

Zusammenfassung

Die heutige Strukturbiologie verwendet häufig eine Kombination aus experimentellen Datensätzen und computergestützten rechnerischen Methoden, um das Struktur-Funktion Paradigma von biologische Makromolekülen, wie zum Beispiel multi-Domänen Proteinen, zu entschlüsseln. In dieser Arbeit wurde dieser kombinierte Ansatz mittels der Anwendung von PELDOR¹ Spektroskopie und der computergestützten Modellierungen von Konformationsräumen verfolgt, um die relative Domänen-Domänen Orientierung und die konformelle Flexibilität zweier multi-Domänen Proteine zu untersuchen. Die PELDOR Spektroskopie in Kombination mit SDSL² ist eine häufig verwendete Methode, um Abstände zwischen zwei ungepaarten Elektronenspins, im Bereich von 1.8 bis 8 nm, und deren Verteilung zu bestimmen. Hierbei, ist sowohl die inter-Spin Distanz als auch die Flexibilität des verwendeten Spin Markers und des Proteins im experimentellen PELDOR Signal in Form der Oszillationsfrequenz und deren Dämpfung kodiert. Im Rahmen der Analyse wurden Hindernisse, die durch (i) die intrinsische Flexibilität des gängigen Nitroxid-Markers MTSSL³ (ii) eine hohe Flexibilität des Proteinrückgrates sowie (iii) große inter-Spin Abstände entstehen, evaluiert.

Zuerst wurden die drei N-terminalen POTRA⁴ Domänen des β -Fass Proteins *anaOmp85* des Cyanobakteriums *Anabaena sp.* PCC 7120⁵ untersucht und der Einfluss der Flexibilität von MTSSL auf Strukturverfeinerungen, mittels PELDOR Abstandsverteilungen, diskutiert. Besonders im Vordergrund stand hierbei die Genauigkeit der Vorhersage der Flexibilität von MTSSL auf der Basis von Rotamer-Bibliotheken anhand eines statischen Modells (NMR⁶, X-ray⁷). Die Analyse zeigte, dass im Falle von multi-Domänen Proteinen mit eingeschränkter inter-Domänen Flexibilität die Überschätzung der Flexibilität von MTSSL, durch die Rotamer-Bibliotheken, zu einem Auflösungslimit der Strukturverfeinerung führt.

¹ Pulsed Electron-Electron Double Resonance = Gepulste Elektronen-Elektronen Doppelresonanz

² Site-Directed Spin Labelling = Zielgerichtete Nitroxid-Markierung von Proteinen

³ 1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl

⁴ POlypeptid TRansport-Assoziierten

⁵ *Anabaena species* Pasteur Culture Collection 7120

⁶ Nuclear Magnetic Resonance = Kernmagnetische Resonanz; auch Kernspinresonanz.

⁷ Kristallstruktur

Als Zweites wurde der Konformationsraum von K48-verknüpften Ubiquitinketten, sowie dessen Änderung durch die Bindung von UBDs⁸ oder eines DUB⁹ ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die inter-Domänen Flexibilität von K48-verknüpften Diubiquitinen die durch Rotamer-Bibliotheken vorhergesagte Spin Marker Flexibilität übersteigt und die Spin Marker Flexibilität somit die Modellierung des Konformationsraumes nicht oder nur wenig beeinflusst. Die weitere Untersuchung des Konformationsraumes von Komplexen dieser Diubiquitinketten mit verschiedenen Interaktionspartnern ermöglichte die Bestimmung der unterschiedlichen Mechanismen der Ubiquitin Bindung im Rahmen des Aufbaus und des Abbaus von Ubiquitinketten.

Die PELDOR Experimente an K48-verknüpften Di-, Tri-, und Tetraubiquitinketten zeigten eine Zunahme der Flexibilität mit der Kettenlänge. Anhand der Tri- und Tetraubiquitinketten wurde daher die Notwendigkeit eines hinreichenden Zeitfensters für die Untersuchung langer inter-Spin Abstände und bereiter Abstandsverteilungen erörtert werden. Die Anwendung von 7-pulse CP¹⁰ PELDOR auf diese Systeme erlaubte eine signifikante Verlängerung des detektierbaren Zeitfensters und so eine verlässliche Abschätzung der inter-Domänen Flexibilität dieser Ketten.

In diesem Zusammenhang konnte die Kristallstruktur von K48-verknüpftem Tetraubiquitin evaluiert werden. Ein Vergleich der experimentellen und simulierten Abstandsverteilung zeigte, dass die Konformation der Kristallstruktur zwar innerhalb der experimentellen Verteilungsbreite liegt, jedoch nicht die vornehmliche Konformation von K48-verknüpftem Tetraubiquitin darstellt. Des Weiteren erlaubte die Anwendung von 7-pulse CP PELDOR die Detektion von Konformationsänderungen von Tri- und Tetraubiquitinketten durch die Bindung von Interaktionspartnern, die mit der Standard 4-pulse PELDOR Sequenz nur schwer zu beobachten waren.

Die erhaltenen Ergebnisse werden zu dem in den biologischen Kontext eingeordnet.

⁸ Ubiquitin Bindungs Domänen

⁹ DeUBquitinierende Enzyme

¹⁰ Carr-Purcell