der Auftrag des mit PreScission-Protease-behandelten Proteins (AP) bestätigt die Trennung des GST-Fusionsproteins. Für weitere Experimente wurden die Fraktionen des ersten Peaks (G1-G3) verwendet.

Im Chromatogramm der Gelfiltration sind drei Peaks zu erkennen. Laut SDS-PAGE bestehen die Proben von den Peaks bei ca. 70 min (G1, G2, G3) und 95 min (G4) zum größten Teil aus D1D2p97, weisen aber zudem einen geringen Anteil an Verunreinigung mit dem GST-Tag auf. Der dritte Peak (G5) enthält sowohl den GST-Tag als auch D1D2p97. Für die weiteren Messungen wurden daher die Fraktionen des ersten Peaks (G1 bis G3) konzentriert und für NMR-Messungen gegebenenfalls umgepuffert. Dabei wurde durch die Porengröße des Zentrikons (30 kDa) die GST-Verunreinigung entfernt.

Der Hauptpeak (bei 70 min) der Gelfiltration der D1D2-Domäne lässt aufgrund seiner Breite und der linksseitigen Schulter vermuten, dass die D1D2-Domäne nicht als reines Hexamer vorliegt. Um dies zu überprüfen wurde zusätzliche eine analytische Gelfiltration durchgeführt (Abb. 56).

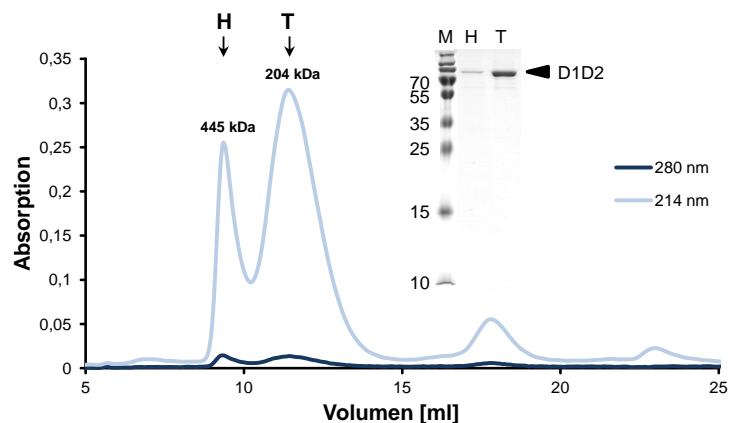


Abb. 56 Analytische Gelfiltration von D1D2p97. Das Chromatogramm zeigt die Absorptionen bei 280 nm (dunkelblau) und bei 214 nm (hellblau) der analytischen Gelfiltration von D1D2p97 mit einer Superdex 200 10/300 GL. Die beiden größten Peaks enthalten D1D2p97 (siehe SDS-PAGE, im Vergleich zu Abb. 55 durch andere Bedingungen verändertes Laufverhalten). Das GST-gereinigte D1D2p97 liegt sowohl als Hexamer (H) als auch als Trimer (T) vor.

Aus der Analyse des Gelfiltrationsprofils geht hervor, dass die D1D2-Domäne in zwei Multimerisierungsformen vorliegt, wobei das größere Multimer einen geringeren Anteil einnimmt. Zur Bestimmung der Größe der Multimere wurde eine Kalibration der Gelfiltrationssäule und eine anschließende lineare Regression durchgeführt (Kap. 8.13). Das

Multimer (H) ist 445 kDa groß, was näherungsweise einem Hexamer (erwartete Größe: 402 kDa) entspricht und das andere Multimer (T) ist 204 kDa groß, was einem Trimer (erwartete Größe: 201 kDa) entspricht.

3.5.2. Untersuchung der Interaktion zwischen UBXD1 und D1D2p97

NMR-Spektroskopie

Um eine mögliche Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und der D1D2-Domäne von p97 mittels NMR-Spektroskopie zu untersuchen, wurde ein ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N -markiertem UBXD1 1-133 in Abwesenheit und Anwesenheit der unmarkierten D1D2-Domäne aufgenommen. Zur Analyse der Interaktion wurden die Intensitäten der Signale ausgewertet (Kap. 2.6.1). Nach Zugabe der D1D2-Domäne kommt es mit zunehmender Konzentration zu Änderungen der Intensität einiger Signale von UBXD1 1-133 (Abb. 57, blau), was auf eine spezifische Interaktion hinweist.

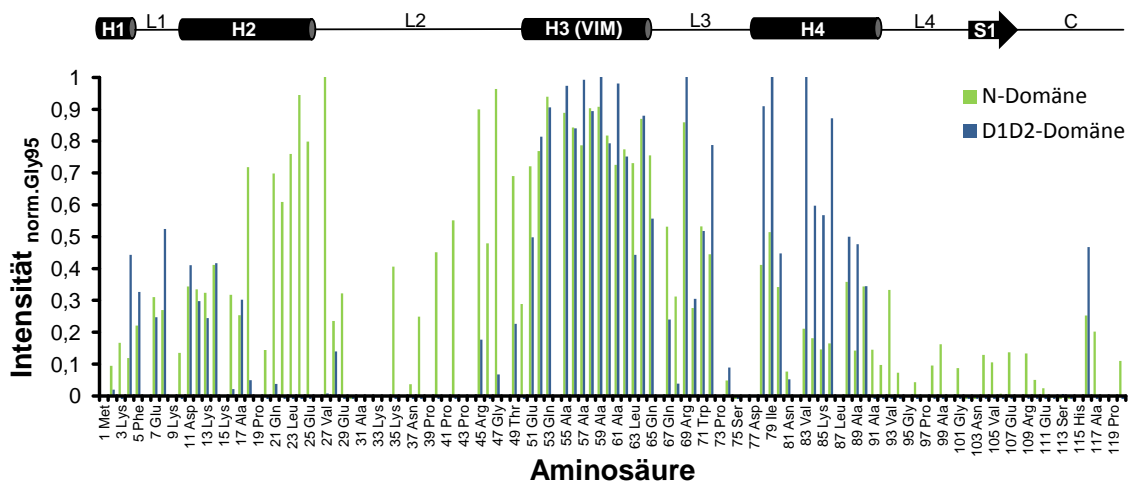


Abb. 57 Titration von ^{15}N -markiertem UBXD1 1-133 mit Np97 und D1D2p97. Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: Analyse der Intensitäten der einzelnen Aminosäuren von UBXD1 1-133 (100 μM) nach Zugabe von 500 μM Np97 (grün) und 200 μM D1D2p97 (blau, doppelte Aufnahmezeit). Die Analyse der Intensitätenänderung bei Zugabe von Np97 entspricht im Wesentlichen der Shift-Analyse der Titration mit Np97 (Kap. 3.3): H1/H2 und H3 mit dem VIM-Motiv von UBXD1 1-133 interagieren mit Np97. D1D2p97 interagiert mit H1/H2 und H3/H4 von UBXD 1-133.

Wie auch die N-Domäne (Kap. 3.3) interagiert auch die D1D2-Domäne mit mehreren Bereichen von UBXD1 1-133. Zum einen gibt es Veränderungen im vorderen N-Terminus von UBXD1 1-133 in H1, L1 und dem Anfang von H2 (Phe 4, Phe 5, Gln 7, Phe 8, Asp 11 bis Phe 14 und Ala 17). Zum anderen sind auch Wechselwirkungen mit H3 (Glu 51 bis Gln 53, Ala 55 bis Gln 65), L3 (Gln 67, Arg 69 bis Gly 72) und H4 (Thr 78 bis Arg 80, Val 83 bis Glu 86 und Gln 88 bis Glu 90) zu erkennen. Desweiteren hat Leu 116 ebenfalls eine merkliche Intensitätsdifferenz von 0,5. Die unterschiedlichen Intensitätsdifferenzen des vorderen (H1 bis H2, $\Delta I = 0,25$ - $0,52$) und des hinteren Bereichs (H3 bis H4, $\Delta I = 0,3$ - $1,3$) deuten darauf hin, dass der vordere Teil mit einer geringeren Affinität bindet als der Bereich um das VIM-Motiv.

Weiterhin wurden die Bindestellen von UBXD1 1-133 an die N-Domäne mit denen der D1D2-Domäne verglichen (Kap. 3.3). Es gibt jeweils zwei interagierende Bereiche (H1/H2 und H3/H4), die sich teilweise überlappen. So binden sowohl die N-Domäne als auch die D1D2-Domäne H1 und H2 von UBXD1 1-133. Während die N-Domäne vorwiegend mit der gesamten H2 und Teilen von L2 interagiert (Ala 17 bis Val 27), bindet die D1D2-Domäne nur H1 und den N-terminalen Bereich von H2 (Asp 11 bis Ala 17). Das VIM-Motiv wird ebenfalls von beiden Domänen gebunden. Während die N-Domäne um den Bereich des VIM-Motivs bindet (Arg 45 bis Trp 71), interagiert die D1D2-Domäne mehr C-terminal des VIM-Motivs (Glu 51 bis Glu 90). Die Intensitätsdifferenzen zwischen der Bindung von UBXD1 1-133 mit Np97 und der mit D1D2p97 liegen für die D1D2-Domäne für den N-terminalen Bereich (H1/H2) niedriger, was auf eine schwächere Bindung von D1D2p97 als Np97 hindeutet. Im Gegensatz dazu wird der Bereich um das VIM-Motiv (H3/H4) von beiden Domänen ähnlich gebunden (keine signifikanten Unterschiede in der Intensitätsdifferenz). Die interagierenden Aminosäuren von UBXD1 1-133 mit Np97 und D1D2p97 wurden zur Veranschaulichung auf dem MD-simulierten Strukturmodell von UBXD1 1-120 markiert (Abb. 58).

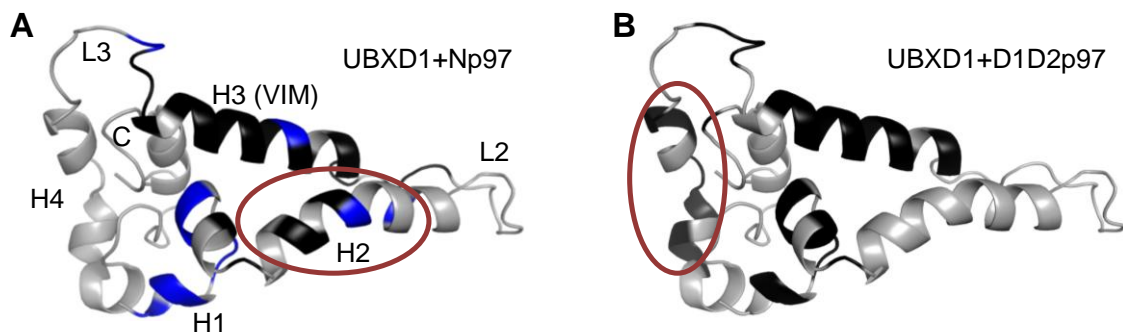


Abb. 58 Interaktion von UBXD1 1-133 mit Np97 und D1D2p97. Dargestellt sind die MD-simulierten Strukturmodelle von UBXD1 1-120. Markiert sind jeweils die verschwindenden oder schwächer werdenden Aminosäuren (schwarz) und die shiftenden Aminosäuren (blau). Aminosäuren, die keine Interaktion zeigen sind grau. A: Titration von UBXD1 mit Np97. Sowohl H1/H2 als auch H3 (VIM) interagieren mit Np97. Np97 interagiert stärker mit H2 als D1D2p97 (roter Kreis) B: Titration von UBXD1 1-133 mit D1D2p97. Neben H1/H2 und H3 bindet D1D2p97 auch H4 (roter Kreis).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass UBXD1 1-133 sowohl die N-Domäne als auch die D1D2-Domäne von p97 bindet. Die Interaktion wird über zwei Bindestellen vermittelt. Die N-terminale Bindestelle (H1/H2) hat eine geringere Affinität als der Bereich mit der VIM-Helix (H3/H4). Im Gegensatz zur N-Domäne interagiert UBXD1 1-133 mit der D1D2-Domäne auch über die vierte Helix. Dafür ist die Interaktion mit Np97 in H2 stärker ausgeprägt.

Die Interaktion zwischen dem VIM-Motiv von UBXD1 1-133 und Np97 konnte durch die Mutation RL62/63AA verhindert werden (Kap. 3.3). In einer weiteren Titration wurde die Interaktion dieser UBXD1-VIM-Mutante und der D1D2-Domäne untersucht. Die Analyse der NMR-Titrationsexperimente hat gezeigt, dass die Bindung von UBXD1 1-133 an die D1D2-Domäne durch die RL62/63AA-Mutation nicht verhindert wird (Abb. 59).

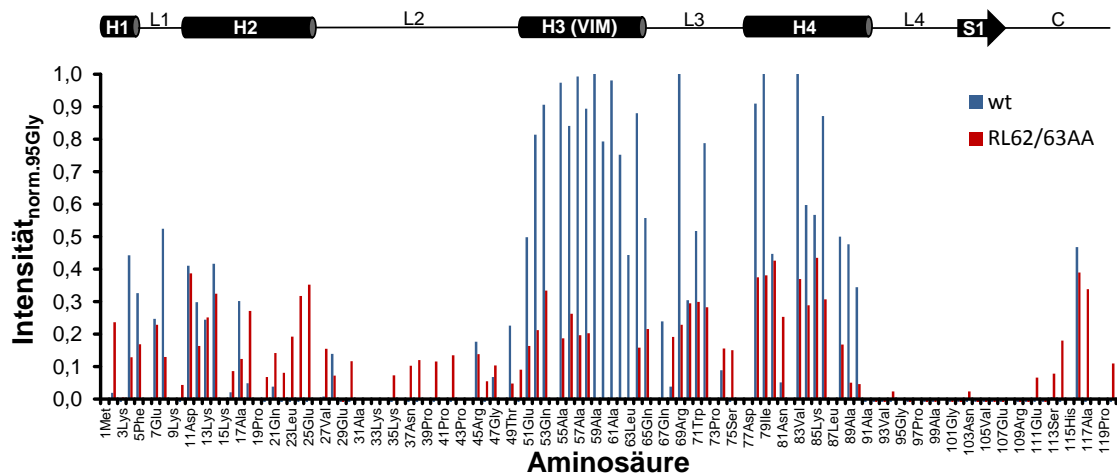


Abb. 59 Titration von ^{15}N -markiertem UBXD1 1-133 und UBXD1 RL62/63AA mit D1D2p97. Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: Analyse der Intensitäten der einzelnen Aminosäuren von UBXD1 1-133 (100 μM , blau) und der VIM-Mutante UBXD1 1-133 RL62/63AA (150 μM , rot) nach Zugabe von 200 μM D1D2p97. D1D2p97 interagiert mit H1/H2 und H3/H4 von UBXD1 1-133. Im Gegensatz zu Np97 wird die Interaktion mit der D1D2-Domäne nicht durch die RL62/63AA-Mutation unterbrochen. Ala 59 bis Leu 63 wurden aufgrund der fehlenden Zuordnung der durch die Mutation geschifteten Aminosäuren nicht ausgewertet.

Die Mutante weist allerdings ein verändertes Bindeverhalten an D1D2p97 im Vergleich zum Wildtyp auf. Neben der Bindung von H1 ist nun auch die gesamte H2 an der Bindung beteiligt (Lys 2, Glu 7, Asp 11, Lys 13, Phe 14, Gly 18, Leu 23 bis Glu 25). Zusätzlich binden auch einige Aminosäuren von L2 sehr schwach (Val 27 bis Arg 45). Der Bereich zwischen H3 und H4 (Asn 50 bis Gln 88) von UBXD1 1-133 bindet an D1D2p97 in ähnlicher Weise wie im Wildtyp beobachtet, aber etwas schwächer ausgeprägt. Zusätzlich gibt es am unstrukturierten C-Terminus von UBXD1 1-133 RL62/63AA (Kap. 3.1.3) einige Aminosäuren (Ala 114 bis Ala 117), die eine Interaktion mit der D1D2-Domäne aufzuweisen scheinen. Die Intensitätsdifferenzen sind bei der Titration der RL62/63AA-Mutante mit D1D2p97 geringer und erreichen im Gegensatz zum Wildtyp bei keiner Aminosäure einen Wert über 0,5. Die Mutation des Arginins und Leucins an Position 62 und 63 zu Alaninen führt zu einem Verlust der Bindung über das VIM-Motiv von UBXD1 an die N-Domäne von p97 (Kap. 3.3), die Bindung an die D1D2-Domäne wird jedoch nur verändert und bleibt weiterhin bestehen (Abb. 60).

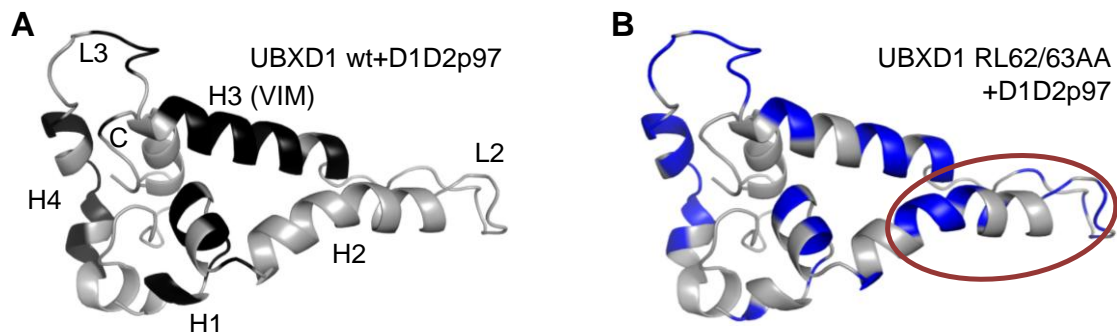


Abb. 60 Interaktion von UBXD1 1-133 und UBXD1 1-133 RL62/63AA mit D1D2p97. Dargestellt sind die MD-simulierten Strukturmodelle von UBXD1 1-120. Markiert sind jeweils die verschwindenden Aminosäuren (schwarz) und die shiftenden oder leicht schwächer werdenden Aminosäuren (blau). A: Titration von UBXD1 1-133 mit D1D2p97. H1/H2 und H3/H4 von UBXD1 1-133 interagieren mit D1D2p97. B: Titration von UBXD1 1-133 RL62/63AA mit D1D2p97. Im Gegensatz zur N-Domäne wird die Interaktion zur D1D2-Domäne durch die Mutation im VIM-Motiv von UBXD1 nicht unterbrochen. Neben den Bereichen des Wildtyps bindet die Mutante zusätzlich mit dem C-Terminus und mit L2 an D1D2p97 (roter Kreis).

Fluoreszenz-Anisotropie:

Da die NMR-spektroskopische Auswertung der Bindung zwischen UBXD1 1-133 und der D1D2-Domäne sowie zwischen UBXD1 1-133 und der N-Domäne auf verschiedene Bindeaffinitäten hinweist, wurden weitere Analysen dieser Interaktion mittels Fluoreszenz-Anisotropie vorgenommen. Dazu wurden zu dem Fluoreszenz-markiertem UBXD1 1-133 und der RL62/63AA-Mutante verschiedene Konzentrationen an D1D2p97 hinzutitriert und die jeweilige Anisotropie gemessen (Kap. 2.6.3, Abb. 61).

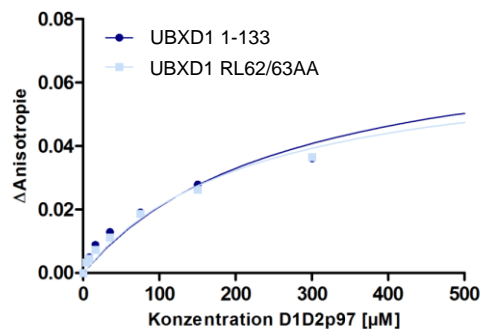


Abb. 61 Affinität von UBXD1 1-133 und UBXD1 1-133 RL62/63AA zu D1D2p97. Die Affinität von UBXD1 1-133 zur D1D2-Domäne (dunkelblau, 270 μM) wird durch die Mutation des VIM-Motivs (hellblau, 226 μM) nicht beeinflusst.

Daraus ergibt sich ein K_D für UBXD1 1-133 an D1D2p97 von 270 μM und für die RL62/63AA-Mutante von 226 μM. Da die Affinitäten des Wildtyps und der Mutante in der gleichen Größenordnung liegen, scheint die Bindung von UBXD1 1-133 an die D1D2-Domäne unabhängig von dieser Mutation zu sein. Im Gegensatz dazu nimmt die Affinität für die N-Domäne von p97 in Gegenwart dieser Mutation deutlich ab (8 μM vs. 580 μM, Kap. 3.3).

Analytische Gelfiltration:

Um den Einfluss der Bindung von UBXD1 1-133 an die D1D2-Domäne auf die Struktur und Multimerisierung von D1D2p97 zu untersuchen, wurde eine analytische Gelfiltration mit einer Superdex 200 10/300 GL durchgeführt (Abb. 62).

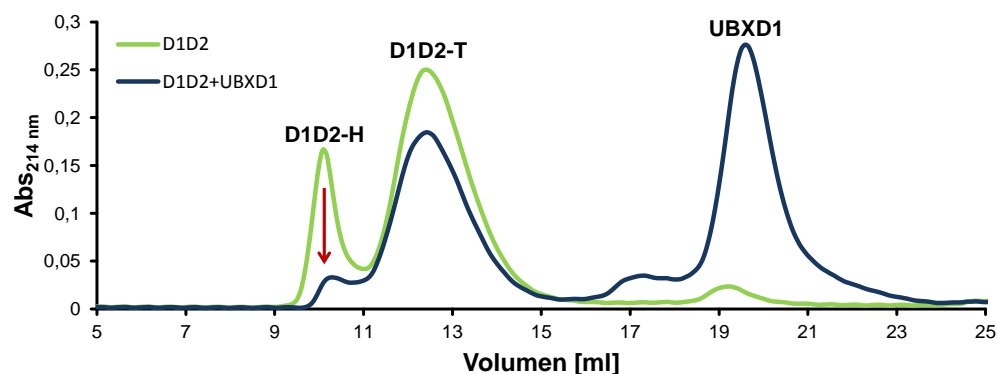


Abb. 62 Analytische Gelfiltration von D1D2p97 mit und ohne UBXD1 1-133. Das Chromatogramm von 100 μg D1D2p97 zeigt auch unter Niedrigsalzbedingungen (25 mM KCl) die hexamere und trimere Form von D1D2p97 (grün). Nach Zugabe eines Überschusses von 100 μg UBXD1 1-133 (blau) kommt es zu einer Verringerung des hexameren D1D2p97-Anteils (roter Pfeil).

Die analytische Gelfiltration von D1D2p97 zeigt ein Gemisch aus Hexamer (D1D2-H) und Trimer (D1D2-T), wobei die trimere Form den größeren Anteil ausmacht. Diese Gelfiltration wurde unter niedrigen Salzbedingungen (25 mM KCl) durchgeführt, um die schwache Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und D1D2p97 von 270 μ M nicht zu unterbinden. Durch die veränderten Salzbedingungen kommt es zu einer erhöhten Elutionszeit im Vergleich zu den Standardbedingungen (Kap 3.5.1). Die Zugabe von UBXD1 führt zu einer Verringerung der hexameren Fraktion um 75 % (korrigierte Absorption beim Maximum, roter Pfeil). Dabei scheint die trimere Form stabilisiert zu werden, da neben der Fraktion für UBXD1 1-133 kein weiterer auffälliger Peak im Chromatogramm zu sehen ist, der auf ein zusätzliches D1D2-Multimer hinweisen könnte.

Das Verhältnis zwischen der hexameren und der trimeren Form verringert sich bei Zugabe von UBXD1 1-133 um den Faktor 3,9 (0,66 ohne vs. 0,17 mit UBXD1 1-133). Das D1D2-Trimer scheint bei Bindung von UBXD1 1-133 seine Konformation zudem nicht wesentlich zu ändern, da es zu keiner Verschiebung des Maximums in der Gelfiltration kommt. Eine Bindung von UBXD1 1-133 (14,4 kDa) und das Trimer ist in diesen Bereichen der Gelfiltrationssäule praktisch nicht auflösbar. Desweiteren scheinen nur wenige Moleküle von UBXD1 1-133 an der Destabilisierung des D1D2-Hexamers beteiligt zu sein, weil mittels SDS-PAGE keine UBXD1-Bande nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Trotz der schwachen Affinität scheint UBXD1 1-133 einen Trimer-stabilisierenden Effekt auf D1D2p97 zu haben.

3.6. Interaktion zwischen UBXD1 und p97

In den vorhergehenden Kapiteln wurde die Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und sowohl der N-Domäne von p97 als auch der D1D2-Domäne bis auf atomare Ebene charakterisiert. Im Folgenden soll nun untersucht werden, welchen Einfluss die Bindung von UBXD1 1-133 an p97 auf die Struktur und Stabilität von p97 in seiner natürlichen Konformation als Hexamer hat und wie stark diese ist. Die Affinität der Bindung wurde mittels Fluoreszenz-Anisotropie bestimmt. Zur Untersuchung der Konformation von p97 wurden analytische Gelfiltrationen und eine limitierte Proteolyse durchgeführt, während die Stabilität thermisch mittels Tryptophan-Fluoreszenz betrachtet wurde. Das Protein wurde in gereinigter Form von der AG Meyer zur Verfügung gestellt.

Fluoreszenz-Anisotropie:

In den vorherigen Kapiteln ist die Interaktion von UBXD1 1-133 mit der N-Domäne und den D1D2-Domänen von p97 jeweils separat analysiert worden. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Gesamtheit aller Domänen auf die Bindung von UBXD1 1-133 an p97 hat, wurde zuerst mittels Fluoreszenz-Anisotropie die Bindungsaffinität bestimmt (Abb. 63).

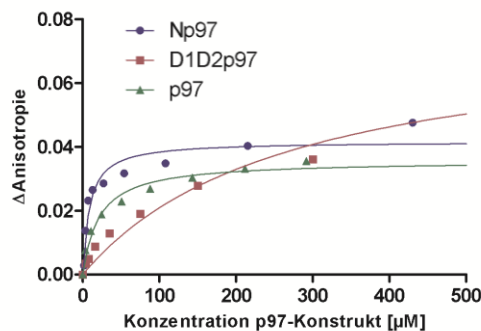


Abb. 63 Affinität von UBXD1 1-133 zu verschiedenen Konstrukten von p97. Die Affinität von UBXD1 1-133 und p97 (21 μM, blau) liegt zwischen jener für die N-Domäne allein (9 μM, dunkelblau) und der separaten D1D2-Domäne (270 μM, hellblau).

Daraus ergibt sich für die Bindung von UBXD1 1-133 an p97 ein K_D von 21 μM. Damit bindet UBXD1 1-133 das gesamte p97 mit einer ähnlichen Affinität wie die N-Domäne allein (K_D : 9 μM), während die D1D2-Domäne separat schlechter gebunden wird (K_D : 270 μM).

Limitierte Proteolyse:

Desweiteren sollte der Einfluss der Bindung von UBXD1 1-133 auf die Konformation der p97-Struktur untersucht werden (Kap. 1.1.4).

Wie bereits erläutert ist die N-Domäne sehr flexibel und kann sich während der ATP-Hydrolyse auf und ab bewegen. Die Position der N-Domäne kann durch Kofaktoren wie p47 oder dem nicht hydrolysierbaren Substratanalogon ATPγS in einer auf-Konformation oberhalb des D1-Rings stabilisiert werden (43; 54; 61). Strukturmodelle von p97 lassen vermuten, dass der ND1-Linker bei einer auf-Konformation der N-Domäne für einen tryptischen Verdau zugänglicher als in der ab-Konformation der N-Domäne ist.

Somit kann eine limitierte Proteolyse von p97 mit Trypsin in Anwesenheit verschiedener Kofaktoren Aufschluss über die Position der N-Domäne in Anwesenheit dieser Kofaktoren geben. Da die Position der N-Domäne in Anwesenheit von p47 und ATP γ S bekannt ist, wurden diese Kombinationen als Referenz mitgeführt (Abb. 64).

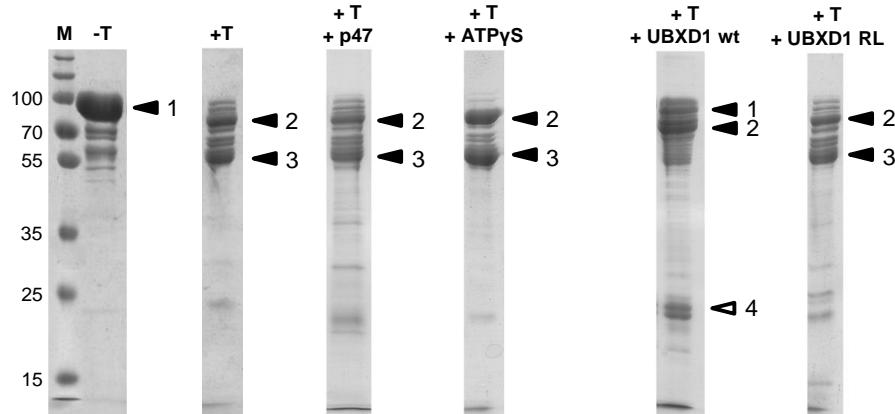


Abb. 64 Limitierte Proteolyse von p97 in Anwesenheit verschiedener Kofaktoren. Das Ergebnis der limitierten Proteolyse wurde mittels SDS-PAGE sichtbar gemacht. Der Trypsinverdau von p97 führt zu Bande 2 und 3 (+T). Die Zugabe des Kofaktors p47 (+ p47, 50 μ M) oder des nicht hydrolysierbaren Nukleotids ATP γ S (+ATP γ S, 1mM) führen nach Verdau mit Trypsin ebenfalls zu Bande 2 und 3. Die Zugabe von UBXD1 1-133 (+UBXD1 wt, 70 μ M) führt zur Stabilisierung von p97 (Bande 1, siehe -T) und Bande 2. Zusätzlich ist eine niedermolekulare Bande 4 zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigt die VIM-Mutante (+UBXD1 RL, 100 μ M) nach Verdau Bande 2 und 3 (vgl. +T) und keine Bande 4.

Bei der Kontrolle ohne Trypsin ist Bande 1 bei etwa 90 kDa zu sehen, die p97 entspricht (89,3 kDa). Desweiteren gibt es einige Abbauprodukte zwischen 70 und 55 kDa, die aber für diesen Versuch vernachlässigbar sind. Nach Zugabe von Trypsin verschwindet Bande 1 fast vollständig und es zeigen sich zwei kleinere Banden bei etwa 70 kDa (Bande 2) und 55 kDa (Bande 3). Desweiteren wurde der Einfluss von p47 und ATP γ S auf den Verdau von p97 getestet. Beide Faktoren stabilisieren die N-Domäne in einer auf-Konformation. Sowohl in Anwesenheit von p47 als auch von ATP γ S entstehen nach dem Verdau von p97 mit Trypsin die Banden 2 und 3. Im Gegensatz dazu ergibt sich nach Zugabe von UBXD1 1-133 ein anderes Bandenmuster. Es entstehen wieder zwei Banden (Bande 1 und 2), wobei Bande 1 vergleichbar mit der p97-Bande ohne Trypsin-Verdau ist (Abb. 64, -T) und Bande 2 auch in den übrigen Verdaus bei Zugabe von p47 und ATP γ S beobachtet werden konnte. Desweiteren ist zwischen 15 und 25 kDa eine weitere Bande (Bande 4) zu sehen.

Dieser Versuch wurde mit der RL62/63AA-Mutante von UBXD1 1-133 wiederholt. Diese Mutante ist nicht in der Lage Np97 zu binden. Das dabei entstehende Bandenmuster ist vergleichbar mit jenen bei Zusatz von p47 und ATP γ S (Abb. 64, +p47, +ATP γ S). Es entstehen wieder die Banden 2 und 3. Im Gegensatz zum Wildtyp ist bei der Mutante auch keine zusätzliche Bande 4 im niedermolekularen Bereich zu sehen.

Analytische Gelfiltration:

Da für die D1D2-Domäne von p97 ein Hexamer-destabilisierender und ein Trimer-stabilisierender Effekt beobachtet werden konnte (Kap. 3.5.2), wurde auch für p97 in seiner Gesamtheit dieser Effekt mittels analytischer Gelfiltration untersucht (Abb. 65).

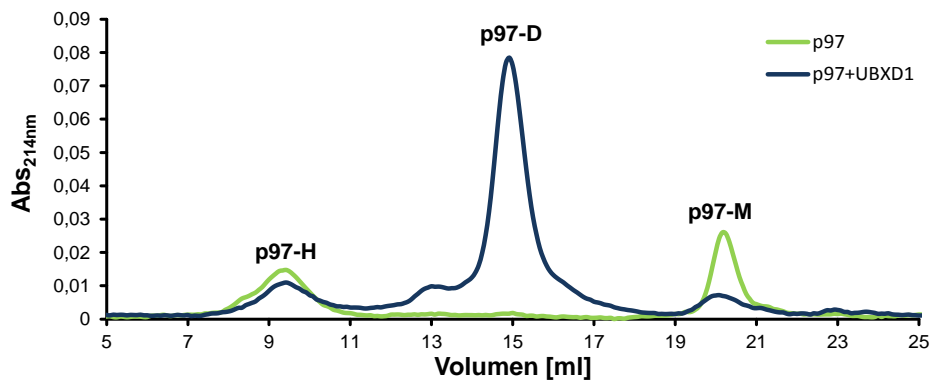


Abb. 65 Analytische Gelfiltration von p97 mit und ohne UBXD1 1-133. Das Chromatogramm von 100 µg p97 zeigt eine hexamere (H) und eine monomere Form (M) von p97 (grün). Nach Zugabe eines Überschusses von 100 µg UBXD1 1-133 (blau) kommt es zu einer leichten Verringerung des hexameren und einer starken Verringerung des monomeren Anteils sowie einer Stabilisierung des dimeren p97 (D). Der Anteil an nicht gebundenem UBXD1 1-133 (*) ist gering.

Daraus ergibt sich, dass p97 in etwa gleichen Maßen sowohl als Hexamer (p97-H) als auch als Monomer (p97-M) vorliegt (Abb. 65, grün). Die Zugabe von UBXD1 1-133 führte zu einer Abnahme des Hexamers (25 %) und des Monomers (80 %). Gleichzeitig entstand zwischen p97-H und p97-M ein weiterer Peak (p97-D), der in etwa einem p97-Dimer (188 kDa) entspricht. Ein Peak für UBXD1 1-133 ist nicht zu sehen. Desweiteren wurde untersucht, welchen Einfluss die Mutation des VIM-Motivs (RL62/63AA) und damit eine fehlende Bindung über dieses Motiv an die N-Domäne von p97 auf den Multimerisierungsgrad von p97 hat (Abb. 66).

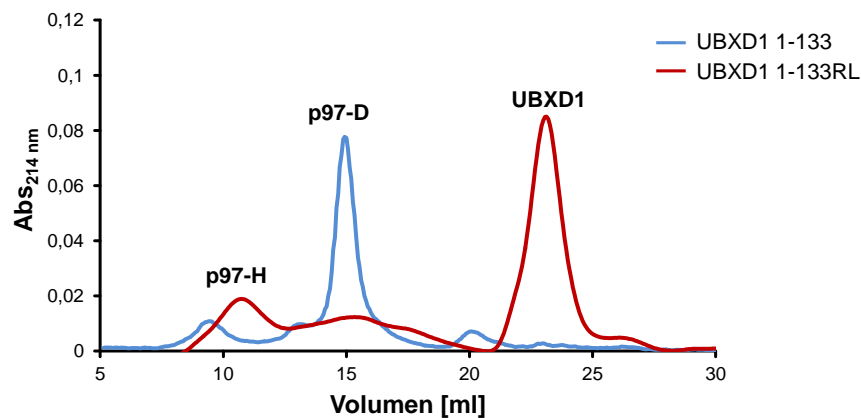


Abb. 66 Analytische Gelfiltration von p97 mit verschiedenen UBXD1-Konstrukten. In Gegenwart von UBXD1 1-133 (blau) bildet p97 Dimere (p97-D). UBXD1 1-133 RL62/63AA (rot) hingegen hat nur einen geringen Einfluss auf die p97-Hexamerddestabilisierung (p97-H).

Das Chromatogramm der analytischen Gelfiltration von UBXD1 1-133 RL62/63AA zeigt drei Peaks. Der erste Peak entspricht dem p97-Hexamer (p97-H) mit einer Laufzeit, die im Vergleich zum Wildtyp um eine Minute verlängert ist. Ein weiterer, sehr breiter und schwacher Peak bildet sich in dem Bereich, in dem bei dem Wildtyp das p97-Dimer zu finden ist. Die längste Laufzeit besitzt durch seine geringe Größe freies UBXD1 1-133 RL62/63AA (14,4 kDa). Somit findet eine Bindung zwischen der UBXD1-Mutante und p97 in nur sehr geringem Maße statt. Demzufolge fällt auch der Anteil an dimerisiertem p97 sehr gering aus, während die hexamere Form vorherrschend ist.

Fluoreszenz-Schmelzkurve:

Desweiteren sollte der Einfluss der Bindung des N-Terminus von UBXD1 auf die thermische Stabilität von p97 untersucht werden. Damit sollen zusätzliche Erkenntnisse zur Position der N-Domäne während der Bindung von UBXD1 1-133 gewonnen werden. Je kompakter eine Struktur vorliegt, umso höher ist die Schmelztemperatur. Die Schmelztemperatur wurde mittels intrinsischer Trp-Fluoreszenz ermittelt. UBXD1 1-133 hat einen geringen Extinktionskoeffizienten durch wenige Tryptophane und eine Erhitzung von UBXD1 1-133 bewirkt keinen Shift in der Trp-Fluoreszenz (Kap. 3.1.4). Damit kann der Effekt durch Zugabe von UBXD1 1-133 auf die Fluoreszenz von p97 vernachlässigt werden. Die Schmelztemperatur von p97 liegt bei etwa 65 °C (Abb. 67).

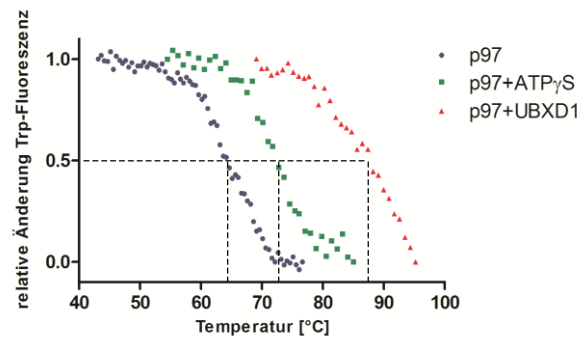


Abb. 67 Einfluss von ATP_γS und UBXD1 1-133 auf die thermische Stabilität von p97. Die thermische Stabilität wurde mittels Tryptophan-Fluoreszenz-Schmelzkurve ermittelt. Die Stabilität von p97 (blau) konnte mit ATP_γS (grün) erhöht werden. Die Zugabe des Kofaktors UBXD1 1-133 (rot) führt zu einer stärkeren Stabilisierung als mit ATP_γS.

Durch Zugabe von ATP_γS, welches die N-Domäne von p97 in einer auf-Konformation hält, kommt es zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur auf 71 °C. ATP_γS hat damit einen stabilisierenden Effekt auf p97. UBXD1 1-133 hat ebenfalls einen stabilisierenden Effekt auf p97 und erhöht dessen Schmelztemperatur auf > 88 °C.

3.7. REGULATION DER ATPASE-AKTIVITÄT VON P97 DURCH UBXD1

Die vorherigen strukturellen Studien haben gezeigt, dass der N-Terminus von UBXD1 sowohl die N-Domäne als auch die D1D2-Domäne von p97 separat bindet. Desweiteren hat ein UBXD1 1-133/p97-Komplex eine andere Konformation als ein p47/p97-Komplex. Zusätzlich hat UBXD1 1-133 einen Hexamer-destabilisierenden Effekt auf p97. Außerdem bindet UBXD1 in die VIM-Furche der N-Domäne, die sich bei einer ab-Konformation der N-Domäne, nahe der D1-Domäne befindet (Abb. 68).

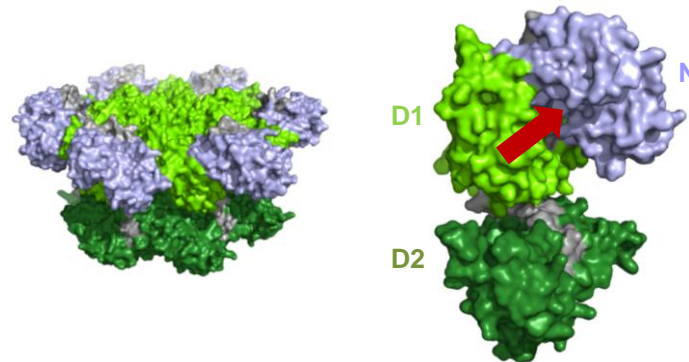


Abb. 68 Struktur von p97 sowie die Bindestelle von UBXD1 1-133. N-Domäne (N): blau, D1-Domäne (D1): hellgrün, D2-Domäne (D2): dunkelgrün, Linker: grau. Links: p97-Hexamersstruktur. Rechts: Struktur eines p97-Monomers mit der N-Domäne in der ab-Konformation. Der rote Pfeil markiert die VIM-Furche, in die UBXD1 unter anderem bindet und sich in räumlicher Nähe zur D1-Domäne befindet.

Somit wäre zum einen über die Position der N-Domäne als auch über den Multimerisierungsgrad von p97 eine Regulation seiner ATPase-Aktivität möglich. Um einen Effekt des N-Terminus von UBXD1 auf die ATPase-Aktivität von p97 zu überprüfen, wurde im Folgenden ein NADH-gekoppelter ATPase-Assay mit p97 durchgeführt (Abb. 69, Kap. 2.6.4).

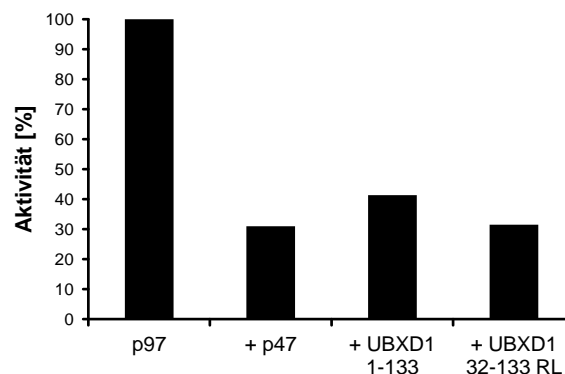


Abb. 69 Inhibition der ATPase-Aktivität von p97 durch verschiedene UBXD1-Konstrukte. Die Inhibition durch UBXD1 1-133 ist vergleichbar mit der durch p47. Ein UBXD1-Konstrukt, das lediglich die D1D2-Domäne bindet, hat ebenfalls einen reduzierenden Effekt auf die ATPase-Aktivität von p97.

Die Aktivität von 15 µg p97 (500 nM) liegt bei 2,3-2,4 µmol ATP/min ohne Zugabe eines Kofaktors. Bei Zugabe von p47 ergibt sich eine Inhibition der ATPase-Aktivität von p97 auf 31 % der ursprünglichen Aktivität. Nach Zugabe von UBXD1 1-133 kommt es ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der p97-Aktivität auf maximal 41 %. Auch die UBXD1-Mutante, die nur noch an die D1D2-Domäne bindet, zeigt eine Inhibition der ATPase-Aktivität von p97 auf 31 % und ist damit stärker als der Wildtyp.

Die inhibitorische Konzentration liegt für die hier getesteten Konstrukte im gleichen Bereich. Der IC_{50} -Wert für p47 liegt bei 7 nM, für UBXD1 1-133 bei 8 nM und für UBXD1 32-133 RL62/63AA bei 6 nM.

Neben den konformationellen Einflüssen des N-Terminus von UBXD1 auf die Struktur und den Multimerisierungsgrad von p97, könnte auch die Bindung des Substrats ATP zu dem inhibitorischen Effekt führen. Daher wurde geprüft, ob UBXD1 1-133 ATP bindet. Dazu wurde eine analytische Gelfiltration mit UBXD1 1-133 und ATP durchgeführt und die Absorptionen bei 214 nm für die Peptidbindung von UBXD1 und bei 260 nm für das Nukleotid ATP gemessen (Abb. 70).

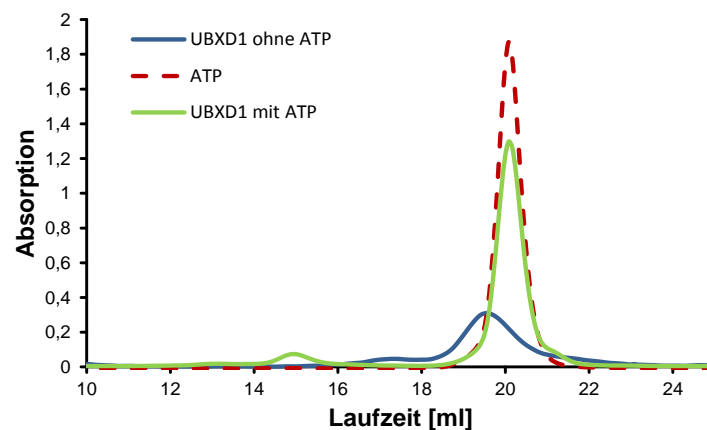


Abb. 70 Analytische Gelfiltration zur Interaktion zwischen ATP und UBXD1. Die Zugabe von 5 mM ATP zu 40 μ M UBXD1 1-133 führt zu einer Verschiebung des Peaks des Wildtyps (blau) zu höheren Elutionsvolumina und damit zu geringen Molekulargewichten (grün). Desweiteren liegt der Peak für die Absorption des Nukleotids ATP (260 nm, rot, gestrichelt) exakt bei dem Absorptionspeak für die Peptidbindung von UBXD1 1-133.

Aus dem Chromatogramm der analytischen Gelfiltration ergibt sich eine Verschiebung des Peaks für UBXD1 1-133 (Abb. 70, blau) in Anwesenheit von ATP zu höheren Elutionsvolumina (grün). Desweiteren hat ein Peak für ATP (rot) exakt die gleiche Laufzeit wie UBXD1 (grün), trotz des Größenunterschiedes von 13,8 kDa, was auf eine Bindung zwischen ATP und UBXD1 hinweist. Bei äquimolaren Verhältnissen von UBXD1 und ATP kommt es unter den getesteten Bedingungen vermehrt zur Bildung von unlöslichen Aggregaten.

Die Verschiebung des Peaks von UBXD1 1-133 zu höheren Elutionszeiten ist ein Hinweis darauf, dass der N-Terminus von UBXD1 eine kompaktere Konformation in Anwesenheit von ATP besitzt. Daher wurde in einem nächsten Schritt die Sekundärstrukturverteilung von UBXD1 1-133 mit und ohne ATP CD-spektroskopisch untersucht (Abb. 71). Das CD-Spektrum von UBXD1 1-133 in Anwesenheit von ATP zeigt eine Verschiebung des Minimums von 200 nm auf 203 nm. Desweiteren gibt es ein Plateau bei 220 nm, welches in Anwesenheit von ATP stärker ausgeprägt ist. Die Vorhersage der Anteile an Sekundärstrukturen aus diesem Spektrum ergab, dass die Anwesenheit von ATP den helikalen Anteil in UBXD1 1-133 im Vergleich zur Abwesenheit von ATP leicht erhöht (random coil: 14,2 % vs. 18 %, Turn: 6,5 % vs. 15 %, β -Strang: 12,9 % vs. 18 %, α -Helix: 66,1 % vs. 49 %).

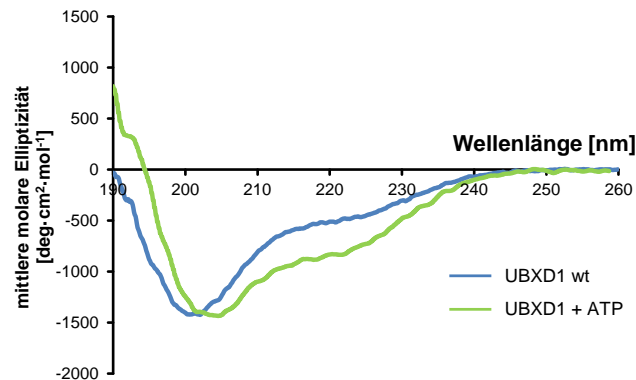


Abb. 71 CD-spektroskopische Untersuchung von UBXD1 1-133 in Anwesenheit von ATP. Das Spektrum von UBXD1 1-133 (10 μ M) in Abwesenheit von 100 μ M ATP besitzt ein Minimum bei 200 nm (blau), welches sich bei Anwesenheit von ATP auf 203 nm verschiebt (grün), sowie ein Plateau bei ca. 220 nm für beide Spektren. Bei Anwesenheit von ATP erhöht sich der α -helikale Anteil von UBXD1 1-133.

Der erhöhte Anteil an helikalen Strukturen in UBXD1 1-133 in Anwesenheit von ATP könnte ähnlich wie bei der VIM-Mutante (RL62/63AA) von UBXD1 einen Einfluss auf die Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und der N-Domäne von p97 haben. Aufgrund dessen wurde im Folgenden die Bindung zwischen UBXD1 1-133 und Np97 erneut in Anwesenheit von ATP mittels analytischer Gelfiltration untersucht (Abb. 72).

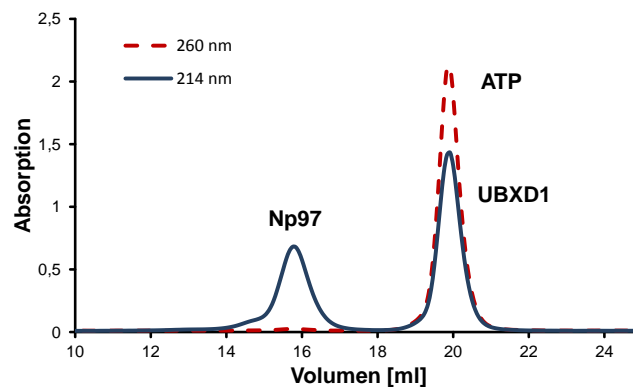


Abb. 72 Bindung zwischen UBXD1 1-133 und Np97 in Anwesenheit von ATP. Die Bindung zwischen 200 μ g der N-Domäne von p97 und 100 μ g UBXD1 1-133 (blau, Peptidbindung, 214 nm) wird in Anwesenheit von 5 mM ATP nahezu vollständig unterbunden. Im Gegensatz zu UBXD1 1-133 weist Np97 keinen Peak für ATP auf (rot, gestrichelt, Nukleotidbindung, 260 nm).

Das Chromatogramm zeigt erneut eine Bindung von ATP (rot, gestrichelt) an UBXD1 1-133 (blau). Zudem liegt bei dem Peak für Np97 kein weiteres Maximum bei 260 nm, was eine ATP-Bindung an die N-Domäne von p97 ausschließt. Im Gegensatz zu der analytischen Gelfiltration von UBXD1 1-133 und Np97 ohne ATP (Abb. 33) findet bei Anwesenheit von ATP lediglich eine sehr geringe Interaktion statt (Abb. 72, Schulter vor dem Peak für Np97 bei 15,5 ml). Um den Einfluss von ATP auf die Affinität von der Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und Np97 beurteilen zu können, wurde mittels Fluoreszenz-Anisotropie die Affinität der Komplexbildung in Anwesenheit von ATP erneut bestimmt (Abb. 73).

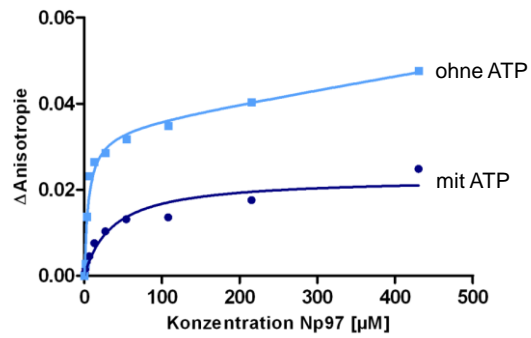


Abb. 73 Affinität von UBXD1 1-133 zu Np97 in Gegenwart von ATP. Die Affinität von UBXD1 1-133 und Np97 (K_D : 9 μ M, hellblau) wird durch die Anwesenheit von 5 mM ATP verschlechtert (K_D : 36 μ M, dunkelblau).

Für die Messung der Anisotropie wurde 1 μ M UBXD1 1-133 mit 30 μ M Np97 inkubiert (K_D : 9 μ M). Die Titration in Anwesenheit von ATP ergab, dass die Bindung von UBXD1 1-133 an Np97 in Anwesenheit von ATP um den Faktor 4 schwächer ist (K_D : 36 μ M).

4. DISKUSSION

4.1. DER N-TERMINUS VON UBXD1 IST EIN IDP

UBXD1 besteht aus dem N-Terminus mit dem Np97-bindenden VIM-Motiv, einer Cp97-bindenden PUB-Domäne sowie einer nicht funktionellen UBX-Domäne. Während es zur PUB-Domäne und zur UBX-Domäne strukturelle Untersuchungen in p97-Kofaktoren mit verwandten Domänen gibt, ist über den N-Terminus von UBXD1 nur wenig bekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der N-Terminus von UBXD1 rekombinant exprimiert, gereinigt und anschließend strukturell charakterisiert.

Die Experimente wurden hauptsächlich mit den ersten 133 Aminosäuren von UBXD1 (UBXD1 1-133) durchgeführt. Die Ausbeute der optimierten Expression und Reinigung von UBXD1 lag bei ca. 3 mg/l Medium. Während der Gelfiltration hat UBXD1 1-133 (14,4 kDa) eine mit dem GST-Tag (28 kDa) vergleichbare Laufzeit, was auf einen erhöhten hydrodynamischen Radius von UBXD1 1-133 hinweist. Die Laufzeit von UBXD1 1-133 verändert sich unter reduzierenden Bedingungen nicht, sodass eine Multimerisierung über Disulfidbrücken als Ursache für die erhöhte Laufzeit ausgeschlossen werden kann und es sich bei UBXD1 1-133 wahrscheinlich um ein flexibles Protein handelt. UBXD1 1-133 zeigt zudem in der SDS-PAGE ein langsames Laufverhalten als bei einer Größe von 14,4 kDa zu erwarten wäre (17 kDa). Der erhöhte Anteil von negativ geladenen Aminosäuren kann zu einer schlechteren Bindung von SDS an das Protein führen. Daher würde UBXD1 1-133 weniger stark zur Anode gezogen werden und damit bei einem höheren Molekulargewicht in der SDS-PAGE zu sehen sein. Desweiteren ist in der SDS-PAGE eine Abbaubande (2-3 kDa unter der eigentlichen Bande) zu sehen. Entsprechend der Zuordnung der Signale des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von UBXD1 1-133 ist dieser Abbau auf einen partiellen Abbau im N-Terminus von UBXD1 1-133 bis Lys 30 und dem kompletten Abbau ab Val 121 zurückzuführen. Neben den Signalen des Proteinrückgrats aus dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum wurden auch die Seitenketten-Atome zugeordnet. Die Zuordnung der Seitenketten-Wasserstoffatome der Lysine und Arginine ist jedoch lückenhaft. Bei dem verwendeten pH von 6,5 tauschen die $\text{H}\delta$ -Atome der Arginine und die $\text{H}\epsilon$ -Atome der Lysine mit den H-Atomen des wasserbasierten Puffers aus. Dadurch sind diese Signale in einem ^1H - ^{15}N -TOCSY-HSQC-Spektrum nicht mehr sichtbar.

Die geringe Dispersion der Signale und deren Verschiebung zu niedrigeren H_N -Werten von UBXD1 1-133 in dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum lässt ein flexibles Protein mit einigen α -Helices vermuten, was unter anderem bereits das Laufverhalten in der Gelfiltration gezeigt hat. Die CD-spektroskopische Sekundärstrukturvorhersage bestätigt diese Hinweise. UBXD1 1-133 ist ein α -helikales Protein (48 %) mit zahlreichen flexiblen Bereichen (33 %). Ähnliche Ergebnisse konnten auch durch die Wishart-Analyse der NMR-Shifts sowie von einigen Sekundärstrukturvorhersage-Programmen ermittelt werden. Laut Wishart-Analyse besteht der N-Terminus von UBXD1 aus vier α -Helices, gefolgt von einem kurzen β -Strang und flexiblen Linkern, welche die einzelnen Elemente miteinander verbinden.

Mutationsstudien haben gezeigt, dass sich die einzelnen Sekundärstrukturelemente in räumlicher Nähe zueinander befinden. Die NMR-spektroskopische Analyse ergab, dass Mutationen am Anfang von H2 zu spezifischen Veränderungen in L3 und *vice versa* führen. Daraus ergibt sich eine räumliche Nähe von H1/H2 und H3/L3. Mit weiteren Mutationsexperimenten konnte ausgeschlossen werden, dass H1/H2 parallel zu H3/L3 liegt. Vielmehr scheinen H2 und H3 über L2 eine hairpin-Struktur zu bilden, da das Ende von H2 und der Anfang von H3 von den anderen Sekundärstrukturelementen isoliert vorliegen (Abb. 74).

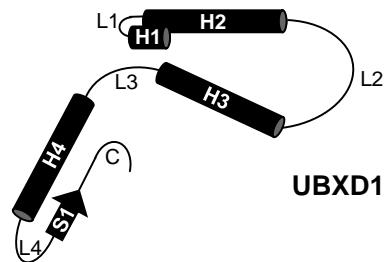


Abb. 74 Modell zur Struktur von UBXD1. Eine mögliche strukturelle Anordnung der Sekundärstrukturelemente im N-Terminus von UBXD1 basierend auf der Wishart-Analyse, Mutationsstudien, CD-Spektroskopie, hetNOE-Analyse und einem D₂O-Austauschexperiment.

Die Interaktion zwischen den ersten beiden Helices (H1 bis H2, 1-30 AS) und dem restlichen Teil des N-Terminus von UBXD1 (L2 bis C, 32-133 AS) konnte mittels NMR-Titrationsexperiment mit den separaten Teilen nicht nachgewiesen werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der geringen Affinität dieser beiden Regionen im mikromolaren Bereich, die jedoch durch die Verbindung durch einen Linker, wie es in dem natürlichen Protein der Fall ist, erheblich verbessert wird. CD-spektroskopische Analysen haben gezeigt, dass die hier eingefügten Mutationen nicht zu einer Zerstörung der Helices führen. Damit werden die Shifts lediglich durch die Unterbrechung einzelner Interaktionen verursacht und nicht durch das Zerstören von Sekundärstrukturen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Mutante RL62/63AA der α -helikale Anteil sogar um 21 % verstärkt. Ob sich der helikale Anteil in UBXD1 1-133 dort verstärkt, wo die Mutation eingefügt worden ist (Ende H3) oder in H1/H2 (zweiter Bereich mit Shifts), kann mittels CD-Spektroskopie nicht ermittelt werden. Die Dispersion der NMR-Signale in einem ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum von UBXD1 1-133 RL62/63AA zeigt jedoch Shifts vieler Signale aus H3 zu niedrigeren H_N-Werten, was auf eine Verstärkung des α -helikalen Anteils in H3 hindeutet. Demnach könnten die Shifts der RL62/63AA-Mutante auch auf die strukturellen Änderungen in H3 zurückzuführen sein, während die Shifts der DI11/12AA lediglich auf die Änderungen der chemischen Umgebung beruhen.

Obwohl die Signal-Dispersion in dem ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektrum von UBXD1 1-133 sehr schwach ist, weisen die Mutationsstudien auf definierte Interaktionsbereiche zwischen den Sekundärstrukturelementen hin. Daher wurden weitere Experimente zur Überprüfung der Flexibilität des N-Terminus von UBXD1 1-133 durchgeführt. Die Trp-Fluoreszenz-Schmelzkurve ergab, dass das Trp 71 nicht in eine rigide Struktur eingebunden ist. Mit einem D₂O-Austauschexperiment konnten zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen in UBXD1 1-133 nachgewiesen werden. Es kann nicht gewährleistet werden, dass die Messungen in 100 % D₂O durchgeführt wurden, da UBXD1 1-133 beim Lyophilisieren aggregiert und nicht wieder in

Lösung geht. Daher wurde dieses Experiment durch Umpuffern durchgeführt, was aber eine 100 %ige D₂O-Lösung ausschließt. Folglich sind die beobachteten Wasserstoffbrückenbindungen auch solche, die durch Interaktionen oder der Ausbildung einer Sekundärstruktur geschützt werden. So konnten unter anderem stabile Wasserstoffbrückenbindung im Bereich der DI11/12AA-Mutation nachgewiesen werden, was den α -helikalen Charakter dieses Bereiches unterstützt. Desweiteren hat diese Mutante einen Einfluss auf einige Aminosäuren in L3, der ebenfalls zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, was die Interaktion von H2 und L3 aus den Mutationsstudien bestätigt. Zudem ist eine weitere Anhäufung von Wasserstoffbrückenbindungen in H3 zu beobachten, die das bereits bekannte VIM-Motiv enthält und damit dessen strukturelle Integrität bestätigt. Auch in H4 sind zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen, jedoch weisen diese entlang der Sequenz einige Lücken auf, was auf eine instabile Helix hindeutet. Betrachtet man anschließend die Wasserstoffbrücken-ausbildenden Aminosäuren in einer Wheel-Projektion, liegen diese alle auf einer Seite der Helix, was auf eine Interaktion mit einem anderen Bereich von UBXD1 1-133 hindeutet (Abb. 75).

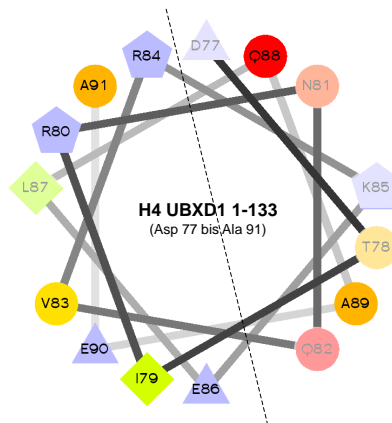


Abb. 75 Wheelprojektion von H4 von UBXD1 1-133. Die meisten der Wasserstoffbrücken-ausbildenden Aminosäuren befinden sich auf einer Seite der Helix (links der gestrichelten Linie). Aminosäuren ohne Wasserstoffbrückenbindungen sind transparent.

Entgegen den Vorhersagen eines unstrukturierten C-Terminus besitzt dieser zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen. Durch die Mutationsstudien kann ausgeschlossen werden, dass C mit H1/H2 oder L2/H3 wechselwirkt. Daher müssen die Wasserstoffbrücken auf die Stabilisierung einer Sekundärstruktur und/oder für die Interaktion mit einem anderen Bereich in UBXD1 1-133 zurückzuführen sein. Für die Interaktion stehen nach den Mutationsstudien noch L2 und H4 zur Verfügung. Da einige Aminosäuren in L2 aufgrund ihrer hohen Flexibilität nicht zugeordnet werden konnten, ist diese Interaktion eher unwahrscheinlich. Jedoch könnte eine Interaktion zwischen C und den Aminosäuren in H4 bestehen. Denn H4 bildet ebenfalls stabile Wasserstoffbrückenbindungen aus, die sich auf einer Seite der Helix befinden (Abb. 75). Andererseits könnten die Wasserstoffbrückenbindungen auch auf die Ausbildung eines β -Turns (Val 105 bis Ser 113) hindeuten, da ein β -Strang alleine keine stabilen Wasserstoffbrückenbindung ausbildet. Die Wasserstoffbrückenbindungen aus dem D₂O-Experiment sowie die Trp-Schmelzkurve weisen auf ein flexibles Protein hin. Um die Flexibilität hinreichend klären zu können, wurde ein hetNOE-Spektrum aufgenommen. Der hetNOE-Wert kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Eine Aminosäure gilt als rigide (wenig flexibel),

wenn sie einen hetNOE-Wert von $> +0,6$ besitzt. Für flexible Bereiche werden dementsprechend negative Werte erwartet (153). Der N-Terminus von UBXD1 1-133 ist weitestgehend flexibel (hetNOE-Werte < 0). Allerdings gibt es einen Bereich in L1 und am Anfang von H2 (Phe 8 bis Phe 14), der weniger flexibel ist. Zum einen sind in diesem Bereich einige Wasserstoffbrückenbindungen zu finden und zum anderen interagieren diese Aminosäuren in den Mutationsstudien mit L3. Analog dazu besitzt auch L3 positive hetNOE-Werte im Gegensatz zu den übrigen Linkern, was die Interaktion zwischen L1/H2 und L3 nochmals bestätigt. H3 mit dem VIM-Motiv hat die höchsten hetNOE-Werte, was die Stabilität zusammen mit den Wasserstoffbrückenbindungen bestätigt. H4 schien laut D_2O -Austauschexperiment eine instabile Helix zu sein, was auch die positiven, aber im Vergleich zu H3 niedrigeren hetNOE-Werten bestätigen. Wie schon der N-Terminus (bis Gly 47) ist auch der C-Terminus (ab Glu 90) von UBXD1 1-133 flexibel. Es gibt zwar eine leichte Tendenz Richtung Null-Werte zum Ende des C-Terminus, ein spezifischer Bereich für ein Sekundärstrukturelement oder eine Interaktion kann jedoch nicht definiert werden. Die flexiblen Bereiche von UBXD1 1-133 tragen nicht zur strukturellen Integrität des Proteins bei, was durch CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden konnte. Die Analyse der Sekundärstrukturverteilung in den CD-Spektren ergab, dass sowohl die Deletion des N-Terminus, des C-Terminus oder das Anfügen einer weiteren Helix keinen Einfluss auf die Sekundärstrukturverteilung haben. H1 bis H2 (UBXD1 1-30) sind allein jedoch eher unstrukturiert und nicht mehr helikal. Das bestätigen die Mutationsstudien und zeigt die Wichtigkeit der restlichen UBXD1-Struktur bei der Helixausbildung im äußersten N-Terminus. Bei dem Vergleich der 1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der einzelnen Konstrukte sind keine wesentlichen Shifts zu verzeichnen, was auf die Unabhängigkeit der Sekundärstrukturelemente in UBXD1 1-133 hindeutet. Obwohl UBXD1 1-133 und 1-154 die gleiche Sekundärstrukturverteilung haben, führt das Anfügen einer fünften Helix zu einigen Shifts im Bereich von H3/L3, was auf eine schwache Interaktion zwischen H3 und einer möglichen H5 aus UBXD1 1-154 hindeutet.

Die Berechnung der Tertiärstruktur von UBXD 1-133 würde Aufschluss über die Art und Lage der einzelnen Sekundärstrukturelemente zueinander geben. Dies ist für UBXD1 1-133 aufgrund der fehlenden NOESY-Signale und den daraus ermittelbaren Abstandsinformationen nicht möglich. Daher wurde als Alternative ein NMR-Resonanzen-basiertes Strukturmodell mit cs23d erstellt. In diesem Modell ist lediglich der Bereich um das VIM-Motiv α -helikal strukturiert (14 % α -Helix, 86 % random coil). In der übrigen Struktur sind aber zusätzlich zahlreiche Windungen zu erkennen, die den Ansatz von Helices andeuten könnten, aber offensichtlich nicht ausgebildet werden. Diese Struktur (mit Ausnahme der Helix mit VIM-Motiv) widerspricht den Ergebnissen der Mutationsstudien, dem D_2O -Austausch-Experiment und den Sequenz-basierten oder CD-spektroskopischen Vorhersagen der Sekundärstrukturanteile (48 % α -Helix, 33 % random coil). Diese Abweichungen zwischen den experimentellen Ergebnissen und dem Strukturmodell könnten darauf zurückzuführen sein, dass die gefundenen Sequenzfragmente mit der BLAST-Suche hauptsächlich aus strukturierten Proteinen kommen, da die PTT-DB nicht auf unstrukturierte Proteine ausgerichtet ist. Damit würde es im weiteren Verlauf der Rechnung zu Differenzen zwischen den eingelesenen NMR-Shifts und denen der gesuchten Sequenzfragmente

geben. Für die Berechnung der Torsionswinkel wird ebenfalls eine Datenbank herangezogen, die nicht auf flexible Proteine ausgerichtet ist. Desweiteren ist die Zuordnung des Proteinrückgrats lückenhaft, sodass cs23d die Lücken eigenständig durch Modelling füllt. Aufgrund des unzureichenden Modells mit cs23d für UBXD1 1-133 wurde ein weiteres Strukturmodell mit YASARA erstellt. Dieses besitzt deutlich mehr Sekundärstrukturanteile (58 % α -Helix, 42 % random coil). Da Helix 2 und 3 aus dem Strukturmodell von UBXD1 1-133 in der Wishart-Analyse zu einer Helix (H2) zusammengefasst werden, befinden sich im Modell am vorderen N-Terminus drei statt der zwei Helices aus der Wishart-Analyse (Abb. 76). Helix 4 aus dem Strukturmodell ist vergleichbar mit H3 mit dem VIM-Motiv aus der Wishart-Analyse und dem cs23d-Strukturmodell. Anders als die Sekundärstrukturvorhersagen besitzt das Strukturmodell keine β -Stränge, sodass der C-Terminus von UBXD1 1-133 statt des kurzen β -Stranges eine α -Helix besitzt (Ser 106 bis Ser 113). Entsprechend des D_2O -Austauschexperiments könnte sich in dem C-terminalen Bereich mit den zahlreichen Wasserstoffbrückenbindungen statt des β -Turns entgegen der Sekundärstrukturanalysen auch eine fünfte α -Helix ausbilden. Die durch das D_2O -Experiment postulierte Interaktion zwischen H4 und S1 (im Strukturmodell: H5 und H6) wird zudem durch die räumliche Nähe der beiden Sekundärstrukturen im Strukturmodell bekräftigt. Andererseits stimmt das Strukturmodell nur ungenügend mit den Mutationsstudien überein. So befindet sich der Anfang von H2 und das Ende von H3 in ausreichender Nähe, um entsprechende Shifts der Mutanten in einem 1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zu bewirken, jedoch ist der Abstand von H2 zu L3 mit 16 Å zu groß, um Wasserstoffbrücken in diesem Bereich auszubilden. Umgekehrt befindet sich RQ45/46AA, deren Mutation in Sequenz-fernen Regionen keine Shifts verursacht, zu dicht (5 Å) am Ende von H2, sodass man hier Shifts in einem 1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum erwarten würde. Insgesamt jedoch ist das Strukturmodell von UBXD1 1-120 ein flexibles Protein ohne kompakten Kern, was mit den fehlenden Abstandssignalen in den 2D- und 3D-NOESY-Spektren übereinstimmt. Zusammenfassend lässt sich anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse für UBXD1 1-133 folgendes Modell ableiten (Abb. 76, B).

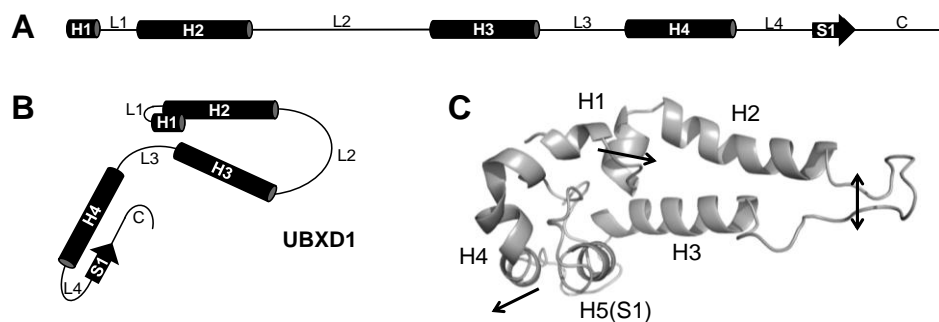


Abb. 76 Modelle zur Struktur des N-Terminus von UBXD1. A: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz aus der Wishart-Analyse (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). B: hypothetisches Modell zur Anordnung der Sekundärelemente anhand der experimentelle Daten. C: MD-simuliertes Strukturmodell von UBXD1 1-133 mit YASARA.

Das Strukturmodell (Abb. 76, C) weist eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Modell aus den Ergebnissen aus dieser Arbeit auf (Abb. 76, B). Jedoch müsste die Struktur insgesamt weniger kompakt gefaltet sein. Dazu müsste der C-Terminus einschließlich ab H4 weniger in die Struktur

eingebunden sein, der Loop zwischen H2 und H3 dürfte keine räumliche Nähe aufweisen und H1 dürfte nicht in Reihe sondern parallel zu H2 liegen (Pfeile in Abb. 76, C).

Anhand des Modells könnte es sich bei dem N-Terminus von UBXD1 um ein intrinsisch ungeordnetes Protein (IDP, *intrinsically disordered protein*) bzw. im Gesamt-UBXD1 um eine intrinsisch ungeordnete Region (IDR, *intrinsically disordered region*) handeln. IDPs kommen häufiger in Eukaryonten (27-41 %) als in Prokaryonten (2-21 %) vor, was unter anderem deren Funktion in Regulation und *signaling* unterstützt (154). Bei IDPs führen die geringe Hydrophobizität und die hohe Ladungsdichte zu starken elektrostatischen Abstoßungskräften und weniger kompakten Strukturen (155). Der N-Terminus von UBXD1 besteht zu 26 % aus geladenen Aminosäuren und hat einen GRAVY-Index von -0,816 (Hydrophobizitätsindex). Die geringe Hydrophobizität ist auch meist einhergehend mit einer hohen Hydratisierung durch die weniger kompakte Struktur. Desweiteren ist der Anteil an *disorder*-fördernden Aminosäuren (Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys und Pro) in UBXD1 1-133 höher (68 %) als jener der *order*-fördernden Aminosäuren (Ile, Leu, Val, Trp, Tyr, Phe, Cys und Asn; 21 %) (156–158). Im Gegensatz zu zahlreichen anderen IDPs besitzt der N-Terminus von UBXD1 keine Anhäufung von β -Faltblättern (159), sondern besteht zu 48 % aus α -Helices. Desweiteren besitzen die Atome von IDPs in der Regel keine festen Positionen, was auch für UBXD1 1-133 zutrifft und sich unter anderem in den fehlenden NOE-Signalen in den NOESY-Spektren äußert (160). Da der N-Terminus von UBXD1 zwar Sekundärstrukturelemente aufweist, diese aufgrund der fehlenden NOE-Signale jedoch keine feste Position haben, handelt es sich bei UBXD1 1-133 wahrscheinlich um ein sogenanntes *pre-molten globule like*-Protein. Typisch für IDPs sind auch die spezifische Bindung seines Bindepartners mit einer relativ schwachen Affinität (156; 161). Die Spezifität für den N-Terminus von UBXD1 wird durch fehlende Bindung anderer Proteine außer p97 bestätigt. Die Bindung erfolgt dabei oft über kurze Motive wie dem VIM-Motiv (162–164), das lediglich aus 12 Aminosäuren besteht. Die schwache Affinität zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und p97 von 20 μ M ermöglicht eine reversible Bindung dieser beiden Interaktionspartner und dadurch eine Funktion in der Regulation von p97. Oftmals sind IDPs aufgrund ihrer regulatorischen Funktion auch in der Ausbildung von Krankheiten involviert, wie es unter anderem auch für UBXD1 bekannt ist (49). Die Bindung des Interaktionspartners führt in vielen IDPs zur Faltung und Umstrukturierung (156; 165; 166). Dabei werden häufig α -Helices gebildet, was für den N-Terminus von UBXD1 jedoch weder ausgeschlossen noch bestätigt werden kann. Die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration lassen vermuten, dass auch UBXD1 1-133 einer Umstrukturierung bei Bindung der Np97 unterliegt, da der Peak für den Komplex aus UBXD1 1-133 und Np97 ein geringeres Elutionsvolumen hat als man für einen Komplex aus zwei globulären Proteinen dieser Größe erwarten würde. Desweiteren haben IDPs häufig posttranslationale Modifikationen, was für das Ser 96 von UBXD1 bereits gezeigt werden konnte (167). Zudem besitzen die Bindungen von IDPs häufig schnelle Kinetiken (hohe k_{on} - und k_{off} -Raten) und die Strukturen werden oft durch Metallionen beeinflusst, was im Rahmen dieser Arbeit für den N-Terminus von UBXD1 jedoch nicht untersucht worden ist (168; 169). Da es sich hierbei um den isolierten N-Terminus von UBXD1 handelt, kann die Bezeichnung IDP verwendet werden. Im gesamten UBXD1 würde man den unstrukturierten N-Terminus als IDR bezeichnen.

4.2. DER N-TERMINUS VON UBXD1 INTERAGIERT MIT DER N-DOMÄNE VON P97

Interaktion UBXD1 mit Np97: UBXD1-bindende Bereiche

Wie bereits bekannt ist, interagiert UBXD1 sowohl mit der PUB-Domäne als auch über das VIM-Motiv im N-Terminus mit p97 (112; 122). Während die PUB-Domäne an den C-Terminus von p97 bindet, interagiert das VIM-Motiv mit der N-Domäne von p97 (75; 101; 112; 113; 122). Im Rahmen dieser Arbeit soll über das VIM-Motiv hinaus die Bindung des gesamten N-Terminus von UBXD1 an p97 untersucht werden. Die NMR-Titration und die Anisotropie-Messung von UBXD1 1-133 mit Np97 zeigen zwei interagierende Bereiche. Der eine Bereich befindet sich im N-Terminus von UBXD1 1-133 (H1/H2) und bindet mit einer schwachen Affinität von 580 μM . Der zweite Bereich enthält das bereits bekannte VIM-Motiv (H3) und bindet mit einer Affinität von 10 μM . Eine Interaktion zwischen der N-Domäne und den ersten beiden Helices von UBXD1 1-133 (H1/H2) ist noch unbekannt. Dabei scheint aufgrund der kleinen Shifts in H1 die Bindung mit H2 stärker und damit auch wichtiger für die Interaktion mit der N-Domäne zu sein. Die mit Np97 interagierenden Aminosäuren in H2 liegen in einer Wheel-Projektion auf einer Seite der Helix und haben eine zum VIM-Motiv vergleichsweise schwache Affinität, sodass wahrscheinlich nur diese Seite der Helix an der Interaktion mit Np97 beteiligt ist (Abb. 77).

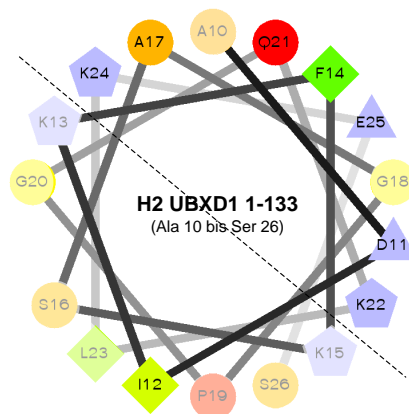


Abb. 77 Wheelprojektion von H2 von UBXD1 1-133. Die meisten der mit Np97 interagierenden Aminosäuren befinden sich auf einer Seite der Helix (oberhalb der gestrichelten Linie). Aminosäuren ohne Interaktion mit Np97 sind transparent.

Desweiteren konnte die Interaktion des VIM-Motivs (H3) von UBXD1 mit Np97 bestätigt werden. Das VIM-Motiv für UBXD1 ist definiert von Ala 52 bis Arg 62 mit dem Ala 52 statt des konservierten Arginins am Anfang des Motivs (111; 112). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass an der Interaktion mit Np97 weitaus mehr Aminosäuren beteiligt sind (Arg 45 bis Trp 71). So befinden sich N-terminal (7 weitere AS) als auch C-terminal (8 weitere AS) von der Konsensussequenz für das VIM-Motiv mit Np97 interagierende Aminosäuren. Diese zusätzlichen Aminosäuren sind vorwiegend hydrophil (40 %) und geladen (30 %). Besonders geladene Aminosäuren wie Arg und Glu besitzen hohe Affinitäten ($K_D < 2,5 \mu\text{M}$ aus der NMR-Titration), was auf die Ausbildung ionischer Wechselwirkungen mit Np97 hinweist. Die affinen Randbereiche des VIM-Motivs könnten den Ausgleich für das nicht konservierte Arg in der VIM-Sequenz von UBXD1 bilden und somit die Bindung in die hydrophobe Tasche zwischen den beiden Subdomänen der N-Domäne von p97 begünstigen.

Damit wird eine Bindung an Np97 ermöglicht, fällt jedoch schwächer als für andere VIM-Motiv-enthaltene Kofaktoren aus (Tab. 24, (112)).

Tab. 24 Affinitäten für das VIM-Motiv verschiedener p97-Kofaktoren. aus (112).

Kofaktor	K_D [μ M]
gp78	0,021
SVIP	6
VIMP	n. b.
ANKZF1	0,016
UBXD1	3
ZFAND2b	n. b.

Die interagierenden Aminosäuren aus H2 von UBXD1 1-133 sind auch häufig geladen (Lys) und könnten ebenfalls zur Stabilisierung der Bindung zwischen UBXD1 1-133 und Np97 beitragen. Für die Interaktion zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und Np97 scheint zudem eine bestimmte Struktur und Flexibilität des N-Terminus von UBXD1 von Bedeutung zu sein, da mit Biolayer Interferometrie-Experimenten mit immobilisierten UBXD1 1-150 nur eine sehr schwache Bindung (K_D : 50 μ M) mit Np97 gemessen werden konnte (112).

Desweiteren wurde der Einfluss einiger Mutanten in UBXD1 1-133 auf die Bindung mit Np97 untersucht. Dabei haben einige Mutationen zwar strukturelle Auswirkungen, jedoch nur einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Bindung der N-Domäne von p97. So konnte festgestellt werden, dass zwischen DI11/12 (H2) und L3 eine Interaktion besteht. Eine Mutation dieser Aminosäuren führt jedoch nur zur Abschwächung der Bindung in H2 und hat keine Auswirkung auf die Bindung von H3 (VIM) oder L3 an Np97. Im Gegensatz dazu hat die Mutation von QK21/22AA strukturell keinen wesentlichen Einfluss auf den restlichen N-Terminus von UBXD1, aber dennoch wird die Interaktion von Np97 mit H2 deutlich abgeschwächt. Die Mutation in L2 (RQ45/46AA) führt weder zu einer Beeinflussung der strukturellen Integrität von UBXD1 1-133 noch der Bindung von Np97. Im Gegensatz zu den übrigen Mutationen handelt es sich hierbei auch um eine Linkerregion, während die übrigen Mutationen in α -helikalen Bereichen liegen. Die Mutation des VIM-Motivs (RL62/63AA) führt zum Verlust der Bindung von H3 und zu einer veränderten Bindung von H1/H2. Die Markierung der interagierenden Aminosäuren auf dem hier verwendeten Strukturmodell des Wildtyps ist dabei fragwürdig, da eine MD-Simulation des Strukturmodells der Mutante zum Kollaps des Proteins führt (Daten nicht gezeigt). Dennoch wird für die Sekundärstrukturverteilung ein erhöhter α -helikaler Anteil vorhergesagt. Damit ist die Inhibition der Bindung des VIM-Motivs in H3 durch die Zerstörung der Helix durch die eingefügten Mutationen unwahrscheinlich. Mit den Mutationsstudien konnte somit die Unabhängigkeit der beiden Bindestellen von UBXD1 1-133 (H1/H2 und H3) bestätigt werden. Einen ähnlichen Bindemechanismus besitzt auch das VIM-Motiv-enthaltene SVIP, einem weiteren p97-Kofaktor, der zusätzlich eine Bindestelle im N-Terminus besitzt, die für die Bindung der N-Domäne inklusive ND1-Linker notwendig ist (65).

Wie bereits erwähnt, haben die verschiedenen UBXD1-Konstrukte keinen wesentlichen Einfluss auf die strukturelle Integrität des N-Terminus von UBXD1. Analog dazu scheint auch die

Veränderung der Helix-Zusammensetzung von UBXD1 keinen starken Einfluss auf die Bindung von H3 mit dem VIM-Motiv zu haben, wohingegen die Bindung von H1/H2 durch Verkürzen (1-80) oder Verlängern (1-154) des Konstruktes abgeschwächt wird. Damit scheinen sowohl stabilisierende Effekte (fallen bei 1-80 weg) als auch eine ausreichende Flexibilität (wird bei 1-154 eingeschränkt) des N-Terminus für die Bindung von H1/H2 von Bedeutung zu sein.

Interaktion UBXD1 mit Np97: Np97-bindende Bereiche

Für die Studien zur Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und Np97 wurde die N-Domäne von p97 separat ohne die D1-/D2-Domänen exprimiert und gereinigt. Die Zuordnung des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums ist mit 85 % unvollständig. Ein Großteil der nicht zugeordneten Aminosäuren befindet sich N-terminal im Linker zum 6xHis-Tag und in Np97 zwischen Lys 19 und Glu 30. Ansonsten liegen die nicht zugeordneten Aminosäuren vereinzelt, sodass im Groben die gesamte Oberfläche von Np97 mit zugeordneten Aminosäuren abgedeckt wird.

Die Zuordnung der Signale des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums von Np97 erfolgte unter anderem durch Übertragung von einem bereits publizierten Spektrum, welches in 50 mM Natriumazetat bei einem pH von 5,0 aufgenommen wurde (98). Das Spektrum im Rahmen dieser Arbeit wurde mit 50 mM KPi-Puffer bei einem pH von 6,5 aufgenommen. Trotz dieser Unterschiede waren nur geringe Verschiebungen in dem HSQC-Spektrum zu erkennen, sodass 111 Signale übertragen werden konnten. Die geringen Veränderungen in dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum trotz unterschiedlicher Bedingungen sprechen für eine hohe Stabilität und die rigide Struktur von Np97 auch in Abwesenheit der D1D2-Domäne von p97.

Es ist bereits bekannt, dass das VIM-Motiv von UBXD1 mit der N-Domäne von p97 interagiert (75; 111; 112; 122). Die NMR-Titrationsstudien dieser Arbeit haben gezeigt, dass der N-Terminus von UBXD1 neben der VIM-Furche auch den Linker zur D1-Domäne bindet. Die Interaktion des VIM-Motivs mit der VIM-Furche wurde bereits für gp78 mittels Röntgenstrukturanalyse beschrieben (Kap. 1.1.5; (112)). Desweiteren wurden auch Mutationsstudien in der VIM-Furche von Np97 durchgeführt, um die an der Interaktion mit einem VIM-Peptid von UBXD1 beteiligten Aminosäuren zu identifizieren (Abb. 78, A). Entsprechend der Veröffentlichung von Hänzelmann *et al.* wäre zu vermuten, dass die mit VIM-UBXD1 interagierenden Aminosäuren beidseitig der VIM-Furche liegen. Die Titration von Np97 mit dem gesamten N-Terminus von UBXD1 zeigt jedoch eine eher linksseitige Bindung in die VIM-Furche. Desweiteren sind in der Studie von Hänzelmann *et al.* Asp 35, Ile 70 und Leu 72 als wichtige, an der Interaktion mit dem VIM-Peptid beteiligte Aminosäuren klassifiziert worden. Diese Aminosäuren zeigen jedoch keine Interaktion mit dem N-Terminus von UBXD1 1-80 (Abb. 78, B), was auf die Verwendung eines Peptids zurückgeführt werden kann.

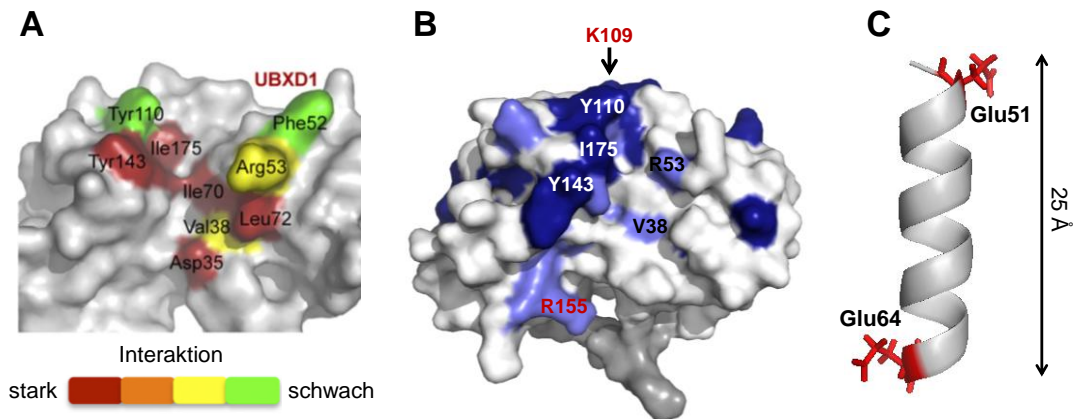


Abb. 78 Interagierende Aminosäuren von Np97 mit dem N-Terminus von UBXD1. A: aus (112). An der Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und Np97 beteiligte Aminosäuren der N-Domäne von p97. Ermittelt durch Mutationsstudien. Die Farbe der jeweiligen Aminosäure zeigt ihre Wichtigkeit bei der Interaktion mit UBXD1 1-133 an. B: Np97-Strukturmodell mit den mit UBXD1 interagierenden Aminosäuren aus dieser Arbeit (blau: stark interagierende AS, hellblau: schwach interagierende AS, weiß/grau: keine Interaktion). C: VIM-Helix aus dem N-Terminus von UBXD1 mit den zwei flankierenden Glutamaten (rot).

Desweiteren wurde die strukturelle Integrität der N-Domäne nicht nachgewiesen, sodass der Austausch einzelner Aminosäuren auch zu strukturellen Änderungen führen könnte. Damit wäre die Ursache für eine andere Bindung des VIM-Motivs die veränderte Struktur und nicht zwangsweise die einzelne mutierte Aminosäure (ähnliche Studie siehe auch (111)). An der Bindung des VIM-Motivs des N-Terminus von UBXD1 in die VIM-Furche von Np97 sind insgesamt 18 Aminosäuren beteiligt, wobei davon nur drei geladene Aminosäuren (Lys 109, Glu 141 und Arg 155) involviert sind. Die basischen Aminosäuren Lys 109 und Arg 155 befinden sich am oberen und unteren Ende der Furche (Abb. 78, B, rote AS). Diese könnten zusammen mit den geladenen flankierenden Aminosäuren des VIM-Motivs Glu 51 und Glu 64 von UBXD1 1-133 ionische Wechselwirkungen eingehen und somit die Bindung der VIM-Helix (H3) am oberen und unteren Ende der VIM-Furche in Np97 stabilisieren (Abb. 78, C). Der Abstand zwischen dem Lys 109 und dem Arg 155 beträgt in der Kristallstruktur 30 Å, die Länge der VIM-Helix von UBXD1 25 Å. Wenn man davon ausgeht, dass Lys 109 und Arg 155 in Lösung beweglicher sind als in der Kristallstruktur, wäre eine Bindung zwischen diesen Resten auch vom Abstand her möglich. Das Arg 155 von Np97 ist unter anderem auch an der Interaktion zwischen der N- und der D1-Domäne (Asn 387) während des ATP-Hydrolyse-Zyklus beteiligt (Kap. 1.1.3, Abb. 79).

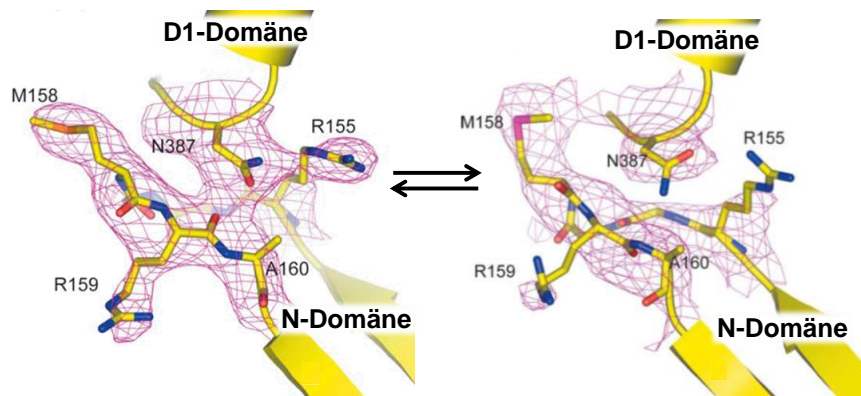


Abb. 79 Kontaktstelle zwischen Np97 und D1p97 während des ATPase-Zyklus von p97. aus (53). Die ab-Konformation der N-Domäne von p97 wird während des ATP-Hydrolyse-Zyklus von p97 durch eine Salzbrücke zwischen dem Arg 155 der N-Domäne und dem Asn 387 der D1-Domäne stabilisiert.

Neben dem Arg 155 sind auch Arg 95, Gly 157 und Arg 159 an der Bindung zwischen der N-Domäne und der D1-Domäne beteiligt, mit denen der N-Terminus von UBXD1 nicht interagiert. Dennoch ist aufgrund der VIM-Helix von UBXD1 eine sterische Hinderung der Interaktion zwischen der N- und der D1-Domäne zu erwarten.

Neben der VIM-Furche interagiert der N-Terminus von UBXD1 auch mit dem Linker zur D1-Domäne (Gly 186 bis Gly 208). Dieser Teil der Interaktion zwischen Np97 und dem N-Terminus von UBXD1 ist noch nicht beschrieben worden. Durch die Bindung von Aminosäuren des Linkers (Arg 191 und Glu 195) und der N-Domäne (Val 87 und Arg 93) durch den N-Terminus von UBXD1 wird die Interaktion zwischen diesen beiden Strukturen verhindert (53). Desweiteren dienen Gly 186 und Gly 208 als Drehpunkte für die Bewegung der N-Domäne während des ATPase-Zyklus (2). Der N-Terminus von UBXD1 bindet das Gly 186 (das Gly 208 ist nicht in dem getesteten Konstrukt enthalten) und schränkt damit die Bewegung der N-Domäne durch Einschränkung eines seiner Drehpunkte ein. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich während des ATP-Hydrolyse-Zyklus im Linker zwischen der N- und D1-Domäne von p97 zeitweilig eine kurze Helix zwischen Arg 191 und Asp 200 ausbildet (Abb. 80, (43)).

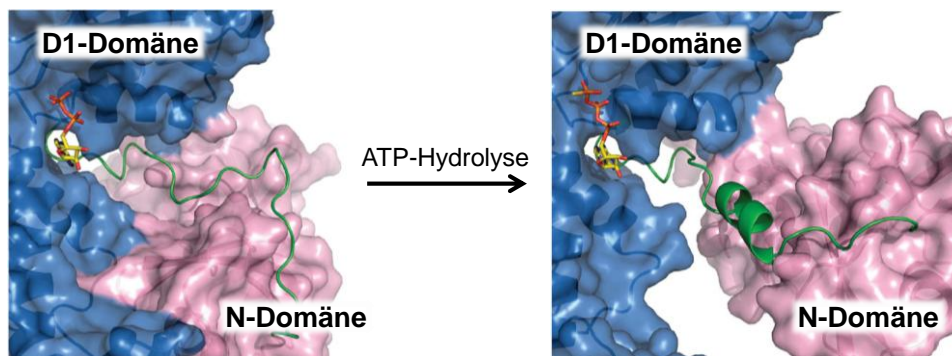


Abb. 80 Zeitweilige Helix im ND1-Linker. aus (43). Während des ATP-Hydrolyse-Zyklus bildet sich zeitweilig eine kleine Helix im ND1-Linker aus, die die auf- und ab-Bewegung der N-Domäne begünstigt.

Der N-Terminus von UBXD1 bindet das in diesem Bereich liegende Arg 191 und Glu 195, was wahrscheinlich die Ausbildung dieser Helix während eines ATPase-Zyklus verhindern würde. Damit würde es zu einer weiteren Einschränkung der Flexibilität der N-Domäne, die für den ATP-Hydrolyse-Zyklus notwendig ist, kommen (Kap. 1.1.3). Die Bindung des Linkers zwischen der N- und der D1-Domäne von p97 ist bereits für den Kofaktor SVIP beschrieben worden (112). Bei SVIP führt der Linker sogar zu einer verbesserten Bindung an die N-Domäne von p97. Affinitätsmessungen mit Fluoreszenz-Anisotropie deuten jedoch darauf hin, dass für den N-Terminus von UBXD1 ein anderer Bindemechanismus vorliegt.

Desweiteren konnte mit der VIM-Mutante von UBXD1 (1-80 RL62/63AA) unterschieden werden, welche Bereiche von UBXD1 (H1/H2 und H3) in die VIM-Furche und welche den ND1-Linker von p97 binden. Wie bereits gezeigt werden konnte, findet bei der VIM-Mutante von UBXD1 zwischen dem VIM-Motiv und der VIM-Furche von Np97 keine Bindung mehr statt (Kap. 3.3). Bei der Titration von Np97 mit der VIM-Mutante waren im Bereich der VIM-Furche von Np97 nur noch kleine Veränderungen einzelner Aminosäuren zu sehen. Das Wegfallen der interagierenden Aminosäuren der VIM-Furche deutet auf einen Verlust der Bindung zwischen dem VIM-Motiv in UBXD1 und der VIM-Furche von Np97 hin. Die Aminosäuren im Linker zur

D1-Domäne von Np97 interagierten weiterhin mit der VIM-Mutante. Das deutet darauf hin, dass H1/H2 von UBXD1 1-80 mit dem ND1-Linker interagieren. Desweiteren sind im Vergleich zum Wildtyp einige zusätzliche interagierende Aminosäuren zu beobachten. Diese könnten durch die leicht veränderte Bindung von H1/H2 der VIM-Mutante entstehen (Kap. 3.3), was wahrscheinlich auf eine veränderte Sekundärstruktur zurückzuführen ist (siehe CD-Spektroskopie). Eine Titration von Np97 mit einem UBXD1-Konstrukt, das weder H1/H2 noch ein intaktes VIM-Motiv besitzt (32-133 RL62/63AA), ergab keine signifikante Bindung zu Np97. Somit konnten weitere Bindungsregionen zwischen Np97 und dem N-Terminus von UBXD1 ausgeschlossen werden.

Damit bindet der N-Terminus (H1/H2) von UBXD1 1-133 schwach (580 μM) an den ND1-Linker von Np97 und das VIM-Motiv (H3) von UBXD1 1-133 stark (10 μM) in die VIM-Furche von Np97. Allerdings hat die strukturelle Charakterisierung von UBXD1 1-133 ergeben, dass zwischen H1/H2 und H3 eine Interaktion besteht. Bei einer solchen Konformation könnte UBXD1 jedoch nicht gleichzeitig mit der VIM-Furche und dem ND1-Linker interagieren. Daher ist davon auszugehen, dass UBXD1 1-133 seine Konformation während der Bindung an Np97 ändert, wie es für IDPs oder IDRs üblich ist (Kap. 4.1). Ein mögliches Modell zur Bindung von UBXD1 1-133 an die N-Domäne, das in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen steht, könnte wie folgt aussehen (Abb. 81).

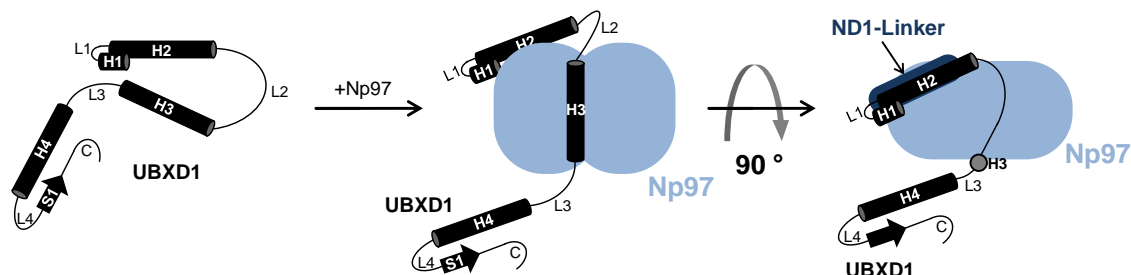


Abb. 81 Modell zur Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und Np97. Während der Bindung an Np97 unterliegt UBXD1 1-133 einer Umstrukturierung, was für IDPs/IDRs üblich ist. Links: UBXD1 1-133 in Lösung. Mitte: Bindung von UBXD1 1-133 an Np97 mit Blick auf die VIM-Furche. Rechts: Bindung von UBXD1 1-133 an Np97 mit Blick auf den Linker zwischen der N- und der D1-Domäne von p97.

Entsprechend dieses Modells (Abb. 81) wäre die Interaktion zwischen H1/H2 und L3 in UBXD1 1-133 eine stabilisierende Interaktion des unstrukturierten N-Terminus von UBXD1. Bei Zugabe von Np97 kommt es dann zum Verlust dieser Interaktion und zur Bindung der N-Domäne und dem ND1-Linker von p97.

4.3. DIE PHOSPHAT-PINZETTE VERSCHLECHTERT DIE BINDUNG VON Np97 UND UBXD1 1-133

Als *proof of principle* sollte in einem ersten Versuch die Interaktion zwischen der N-Domäne von p97 und dem N-Terminus von UBXD1 durch ein Werkzeug der supramolekularen Chemie verhindert werden. Dazu wurde auf eine Lysin- und Arginin-bindende Phosphat-Pinzette zurück gegriffen. Die N-Domäne von p97 besitzt 14 Lysine und 16 Arginine, von denen jedoch nicht alle

durch die Phosphat-Pinzette gebunden werden. Zum einen, weil einige Lysine und Arginine im Inneren der Struktur liegen und für die Pinzette nicht zugänglich sind. Zum anderen können einige Lysine und Arginine zwar an der Oberfläche von Np97 liegen, jedoch ist deren Seitenkette in die Ausbildung einer Salzbrücke involviert, was ebenfalls die Bindung der Pinzette verhindern würde. Desweiteren muss die Seitenkette des Lysins oder Arginins frei liegen, damit die Phosphat-Pinzette binden kann, ansonsten kommt es zu sterischen Einschränkungen durch benachbarte Aminosäuren. Somit lassen sich mittels NMR-Titration sechs Bereiche auf der Oberfläche der N-Domäne von p97 bestimmen, die ein Lysin oder Arginin besitzen und an deren Seitenkette die Phosphat-Pinzette gebunden haben könnte. Die Stöchiometrie von sechs Pinzetten und einem Np97 Moleküle konnte auch durch ITC-Studien bestätigt werden. Die mit der Pinzette interagierenden Bereiche von Np97 liegen auf der Seite mit dem ND1-Linker gegenüberliegend von der VIM-Furche. Damit sind die Lysine und Arginine der VIM-Furche offensichtlich sehr schlecht zugänglich für die Pinzette. Es gibt einen Bereich am unteren Ende der VIM-Furche, der eine Anhäufung shiftender Aminosäuren enthält. In diesem Bereich befindet sich jedoch weder ein Lysin noch ein Arginin, das die richtige Bindung der Pinzette vermitteln könnte. Aber dafür befinden sich in diesem Bereich positiv geladene Aminosäuren (Glu, Asp), die eine unspezifische Bindung der Pinzette über die negative Ladung der Phosphationen vermitteln könnten. Desweiteren handelt es sich bei dem Strukturmodell um eine Kristallstruktur, sodass in Lösung die Position des N-Terminus der N-Domäne bzw. des ND1-Linkers abweichen könnte. Somit könnte über diese flexiblen Bereiche ein Lysin oder Arginin in die Nähe der VIM-Furche gebracht werden, was die Shifts verursachen würde. Die Lysine und Arginine auf der, der VIM-Furche gegenüberliegenden Seite sind offenbar besser für die Phosphat-Pinzette zugänglich. Hier liegen die möglichen sechs Bindungsstellen für die Phosphat-Pinzette. Jeder dieser Bereiche besitzt ein Lysin oder Arginin. Aufgrund der hohen Elektronendichte in dem Ringsystem der Phosphat-Pinzette, reagieren auch die umliegenden Aminosäuren auf die Anwesenheit der Pinzette, was in der Veränderung der Signale sowohl in der Position als auch in ihrer Intensität in dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zu sehen ist. Entgegen der höheren Affinität der Phosphat-Pinzette zu Lysinen als zu Argininen (152), scheint die Phosphat-Pinzette vorwiegend Arginine von Np97 zu binden (vier Arginine vs. zwei Lysine). Was zum einen daran liegen kann, dass mehr Arginine Oberflächen-exponiert vorliegen und zum anderen sind die Lysine wahrscheinlich stärker in die Struktur der N-Domäne eingebunden. Die ITC-Studien haben gezeigt, dass die freie Bindungsenthalpie einer Pinzette ΔG -7,2 kcal/mol für die Bindung an Np97 beträgt. Der Entropieterm hat einen Wert von 57 kcal/mol und der Enthalpieterm einen Wert von -64 kcal/mol. Damit ist die Bindung zwischen der Pinzette und Np97 eine enthalpiegetriebene Bindung, was auf eine ionische Bindung hinweist und eine reine hydrophobe Interaktion ausschließt. Außerdem konnte eine Affinität von 6 μM pro Phosphat-Pinzette ermittelt werden, die mit freien Aminosäuren vergleichbar ist (152).

Nach Evaluierung der Bindung zwischen der Phosphat-Pinzette und der N-Domäne von p97 wurde eine Titration von UBXD1 1-133 mit dem Np97-Pinzetten-Komplex durchgeführt. Wie bereits erwähnt interagiert der N-Terminus von UBXD1 mit der VIM-Furche von Np97 und dem ND1-Linker. Die Pinzette zeigt sowohl eine schwache Interaktion im unteren Bereich der VIM-

Furche sowie dem ND1-Linker. Demzufolge ist die Affinität zwischen UBXD1 1-133 und Np97 in Anwesenheit der Phosphat-Pinzette um den Faktor 27 schlechter. Damit konnte die Funktion der Phosphat-Pinzette, die spezifische Bindung von Lysinen und Argininen, erfolgreich bestätigt werden (170; 171).

4.4. DER N-TERMINUS VON UBXD1 INTERAGIERT MIT DER D1D2-DOMÄNE VON P97

Die N-Domäne von p97 bindet den N-Terminus von UBXD1 über die hydrophobe VIM-Furche. Die VIM-Furche befindet sich bei einer ab-Konformation der N-Domäne in räumlicher Nähe zur D1-Domäne. Dabei kann auch eine Salzbrücke zwischen dem Arg 155 der N-Domäne und dem Asn 387 der D1-Domäne gebildet werden (Kap. 4.2). Demzufolge könnte UBXD1 sowohl die N-Domäne als auch die D1-Domäne bei einer ab-Konformation der N-Domäne binden. Diese mögliche Bindung wurde mit einem D1D2-Konstrukt untersucht. Der Expressionstest von GST-D1D2 zeigt, dass bereits ohne Induktion eine Expression stattfindet. Diese permanente Expression könnte auf Mutationen im Promotor des Vektors zurückzuführen sein. Da GST-D1D2 bei den entsprechenden Bedingungen jedoch ausreichend und löslich exprimiert werden kann, wurde das DNA-Konstrukt dennoch verwendet. Die D1D2-Domäne besitzt eine Größe von 67 kDa, die auch ohne N-Domäne selbst bei Niedrigsalzbedingungen sehr stabil ist. Diese Stabilität wird unter anderem wahrscheinlich durch die Multimerisierung begünstigt. Da die Multimerisierung hauptsächlich durch interprotomere Kontakte zwischen den benachbarten D1-Domänen erfolgt (2; 43; 52), müsste die D1D2-Domäne wie p97 als Hexamer vorliegen. Die analytische Gelfiltration der D1D2-Domäne zeigt jedoch neben der hexameren auch eine trimere Form. Die Abweichung der Hexamer-Größe in der analytischen Gelfiltration von der tatsächlichen Größe ist wahrscheinlich auf die Ausbildung eines ringförmigen Komplexes zurückzuführen. Dieser hat einen größeren hydrodynamischen Radius als ein globuläres Protein, das zur Kalibration verwendet wurde. Daraus ergibt sich eine verkürzte Laufzeit. Der relativ geringe Anteil an D1D2-Hexamer in der analytischen Gelfiltration erklärt auch die mit p97 vergleichsweise geringe ATPase-Aktivität, die nur bei Hexameren zu beobachten ist (2; 50; 52; 54; 118). Das Vorliegen einer trimeren/dimeren Form von p97 bzw. der D1D2-Domäne ist noch nicht beschrieben worden, jedoch ist sie häufig in Einheitszellen in Kristallen von p97-Konstrukten zu beobachten (PDB-ID: 4K08, 3HU3, 3CF1). Bei der trimeren Form handelt es sich nicht um die physiologische Form. Ursache könnten die geringen Salzbedingungen (25 mM KCl) und/oder das Fehlen Hexamer-stabilisierender Faktoren wie Zinkionen sein (52). Desweiteren ist auch der Säulendruck bei einer analytischen Gelfiltrationssäule mit max. 216 psi sehr hoch, was ebenfalls die Multimerisierung der D1D2-Domäne beeinflussen könnte. Nach Beurteilung der Konformation der D1D2-Domäne wurde die Interaktion mit dem N-Terminus von UBXD1 untersucht. Durch NMR-Titrations und Fluoreszenz-Anisotropie konnte eine schwache Bindung (K_D : 260 μ M) zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und der D1D2-Domäne festgestellt werden. Diese Interaktion war noch nicht bekannt und ist mit einigen *pull down*-Experimenten im Gegensatz dazu bereits auch ausgeschlossen worden (111; 122). In diesen Studien haben p97-Konstrukte mit einer Deletion der N-Domäne keine Interaktion mit dem N-Terminus von

UBXD1 gezeigt. Die Ursache dafür könnte in der Zusammensetzung des Puffers liegen. Dieser enthielt unter anderem 150 mM NaCl. Versuche im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die schwache Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und D1D2p97 mit 150 mM KCl bereits unterbunden wird (NMR-Titration, Daten nicht gezeigt). Die D1D2-Domäne bindet an ähnliche Bereiche von UBXD1 1-133 wie die N-Domäne von p97 (Abb. 82).

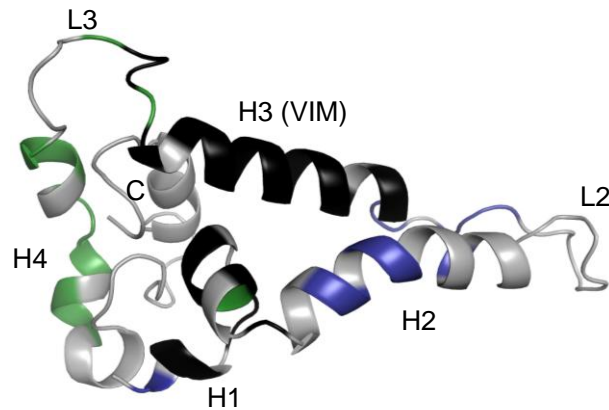


Abb. 82 Binderegionen der N- und der D1D2-Domäne auf UBXD1 1-133. Dargestellt ist das MD-simulierte Strukturmodell von UBXD1 1-120. Die N- und die D1D2-Domäne binden ähnliche Bereiche von UBXD1 1-133 (schwarz: Bindung der N- und der D1D2-Domäne, blau: Bindung der N-Domäne, grün: Bindung der D1D2-Domäne, grau: keine Interaktion).

Die D1D2-Domäne bindet den N-Terminus bis zur Mitte von H2 (bis Ala 17). Die N-Domäne hingegen bindet H1 nur leicht und dafür den hinteren Teil von H2 stärker (Phe 14 bis Glu 25, Abb. 82, blau). Das VIM-Motiv in H3 wird von beiden Konstrukten gebunden. Die N-Domäne von p97 bindet zudem Aminosäuren N-terminal des VIM-Motivs (bis Arg 45), wohingegen die D1D2-Domäne von p97 eher C-terminal vom VIM-Motiv gelegene Aminosäuren bindet (einschließlich H4 bis Glu 90, Abb. 82, grün). Der von der D1D2-Domäne gebundene Bereich nach dem VIM-Motiv enthält viele hydrophile (47 %) und geladene Reste (37 %), wohingegen die N-Domäne den N-terminal der VIM-Helix gelegenen Teil mit zahlreichen neutralen Aminosäuren (54 %) bindet. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die RL62/63AA-Mutante von UBXD1 1-133 die Bindung des VIM-Motivs in die hydrophobe Furche der N-Domäne unterbindet. Diese Mutante bindet die D1D2-Domäne weiterhin. Dabei interagieren zusätzliche Aminosäuren aus dem hinteren Teil von H2 und L2, was wahrscheinlich zu der erhöhten Affinität führt (226 µM vs. 270 µM). Die Unterschiede der an der Bindung beider Domänen beteiligten Aminosäuren von UBXD1 1-133 hinsichtlich ihrer Lage, ihrer Sekundärstruktur und ihrer biochemischen Eigenschaften sowie das unterschiedliche Bindungsverhalten der VIM-Mutante lassen unterschiedliche Bindemechanismen der N-Domäne und der D1D2-Domäne an UBXD1 1-133 vermuten. Damit müssen sich beide Bindungen nicht unbedingt ausschließen und könnten simultan stattfinden (Kap. 3.6). Insgesamt ist der N-Terminus (H1/H2) von UBXD1 weniger an der Bindung beider Domänen von p97 als das VIM-Motiv in H3 beteiligt, sodass dem N-Terminus eher eine stabilisierende Funktion zugeordnet werden kann als eine weitere Bindungsstelle. Da zur Zeit keine Daten der bindenden Aminosäuren von der D1D2-Domäne vorliegen, ist das Erstellen eines Modells für die Bindung zwischen D1D2p97 und UBXD1 1-133 nicht möglich.

4.5. DER N-TERMINUS VON UBXD1 HÄLT DIE N-DOMÄNE VON P97 IN EINER AB-KONFORMATION

Neben der Bindung des N-Terminus von UBXD1 an die einzelnen Domänen von p97, wurde auch der Einfluss von UBXD1 1-133 auf die Konformation des p97-Hexamers untersucht. Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen ergaben eine Affinität von 21 μM zwischen UBXD1 1-133 und p97. Damit liegt die Affinität für p97 etwas unter der für die separierte N-Domäne (9 μM), was wahrscheinlich auf sterische Einschränkungen zurückzuführen ist. Zum einen ist die N-Domäne über den ND1-Linker fest an das p97-Hexamer gebunden und zum anderen beeinflussen sich die im Hexamer nebeneinander liegenden N-Domänen hinsichtlich ihrer Position (43; 50; 54). Desweiteren könnte *in vivo* die Anwesenheit weiterer Kofaktoren zu einer erhöhten Affinität führen wie es zum Beispiel bereits für Faf1 mit Npl4-Ufd1 gezeigt werden konnte (100). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Affinität zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und p97 widerspricht den Daten einer aktuellen Veröffentlichung (112). Dort konnte mittels ITC keine Bindung zwischen einer UBXD1 fl PUB-Mutante (fl: volle Länge, Bindung nur noch über das VIM-Motiv möglich) bzw. dem isolierten N-Terminus von UBXD1 (1-150 AS) gemessen werden. Ein möglicher Grund für diese fehlende Bindung wird nicht diskutiert. Obwohl die Affinität in dieser Arbeit mit UBXD1 1-133 gemessen wurde, ist entsprechend der NMR-Titration eines UBXD1 1-154-Konstruktes mit Np97 kein Unterschied bezüglich der Affinität dieser beiden Konstrukte zu erkennen. CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass es durch die Verlängerung des C-Terminus (133 vs. 154 AS) zu keiner strukturellen Änderung von UBXD1 kommt, die zu einer verringerten Bindung an p97 führen könnte. Desweiteren konnte in einigen anderen Publikationen mit *pull down*-Assays eine der PUB-Domäne ähnliche Affinität des VIM-Motivs zu p97 nachgewiesen werden (111; 122). Außerdem konnte in den ITC-Studien von Hänzelmann *et al.* nur eine sehr geringe Bindung zwischen der PUB-Domäne und p97 mit einer UBXD1 fl VIM-Mutante (Bindung nur noch über die PUB-Domäne möglich) gemessen werden. Im Gegensatz dazu ist für die PUB-Domäne der PNGase und p97 bereits ein K_D von 6 μM mittels ITC ermittelt worden (113). In der PUB-Domäne von UBXD1 ist zwar das Arg 55 durch ein Lysin ersetzt, welches signifikant an der Bindung des C-Terminus von p97 beteiligt ist. Jedoch wurde bereits diskutiert, dass die PUB-Domäne von UBXD1 aufgrund der sterischen Bedingungen sogar besser binden soll (113). Insgesamt sind damit die ITC-Studien von Hänzelmann *et al.* fragwürdig.

Außerdem wurde mittels limitierter Proteolyse die Position der N-Domäne in Relation zum p97-Hexamer untersucht. Bei einer ab-Konformation der N-Domäne wird diese durch eine Salzbrücke zwischen dem Arg 155 der N-Domäne und dem Asn 378 der D1-Domäne stabilisiert (53). In diesem Bereich bindet auch UBXD1 1-133 die N-Domäne, was die Position der N-Domäne in einem p97-Hexamer stabilisieren könnte (Kap. 4.2). Die Proteolyse von p97 mit Trypsin ergab zwei Banden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit diesen Banden kein MS durchgeführt. Damit kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Teile von p97 in diesem Zusammenhang Trypsin-sensitiv waren. Bei Zugabe von p47 fl oder ATPyS ändert sich dieses Bandenmuster nicht. Beide Faktoren stabilisieren die N-Domäne in einer auf-

Konformation (43; 54; 61). Bei Zugabe von UBXD1 1-133 sind ebenfalls zwei Banden zu sehen, die jedoch andere Größen als bei p47 und ATP γ S aufweisen. Damit ist das Bandenmuster von dem der anderen Kofaktoren oder p97 allein verschieden, was auf eine andere Konformation von p97 in Gegenwart von UBXD1 1-133 hinweist. Die obere Bande liegt bei dem Verdau von UBXD1 1-133 und p97 auf Höhe des unverdauten p97, sodass p97 in Gegenwart von UBXD1 1-133 vor Abbau durch Trypsin partiell geschützt zu sein scheint. Desweiteren ist bei diesem Ansatz eine dritte Bande bei etwa 20 kDa zu sehen, die in dieser Stärke nur bei UBXD1 1-133 zu beobachten ist. Diese Bande könnte vor Proteolyse geschütztes UBXD1 1-133 sein, was jedoch erst mit MS genau überprüft werden sollte. Durch die unstrukturierten Regionen besitzen IDPs/IDRs wie der N-Terminus von UBXD1 auch *in vivo* eine verkürzte Halbwertszeit, die unter anderem durch Bindung ihres Interaktionspartners verlängert werden kann (161; 172). Im Vergleich zu UBXD1 1-133 wurde eine UBXD1-Mutante getestet, die nicht mehr die VIM-Furche der N-Domäne bindet, jedoch weiterhin mit schwacher Affinität mit der D1D2-Domäne interagiert. Bei Zugabe dieser UBXD1-Mutante ist das Bandenmuster des p97-Verdaus mit dem in Gegenwart von p47 oder ATP γ S vergleichbar. Auch die Bande bei 20 kDa wie beim Wildtyp ist nicht mehr zu erkennen. Damit scheinen in diesem Ansatz sowohl p97 als auch die UBXD1-Mutante vor Abbau durch Trypsin nicht mehr geschützt zu sein, sodass die Bindung von UBXD1 1-133 wt an die N-Domäne von p97 entscheidend für den Schutz vor dem Trypsinverdau ist. Somit befindet sich die N-Domäne von p97 in Anwesenheit von UBXD1 1-133 nicht in einer auf-Konformation, sondern in einer kompakteren Struktur, die sowohl p97 als auch UBXD1 1-133 partiell vor Abbau schützt. Die Kompaktheit des p97-Hexamers wurde zusätzlich mittels Trp-Fluoreszenz-Schmelzkurve untersucht. Bei einer Schmelzkurve wären bei einem Übergang zwischen den multimeren Formen und der monomeren Form von p97 mehrere Übergänge zu erwarten. Die Schmelzkurve von p97 zeigt jedoch nur einen Übergangspunkt, was auf die hohe Stabilität des p97-Hexamers hindeutet. In Gegenwart von ATP γ S und UBXD1 1-133 kann die thermische Stabilität von p97 erhöht werden. Diese Erhöhung ist wahrscheinlich auf die Stabilisierung der flexiblen N-Domänen zurückzuführen. Die Stabilität kann durch UBXD1 jedoch stärker erhöht werden als mit ATP γ S (> 17 °C), was auf eine kompaktere Struktur von p97 in Gegenwart von UBXD1 1-133 als in Gegenwart von ATP γ S hindeutet.

Die Ergebnisse der limitierten Proteolyse sowie der Schmelzkurve deuten auf eine kompaktere Struktur von p97 mit UBXD1 1-133 als in Gegenwart von anderen gemessenen Kofaktoren hin. Zusammen mit dem Hinweis aus der NMR-Titration, dass UBXD1 1-133 neben der N-Domäne auch schwach den ND1-Linker sowie die D1D2-Domäne bindet, könnte UBXD1 1-133 die N-Domäne in einer ab-Konformation fixieren. UBXD1 würde damit als "Kleber" zwischen der N-Domäne und der D1D2-Domäne dienen. Damit wäre der N-Terminus von UBXD1 der erste Kofaktor durch dessen Bindung die N-Domäne von p97 in einer ab-Konformation gehalten wird. Strukturelle Untersuchungen von FAF1 (173), p47 (61) und Ufd1-Npl4 (174) in Gegenwart von p97 haben bis heute nur die Stabilisierung der N-Domäne in einer auf-Konformation beschrieben (Abb. 83).

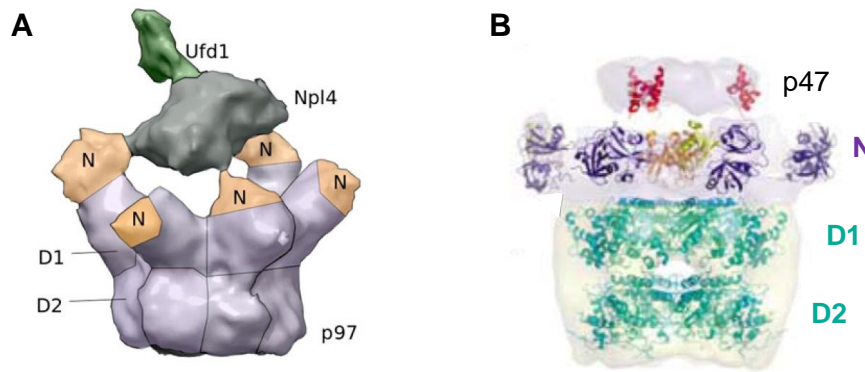


Abb. 83 Konformation der N-Domäne in Anwesenheit von Ufd1-Npl4 und p47. Das Heterodimer Ufd1-Npl4 (A, aus (174)), p47 (B, aus (61)) und Faf1 (nicht gezeigt) stabilisieren die N-Domäne von p97 in einer auf-Konformation.

4.6. DER N-TERMINUS VON UBXD1 DESTABILISIERT DAS p97-HEXAMER

Neben den Studien der Bindung von UBXD1 1-133 an die N-Domäne und die D1D2-Domäne von p97 wurde auch der Einfluss auf den Multimerisierungsgrad von D1D2p97 mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Dabei führte die Zugabe von UBXD1 1-133 zu einer Hexamer-Destabilisierung, was unter anderem die Interaktion zwischen UBXD1 1-133 und D1D2p97 bestätigt. Die bevorzugte Konformation der D1D2-Domäne in Anwesenheit von UBXD1 1-133 scheint ein Trimer zu sein, da kein weiterer Peak für ein anderes Multimer zu detektieren war. Da dieser Effekt eventuell auch auf das Fehlen der N-Domäne oder den niedrigen Salzbedingungen beruhen könnte, wurde dieses Experiment mit dem gesamten p97 in einem Puffer mit 150 mM KCl wiederholt. In der Gelfiltration ist für p97 ein Peak für die hexamere und für die monomere Form zu sehen. Bei Zugabe von UBXD1 1-133 nimmt sowohl der Anteil der hexameren als auch der monomeren Form von p97 ab. Gleichzeitig bildet sich ein neuer Peak bei der Größe eines p97-Dimers. Damit scheint der N-Terminus von UBXD1 auch p97-Monomere zu binden, sodass die Bindung nicht von der quartären Hexamerstruktur von p97 abhängig ist. Zudem hat UBXD1 1-133 einen ähnlichen Hexamer-destabilisierenden Effekt auf p97 wie es bereits bei der D1D2-Domäne zu sehen war. Jedoch bilden sich bei p97 Dimere, während bei der D1D2-Domäne Trimere gebildet werden. Dieser Unterschied könnte unter anderem an der zusätzlichen N-Domäne in p97 liegen. Diese liegt innerhalb eines Monomers leicht versetzt zu der D1D2-Domäne, was bei Bindung durch UBXD1 1-133 zu zusätzlichen Spannung und damit nur zur Bildung von Dimeren statt den Trimeren wie bei D1D2p97 führen könnte. Desweiteren wurden bei der analytischen Gelfiltration mit dem gesamten p97 höhere Salzkonzentrationen (150 mM vs. 25 mM KCl) als bei den Versuchen mit der D1D2-Domäne verwendet. Die erhöhte Salzkonzentration könnte einen zusätzlichen, destabilisierenden Effekt haben. Desweiteren ist das Laufverhalten von p97 abhängig von der Nukleotidbindung und damit der Position der N-Domäne, wohingegen die D1D2-Domäne diesem Einfluss der N-Domäne nicht unterliegt. Somit kann es zu unterschiedlichen Laufzeiten kommen, die zur Abweichung zwischen der trimeren und der dimeren Form von p97 führen, obwohl eventuell beide Proteine den gleichen Multimerisierungsgrad aufweisen. Welcher Multimerisierungsgrad von p97 durch UBXD1 1-133

stabilisiert wird, ist demnach ungeklärt. Festzuhalten ist allerdings, dass UBXD1 1-133 einen Hexamer-destabilisierenden Effekt auf p97 hat. Im Vergleich zur D1D2-Domäne scheint der gebundene Anteil an UBXD1 1-133 an p97 jedoch deutlich höher zu liegen, da in der analytischen Gelfiltration von p97 kein UBXD1-Peak mehr zu sehen ist. Desweiteren wurde mit einer VIM-Mutante (UBXD1 1-133 RL62/63AA) untersucht, welche Rolle die Bindung an die N-Domäne bei der Destabilisierung des p97-Hexamers einnimmt. Bei Zugabe der VIM-Mutante von UBXD1 zu p97 ist im Vergleich zum Wildtyp nur noch ein schwacher und breiter Peak für ein p97-Dimer zu erkennen und ein großer Teil ungebundenes UBXD1. Die Bindung von UBXD1 1-133 RL62/63AA findet aufgrund der geringen Affinität (Np97: 580 μ M, D1D2p97: 230 μ M) nur in sehr geringem Maße stattfindet. Dennoch ist ein kleiner Peak für ein p97-Dimer zu erkennen, was für die Destabilisierung des p97-Hexamers durch die VIM-Mutante spricht. Demnach wird der destabilisierende Effekt wahrscheinlich durch die gesamte durch UBXD1 bedingte Konformation von p97 verursacht und nicht nur durch die Position der N-Domäne.

Es gibt einen Hinweis aus der Literatur, dass sich der isolierte N-Terminus offensichtlich anders Verhält als UBXD1 fl (112). So führt eine analytische Gelfiltration von p97 unter Zugabe von UBXD1 fl nicht zu einer Destabilisierung des p97-Hexamers. Da kein destabilisierender Effekt in diesem Experiment zu sehen ist, kann davon ausgegangen werden, dass der N-Terminus nicht an p97 gebunden ist. Das könnte daran liegen, dass eine simultane Bindung des VIM-Motivs und der PUB-Domäne nicht möglich ist und in diesem Fall aufgrund der höheren Affinität die PUB-Domäne den C-Terminus von p97 bindet. Dadurch würde die Bindung von UBXD1 fl an p97 und gleichzeitig der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete ausgebliebene destabilisierende Effekt des N-Terminus von UBXD1 erklärt werden. Generell scheint der destabilisierende Effekt des N-Terminus von UBXD1 durchaus möglich, da er auch bereits für andere Kofaktoren von p97 beschrieben worden ist (175; 176). Zum einen ist bekannt, dass PUX1 aus *A. thaliana* AtCdc48 (p97-Homolog aus *A. thaliana*) durch Bindung der D1D2-Domäne p97 destabilisiert und damit die ATPase-Aktivität von p97 nicht-kompetitiv inhibiert. Für diesen destabilisierenden Effekt durch PUX1 scheinen zwei Regionen notwendig zu sein, die ihre Bindung kooperativ begünstigen. Das Säugetier-PUX1-Homolog UBXD9 hat in gleicher Weise wie PUX1 ebenfalls einen destabilisierenden Effekt auf das p97-Hexamer (94). Außerdem gibt es Hinweise, dass der Oligomerisierungsgrad von p97 auch *in vivo* dynamisch ist (11; 177), sodass die Destabilisierung des p97-Hexamers ein generelles Prinzip zur Regulation der ATPase-Aktivität von p97 sein könnte.

4.7. DER N-TERMINUS VON UBXD1 INHIBIERT DIE ATPASE-AKTIVITÄT VON P97 UND BINDET ATP

Die Interaktionsstudien zwischen p97 und UBXD1 haben gezeigt, dass der N-Terminus von UBXD1 aufgrund seines Einflusses auf die p97-Konformation dessen ATPase-Aktivität beeinflussen könnte. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene ATPase-Aktivität von 38 μ mol ATP/mg p97/h liegt etwa doppelt so hoch wie die bereits in der Literatur beschriebene Aktivität

von 18 $\mu\text{mol ATP/mg p97/h}$ (55). Diese Differenz ist wahrscheinlich zum einen auf die unterschiedlichen Salzkonzentrationen in den Puffern und zum anderen auf die verschiedenen Assays zurückzuführen. Da Salz inhibitorisch auf die ATPase-Aktivität wirkt, wurde hier lediglich ein 100 mM Tris-Puffer eingesetzt, während Meyer *et al.* zusätzlich 150 mM KCl eingesetzt hat. Desweiteren wurde der ATP-Verbrauch hier über einen indirekten NADH-gekoppelten Assay bestimmt, während in der Veröffentlichung die Konzentration anorganischen Phosphats, das bei der Hydrolyse von ATP entsteht, über Malachitgrün ermittelt wurde.

Nach Zugabe von UBXD1 1-133 konnte die ATPase-Aktivität von p97 konzentrationsabhängig um 59 % reduziert werden. Bei dem Kofaktor p47 ist eine Reduktion auf 31 % der ursprünglichen Aktivität zu beobachten. Diese Reduktion durch UBXD1 findet auch statt, wenn die N-Domäne nicht mehr von dem UBXD1-Konstrukt gebunden wird. Daher scheint nicht zwangsweise die Bindung der N-Domäne für die Reduktion der ATPase-Aktivität von p97 verantwortlich zu sein, was an dem Hexamer-destabilisierenden Effekt von dieser Mutante liegen könnte. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität der D1D2-Domäne ebenfalls durch den N-Terminus von UBXD1 reduziert werden kann, jedoch ist die Restaktivität größer (67 %) und es werden größere Mengen an UBXD1 für die Inhibition benötigt (Daten nicht gezeigt). Ursache dafür könnte unter anderem die verschlechterte Bindung von UBXD1 an die D1D2-Domäne bei den verwendeten Assay-Bedingungen (100 mM Tris-HCl) sein. Diesen Ergebnissen zu Folge scheint die ATPase-Aktivität von p97 in Gegenwart von UBXD1 1-133 mehr über die Destabilisierung des Hexamers und die Bindung nahe des Walker A-Motivs der D1-Domäne reguliert zu werden als über die auf- und ab-Konformation der N-Domäne von p97. Trotz der geringen Affinität von 21 μM zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und p97, wurde eine inhibitorische Konzentration im nanomolaren Bereich ($< 10 \text{ nM}$) ermittelt. Somit wird bereits bei sehr geringen Konzentrationen von UBXD1 1-133 die ATPase-Aktivität von p97 reduziert, was wiederum die Inhibition durch die Destabilisierung des Hexamers bestätigt. IC_{50} -Werte für die Inhibition der ATPase-Aktivität sind in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Im Gegensatz zu dieser hier durchgeführten Arbeit haben Studien gezeigt, dass die ATPase-Aktivität zwar durch p47 (55), jedoch nicht durch UBXD1 (75) inhibiert werden kann. In dieser Studie wurde jedoch nicht der isolierte N-Terminus von UBXD1, sondern UBXD1 fl als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-Tag verwendet. Daher könnte zum einen der N-terminale GST-Tag die Bindung des VIM-Motivs an die N-Domäne stark einschränken und zum anderen könnte UBXD1 über die noch vorhandene PUB-Domäne binden und damit eine Bindung über das VIM-Motiv verhindern. In diesem Falle würde die Destabilisierung des p97-Hexamers ausbleiben und die ATPase-Aktivität nicht reduziert werden. Erste Vorversuche haben bestätigt, dass UBXD1 fl mit einem N-terminalen 6xHis-Tag keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von p97 hat (Daten nicht gezeigt).

Desweiteren wurde gezeigt, dass der N-Terminus von UBXD1 ATP bindet. In der analytischen Gelfiltration haben ATP und UBXD1 das gleiche Elutionsvolumen, obwohl ATP aufgrund seiner geringen Größe (0,6 kDa vs. 14,4 kDa für UBXD1 1-133) später eluiert werden müsste. Desweiteren ist die Laufzeit von UBXD1 1-133 in Anwesenheit von ATP im Vergleich zu jener in

Abwesenheit von ATP etwas größer, was auf eine kompaktere Struktur von UBXD1 1-133 hinweist. Die CD-spektroskopische Sekundärstrukturanalyse bestätigt eine strukturelle Veränderung durch einen erhöhten α -helikalen Anteil im N-Terminus von UBXD1 in Anwesenheit von ATP. Die Bindung von ATP und UBXD1 1-133 scheint spezifisch zu sein, da im Gegensatz dazu die N-Domäne von p97 kein ATP bindet. Für den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NADH-gekoppelten ATPase Assay scheint die ATP-Bindung durch UBXD1 jedoch keine Rolle zu spielen, da diese zum einen sehr niedrig affin zu sein scheint (Anhang 8.17) und zum anderen liegt ATP in dem verwendeten Assay auch bei der höchsten UBXD1-Konzentration in 700fachen Überschuss vor. Eine Bindung zwischen UBXD1 und ATP ist bis heute noch nicht beschrieben worden. Eine mögliche Funktion für die ATP-Bindung von UBXD1 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt. Vorversuche haben gezeigt, dass der N-Terminus von UBXD1 eine schwache ATP-Hydrolyse verursacht. Diese Aktivität ist jedoch 200fach schwächer als für eine zelluläre ATPase wie p97, sodass eine ATPase-Aktivität für den N-Terminus von UBXD1 wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann. Andererseits könnte es möglich sein, dass UBXD1 ein anderes Nukleotid wie GTP höher affin bindet und damit unter anderem bei der Signaltransduktion eine Rolle spielt.

4.8. HYPOTHETISCHES MODELL ZUR REGULATION DER ATPASE-AKTIVITÄT VON P97 DURCH UBXD1

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Punkte festgestellt:

1. UBXD1 ist ein IDP
2. UBXD1 bindet mit dem VIM-Motiv in die VIM-Furche von Np97
3. UBXD1 bindet mit dem N-Terminus den ND1-Linker
4. UBXD1 ändert während der Bindung seine Struktur
5. UBXD1 interagiert mit D1D2p97 schwach
6. UBXD1 bindet mit dem N-Terminus und dem VIM-Motiv an D1D2p97
7. UBXD1 bindet p97 fl
8. UBXD1 schützt p97 fl partiell vor Abbau und sich selber
9. UBXD1 erhöht den Schmelzpunkt von p97
10. UBXD1 destabilisiert p97- und D1D2-Hexamer
11. UBXD1 inhibiert die ATPase-Aktivität von p97
12. UBXD1 bindet ATP
13. UBXD1 wird bei ATP-Bindung kompakter
14. UBXD1 bindet Np97 in Anwesenheit von ATP schlechter

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse führen zu folgendem Modell zur Regulation der ATPase-Aktivität von p97 durch den N-Terminus von UBXD1 (Abb. 84).

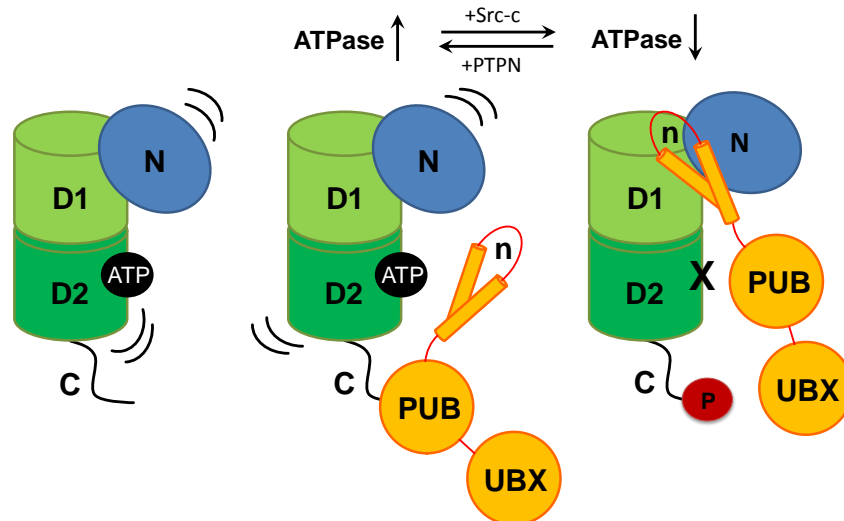


Abb. 84 Hypothetisches Modell zur Regulation der ATPase-Aktivität von p97 durch UBXD1. In Abwesenheit von UBXD1 besitzt p97 eine normale ATPase-Aktivität (links). Die Zugabe von UBXD1 führt zu einer Bindung des C-Terminus von p97 über die PUB-Domäne von UBXD1, was aber keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität von p97 hat (mitte). Nach Phosphorylierung des C-Terminus kann UBXD1 nicht mehr über die PUB-Domäne mit dem C-Terminus von p97 interagieren und es kommt zur Inhibition der ATPase-Aktivität von p97 durch Bindung des N-Terminus von UBXD1 an die N-Domäne.

In Abwesenheit von UBXD1 bindet p97 ATP und hydrolysiert es, was zur konformationellen Änderung der N-Domäne führt, die wahrscheinlich die Segregase-Aktivität verursacht (Abb. 84, links). UBXD1 besitzt N-terminal das VIM-Motiv, welches mit einer Affinität von 20 μM an die N-Domäne von p97 bindet, und mittig eine PUB-Domäne, die mit einer Affinität von 5 μM mit dem C-Terminus von p97 interagiert. Erste Vorversuche mit unterschiedlichen UBXD1-Konstrukten mit dem NADH-gekoppelten ATPase-Assay haben gezeigt, dass UBXD1 nicht simultan über beide Bindemotive mit p97 interagiert (Daten nicht gezeigt). Ist der C-Terminus nicht phosphoryliert, bindet UBXD1 aufgrund der höheren Affinität vorwiegend über die PUB-Domäne an p97. Die ATPase-Aktivität von p97 bleibt dabei unverändert. Die Regulation der Bindung der PUB-Domäne an den C-Terminus von p97 erfolgt über die Phosphorylierung des Tyr 805 (66; 75; 113). Wird der C-Terminus im Gegensatz dazu durch die Src-c-Kinase phosphoryliert (178), kann die PUB-Domäne nicht mehr mit dem C-Terminus von UBXD1 interagieren. Dadurch kommt es zur Bindung des etwas weniger affinen VIM-Motivs an die N-Domäne von p97. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung des N-Terminus von UBXD1 mit dem VIM-Motiv an p97 zu einer Fixierung der N-Domäne in der ab-Konformation und einer Destabilisierung des p97-Hexamers führt, was wiederum eine Reduktion der ATPase-Aktivität bewirkt. Diese Inhibition kann durch Phosphatasen wie die PTPN22 oder PTPH1 wieder aufgehoben werden (179; 180) und erneut die Bindung von UBXD1 über die PUB-Domäne an den C-Terminus von p97 begünstigen, was die ursprüngliche ATPase-Aktivität wieder herstellt.

5. AUSBLICK

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit dem isolierten N-Terminus von UBXD1 unter teilweise unphysiologischen Bedingungen durchgeführt. Damit ist die physiologische Relevanz des hier gezeigten Modells zur Regulation der ATPase-Aktivität von p97 durch den N-Terminus von UBXD1 noch fragwürdig (Abb. 85).

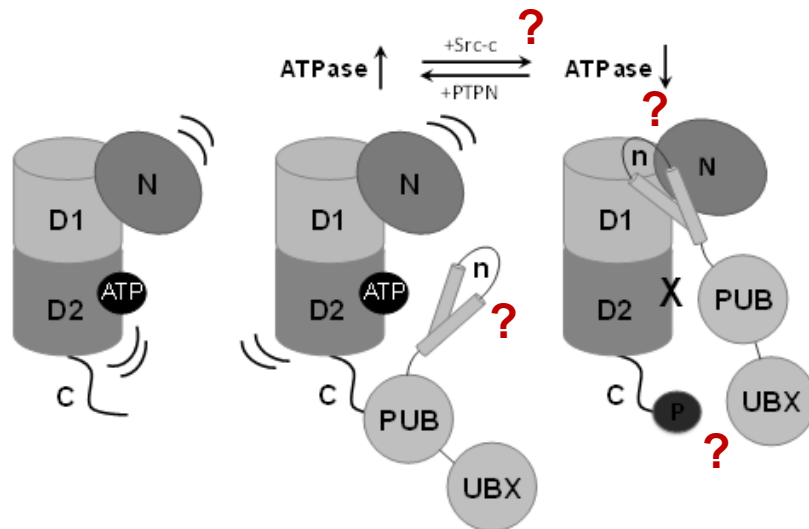


Abb. 85 Offene Fragen im Modell zur Regulation von p97 durch UBXD1. Die Studien im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem isolierten N-Terminus von UBXD1 durchgeführt. Im Folgenden sind daher Experimente im Zusammenhang mit dem gesamten UBXD1-Protein notwendig sowie die Verifizierung dieser Bindung *in vivo*.

Zur Zeit ist unklar wie der N-Terminus von UBXD1 im Kontext des gesamten UBXD1 strukturiert ist. Im Folgenden sollte daher die strukturelle Integrität des N-Terminus von UBXD1 in Anwesenheit der PUB- und der UBX-Domäne von UBXD1 untersucht werden. Desweiteren sollte überprüft werden, welchen Effekt das gesamte UBXD1 auf die Bindung des N-Terminus an die N-Domäne von p97 hat und in wie weit diese Bindung die Konformation des p97-Hexamers und seine ATPase-Aktivität beeinflusst. Bei diesen Untersuchungen ist der Einfluss der Bindung über die PUB-Domäne von UBXD1 und dem Phosphorylungsgrad des C-Terminus von p97 zu beachten. Zudem sollte der Einfluss von UBXD1 auf p97 auch *in vivo* studiert werden. Desweiteren könnte eine genauere Untersuchung der Kinasen und Phosphatasen von p97-805Y Aufschluss darüber geben, in welchem Kontext die Regulation von p97 durch UBXD1 Bedeutung hat.

6. ZUSAMMENFASSUNG

p97 ist eine ubiquitäre ATPase mit zahlreichen diversen Funktionen, die durch ein großes Netzwerk an Kofaktoren ermöglicht werden. Einer dieser Kofaktoren ist UBXD1, der eine besondere Rolle im Netzwerk der p97-Kofaktoren einnimmt. Zum einen ist die Bindung mit den IBMPFD-assoziierten Mutationen von p97 im Gegensatz zu vielen anderen Kofaktoren eingeschränkt. Zum anderen besitzt UBXD1 zwei Bindemotive mit denen es theoretisch sowohl mit der N-Domäne als auch dem C-Terminus von p97 interagieren kann. UBXD1 spielt unter anderem eine Rolle beim Proteinabbau in Lysosomen. Folglich führen Störungen in der Interaktion zwischen p97 und UBXD1 zur Anhäufung fehlgefalteter Proteine, was die Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen begünstigt (IBMPFD, ALS). Obwohl UBXD1 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese einiger p97-assoziiierter Krankheiten spielt, ist die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen nur unzureichend verstanden. Da die Interaktion zwischen der PUB-Domäne von UBXD1 und dem C-Terminus von p97 bereits in verwandten Kofaktoren gut studiert ist, konzentrieren sich die Experimente im Rahmen dieser Arbeit auf die Interaktion zwischen p97 und dem isolierten N-Terminus von UBXD1 mit dem enthaltenen VIM-Motiv.

In einem ersten Schritt wurde der N-Terminus von UBXD1 1-133 strukturell charakterisiert. Dazu wurde ein Strukturmodell aus NMR- und CD-spektroskopischen Daten sowie einigen Mutationsstudien entwickelt und mit Sekundärstrukturvorhersagen (Sequenz-, NMR-Resonanzen- und CD-basiert) abgeglichen. Dieses Modell führte zusammen mit den fehlenden Abstandsinformationen einzelner Atome in den NOESY-Spektren und der geringen Signaldispersion zu dem Schluss, dass es sich bei dem N-Terminus von UBXD1 um eine IDR (*intrinsically disordered region*) ohne eine kompakte Struktur handelt.

Desweiteren wurde die Interaktion des N-Terminus von UBXD1 mit einzelnen Domänen von p97 NMR-spektroskopisch auf atomarer Ebene untersucht. Damit konnten zwei interagierende Bereiche zwischen dem N-Terminus von UBXD1 und der N-Domäne von p97 festgestellt werden. Zum einen konnte die Bindung des VIM-Motivs von UBXD1 in die hydrophobe Furche der N-Domäne bestätigt werden. Zum anderen wurde eine neue Bindestelle des äußersten N-Terminus von UBXD1 an den Linker zur D1-Domäne entdeckt. Zudem interagiert der N-Terminus von UBXD1 mit der D1D2-Domäne. Diese Interaktion wurden mit Anisotropie-Messungen und Gelfiltrationen bestätigt.

Da es sich bei p97 um eine hexamere ATPase mit sehr flexiblen Domänen handelt, wurde biochemisch (Anisotropie, limitierte Proteolyse, Gelfiltration und Schmelzkurven) der Einfluss der Bindung des N-Terminus von UBXD1 auf die Konformation von p97 untersucht. Demnach destabilisiert der N-Terminus von UBXD1 das p97-Hexamer, während es andererseits p97-Monomere in einer kompakten Struktur (ab-Konformation der N-Domäne) fixiert.

Sowohl die Bindung der einzelnen Domänen von p97 sowie der Einfluss des N-Terminus von UBXD1 auf die Gesamtstruktur von p97 weisen auf eine Inhibition der ATPase-Aktivität von p97 hin, was im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Desweiteren bindet der N-Terminus von UBXD1 ATP. Die Funktion dieser Bindung ist jedoch noch unbekannt.

Abstract: The structural characterization of the N-terminus of UBXD1 and its regulation of the ATPase activity of p97

p97 is an ubiquitinary AAA ATPase with many diverse cellular functions which are mediated by a big network of different cofactors. One of these cofactors is UBXD1 which has a special role among p97 cofactors. On the one hand the interaction between UBXD1 and p97 is interrupted by IBMPFD-associated mutations of p97 while the binding of other cofactors is still intact. On the other hand UBXD1 has two p97 binding motifs (PUB domain, VIM motif) which can theoretically bind simultaneously the N domain and the C-terminus of p97. UBXD1 is involved in protein degradation in lysosomes via p97. The disruption of the interaction between p97 and UBXD1 leads to the accumulation of misfolded proteins which are responsible for the pathogenesis of neurodegenerative diseases like IBMPFD and ALS. Although UBXD1 is quite important in the development of p97-associated diseases the interaction between UBXD1 and p97 is poorly understood. As the interaction between the PUB domain of related cofactors and the C-terminus of p97 has already been studied the experiments of this work are concentrated to the N-terminus of UBXD1 including the VIM motif.

In a first step the N-terminus of UBXD1 was structurally characterized. Subsequently a model was developed on the basis of NMR- and CD-spectroscopic data as well as on data from mutational studies. This model was refined using secondary structure prediction algorithms (sequence-based, NMR resonances- and CD-based). The structural data imply a protein with α -helical regions but without any rigid tertiary structure. These features are typical for IDPs (intrinsically disordered proteins) or IDRs (intrinsically disordered regions).

Furthermore the interaction between the N-terminus of UBXD1 and the individual domains of p97 was investigated by NMR spectroscopy on an atomic level. These studies showed two interacting regions of the N-terminus of UBXD1 and the N domain. On the one hand the interaction between the VIM motif of UBXD1 and the hydrophobic cleft of the N domain was confirmed. On the other hand a new binding region was defined including the first 30 amino acids of the N-terminus of UBXD1 and the linker between the N domain and the D1 domain of p97. In addition the N-terminus of UBXD1 interacts with the D1D2 domain of p97. All these interactions were confirmed by fluorescence anisotropy studies and size exclusion chromatography.

p97 is a hexameric ATPase with flexible domains. Therefore the influence of the binding of the N-terminus of UBXD1 on the conformation of p97 was investigated biochemically (anisotropy, limited proteolysis, size exclusion chromatography and melting curves). It could be shown, that UBXD1 destabilizes the hexameric p97 and in addition fixes the p97 monomers in a more compact structure (down position of the N domain of p97).

The binding of the individual domains of p97 as well as the influence of the N-terminus of UBXD1 on the structure of the hexameric p97 suggest a inhibitory effect of the N-terminus of UBXD1 on the ATPase activity of p97 which was also confirmed experimentally. In addition the N-terminus of UBXD1 binds ATP while the physiological function of this binding has not yet been elucidated.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Neuwald, A. F.; Aravind, L.; Spouge, J. L.; Koonin, E. V. (1999): AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. In: *Genome Res* 9 (1), S. 27–43.
- (2) Zhang, X.; Shaw, A.; Bates, P. A.; Newman, R. H.; Gowen, B.; Orlova, E. et al. (2000): Structure of the AAA ATPase p97. In: *Mol Cell* 6 (6), S. 1473–1484.
- (3) Song, Changcheng; Wang, Qing; Li, Chou-Chi H. (2003): ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. In: *J Biol Chem* 278 (6), S. 3648–3655.
- (4) Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M. J.; Gay, N. J. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. In: *EMBO J* 1 (8), S. 945–951.
- (5) Koller, K. J.; Brownstein, M. J. (1987): Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin. In: *Nature* 325 (6104), S. 542–545.
- (6) Peters, J. M.; Walsh, M. J.; Franke, W. W. (1990): An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. In: *EMBO J* 9 (6), S. 1757–1767.
- (7) Peters, J. M.; Harris, J. R.; Lustig, A.; Muller, S.; Engel, A.; Volker, S.; Franke, W. W. (1992): Ubiquitous soluble Mg(2+)-ATPase complex. A structural study. In: *J Mol Biol* 223 (2), S. 557–571.
- (8) Moir, D.; Stewart, S. E.; Osmond, B. C.; Botstein, D. (1982): Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. In: *Genetics* 100 (4), S. 547–563.
- (9) Frohlich, K. U.; Fries, H. W.; Rudiger, M.; Erdmann, R.; Botstein, D.; Mecke, D. (1991): Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. In: *J Cell Biol* 114 (3), S. 443–453.
- (10) Feiler, H. S.; Desprez, T.; Santoni, V.; Kronenberger, J.; Caboche, M.; Traas, J. (1995): The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. In: *EMBO J* 14 (22), S. 5626–5637.
- (11) Lamb, J. R.; Fu, V.; Wirtz, E.; Bangs, J. D. (2001): Functional analysis of the trypanosomal AAA protein TbVCP with trans-dominant ATP hydrolysis mutants. In: *J Biol Chem* 276 (24), S. 21512–21520.
- (12) Pamnani, V.; Tamura, T.; Lupas, A.; Peters, J.; Cejka, Z.; Ashraf, W.; Baumeister, W. (1997): Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. In: *FEBS Lett* 404 (2-3), S. 263–268.
- (13) Takata, Takahiro; Kimura, Yoko; Ohnuma, Yohei; Kawawaki, Junko; Kakiyama, Yukie; Tanaka, Keiji; Kakizuka, Akira (2012): Rescue of growth defects of yeast *cdc48* mutants by pathogenic IBMPFD-VCPs. In: *J Struct Biol* 179 (2), S. 93–103.
- (14) Rabouille, C.; Levine, T. P.; Peters, J. M.; Warren, G. (1995): An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. In: *Cell* 82 (6), S. 905–914.
- (15) Dai, R. M.; Li, C. C. (2001): Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. In: *Nat Cell Biol* 3 (8), S. 740–744.
- (16) Haines, Dale S. (2010): p97-containing complexes in proliferation control and cancer: emerging culprits or guilt by association? In: *Genes Cancer* 1 (7), S. 753–763.
- (17) Dobrynin, Grzegorz; Popp, Oliver; Romer, Tina; Bremer, Sebastian; Schmitz, Michael H A; Gerlich, Daniel W.; Meyer, Hemmo (2011): Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 antagonizes Aurora B during chromosome segregation in HeLa cells. In: *J Cell Sci* 124 (Pt 9), S. 1571–1580.
- (18) Cao, Kan; Nakajima, Reiko; Meyer, Hemmo H.; Zheng, Yixian (2003): The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. In: *Cell* 115 (3), S. 355–367.

- (19) Yamada, T.; Okuhara, K.; Iwamatsu, A.; Seo, H.; Ohta, K.; Shibata, T.; Murofushi, H. (2000): p97 ATPase, an ATPase involved in membrane fusion, interacts with DNA unwinding factor (DUF) that functions in DNA replication. In: *FEBS Lett* 466 (2-3), S. 287–291.
- (20) Vong, Queenie P.; Cao, Kan; Li, Hoi Y.; Iglesias, Pablo A.; Zheng, Yixian (2005): Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. In: *Science* 310 (5753), S. 1499–1504.
- (21) Cao, Jian; Wang, Jiang; Qi, Wei; Miao, Hong-Hua; Wang, Jing; Ge, Liang et al. (2007): Ufd1 is a cofactor of gp78 and plays a key role in cholesterol metabolism by regulating the stability of HMG-CoA reductase. In: *Cell Metab* 6 (2), S. 115–128.
- (22) Bogan, Jonathan S.; Hendon, Natalie; McKee, Adrienne E.; Tsao, Tsu-Shuen; Lodish, Harvey F. (2003): Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. In: *Nature* 425 (6959), S. 727–733.
- (23) Meyer, Hemmo; Bug, Monika; Bremer, Sebastian (2012): Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. In: *Nat Cell Biol* 14 (2), S. 117–123.
- (24) Beskow, Anne; Grimberg, Kristian Bjork; Bott, Laura C.; Salomons, Florian A.; Dantuma, Nico P.; Young, Patrick (2009): A conserved unfoldase activity for the p97 AAA-ATPase in proteasomal degradation. In: *J Mol Biol* 394 (4), S. 732–746.
- (25) Kirchner, Philipp; Bug, Monika; Meyer, Hemmo (2013): Ubiquitination of the N-terminal region of caveolin-1 regulates endosomal sorting by the VCP/p97 AAA-ATPase. In: *J Biol Chem* 288 (10), S. 7363–7372.
- (26) Dai, R. M.; Chen, E.; Longo, D. L.; Gorbea, C. M.; Li, C. C. (1998): Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. In: *J Biol Chem* 273 (6), S. 3562–3573.
- (27) Asai, Tatsuya; Tomita, Yasuhiko; Nakatsuka, Shin-ichi; Hoshida, Yoshihiko; Myoui, Akira; Yoshikawa, Hideki; Aozasa, Katsuyuki (2002): VCP (p97) regulates NFkappaB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line. In: *Jpn J Cancer Res* 93 (3), S. 296–304.
- (28) Koike, Masaaki; Fukushi, Junpei; Ichinohe, Yuzuru; Higashimae, Naoki; Fujishiro, Masahiko; Sasaki, Chiyomi et al. (2010): Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. In: *J Biol Chem* 285 (28), S. 21736–21749.
- (29) Zhang, H.; Wang, Q.; Kajino, K.; Greene, M. I. (2000): VCP, a weak ATPase involved in multiple cellular events, interacts physically with BRCA1 in the nucleus of living cells. In: *DNA Cell Biol* 19 (5), S. 253–263.
- (30) Indig, Fred Eliezer; Partridge, Juneth Joaquin; Kobbe, Cayetano von; Aladjem, Mirit I.; Latterich, Martin; Bohr, Wilhelm A. (2004): Werner syndrome protein directly binds to the AAA ATPase p97/VCP in an ATP-dependent fashion. In: *J Struct Biol* 146 (1-2), S. 251–259.
- (31) Livingstone, Mark; Ruan, Hong; Weiner, Jessica; Clauser, Karl R.; Strack, Peter; Jin, Shengfang et al. (2005): Valosin-containing protein phosphorylation at Ser784 in response to DNA damage. In: *Cancer Res* 65 (17), S. 7533–7540.
- (32) Ju, Jeong-Sun; Wehl, Conrad C. (2010): p97/VCP at the intersection of the autophagy and the ubiquitin proteasome system. In: *Autophagy* 6 (2), S. 283–285.
- (33) Chou, Tsui-Fen; Deshaies, Raymond J. (2011): Development of p97 AAA ATPase inhibitors. In: *Autophagy* 7 (9), S. 1091–1092.
- (34) Tresse, Emilie; Salomons, Florian A.; Vesa, Jouni; Bott, Laura C.; Kimonis, Virginia; Yao, Tso-Pang et al. (2010): VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. In: *Autophagy* 6 (2), S. 217–227.
- (35) Ye, Yihong; Meyer, Hemmo H.; Rapoport, Tom A. (2003): Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. In: *J Cell Biol* 162 (1), S. 71–84.
- (36) Stolz, Alexandra; Hilt, Wolfgang; Buchberger, Alexander; Wolf, Dieter H. (2011): Cdc48: a power machine in protein degradation. In: *Trends Biochem Sci* 36 (10), S. 515–523.

- (37) Ye, Yihong (2006): Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. In: *J Struct Biol* 156 (1), S. 29–40.
- (38) Wojcik, Cezary; Rowicka, Maga; Kudlicki, Andrzej; Nowis, Dominika; McConnell, Elizabeth; Kujawa, Marek; DeMartino, George N. (2006): Valosin-containing protein (p97) is a regulator of endoplasmic reticulum stress and of the degradation of N-end rule and ubiquitin-fusion degradation pathway substrates in mammalian cells. In: *Mol Biol Cell* 17 (11), S. 4606–4618.
- (39) Shirogane, T.; Fukada, T.; Muller, J. M.; Shima, D. T.; Hibi, M.; Hirano, T. (1999): Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. In: *Immunity* 11(6), S. 709–719.
- (40) Braun, Ralf J.; Zischka, Hans (2008): Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death: from yeast apoptosis to human disease. In: *Biochim Biophys Acta* 1783 (7), S. 1418–1435.
- (41) Kakizuka, Akira (2008): Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. In: *Biochem Soc Trans* 36 (Pt 1), S. 105–108.
- (42) Watts, Giles D J; Wymer, Jill; Kovach, Margaret J.; Mehta, Sarju G.; Mumm, Steven; Darvish, Daniel et al. (2004): Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. In: *Nat Genet* 36 (4), S. 377–381.
- (43) Tang, Wai Kwan; Li, Dongyang; Li, Chou-chi; Esser, Lothar; Dai, Renming; Guo, Liang; Di Xia (2010): A novel ATP-dependent conformation in p97 N-D1 fragment revealed by crystal structures of disease-related mutants. In: *EMBO J* 29 (13), S. 2217–2229.
- (44) Manno, Atsushi; Noguchi, Masakatsu; Fukushi, Junpei; Motohashi, Yasuhiro; Kakizuka, Akira (2010): Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. In: *Genes Cells* 15 (8), S. 911–922.
- (45) Halawani, Dalia; LeBlanc, Andrea C.; Rouiller, Isabelle; Michnick, Stephen W.; Servant, Marc J.; Latterich, Martin (2009): Hereditary inclusion body myopathy-linked p97/VCP mutations in the NH2 domain and the D1 ring modulate p97/VCP ATPase activity and D2 ring conformation. In: *Mol Cell Biol* 29 (16), S. 4484–4494.
- (46) Chapman, Eli; Fry, Anastasia N.; Kang, MinJin (2011): The complexities of p97 function in health and disease. In: *Mol Biosyst* 7 (3), S. 700–710.
- (47) Erzurumlu, Yalcin; Kose, Fadime Aydin; Gozen, Oguz; Gozuacik, Devrim; Toth, Eric A.; Ballar, Petek (2013): A unique IBMPFD-related P97/VCP mutation with differential binding pattern and subcellular localization. In: *Int J Biochem Cell Biol* 45 (4), S. 773–782.
- (48) Fernandez-Saiz, Vanesa; Buchberger, Alexander (2010): Imbalances in p97 co-factor interactions in human proteinopathy. In: *EMBO Rep* 11 (6), S. 479–485.
- (49) Ritz, Danilo; Vuk, Maja; Kirchner, Philipp; Bug, Monika; Schutz, Sabina; Hayer, Arnold et al. (2011): Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. In: *Nat Cell Biol* 13 (9), S. 1116–1123.
- (50) Huyton, Trevor; Pye, Valerie E.; Briggs, Louise C.; Flynn, Terence C.; Beuron, Fabienne; Kondo, Hisao et al. (2003): The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6 Å. In: *J Struct Biol* 144 (3), S. 337–348.
- (51) Rouiller, I.; Butel, V. M.; Latterich, M.; Milligan, R. A.; Wilson-Kubalek, E. M. (2000): A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding. In: *Mol Cell* 6 (6), S. 1485–1490.
- (52) DeLaBarre, Byron; Brunger, Axel T. (2003): Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. In: *Nat Struct Biol* 10 (10), S. 856–863.
- (53) DeLaBarre, Byron; Brunger, Axel T. (2005): Nucleotide dependent motion and mechanism of action of p97/VCP. In: *J Mol Biol* 347 (2), S. 437–452.
- (54) Beuron, Fabienne; Flynn, Terence C.; Ma, Jianpeng; Kondo, Hisao; Zhang, Xiaodong; Freemont, Paul S. (2003): Motions and negative cooperativity between p97 domains revealed by cryo-electron microscopy and quantised elastic deformational model. In: *J Mol Biol* 327 (3), S. 619–629.
- (55) Meyer, H. H.; Kondo, H.; Warren, G. (1998): The p47 co-factor regulates the ATPase activity of the membrane fusion protein, p97. In: *FEBS Lett* 437 (3), S. 255–257.

- (56) Frohlich, K. U.; Fries, H. W.; Peters, J. M.; Mecke, D. (1995): The ATPase activity of purified CDC48p from *Saccharomyces cerevisiae* shows complex dependence on ATP-, ADP-, and NADH-concentrations and is completely inhibited by NEM. In: *Biochim Biophys Acta* 1253 (1), S. 25–32.
- (57) Davies, Jason M.; Tsuruta, Hirotsugu; May, Andrew P.; Weis, William I. (2005): Conformational changes of p97 during nucleotide hydrolysis determined by small-angle X-Ray scattering. In: *Structure* 13 (2), S. 183–195.
- (58) Zalk, Ran; Shoshan-Barmatz, Varda (2003): ATP-binding sites in brain p97/VCP (valosin-containing protein), a multifunctional AAA ATPase. In: *Biochem J* 374 (Pt 2), S. 473–480.
- (59) Wang, Qing; Song, Changcheng; Li, Chou-Chi H. (2003): Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities. In: *Biochem Biophys Res Commun* 300 (2), S. 253–260.
- (60) Wang, Qing; Song, Changcheng; Yang, Xiaoyi; Li, Chou-Chi H. (2003): D1 ring is stable and nucleotide-independent, whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-VCP. In: *J Biol Chem* 278 (35), S. 32784–32793.
- (61) Beuron, Fabienne; Dreveny, Ingrid; Yuan, Xuemei; Pye, Valerie E.; McKeown, Ciaran; Briggs, Louise C. et al. (2006): Conformational changes in the AAA ATPase p97-p47 adaptor complex. In: *EMBO J* 25 (9), S. 1967–1976.
- (62) Bruderer, Roland M.; Brasseur, Catherine; Meyer, Hemmo H. (2004): The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. In: *J Biol Chem* 279 (48), S. 49609–49616.
- (63) Dreveny, I.; Pye, V. E.; Beuron, F.; Briggs, L. C.; Isaacson, R. L.; Matthews, S. J. et al. (2004): p97 and close encounters of every kind: a brief review. In: *Biochem Soc Trans* 32 (Pt 5), S. 715–720.
- (64) Buchberger, Alexander (2002): From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. In: *Trends Cell Biol* 12 (5), S. 216–221.
- (65) Liu, Shuai; Fu, Qing-Shan; Zhao, Jian; Hu, Hong-Yu (2013): Structural and mechanistic insights into the arginine/lysine-rich peptide motifs that interact with P97/VCP. In: *Biochim Biophys Acta* 1834 (12), S. 2672–2678.
- (66) Yeung, Heidi O.; Kloppsteck, Patrik; Niwa, Hajime; Isaacson, Rivka L.; Matthews, Steve; Zhang, Xiaodong; Freemont, Paul S. (2008): Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. In: *Biochem Soc Trans* 36 (Pt 1), S. 62–67.
- (67) Qiu, Liyan; Pashkova, Natasha; Walker, John R.; Winistorfer, Stanley; Allali-Hassani, Abdellah; Akutsu, Masato et al. (2010): Structure and function of the PLAA/Ufd3-p97/Cdc48 complex. In: *J Biol Chem* 285 (1), S. 365–372.
- (68) Buchberger, A.; Howard, M. J.; Proctor, M.; Bycroft, M. (2001): The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. In: *J Mol Biol* 307 (1), S. 17–24.
- (69) Schubert, C.; Buchberger, A. (2008): UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. In: *Cell Mol Life Sci* 65 (15), S. 2360–2371.
- (70) Meyer, H., Prof. (2014): Einteilung von p97-Kofaktoren entsprechend ihrer UBX-Domänen. Essen, 15.01.2014. Gespräch an Franziska Trusch.
- (71) Meyer, H. H.; Shorter, J. G.; Seemann, J.; Pappin, D.; Warren, G. (2000): A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. In: *EMBO J* 19 (10), S. 2181–2192.
- (72) Uchiyama, Keiji; Totsukawa, Go; Puhka, Maija; Kaneko, Yayoi; Jokitalo, Eija; Dreveny, Ingrid et al. (2006): p37 is a p97 adaptor required for Golgi and ER biogenesis in interphase and at the end of mitosis. In: *Dev Cell* 11 (6), S. 803–816.
- (73) Rumpf, Sebastian; Jentsch, Stefan (2006): Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. In: *Mol Cell* 21 (2), S. 261–269.
- (74) Kondo, H.; Rabouille, C.; Newman, R.; Levine, T. P.; Pappin, D.; Freemont, P.; Warren, G. (1997): p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. In: *Nature* 388 (6637), S. 75–78.
- (75) Madsen, Louise; Andersen, Katrine M.; Prag, Soren; Moos, Torben; Semple, Colin A.; Seeger, Michael; Hartmann-Petersen, Rasmus (2008): Ubx1 is a novel co-factor of the human p97 ATPase. In: *Int J Biochem Cell Biol* 40 (12), S. 2927–2942.

- (76) Boeddrich, Annett; Gaumer, Sebastien; Haacke, Annette; Tzvetkov, Nikolay; Albrecht, Mario; Evert, Bernd O. et al. (2006): An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis. In: *EMBO J* 25 (7), S. 1547–1558.
- (77) Song, Jinsue; Park, Joon Kyu; Lee, Jae-Jin; Choi, Yun-Seok; Ryu, Kyoung-Seok; Kim, Jae-Hong et al. (2009): Structure and interaction of ubiquitin-associated domain of human Fas-associated factor 1. In: *Protein Sci* 18 (11), S. 2265–2276.
- (78) Liang, Jing; Yin, Chaobo; Doong, Howard; Fang, Shengyun; Peterhoff, Corrine; Nixon, Ralph A.; Monteiro, Mervyn J. (2006): Characterization of erasin (UBXD2): a new ER protein that promotes ER-associated protein degradation. In: *J Cell Sci* 119 (Pt 19), S. 4011–4024.
- (79) McNeill, Helen; Knebel, Axel; Arthur, J Simon C; Cuenda, Ana; Cohen, Philip (2004): A novel UBA and UBX domain protein that binds polyubiquitin and VCP and is a substrate for SAPKs. In: *Biochem J* 384 (Pt 2), S. 391–400.
- (80) Park, H.; Suzuki, T.; Lennarz, W. J. (2001): Identification of proteins that interact with mammalian peptide:N-glycanase and implicate this hydrolase in the proteasome-dependent pathway for protein degradation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (20), S. 11163–11168.
- (81) Alexandru, Gabriela; Graumann, Johannes; Smith, Geoffrey T.; Kolawa, Natalie J.; Fang, Ruihua; Deshaies, Raymond J. (2008): UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. In: *Cell* 134 (5), S. 804–816.
- (82) Rezvani, Khosrow; Teng, Yanfen; Pan, Yaping; Dani, John A.; Lindstrom, Jon; Garcia Gras, Eduardo A et al. (2009): UBXD4, a UBX-containing protein, regulates the cell surface number and stability of alpha3-containing nicotinic acetylcholine receptors. In: *J Neurosci* 29 (21), S. 6883–6896.
- (83) Laser, Heike; Conforti, Laura; Morreale, Giacomo; Mack, Till G M; Heyer, Molly; Haley, Jane E. et al. (2006): The slow Wallerian degeneration protein, WldS, binds directly to VCP/p97 and partially redistributes it within the nucleus. In: *Mol Biol Cell* 17 (3), S. 1075–1084.
- (84) Suzuki, Michitaka; Otsuka, Toshihiko; Ohsaki, Yuki; Cheng, Jinglei; Taniguchi, Takako; Hashimoto, Hisashi et al. (2012): Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets. In: *Mol Biol Cell* 23 (5), S. 800–810.
- (85) Katoh, Hironori; Harada, Amane; Mori, Kazutoshi; Negishi, Manabu (2002): Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers. In: *Mol Cell Biol* 22 (9), S. 2952–2964.
- (86) Nagahama, Masami; Suzuki, Mie; Hamada, Yuko; Hatsuzawa, Kiyotaka; Tani, Katsuko; Yamamoto, Akitsugu; Tagaya, Mitsuo (2003): SVIP is a novel VCP/p97-interacting protein whose expression causes cell vacuolation. In: *Mol Biol Cell* 14 (1), S. 262–273.
- (87) Schmidtke, Gunter; Kalveram, Birte; Weber, Elvira; Bochtler, Petra; Lukasiak, Sebastian; Hipp, Mark Steffen; Groettrup, Marcus (2006): The UBA domains of NUB1L are required for binding but not for accelerated degradation of the ubiquitin-like modifier FAT10. In: *J Biol Chem* 281 (29), S. 20045–20054.
- (88) Madsen, Louise; Kriegenburg, Franziska; Vala, Andrea; Best, Diana; Prag, Soren; Hofmann, Kay et al. (2011): The tissue-specific Rep8/UBXD6 tethers p97 to the endoplasmic reticulum membrane for degradation of misfolded proteins. In: *PLoS One* 6 (9), S. e25061.
- (89) Ye, Yihong; Shibata, Yoko; Yun, Chi; Ron, David; Rapoport, Tom A. (2004): A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. In: *Nature* 429 (6994), S. 841–847.
- (90) Uchiyama, Keiji; Jokitalo, Eija; Kano, Fumi; Murata, Masayuki; Zhang, Xiaodong; Canas, Benito et al. (2002): VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. In: *J Cell Biol* 159 (5), S. 855–866.
- (91) Glinka, Tal; Alter, Joel; Braunstein, Ilana; Tzach, Lolita; Wei Sheng, Chia; Geifman, Susana et al. (2014): Signal-peptide-mediated translocation is regulated by a p97-AIRAPL complex. In: *Biochem J* 457 (2), S. 253–261.
- (92) Ernst, Robert; Mueller, Britta; Ploegh, Hidde L.; Schlieker, Christian (2009): The otubain YOD1 is a deubiquitinating enzyme that associates with p97 to facilitate protein dislocation from the ER. In: *Mol Cell* 36 (1), S. 28–38.

- (93) Davis, Emily J.; Lachaud, Christophe; Appleton, Paul; Macartney, Thomas J.; Nathke, Inke; Rouse, John (2012): DVC1 (C1orf124) recruits the p97 protein segregase to sites of DNA damage. In: *Nat Struct Mol Biol* 19 (11), S. 1093–1100.
- (94) Orme, Charisse M.; Bogan, Jonathan S. (2012): The ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein TUG regulates the p97 ATPase and resides at the endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment. In: *J Biol Chem* 287 (9), S. 6679–6692.
- (95) Schulze, Andrea; Standera, Sybille; Buerger, Elke; Kikkert, Marjolein; van Voorden, Sjaak; Wiertz, Emmanuel et al. (2005): The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. In: *J Mol Biol* 354 (5), S. 1021–1027.
- (96) Chen, Zhiliang; Du, Shaojun; Fang, Shengyun (2012): gp78: a multifaceted ubiquitin ligase that integrates a unique protein degradation pathway from the endoplasmic reticulum. In: *Curr Protein Pept Sci* 13 (5), S. 414–424.
- (97) Morreale, Giacomo; Conforti, Laura; Coadwell, John; Wilbrey, Anna L.; Coleman, Michael P. (2009): Evolutionary divergence of valosin-containing protein/cell division cycle protein 48 binding interactions among endoplasmic reticulum-associated degradation proteins. In: *FEBS J* 276 (5), S. 1208–1220.
- (98) Isaacson, Rivka L.; Pye, Valerie E.; Simpson, Peter; Meyer, Hemmo H.; Zhang, Xiaodong; Freemont, Paul S.; Matthews, Steve (2007): Detailed structural insights into the p97-Npl4-Ufd1 interface. In: *J Biol Chem* 282 (29), S. 21361–21369.
- (99) Pye, Valerie E.; Beuron, Fabienne; Keetch, Catherine A.; McKeown, Ciaran; Robinson, Carol V.; Meyer, Hemmo H. et al. (2007): Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2), S. 467–472.
- (100) Hanzelmann, Petra; Buchberger, Alexander; Schindelin, Hermann (2011): Hierarchical binding of cofactors to the AAA ATPase p97. In: *Structure* 19 (6), S. 833–843.
- (101) Allen, Mark D.; Buchberger, Alexander; Bycroft, Mark (2006): The PUB domain functions as a p97 binding module in human peptide N-glycanase. In: *J Biol Chem* 281 (35), S. 25502–25508.
- (102) Meyer, Hemmo H.; Wang, Yanzhuang; Warren, Graham (2002): Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. In: *EMBO J* 21 (21), S. 5645–5652.
- (103) Song, Eun Joo; Yim, Seung-Hee; Kim, Eunhee; Kim, Nam-Soon; Lee, Kong-Joo (2005): Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway. In: *Mol Cell Biol* 25 (6), S. 2511–2524.
- (104) Suzuki, T.; Park, H.; Till, E. A.; Lennarz, W. J. (2001): The PUB domain: a putative protein-protein interaction domain implicated in the ubiquitin-proteasome pathway. In: *Biochem Biophys Res Commun* 287 (5), S. 1083–1087.
- (105) Li, Guangtao; Zhao, Gang; Zhou, Xiaoke; Schindelin, Hermann; Lennarz, William J. (2006): The AAA ATPase p97 links peptide N-glycanase to the endoplasmic reticulum-associated E3 ligase autocrine motility factor receptor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (22), S. 8348–8353.
- (106) Wang, Qiuyan; Li, Lianyun; Ye, Yihong (2006): Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. In: *J Cell Biol* 174 (7), S. 963–971.
- (107) Zhong, Xiaoyan; Pittman, Randall N. (2006): Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. In: *Hum Mol Genet* 15 (16), S. 2409–2420.
- (108) Ballar, Petek; Shen, Yuxian; Yang, Hui; Fang, Shengyun (2006): The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation. In: *J Biol Chem* 281 (46), S. 35359–35368.
- (109) Ballar, Petek; Zhong, Yongwang; Nagahama, Masami; Tagaya, Mitsuo; Shen, Yuxian; Fang, Shengyun (2007): Identification of SVIP as an endogenous inhibitor of endoplasmic reticulum-associated degradation. In: *J Biol Chem* 282 (47), S. 33908–33914.
- (110) Zhong, Xiaoyan; Shen, Yuxian; Ballar, Petek; Apostolou, Andria; Agami, Reuven; Fang, Shengyun (2004): AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. In: *J Biol Chem* 279 (44), S. 45676–45684.

- (111) Stapf, Christopher; Cartwright, Edward; Bycroft, Mark; Hofmann, Kay; Buchberger, Alexander (2011): The general definition of the p97/valosin-containing protein (VCP)-interacting motif (VIM) delineates a new family of p97 cofactors. In: *J Biol Chem* 286 (44), S. 38670–38678.
- (112) Hanzelmann, Petra; Schindelin, Hermann (2011): The structural and functional basis of the p97/valosin-containing protein (VCP)-interacting motif (VIM): mutually exclusive binding of cofactors to the N-terminal domain of p97. In: *J Biol Chem* 286 (44), S. 38679–38690.
- (113) Zhao, Gang; Zhou, Xiaoke; Wang, Liqun; Li, Guangtao; Schindelin, Hermann; Lennarz, William J. (2007): Studies on peptide:N-glycanase-p97 interaction suggest that p97 phosphorylation modulates endoplasmic reticulum-associated degradation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (21), S. 8785–8790.
- (114) Hofmann, K.; Bucher, P. (1996): The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. In: *Trends Biochem Sci* 21 (5), S. 172–173.
- (115) Carim-Todd, L.; Escarceller, M.; Estivill, X.; Sumoy, L. (2001): Identification and characterization of UBXD1, a novel UBX domain-containing gene on human chromosome 19p13, and its mouse ortholog. In: *Biochim Biophys Acta* 1517 (2), S. 298–301.
- (116) Orengo, C. A.; Jones, D. T.; Thornton, J. M. (1994): Protein superfamilies and domain superfolds. In: *Nature* 372 (6507), S. 631–634.
- (117) Yuan, X.; Shaw, A.; Zhang, X.; Kondo, H.; Lally, J.; Freemont, P. S.; Matthews, S. (2001): Solution structure and interaction surface of the C-terminal domain from p47: a major p97-cofactor involved in SNARE disassembly. In: *J Mol Biol* 311 (2), S. 255–263.
- (118) Dreveny, Ingrid; Kondo, Hisao; Uchiyama, Keiji; Shaw, Anthony; Zhang, Xiaodong; Freemont, Paul S. (2004): Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. In: *EMBO J* 23 (5), S. 1030–1039.
- (119) Yuan, Xuemei; Simpson, Peter; McKeown, Ciaran; Kondo, Hisao; Uchiyama, Keiji; Wallis, Russell et al. (2004): Structure, dynamics and interactions of p47, a major adaptor of the AAA ATPase, p97. In: *EMBO J* 23 (7), S. 1463–1473.
- (120) Schubert, Christian; Richly, Holger; Rumpf, Sebastian; Buchberger, Alexander (2004): Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. In: *EMBO Rep* 5 (8), S. 818–824.
- (121) Nagahama, Masami; Ohnishi, Machi; Kawate, Yumiko; Matsui, Takayuki; Miyake, Hitomi; Yuasa, Keizo et al. (2009): UBXD1 is a VCP-interacting protein that is involved in ER-associated degradation. In: *Biochem Biophys Res Commun* 382 (2), S. 303–308.
- (122) Kern, Maximilian; Fernandez-Saiz, Vanesa; Schafer, Zasio; Buchberger, Alexander (2009): UBXD1 binds p97 through two independent binding sites. In: *Biochem Biophys Res Commun* 380 (2), S. 303–307.
- (123) Haines, Dale S.; Lee, J. Eugene; Beauparlant, Stephen L.; Kyle, Dane B.; den Besten, Willem; Sweredoski, Michael J. et al. (2012): Protein interaction profiling of the p97 adaptor UBXD1 points to a role for the complex in modulating ERGIC-53 trafficking. In: *Mol Cell Proteomics* 11 (6), S. M111.016444.
- (124) Ballar, Petek; Fang, Shengyun (2008): Regulation of ER-associated degradation via p97/VCP-interacting motif. In: *Biochem Soc Trans* 36 (Pt 5), S. 818–822.
- (125) Ju, Jeong-Sun; Fuentealba, Rodrigo A.; Miller, Sara E.; Jackson, Erin; Piwnicka-Worms, David; Baloh, Robert H.; Wehl, Conrad C. (2009): Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. In: *J Cell Biol* 187 (6), S. 875–888.
- (126) Ju, Jeong-Sun; Miller, Sara E.; Hanson, Phyllis I.; Wehl, Conrad C. (2008): Impaired protein aggregate handling and clearance underlie the pathogenesis of p97/VCP-associated disease. In: *J Biol Chem* 283 (44), S. 30289–30299.
- (127) Handbuch (2013): Protino Ni-NTA Agarose. In: *Macherey & Nagel*.
- (128) Niwa, Hajime; Ewens, Caroline A.; Tsang, Chun; Yeung, Heidi O.; Zhang, Xiaodong; Freemont, Paul S. (2012): The role of the N-domain in the ATPase activity of the mammalian AAA ATPase p97/VCP. In: *J Biol Chem* 287 (11), S. 8561–8570.

- (129) Harris, Robin K.; Becker, Edwin D.; Cabral De Menezes, Sonia M; Granger, Pierre; Hoffman, Roy E.; Zilm, Kurt W. (2008): Further conventions for NMR shielding and chemical shifts IUPAC recommendations 2008. In: *Solid State Nucl Magn Reson* 33 (3), S. 41–56.
- (130) Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. (1992): The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. In: *Biochemistry* 31 (6), S. 1647–1651.
- (131) Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Holm, A.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D. (1995): ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. In: *J Biomol NMR* 5 (3), S. 332.
- (132) Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Yao, J.; Abildgaard, F.; Dyson, H. J.; Oldfield, E. et al. (1995): ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. In: *J Biomol NMR* 6 (2), S. 135–140.
- (133) Ayed, A.; Mulder, F. A.; Yi, G. S.; Lu, Y.; Kay, L. E.; Arrowsmith, C. H. (2001): Latent and active p53 are identical in conformation. In: *Nat Struct Biol* 8 (9), S. 756–760.
- (134) Compton, L. A.; Johnson, W C Jr (1986): Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. In: *Anal Biochem* 155 (1), S. 155–167.
- (135) Manavalan, P.; Johnson, W C Jr (1987): Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. In: *Anal Biochem* 167 (1), S. 76–85.
- (136) Sreerama, N.; Woody, R. W. (2000): Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. In: *Anal Biochem* 287 (2), S. 252–260.
- (137) Mao, D.; Wachter, E.; Wallace, B. A. (1982): Folding of the mitochondrial proton adenosinetriphosphatase proteolipid channel in phospholipid vesicles. In: *Biochemistry* 21 (20), S. 4960–4968.
- (138) Lobley, A.; Whitmore, L.; Wallace, B. A. (2002): DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. In: *Bioinformatics* 18 (1), S. 211–212.
- (139) Johnson, W. C. (1999): Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. In: *Proteins* 35 (3), S. 307–312.
- (140) Pancoska, P.; Keiderling, T. A. (1991): Systematic comparison of statistical analyses of electronic and vibrational circular dichroism for secondary structure prediction of selected proteins. In: *Biochemistry* 30 (28), S. 6885–6895.
- (141) Sreerama, Narasimha; Woody, Robert W. (2004): Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. In: *Methods Enzymol* 383, S. 318–351.
- (142) Yang, J. T.; Wu, C. S.; Martinez, H. M. (1986): Calculation of protein conformation from circular dichroism. In: *Methods Enzymol* 130, S. 208–269.
- (143) Labeling Manual (2013): Atto 594 NHS-Ester. In: *ATTO-TEC GmbH*.
- (144) Wishart, David S.; Arndt, David; Berjanskii, Mark; Tang, Peter; Zhou, Jianjun; Lin, Guohui (2008): CS23D: a web server for rapid protein structure generation using NMR chemical shifts and sequence data. In: *Nucleic Acids Res* 36 (Web Server issue), S. W496-502.
- (145) Combet, C.; Blanchet, C.; Geourjon, C.; Deleage, G. (2000): NPS@: network protein sequence analysis. In: *Trends Biochem Sci* 25 (3), S. 147–150.
- (146) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. (1974): Prediction of protein conformation. In: *Biochemistry* 13 (2), S. 222–245.
- (147) Chou, P. Y.; Fasman, G. D. (1974): Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. In: *Biochemistry* 13 (2), S. 211–222.
- (148) Cole, Christian; Barber, Jonathan D.; Barton, Geoffrey J. (2008): The Jpred 3 secondary structure prediction server. In: *Nucleic Acids Res* 36 (Web Server issue), S. W197-201.
- (149) Pollastri, Gianluca; McLysaght, Aoife (2005): Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. In: *Bioinformatics* 21 (8), S. 1719–1720.
- (150) Cheng, J.; Randall, A. Z.; Sweredoski, M. J.; Baldi, P. (2005): SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. In: *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue), S. W72-6.

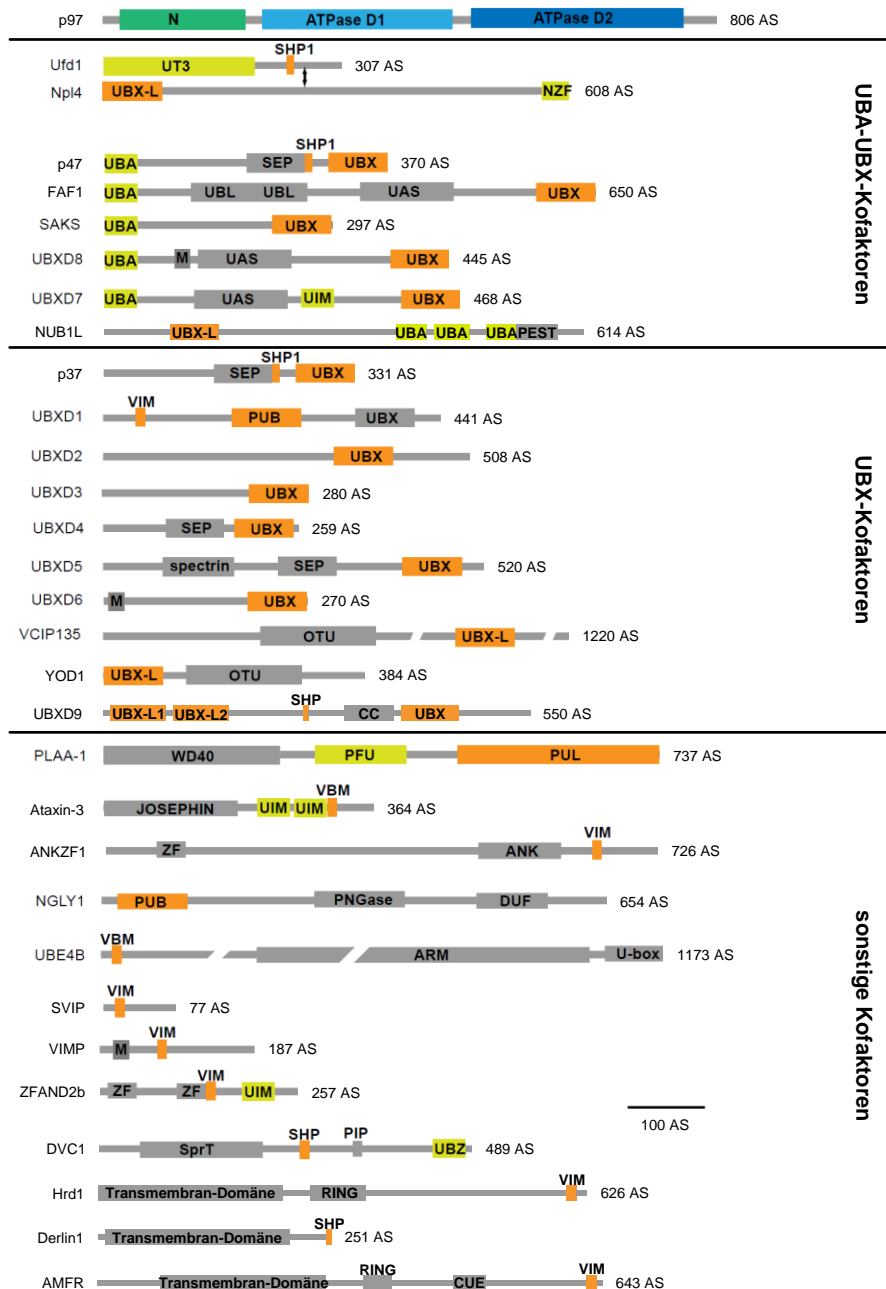
- (151) Jones, D. T. (1999): Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. In: *J Mol Biol* 292 (2), S. 195–202.
- (152) Fokkens, Michael; Schrader, Thomas; Klarner, Frank-Gerrit (2005): A molecular tweezer for lysine and arginine. In: *J Am Chem Soc* 127 (41), S. 14415–14421.
- (153) Pfänder, R. (2000): Kernspinresonanzspektroskopie an Proteinen in Lösung: Strukturbestimmung, Relaxationsstudien und dipolare Kopplungen. Dissertation. Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Abteilung Strukturforschung: Biologische NMR- Spektroskopie.
- (154) Dunker, A. K.; Obradovic, Z.; Romero, P.; Garner, E. C.; Brown, C. J. (2000): Intrinsic protein disorder in complete genomes. In: *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 11, S. 161–171.
- (155) Uversky, V. N.; Gillespie, J. R.; Fink, A. L. (2000): Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? In: *Proteins* 41 (3), S. 415–427.
- (156) Dunker, A. K.; Obradovic, Z. (2001): The protein trinity--linking function and disorder. In: *Nat Biotechnol* 19 (9), S. 805–806.
- (157) Williams, R. M.; Obradovi, Z.; Mathura, V.; Braun, W.; Garner, E. C.; Young, J. et al. (2001): The protein non-folding problem: amino acid determinants of intrinsic order and disorder. In: *Pac Symp Biocomput*, S. 89–100.
- (158) Romero, P.; Obradovic, Z.; Li, X.; Garner, E. C.; Brown, C. J.; Dunker, A. K. (2001): Sequence complexity of disordered protein. In: *Proteins* 42 (1), S. 38–48.
- (159) Dunker, A. K.; Garner, E.; Guilliot, S.; Romero, P.; Albrecht, K.; Hart, J. et al. (1998): Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. In: *Pac Symp Biocomput*, S. 473–484.
- (160) Dunker, A. Keith; Uversky, Vladimir N. (2010): Drugs for 'protein clouds': targeting intrinsically disordered transcription factors. In: *Curr Opin Pharmacol* 10 (6), S. 782–788.
- (161) Uversky, Vladimir N. (2011): Intrinsically disordered proteins from A to Z. In: *Int J Biochem Cell Biol* 43 (8), S. 1090–1103.
- (162) Linding, Rune; Russell, Robert B.; Neduva, Victor; Gibson, Toby J. (2003): GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. In: *Nucleic Acids Res* 31 (13), S. 3701–3708.
- (163) Puntervoll, Pal; Linding, Rune; Gemund, Christine; Chabanis-Davidson, Sophie; Mattingsdal, Morten; Cameron, Scott et al. (2003): ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. In: *Nucleic Acids Res* 31 (13), S. 3625–3630.
- (164) Fuxreiter, Monika; Tompa, Peter; Simon, Istvan (2007): Local structural disorder imparts plasticity on linear motifs. In: *Bioinformatics* 23 (8), S. 950–956.
- (165) Dunker, A. Keith; Cortese, Marc S.; Romero, Pedro; Iakoucheva, Lilia M.; Uversky, Vladimir N. (2005): Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. In: *FEBS J* 272 (20), S. 5129–5148.
- (166) Uversky, Vladimir N.; Oldfield, Christopher J.; Dunker, A. Keith (2005): Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. In: *J Mol Recognit* 18 (5), S. 343– 384.
- (167) Dephoure, Noah; Zhou, Chunshui; Villen, Judit; Beausoleil, Sean A.; Bakalarski, Corey E.; Elledge, Stephen J.; Gygi, Steven P. (2008): A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (31), S. 10762–10767.
- (168) Huang, Yongqi; Liu, Zhirong (2009): Kinetic advantage of intrinsically disordered proteins in coupled folding-binding process: a critical assessment of the "fly-casting" mechanism. In: *J Mol Biol* 393 (5), S. 1143–1159.
- (169) Iakoucheva, Lilia M.; Radivojac, Predrag; Brown, Celeste J.; O'Connor, Timothy R.; Sikes, Jason G.; Obradovic, Zoran; Dunker, A. Keith (2004): The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. In: *Nucleic Acids Res* 32 (3), S. 1037–1049.
- (170) Attar, Aida; Ripoli, Cristian; Riccardi, Elisa; Maiti, Panchanan; Li Puma, Domenica D; Liu, Tingyu et al. (2012): Protection of primary neurons and mouse brain from Alzheimer's pathology by molecular tweezers. In: *Brain* 135 (Pt 12), S. 3735–3748.

- (171) Bier, David; Rose, Rolf; Bravo-Rodriguez, Kenny; Bartel, Maria; Ramirez-Angueta, Juan Manuel; Dutt, Som et al. (2013): Molecular tweezers modulate 14-3-3 protein-protein interactions. In: *Nat Chem* 5 (3), S. 234–239.
- (172) Suskiewicz, Marcin J.; Sussman, Joel L.; Silman, Israel; Shaul, Yosef (2011): Context-dependent resistance to proteolysis of intrinsically disordered proteins. In: *Protein Science* 20 (8), S. 1285–1297.
- (173) Freemont, P., Prof. (2013): Konformation der N-Domäne von p97 in Gegenwart von Faf1. Neuss, Deutschland, 16.09.2013. Gespräch an Franziska Trusch.
- (174) Bebeacua, Cecilia; Forster, Andreas; McKeown, Ciaran; Meyer, Hemmo H.; Zhang, Xiaodong; Freemont, Paul S. (2012): Distinct conformations of the protein complex p97-Ufd1-Npl4 revealed by electron cryomicroscopy. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (4), S. 1098–1103.
- (175) Park, Sookhee; Rancour, David M.; Bednarek, Sebastian Y. (2007): Protein domain-domain interactions and requirements for the negative regulation of Arabidopsis CDC48/p97 by the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein, PUX1. In: *J Biol Chem* 282 (8), S. 5217– 5224.
- (176) Rancour, David M.; Park, Sookhee; Knight, Seth D.; Bednarek, Sebastian Y. (2004): Plant UBX domain-containing protein 1, PUX1, regulates the oligomeric structure and activity of arabidopsis CDC48. In: *J Biol Chem* 279 (52), S. 54264–54274.
- (177) Dalal, Seema; Rosser, Meredith F N; Cyr, Douglas M.; Hanson, Phyllis I. (2004): Distinct roles for the AAA ATPases NSF and p97 in the secretory pathway. In: *Mol Biol Cell* 15 (2), S. 637–648.
- (178) Li, Guangtao; Zhao, Gang; Schindelin, Hermann; Lennarz, William J. (2008): Tyrosine phosphorylation of ATPase p97 regulates its activity during ERAD. In: *Biochem Biophys Res Commun* 375 (2), S. 247–251.
- (179) Wu, Jiansheng; Katrekar, Anjali; Honigberg, Lee A.; Smith, Ashley M.; Conn, Marion T.; Tang, Jie et al. (2006): Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. In: *J Biol Chem* 281 (16), S. 11002–11010.
- (180) Zhang, S. H.; Liu, J.; Kobayashi, R.; Tonks, N. K. (1999): Identification of the cell cycle regulator VCP (p97/CDC48) as a substrate of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1. In: *J Biol Chem* 274 (25), S. 17806–17812.

8. ANHANG

8.1. DOMÄNENSTRUKTUR DER KOFAKTOREN VON P97

Aufgeführt sind die 30 bekannten Kofaktoren von p97 und ihre Domänenstruktur. Die Kofaktoren sind entsprechend der UBX-Domänen eingeteilt.



ANK: ankyrin repeat, ARM: armadillo domain, CUE: yeast Cue1 homolog domain, D1/D2: D1- und D2-Domäne von p97, DUF: domain of unknown function, M: Membrananker, N: N-Domäne p97, NZF: Npl4 Zinkfinger, OTU: ovarian tumor deubiquitylating domain, PEST: Pro-Glu-Ser-Thr-reiche Sequenz, PIP: PCNA-interacting protein box, PUB: peptide N-glycosidase/ubiquitin-associated domain, PUL: PLAP, Ufd3p, and Lub1p domain, PFU: PLAA family ubiquitin binding domain, RING: Zinkfinger, SEP: Shp1-eyc-p47 domain, SHP (auch BS1): binding site 1, UAS: ubiquitin-associating domain, UBA: ubiquitin-associated domain, UBL: ubiquitin-like domain, UBX-L (UBD): UBX domain like domain, UIM: ubiquitin-interaction motif, UT3: Ufd1 truncation 3 domain, VBM: VCP/p97 binding motif, VIM: VCP/p97 interaction motif, WD40: WD-endende Domäne mit 40 AS, ZF: Zinkfinger.

8.3. VERWENDETE PRIMER FÜR KLONIERUNGEN UND SITE-DIRECTED MUTAGENESEN

Konstrukt	Methode	Template	Interne Nummer	Sequenz 5'→3'	bp	GC-Gehalt [%]	T _m [°C]
UBXD1 1-80	Klonierung	BC1031	2001F	CACACAGGGCCCATGAAAAAATCTTCCAG	30	47	63,6
			2002R	GGTTGGCTCGAGCTTAACGGATGGTATCCTGAGATGTTG	39	51	62,9
UBXD1 32-133	Klonierung	BC1031	1051F	CACACAGGGCCCCACAAAGAGAAGCCGAACCAG	33	61	51,4
			1052R	GGTTGGCTCGAGCTTACCTCAGGGTGGCACCAG	33	64	67,9
UBXD1 1-80 RL62/63AA	QuickChange	BC1071	1099F	ACGCTCTGGCAGCGGCGGAGCAGAAACAGTC	31	65	66,6
			2000R	GACTGTTTCTGCTCCGCCGCTGCCAGAGCGT	31	65	66,6
UBXD1 32-133 RL62/63AA	QuickChange	BC1065	1099F	ACGCTCTGGCAGCGGCGGAGCAGAAACAGTC	31	65	66,6
			2000R	GACTGTTTCTGCTCCGCCGCTGCCAGAGCGT	31	65	66,6
UBXD1 1-133 QK21/22AA	QuickChange	BC1031	1095F	GCCGGTCCAGGTGCCCGCTGAAAGAGTCC	30	70	70,6
			1096R	GGACTCTTTTCAGCGCGGCACCTGGACCGGC	30	70	70,6
UBXD1 1-133 RQ45/46AA	QuickChange	BC1031	1097F	GCACCTCGTCCTCCAGCGGCGGGTCTACCAATGAAGC	38	66	77,5
			1098R	GCTTCATTGGTAGGACCCGCCGCTGGAGGACGAGGTGC	38	66	77,5
UBXD1 1-133 RL62/63AA	QuickChange	BC1031	1099F	ACGCTCTGGCAGCGGCGGAGCAGAAACAGTC	31	65	66,6
			2000R	GACTGTTTCTGCTCCGCCGCTGCCAGAGCGT	31	65	66,6
p97 200-806 (D1D2)	Klonierung	BC1118	2062F	CACACAGGGCCCGAAGTAGGGTATGATGACATTGG	35	54	77,6
			2063R	GGTTGGCTCGAGCTTAGCCATACAGGTCATCATC	34	53	76,5

8.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE DATEN ZU DEN VERWENDETEN KONSTRUKTEN

Konstrukt	interne Nummer	Template für Klonierung	Primer	Restriktions-schnittstellen	Vektor	Resistenz	Tag, Position	Schnittstelle	pI	MW [kDa]	ϵ [$M^{-1}\cdot cm^{-1}$]
UBXD1 1-32	BC1029	Synthese Geneart	-	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	9,78	3,795	0
UBXD1 1-80	BC1071	Klonierung, BC1031	2001F 2002R	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	10,23	9,028	5.500
UBXD1 32-133	BC1065	Klonierung, BC1031	1051F 2052R	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	9,04	11,048	6.990
UBXD1 1-133	BC1031	Synthese Geneart	-	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	9,67	14,533	6.990
UBXD1 1-154	BC1089	AG Meyer	-	BamHI/EcoRI fl, Stop bei 156	pGEX-4T1	Ampicillin	6xHis, N-terminal	Thrombin	9,33	16,904	7.115
UBXD1 1-80 RL62/63AA	BC1087	Klonierung, BC1070	1099F 2000R	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	10,07	8,900	5.500
UBXD1 32-133 RL62/63AA	BC1088	Klonierung, BC1070	1099F 2000R	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	8,15	10,920	5.500
UBXD1 1-133 QK21/22AA	BC1072	QuickChange, BC1031	1095F 1096R	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	9,56	14,419	6.990
UBXD1 1-133 RQ45/46AA	BC1069	QuickChange, BC1031	1097F 1098R	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	9,52	14,391	6.990
UBXD1 1-133 RL62/63AA	BC1070	QuickChange, BC1031	1099F 2000R	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	9,52	14,406	6.990

Konstrukt	interne Nummer	Template für Klonierung	Primer	Restriktions-schnittstellen	Vektor	Resistenz	Tag, Position	Schnittstelle	pI	MW [kDa]	ϵ [$M^{-1}\cdot cm^{-1}$]
p97 1-213 (Np97)	BC1073	AG Freemont	-	NcoI/BamHI	pProEx	Ampicillin	6xHis, N-terminal	TEV-Protease	5,64	25,413	13.660
p97 200-806 (D1D2p97)	BC1086	Klonierung, BC1081	2062F 2063R	Apal/XhoI	pET41b-PreScission	Kanamycin	GST, N-terminal	PreScission-Protease	5,07	66,910	28.795

8.5. PARAMETER FÜR VERWENDETE NMR-SPEKTREN

Parameter für die Aufnahme der NMR-Spektren. Aufgeführt sind der verwendete p1-Puls, die Anzahl der Scans, sowie jeweils die Spektrumweite und die Auflösung in den einzelnen Dimensionen F1, F2 und F3.

Spektrum	p1	NS	F1		F2		F3	
			SW	TD	SW	TD	SW	TD
SOFAST-HSQC UBXD1 (sfhmqcf3gpqh)	7,5	6	38,0000	512	15,0012	2048	-	-
HSQC Np97 (hsqctf3gpsi2)	13,0	25	40,0000	256	16,0824	2048	-	-
hetNOE (hsqcnoef3gpsi_pbayer)	11,4	16	16,0824	1024	40,0000	2048	-	-
¹⁵ N-TOCSY-HSQC (dipsihsqc3gpsi3d)	13,2	8	16,0000	128	39,0000	48	15,9388	2048
¹⁵ N-NOESY-HSQC (Ehnhsqcnoe)	13,0	4	34,9988	140	15,0012	300	15,0012	1024
HNCACB UBXD1 (hncacbpgwg3d)	13,0	24	80,0000	128	34,0000	40	15,0012	2048
CBCACONH UBXD1 (cbcaconhpgwg3d)	12,31	24	75,0000	128	34,0000	36	15,0012	2048
HNCO UBXD1 (hncogpgwg3d)	13,0	16	22,0849	128	36,0000	40	14,0011	2048

p1: p1-Puls [μ s]

NS: Anzahl der Scans

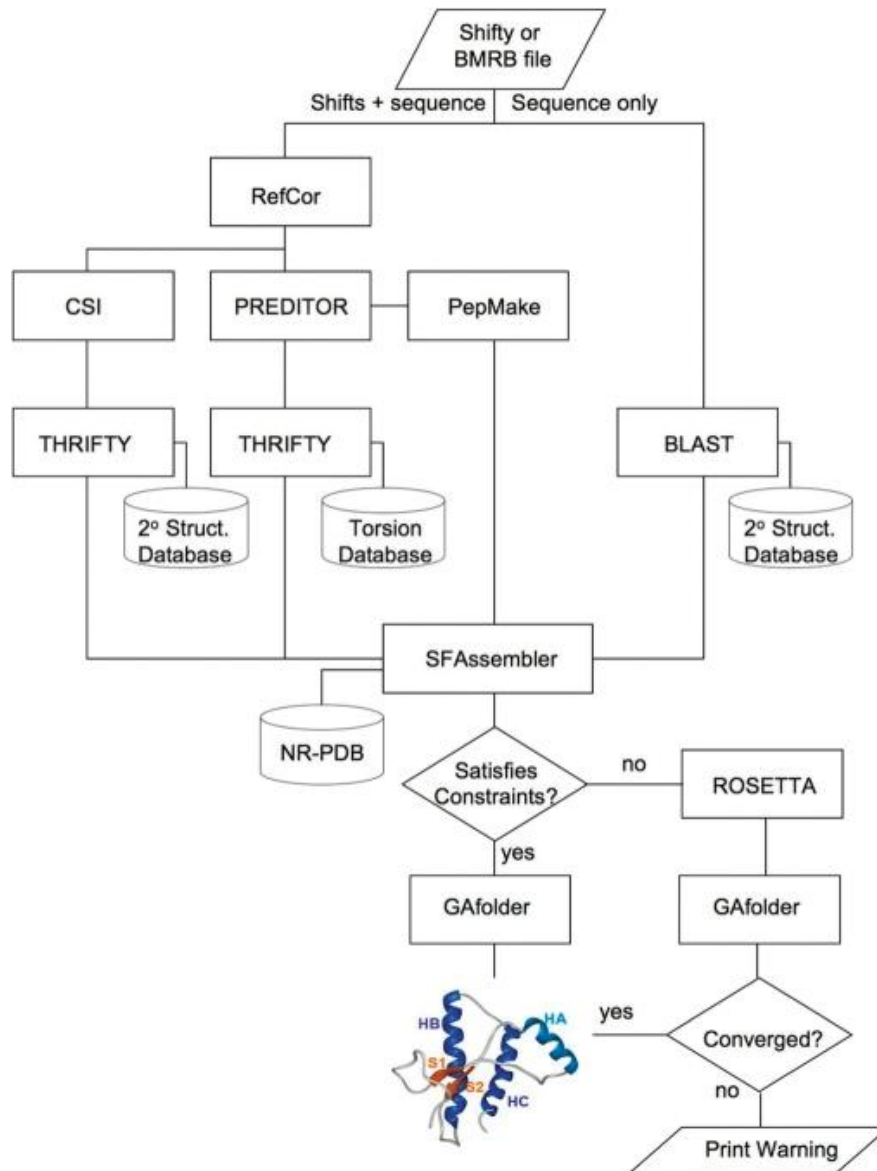
SW: Spektralweite [ppm]

TD: Größe des FID ("Auflösung")

Die Mischzeit für das ¹⁵N-TOCSY-HSQC betrug 70 ms, die Mischzeit für das ¹⁵N-NOESY-HSQC 100 ms.

8.6. ARBEITSDIAGRAMM FÜR CS23D

Dargestellt sind die einzelnen Arbeitsschritte des cs23d-Servers sowie die daran beteiligten Programme (144).



8.7. ÜBERSICHT SHIFT-RESONANZEN UBXD1 1-133

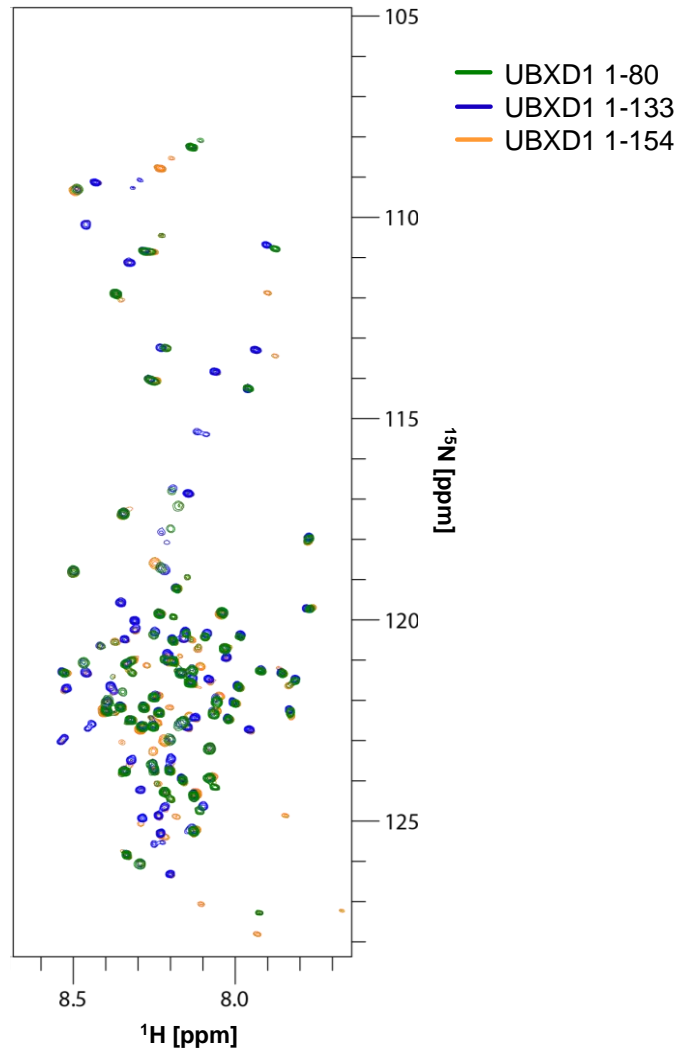
Position	Residue	HN	N	C α	C β	CO	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ
01 M	Met	-	-	54,929	36,646	-	-	-	-	-	-
02 K	Lys	8,078	123,898	53,321	30,475	180,908	4,186	-	-	-	-
03 K	Lys	8,284	122,165	53,610	30,142	177,922	4,214	-	-	-	3,023
04 F	Phe	8,133	121,211	54,693	37,115	180,533	4,554	3,016	-	-	-
05 F	Phe	8,059	121,971	54,958	37,075	-	4,212	3,005	-	-	-
06 Q	Gln	-	-	52,853	27,085	-	-	-	-	-	-
07 E	Glu	8,253	122,603	53,539	26,577	-	-	-	-	-	-
08 F	Phe	8,248	121,890	54,912	36,877	178,868	-	-	-	-	-
09 K	Lys	-	-	53,602	30,256	-	-	-	-	-	-
10 A	Ala	8,219	124,357	49,854	16,436	178,348	4,192	1,298	-	-	-
11 D	Asp	8,236	119,841	51,573	38,543	-	4,497	2,582	-	-	-
12 I	Ile	7,920	121,246	58,842	35,832	178,918	4,097	1,839	0,863	-	-
13 K	Lys	8,218	124,282	53,708	29,996	177,327	4,220	1,668	1,470	-	2,885
14 F	Phe	8,035	120,701	55,024	36,488	177,467	4,306	3,044	-	-	-
15 K	Lys	-	-	53,683	27,749	-	-	-	-	-	-
16 S	Ser	8,345	117,339	55,525	61,133	178,262	4,410	3,820	-	-	-
17 A	Ala	8,293	126,046	49,852	16,870	179,194	4,210	1,627	-	-	-
18 G	Gly	8,136	108,248	41,892	-	177,006	4,044	-	-	-	-
19 P	Pro	-	-	60,965	29,275	-	-	-	-	-	-
20 G	Gly	8,489	109,292	42,680	-	176,783	3,902	-	-	-	-
21 Q	Gln	8,042	119,805	53,199	26,843	180,474	4,254	1,953	2,264	-	-
22 K	Lys	8,287	122,629	53,682	30,125	178,768	-	-	-	-	-
23 L	Leu	8,203	123,720	52,833	39,641	178,170	-	-	-	-	-
24 K	Lys	8,236	122,297	53,615	30,234	177,365	4,213	-	-	-	2,995
25 E	Glu	8,355	122,151	53,871	27,683	178,225	4,236	1,950	2,244	-	-
26 S	Ser	-	-	55,406	61,170	-	-	-	-	-	-
27 V	Val	8,138	121,535	59,855	29,993	180,083	4,102	2,053	0,915	-	-
28 G	Gly	8,369	111,874	42,493	-	177,974	3,905	-	-	-	-
29 E	Glu	8,200	121,015	52,848	26,571	180,492	4,194	1,936	2,592	-	-
30 K	Lys	8,200	122,967	53,685	27,818	179,650	4,213	1,668	1,534	-	2,977
31 A	Ala	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32 H	His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33 K	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34 E	Glu	-	-	53,596	27,645	-	-	-	-	-	-
35 K	Lys	8,342	123,755	51,584	29,815	178,553	4,507	1,717	1,514	-	2,966
36 P	Pro	-	-	60,534	29,299	-	-	-	-	-	-
37 N	Asn	8,498	118,776	50,584	36,026	177,976	4,579	2,724	-	-	-
38 Q	Gln	8,168	121,311	50,757	26,436	179,910	4,572	1,947	2,280	-	-
39 P	Pro	-	-	60,151	29,246	-	-	-	-	-	-
40 A	Ala	8,337	125,839	47,663	15,266	178,509	4,484	1,353	-	-	-
41 P	Pro	-	-	60,176	29,366	-	-	-	-	-	-
42 R	Arg	8,325	122,471	51,113	27,383	178,086	4,529	1,738	-	3,102	-
43 P	Pro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44 P	Pro	-	-	60,720	29,368	-	-	-	-	-	-
45 R	Arg	8,337	121,091	53,565	27,605	177,886	4,209	1,828	-	3,154	-
46 Q	Gln	8,396	122,027	53,436	27,517	178,488	4,252	1,956	2,285	-	-
47 G	Gly	8,282	110,817	41,831	-	178,826	4,063	-	-	-	-
48 P	Pro	-	-	60,333	29,505	-	-	-	-	-	-
49 T	Thr	8,265	114,012	59,402	67,300	177,257	4,340	4,197	1,215	-	-
50 N	Asn	8,418	120,645	51,181	36,084	-	4,419	2,579	-	-	-
51 E	Glu	8,534	121,306	56,257	26,918	-	4,113	1,925	2,214	-	-
52 A	Ala	8,250	123,713	51,608	15,569	176,951	4,236	1,686	-	-	-
53 Q	Gln	8,183	119,217	54,995	26,026	177,114	4,221	1,995	2,340	-	-
54 M	Met	-	-	54,764	-	-	-	-	-	-	-
55 A	Ala	8,166	123,946	51,503	15,536	176,897	4,237	1,567	-	-	-
56 A	Ala	8,024	122,456	51,498	15,563	175,411	4,179	1,418	-	-	-
57 A	Ala	7,993	121,642	51,536	15,578	175,309	4,172	1,421	-	-	-
58 A	Ala	8,006	122,048	51,468	15,572	175,140	4,178	1,420	-	-	-
59 A	Ala	7,858	121,318	51,465	15,561	175,662	4,040	1,458	-	-	-
60 L	Leu	7,779	119,723	53,918	39,273	178,245	4,122	1,679	0,894	-	-

Übersicht Shift-Resonanzen UBXD1 1-133

Position	Residue	HN	N	C α	C β	CO	H α	H β	H γ	H δ	H ϵ
61 A	Ala	7,832	122,234	51,137	15,676	176,400	4,155	1,438			
62 R	Arg	7,773	117,945	54,828	27,675	175,806	4,135	1,900	1,757	3,214	-
63 L	Leu	7,814	121,475	53,545	39,420	177,419	4,160	1,697	0,914	-	
64 E	Glu	8,155	120,291	54,700	27,070	-	4,161	1,994	2,291		
65 Q	Gln	8,088	120,347	53,859	26,525	177,522	4,194	2,027	2,352	-	
66 K	Lys	-	-	54,279	30,215	-	-	-	-	-	-
67 Q	Gln	8,248	120,298	53,521	26,527	-	4,227	2,006	2,364	-	
68 S	Ser	8,194	116,746	55,953	61,143	178,316	4,314	3,793			
69 R	Arg	8,195	120,484	54,507	27,605	177,286	4,220	2,214	1,953	-	-
70 A	Ala	8,099	124,644	49,730	16,382	179,678	4,104	1,259			
71 W	Trp	7,983	120,372	54,557	27,189	177,548	4,592	3,229			
72 G	Gly	7,904	110,682	41,985		178,570	3,933				
73 P	Pro			60,863	29,500	-	-	-	-	-	
74 T	Thr	8,230	113,236	59,136	67,271	177,304	4,386	4,233	1,195		
75 S	Ser	8,228	117,829	56,158	61,094	177,497	4,630	3,794			
76 Q	Gln	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
77 D	Asp	-	-	52,329	38,465	-	-	-			
78 T	Thr	7,961	114,258	60,135	66,887	178,404	4,239	4,078	1,163		
79 I	Ile	7,957	122,730	59,441	35,531	179,968	4,016	1,845	-	0,849	
80 R	Arg	8,198	123,464	53,312	27,813	-	4,190	1,760	1,611	3,175	-
81 N	Asn	8,217	118,778	50,826	36,019	177,147	4,617	2,775	-	-	
82 Q	Gln	-	-	53,176	26,805	-	-	-	-	-	
83 V	Val	8,081	121,485	60,005	29,776	178,597	3,999	2,026	0,898		
84 R	Arg	8,286	124,942	53,430	27,640	178,488	4,232	1,848	1,695	3,146	-
85 K	Lys	8,321	123,496	53,984	30,328	-	4,206	1,696	-	-	3,213
86 E	Glu	8,522	121,720	54,153	27,184	178,462	4,209	1,926	2,212		
87 L	Leu	-	-	52,461	38,457	-	-	-	-	-	
88 Q	Gln	8,209	120,863	53,697	26,664	-	4,221	1,993	2,347	-	
89 A	Ala	8,222	125,242	49,996	16,500	180,122	4,134	1,361			
90 E	Glu	8,311	120,024	53,871	27,506	176,972	3,748	1,938	2,274		
91 A	Ala	8,238	124,860	49,998	16,496	178,477	4,135	1,364			
92 T	Thr	8,063	113,833	59,330	67,244	176,888	4,334	4,162	1,120		
93 V	Val	8,124	122,436	59,573	29,988	178,877	4,105	2,047	0,907		
94 S	Ser	8,355	119,575	55,839	61,201	178,540	4,238	3,796			
95 G	Gly	8,328	111,119	42,414		179,773	3,947				
96 S	Ser	8,145	116,862	53,636	60,862	180,984	4,728	3,794			
97 P	Pro			60,630	29,375	-	-	-	-	-	
98 E	Glu	8,342	120,488	53,587	27,658	177,005	4,185	1,842	2,249		
99 A	Ala	8,202	126,325	47,717	15,476	178,841	4,532	1,325			
100 P	Pro			60,791	29,309	-	-	-	-	-	
101 G	Gly	8,431	109,133	42,551		177,048	3,944				
102 T	Thr	7,936	113,292	59,407	67,122	180,320	4,282	4,160	1,174		
103 N	Asn	8,461	121,322	50,519	36,134	180,463	4,691	2,722	-		
104 V	Val	8,027	120,944	59,690	29,983	179,950	4,070	2,002	0,868		
105 V	Val	8,218	124,663	59,534	30,001	178,662	4,136	2,007	0,918		
106 S	Ser	8,309	120,239	55,433	61,222	178,736	4,187	3,769			
107 E	Glu	8,293	124,234	51,674	27,084	180,822	4,528	-	2,254		
108 P	Pro			60,567	30,443	-	-	-	-	-	
109 R	Arg	8,385	121,667	53,038	28,423	177,912	4,288	1,897	1,715	3,179	-
110 E	Glu	8,443	122,600	53,497	27,641	178,501	4,233	1,899	2,224		
111 E	Glu	8,530	122,961	54,137	27,529	178,177	4,228	1,936	2,217		
112 G	Gly	8,462	110,171	42,777		177,547	3,947				
113 S	Ser	8,118	115,333	55,781	61,188	180,298	4,368	3,812			
114 A	Ala	8,250	125,574	49,840	16,016	179,086	4,247	1,524			
115 H	His	-	-	53,965	27,084	-	-	-			
116 L	Leu	8,146	122,673	52,656	39,561	180,205	4,227	1,581	-	-	
117 A	Ala	8,132	125,225	49,751	16,415	178,081	4,257	1,273			
118 V	Val	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
119 P	Pro			60,888	29,308	-	-	-	-	-	
120 G	Gly	8,295	109,077	42,592		177,373	3,850				

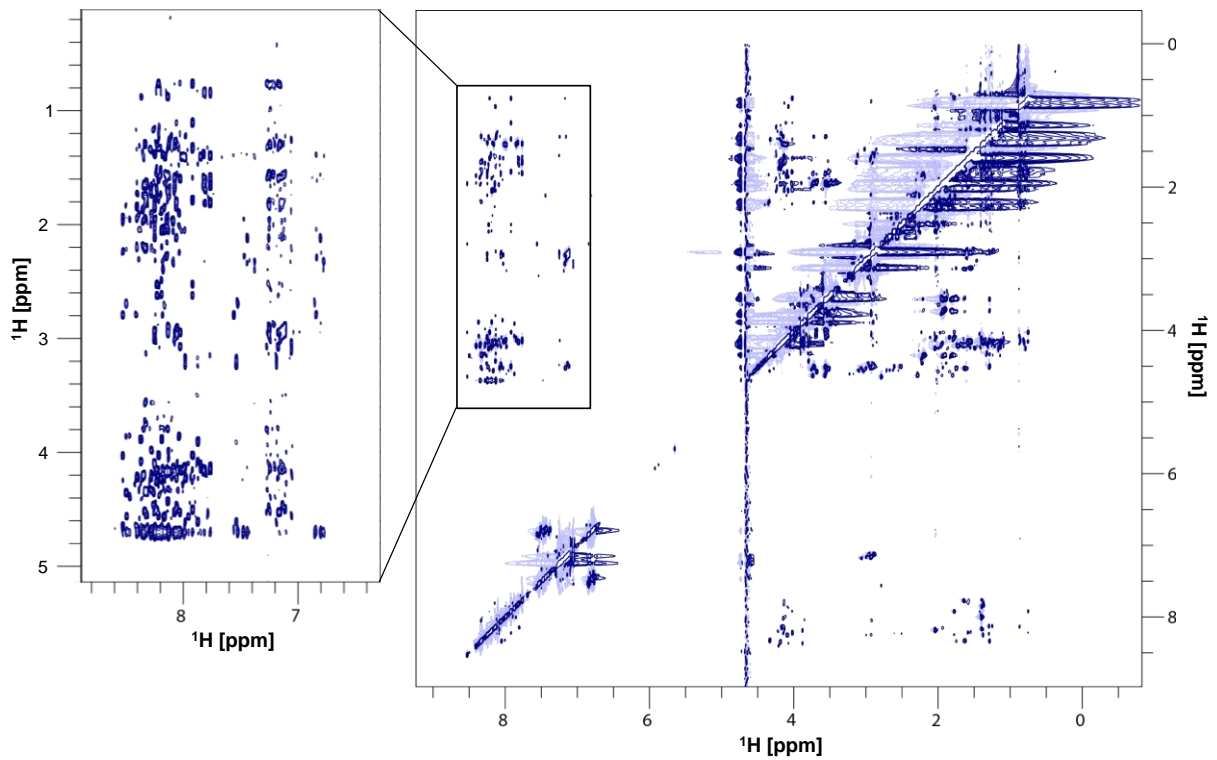
8.8. ^1H - ^{15}N -HSQC-SPEKTREN VERSCHIEDENER UBXD1-KONSTRUKTE

Dargestellt sind die ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von UBXD1 1-80 (grün), UBXD1 1-133 (blau) und UBXD1 1-154 (orange). Alle Konstrukte zeigen die gleiche geringe Dispersion. Die Signale der gemeinsamen Aminosäuren in den einzelnen Konstrukten unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer Lage.



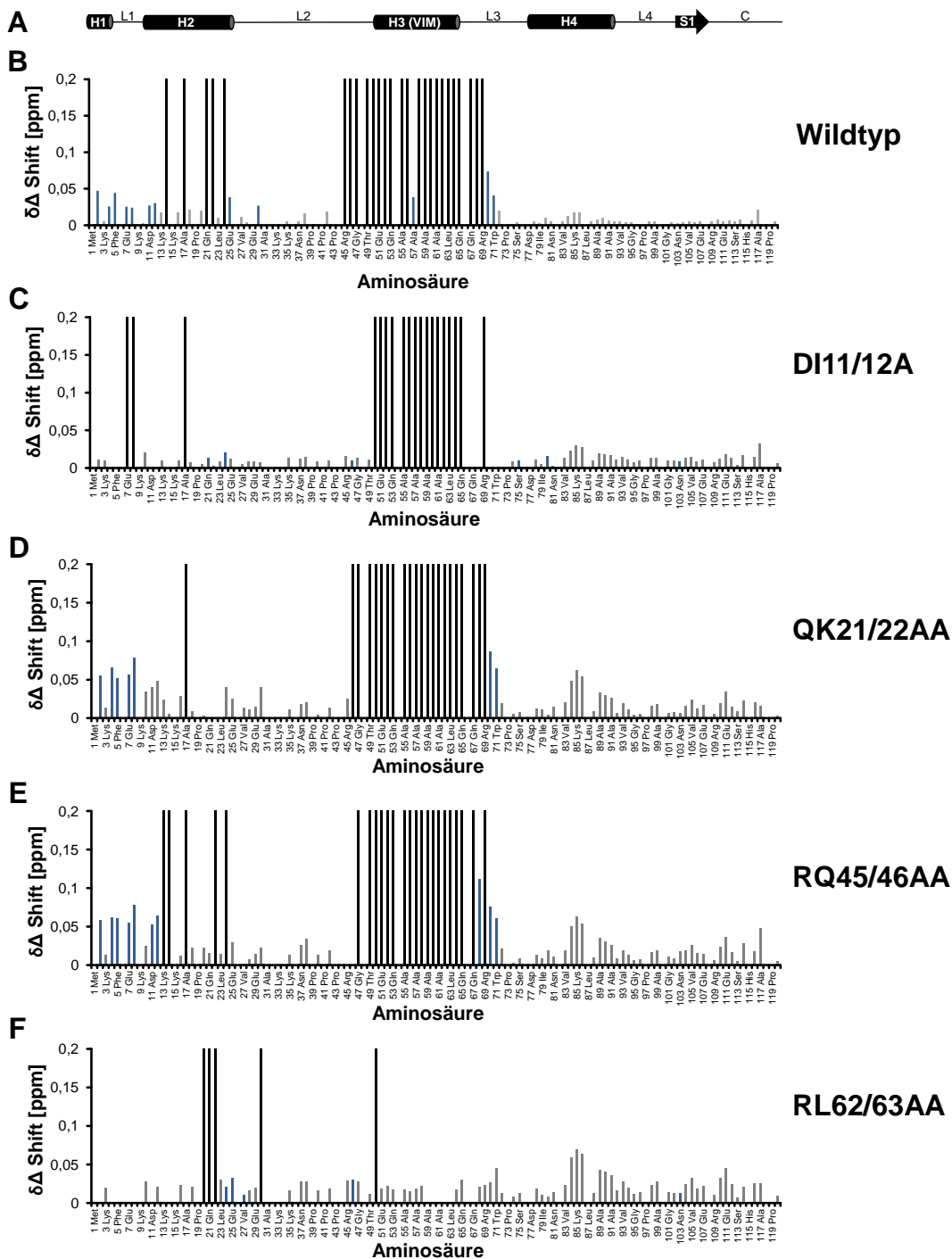
8.9. 2D-NOESY-SPEKTRUM VON UBXD1 1-80

Dargestellt ist das 2D ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum von UBXD1 1-80. Links ein vergrößerter Ausschnitt der NH-Region. Die unzureichenden NOESY-Signale lassen keine Strukturberechnung des N-Terminus von UBXD1 zu.



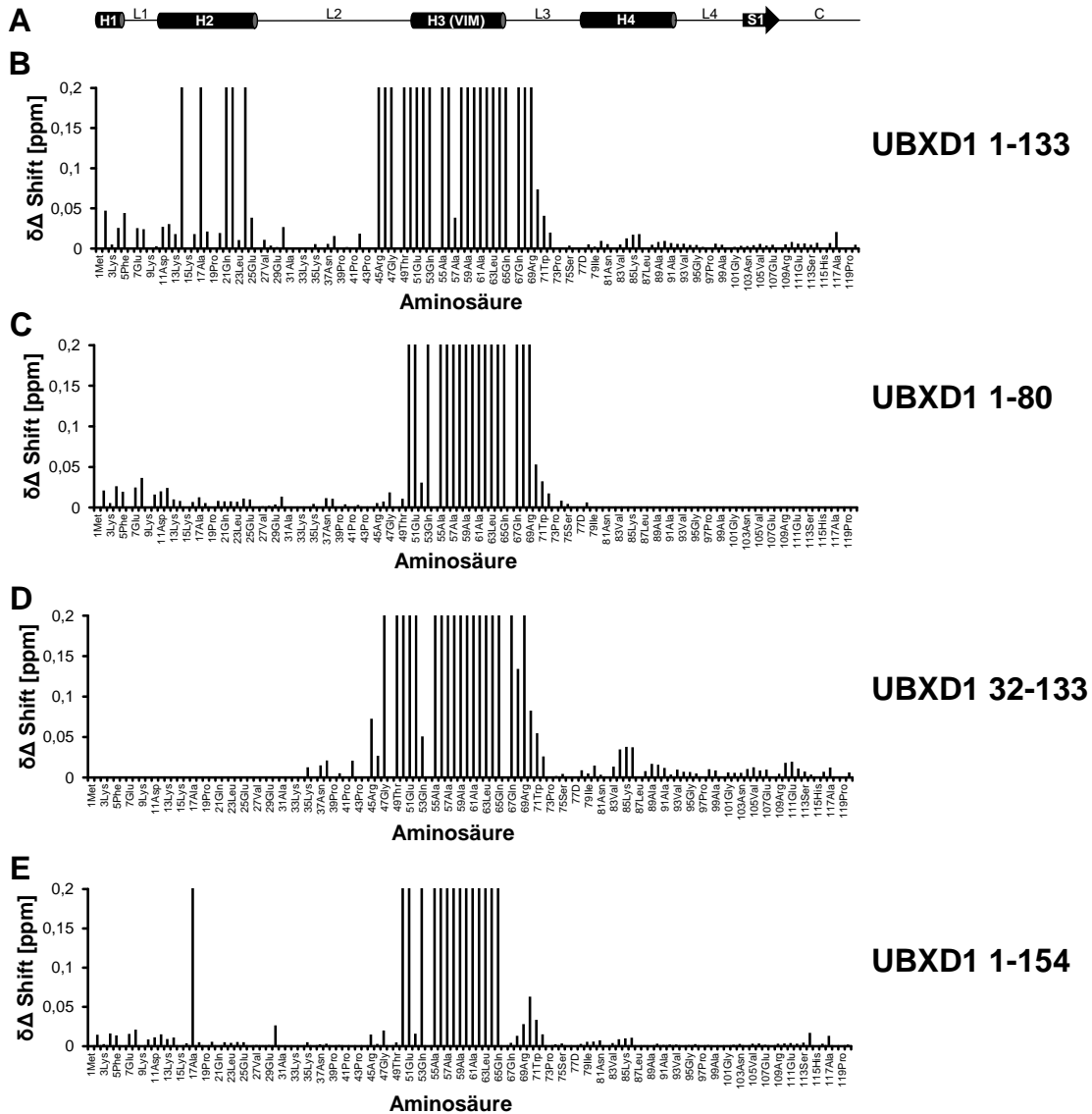
8.10. SHIFT-MAPS DER TITRATION DER UBXD1-MUTANTEN MIT NP97

Dargestellt sind jeweils die Endpunkte der Titration verschiedener UBXD1-Mutanten mit Np97. Jede Titration ist in der Sättigung. A: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder: α -Helix, Pfeil: β -Strang, Strich: unstrukturierter Bereich). B: Titration von UBXD1 1-133 wt (100 μ M) + 500 Np97, C: Titration von UBXD1 1-133 DI11/12AA (120 μ M) + 200 Np97, D: Titration von UBXD1 1-133 QK21/22AA (160 μ M) + 200 Np97, E: Titration von UBXD1 1-133 RQ45/46AA (220 μ M) + 200 Np97, F: Titration von UBXD1 1-133 RL62/63AA (200 μ M) + 200 Np97.



8.11. SHIFT-MAPS DER TITRATION DER UBXD1-KONSTRUKTE MIT NP97

Dargestellt sind jeweils die Endpunkte der Titration verschiedener UBXD1-Konstrukte mit Np97. Jede Titration ist in der Sättigung. A: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder: α -Helix, Pfeil: β -Strang, Strich: unstrukturierter Bereich). B: Titration von UBXD1 1-133 wt (100 μ M) + 500 Np97, C: Titration von UBXD1 1-80 (200 μ M) + 400 Np97, C: Titration von UBXD1 32-133 (350 μ M) + 1050 Np97, D: Titration von UBXD1 1-154 (300 μ M) + 300 Np97.



8.12. ÜBERSICHT SHIFT-RESONANZEN Np97

Position	Residue	HN	N	Position	Residue	HN	N
1 M	Met	-	-	61 G	Gly	8,122	111,427
2 A	Ala	8,177	124,946	62 K	Lys	-	-
3 S	Ser	-	-	63 K	Lys	7,921	121,044
4 G	Gly	-	-	64 R	Arg	-	-
5 A	Ala	8,117	123,493	65 R	Arg	-	-
6 D	Asp	-	-	66 E	Glu	-	-
7 S	Ser	8,097	115,893	67 A	Ala	-	-
8 K	Lys	-	-	68 V	Val	9,023	118,131
9 G	Gly	8,258	109,121	69 C	Cys	-	-
10 D	Asp	8,174	120,306	70 I	Ile	9,115	120,454
11 D	Asp	-	-	71 V	Val	8,305	122,741
12 L	Leu	7,943	123,751	72 L	Leu	8,555	126,015
13 S	Ser	8,229	116,761	73 S	Ser	7,400	112,244
14 T	Thr	7,935	115,128	74 D	Asp	8,312	122,367
15 A	Ala	7,991	125,179	75 D	Asp	-	-
16 I	Ile	7,879	118,890	76 T	Thr	8,754	109,796
17 L	Leu	7,436	124,142	77 C	Cys	7,391	125,371
18 K	Lys	7,997	123,488	78 S	Ser	-	-
19 Q	Gln	8,701	124,133	79 D	Asp	8,553	123,090
20 K	Lys	-	-	80 E	Glu	8,535	122,443
21 N	Asn	-	-	81 K	Lys	7,598	120,073
22 R	Arg	-	-	82 I	Ile	8,245	115,307
23 P	Pro	-	-	83 R	Arg	8,691	125,018
24 N	Asn	-	-	84 M	Met	-	-
25 R	Arg	8,022	120,525	85 N	Asn	8,594	118,094
26 L	Leu	-	-	86 R	Arg	8,014	122,664
27 I	Ile	8,383	120,935	87 V	Val	7,107	119,416
28 V	Val	-	-	88 V	Val	7,774	122,778
29 D	Asp	-	-	89 R	Arg	-	-
30 E	Glu	-	-	90 N	Asn	8,322	115,909
31 A	Ala	8,201	126,051	91 N	Asn	7,906	120,413
32 I	Ile	8,216	118,872	92 L	Leu	7,715	117,062
33 N	Asn	-	-	93 R	Arg	7,931	114,293
34 E	Glu	8,585	112,793	94 V	Val	-	-
35 D	Asp	8,164	121,915	95 R	Arg	9,103	120,385
36 N	Asn	-	-	96 L	Leu	-	-
37 S	Ser	8,786	110,850	97 G	Gly	8,902	111,406
38 V	Val	7,081	117,628	98 D	Asp	-	-
39 V	Val	8,843	116,844	99 V	Val	8,140	117,061
40 S	Ser	8,215	114,305	100 I	Ile	8,809	117,888
41 L	Leu	8,026	122,030	101 S	Ser	7,967	112,755
42 S	Ser	9,734	117,397	102 I	Ile	8,183	121,341
43 Q	Gln	9,347	120,711	103 Q	Gln	8,365	123,607
44 P	Pro	-	-	104 P	Pro	-	-
45 K	Lys	-	-	105 C	Cys	7,884	114,200
46 M	Met	-	-	106 P	Pro	-	-
47 D	Asp	-	-	107 D	Asp	8,370	117,299
48 E	Glu	-	-	108 V	Val	7,358	120,001
49 L	Leu	-	-	109 K	Lys	9,149	128,293
50 Q	Gln	7,705	115,372	110 y	Tyr	8,499	119,537
51 L	Leu	7,978	117,180	111 G	Gly	9,773	107,436
52 F	Phe	8,661	120,519	112 K	Lys	10,088	128,379
53 R	Arg	8,306	120,364	113 R	Arg	7,774	117,759
54 G	Gly	9,482	114,898	114 I	Ile	8,939	115,778
55 D	Asp	8,223	122,355	115 H	His	8,567	123,350
56 T	Thr	7,857	110,213	116 V	Val	7,676	112,570
57 V	Val	9,178	117,270	117 L	Leu	8,501	120,336
58 L	Leu	8,827	123,100	118 P	Pro	-	-
59 L	Leu	-	-	119 I	Ile	7,852	118,590
60 K	Lys	8,441	118,895	120 D	Asp	9,278	130,512

Übersicht Shift-Resonanzen Np97

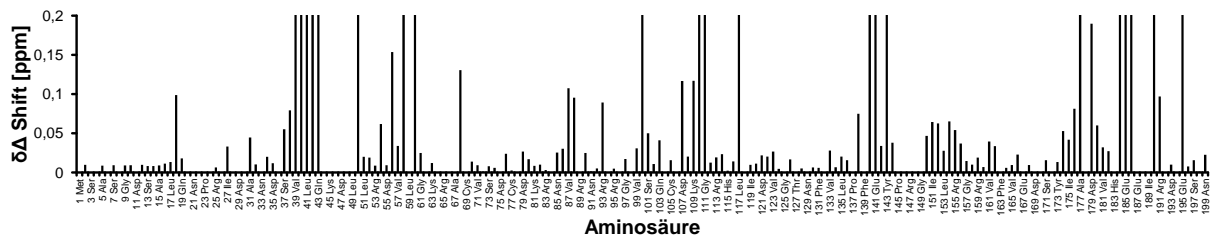
Position	Residue	HN	N
121 D	Asp	8,628	121,969
122 T	Thr	8,146	108,806
123 V	Val	7,199	113,632
124 E	Glu	7,643	123,849
125 G	Gly	-	-
126 I	Ile	7,702	120,588
127 T	Thr	-	-
128 G	Gly	8,069	109,089
129 N	Asn	-	-
130 L	Leu	7,864	122,000
131 F	Phe	8,600	119,536
132 E	Glu	-	-
133 V	Val	8,065	113,787
134 Y	Tyr	7,226	111,667
135 L	Leu	7,549	117,154
136 K	Lys	9,049	119,308
137 P	Pro	-	-
138 Y	Tyr	6,836	116,726
139 F	Phe	-	-
140 L	Leu	7,629	121,464
141 E	Glu	8,774	120,839
142 A	Ala	7,463	119,696
143 Y	Tyr	8,250	118,279
144 R	Arg	8,937	117,868
145 P	Pro	-	-
146 I	Ile	-	-
147 R	Arg	-	-
148 K	Lys	-	-
149 G	Gly	-	-
150 D	Asp	8,455	122,061
151 I	Ile	8,937	119,466
152 F	Phe	9,096	123,378
153 L	Leu	5,959	122,373
154 V	Val	9,140	126,456
155 R	Arg	8,732	126,018
156 G	Gly	8,336	111,814
157 G	Gly	8,119	120,223
158 M	Met	8,156	122,286
159 R	Arg	7,819	119,695
160 A	Ala	8,606	126,664
161 V	Val	8,193	122,516
162 E	Glu	7,502	122,196
163 F	Phe	-	-
164 K	Lys	9,259	119,596
165 V	Val	9,172	125,071
166 V	Val	8,884	129,631
167 E	Glu	-	-
168 T	Thr	8,715	114,600
169 D	Asp	-	-
170 P	Pro	-	-
171 S	Ser	8,359	112,874
172 P	Pro	-	-
173 Y	Tyr	6,908	115,695
174 C	Cys	8,852	111,176
175 I	Ile	8,398	118,237
176 V	Val	8,707	129,263
177 A	Ala	8,648	95,778
178 P	Pro	-	-
179 D	Asp	7,917	110,105
180 T	Thr	7,833	120,796
181 V	Val	7,775	130,296
182 I	Ile	8,429	128,348
183 H	His	-	-

Position	Residue	HN	N
184 C	Cys	8,825	127,668
185 E	Glu	8,272	118,735
186 G	Gly	7,963	110,265
187 E	Glu	-	-
188 P	Pro	-	-
189 I	Ile	-	-
190 K	Lys	8,530	124,154
191 R	Arg	8,953	120,870
192 E	Glu	-	-
193 D	Asp	8,137	118,443
194 E	Glu	-	-
195 E	Glu	7,248	121,755
196 E	Glu	8,049	120,092
197 S	Ser	8,411	117,304
198 L	Leu	8,238	124,905
199 N	Asn	7,898	123,504

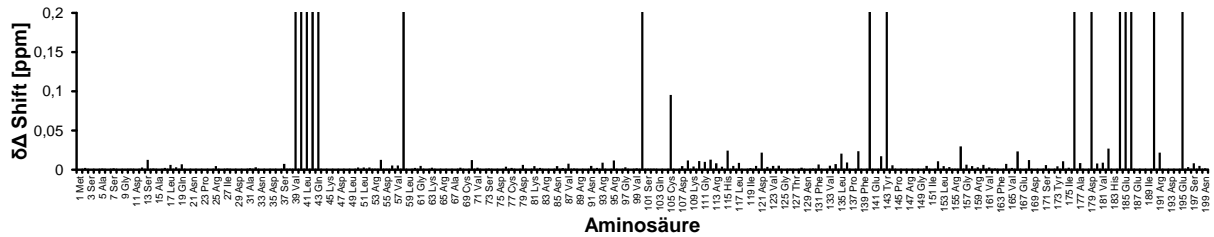
8.13. SHIFT-MAPS DER TITRATION VON NP97 MIT UBXD1-KONSTRUKTEN

Dargestellt sind jeweils die Endpunkte der Titration von Np97 mit verschiedenen UBXD1-Konstrukten. Jede Titration ist in der Sättigung. Ausgewertet wurden die Shifts. A: Titration von Np97 (260 μ M) + 220 μ M UBXD1 1-80, B: Titration von Np97 (260 μ M) + 220 μ M UBXD1 1-80 RL62/63AA, C: Titration von Np97 (260 μ M) + 380 μ M UBXD1 32-133 RL62/63AA.

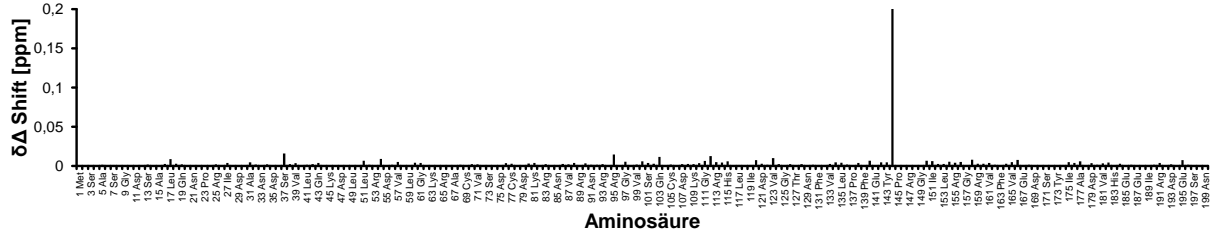
A Np97 + UBXD1 1-80



B Np97 + UBXD1 1-80 RL62/63AA



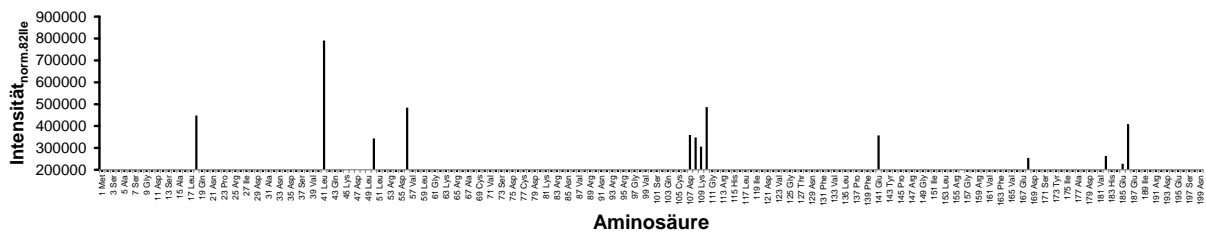
C Np97 + UBXD1 32-133 RL62/63AA



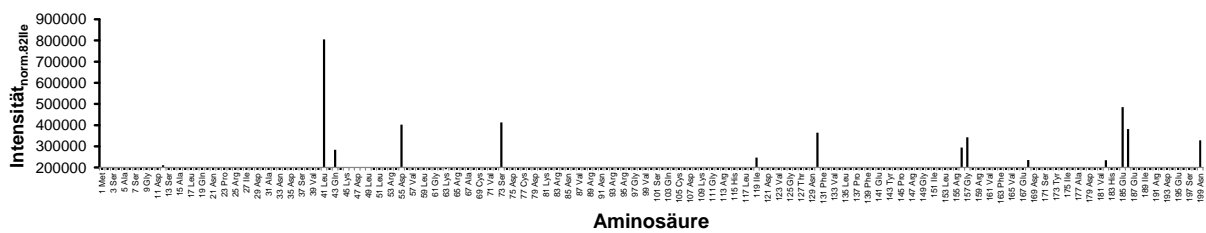
8.14. INTENSITÄTENAUSWERTUNG DER TITRATION VON NP97 MIT UBXD1-KONSTRUKTEN

Dargestellt sind jeweils die Endpunkte der Titration von Np97 mit verschiedenen UBXD1-Konstrukten. Jede Titration ist in der Sättigung. Ausgewertet wurde die Änderung der Intensitäten. A: Titration von Np97 (260 µM) + 220 µM UBXD1 1-80, B: Titration von Np97 (260 µM) + 220 µM UBXD1 1-80 RL62/63AA, C: Titration von Np97 (260 µM) + 380 µM UBXD1 32-133 RL.

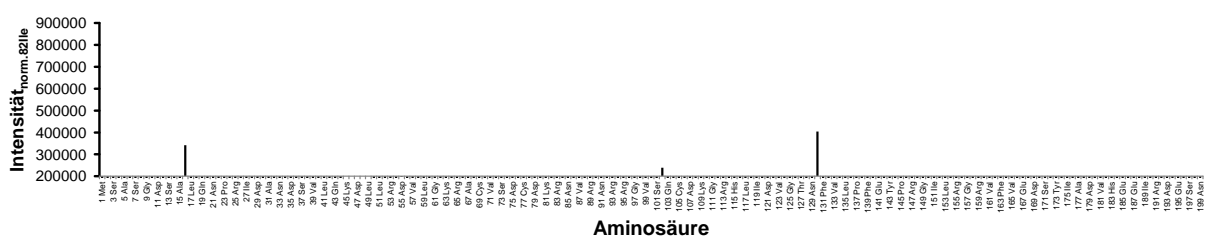
A Np97 + UBXD1 1-80



B Np97 + UBXD1 1-80 RL62/63AA



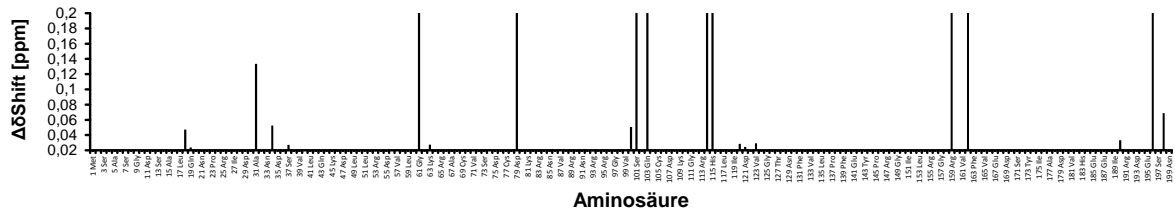
C Np97 + UBXD1 32-133 RL62/63AA



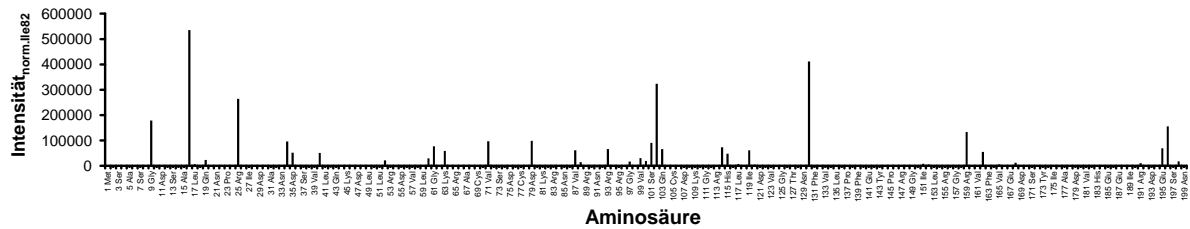
8.15. TITRATION VON NP97 MIT DER PHOSPHAT-PINZETTE

Dargestellt sind jeweils die Endpunkte der Titration von Np97 (260 μM) mit der Phosphatpinzette (200 μM). Die Titration ist in der Sättigung. Ausgewertet wurde die Änderung der Shifts (A) und der Intensitäten (B).

A Shift-Analyse: Np97 + Phosphat-Pinzette



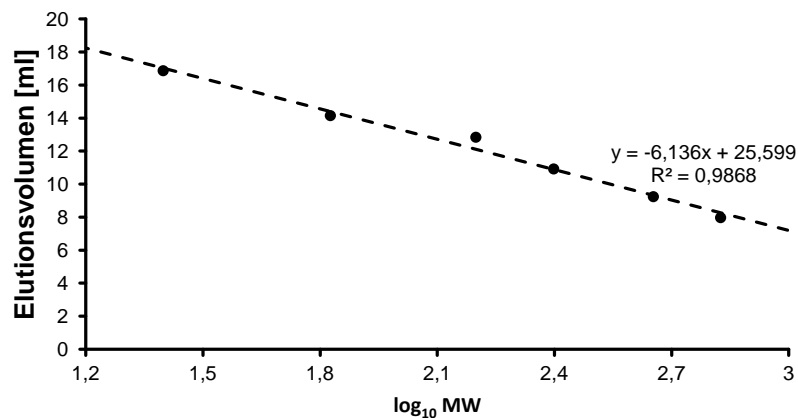
B Intensitäten-Analyse: Np97 + Phosphat-Pinzette



8.16. KALIBRATION SUPERDEX 200 10/300 GL

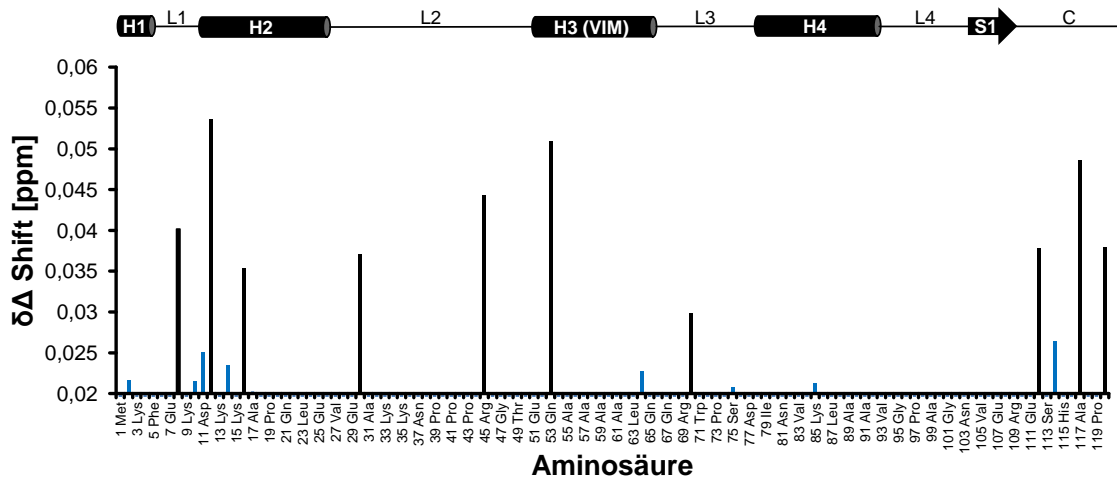
Zur Untersuchung des Multimerisierungsgrades der D1D2-Domäne wurde eine analytische Gelfiltration durchgeführt (Kap. 3.5.1). Dazu wurde die Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL mit den Proteinen Thyroglobulin, Ferritin, Katalase, Aldolase, BSA und Chymotrypsinogen A kalibriert. Danach wurden das Elutionsvolumen gegen das dekadisch logarithmierte Molekulargewicht aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt, die anschließend zur Berechnung der Größe der D1D2-Multimere verwendet wurde.

Protein	MW [kDa]	log ₁₀ MW	Elutionsvolumen [ml]
Thyroglobulin	669	2,825	7,97
Ferritin	450	2,653	9,24
Katalase	250	2,398	10,92
Aldolase	158	2,199	12,84
BSA	67	1,826	14,15
Chymotrypsinogen A	25	1,378	16,87



8.17. NMR-TITRATION VON UBXD1 1-133 MIT ATP

Desweiteren wurde NMR-spektroskopisch die mit ATP interagierenden Aminosäuren von UBXD1 1-133 ermittelt. Da eine Titration jedoch aufgrund der Aggregatbildung bei niedrigen UBXD1-ATP-Verhältnissen nicht möglich ist, wurde zur Auswertung ein Spektrum ohne und eines mit 10 mM ATP verwendet.



Oben: Sekundärstrukturverteilung entlang der UBXD1-Sequenz (Zylinder = α -Helix, Pfeil = β -Strang, Strich = unstrukturierter Bereich). Unten: Shift-Analyse der einzelnen Aminosäuren von UBXD1 1-120 (150 μ M) nach Zugabe von 10 mM ATP. Es gibt einige Aminosäuren, die nach Zugabe von ATP stärker shiften (schwarz) oder schwach shiften (blau) und viele, die keine Veränderungen zeigen (grau). Die mit ATP interagierenden Aminosäuren befinden sich vor allem im N-Terminus und am C-Terminus von UBXD1 1-133.

Die nach Zugabe von ATP auftretenden Shifts in einem ^1H - ^{15}N -HSQC von ^{15}N -markiertem UBXD1 1-133 sind sehr klein (max. 0,05 ppm), was gegen eine Bindung der Phosphate spricht und eher auf eine Bindung des Adenosinringgerüsts von ATP hinweist. Die meisten der shiftenden Aminosäuren befinden sich in unstrukturierten Bereichen von UBXD1 1-133. Neben dem Lys 2 in H1 befindet sich ein konzentrierter Bereich ATP interagierender Aminosäuren in H2 (Phe 8, Ala 10 bis Ile 12, Ser 16) und am C-Terminus (Gly 112, Ala 114, Ala 117 und Gly 120). Desweiteren gibt es einige vereinzelte shiftende Aminosäuren im (Lys 30, Arg 45, Gln 53, Glu 64, Ala 70, Ser 75 und Lys 85). Insgesamt ist keine Präferenz für eine bestimmte Gruppe an Aminosäuren, die auf einen möglichen Bindungsmechanismus hinweisen könnte, festzustellen.

9. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNGEN

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Strukturelle Charakterisierung des N-Terminus von UBXD1 und seine Regulation der ATPase-Aktivität von p97" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Franziska Trusch befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Unterschrift des Doktoranden

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den

Unterschrift des Doktoranden