

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an Qualitätskontrollproteinen des Endoplasmatischen Retikulums

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Biochem. Jennifer Hanna
aus Berlin

2011

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2007 bis Juni 2011 unter Leitung von Prof. Dr. Udo Heinemann in der Forschungsgruppe Makromolekulare Strukturen und Interaktionen am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Sommer

Disputation am 27.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung: Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum	1
1.1	Erkennung fehlgefalteter Proteine	1
1.1.1	EDEM und Htm1	3
1.1.2	Yos9	3
1.2	Der Ubiquitin-Proteasom-Weg	5
1.3	Ubiquitin-Ligase-Komplexe	6
1.3.1	RING-Finger-Ubiquitinligasen	6
1.3.2	HECT-Ubiquitinligasen	7
1.3.3	SCF-Komplexe	8
1.4	Unterschiedliche Wege für unterschiedliche Substrattypen	8
1.5	Retrotranslokation	9
1.6	Fragestellung	11
2	Material	12
2.1	Geräte	12
2.2	Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits	13
2.2.1	Chemikalien	13
2.2.2	Enzyme und Antikörper	15
2.2.3	Kits	15
2.3	Nährmedien und Lösungen	16
2.3.1	Molekularbiologie	16
2.3.2	Nährmedien	16
2.3.3	Proteinreinigung	18
2.3.4	Co-Immunpräzipitation	20
2.3.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.3.6	Western-Blot und Immunodetektion	21
2.4	Plasmide und Stämme	22
2.4.1	Plasmide	22
2.4.2	Bakterienstämme	22
2.4.3	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	22
2.5	Oligonukleotide	22
3	Methoden	25
3.1	Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1	Polymerasekettenreaktion	25
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.1.3	Restriktionsverdau	26
3.1.4	Reinigung von DNA	26
3.1.5	Ligation	27
3.1.6	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	27

3.1.7	Präparation von Plasmid-DNA	28
3.1.8	QuikChange-Mutagenese	28
3.2	Expression und Proteinreinigung	28
3.2.1	Expression in <i>E. coli</i>	28
3.2.2	Expression in <i>S. cerevisiae</i>	29
3.2.3	Zellaufschluss	30
3.2.4	Reinigung und Solubilisierung von <i>Inclusion Bodies</i>	30
3.2.5	Affinitätschromatographie	30
3.2.6	<i>Tag</i> -Verdau	30
3.2.7	Ionenaustausch-Chromatographie	31
3.2.8	Gelfiltration	31
3.2.9	Rückfaltung denaturierter Proteine	32
3.2.10	Konzentrieren von Proteinlösungen	32
3.3	Biochemische Methoden	32
3.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	32
3.3.2	TCA-Präzipitation	34
3.3.3	Quervernetzung (<i>Crosslinking</i>)	34
3.3.4	Präparation von mikrosomalem Extrakt aus <i>S. cerevisiae</i>	35
3.3.5	Co-Immunpräzipitation	35
3.3.6	Western-Blot	35
3.3.7	Immundetektion	35
3.3.8	Limitierte Proteolyse	36
3.3.9	Analytische Gelfiltration	36
3.3.10	<i>Pulse-Chase</i> -Experimente	36
3.4	Proteinkristallographie	37
3.4.1	Kristallisation	37
3.4.2	Datensammlung	38
3.4.3	Datenprozessierung	39
3.4.4	Phasierung	39
3.4.5	Modellbau und Verfeinerung	41
3.4.6	Validierung	42
3.4.7	Strukturanalyse von Yos ₉₂₆₆₋₄₂₄	42
3.5	Biophysikalische Methoden	43
3.5.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	43
3.5.2	Analytische Ultrazentrifugation	43
3.5.3	CD-Spektroskopie	45
3.5.4	Dynamische Lichtstreuung	46
3.5.5	Statische Lichtstreuung	47
3.5.6	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	47
4	Usa1 und Hrd3	49
4.1	Ergebnisse	49
4.1.1	Expression und Reinigung	49
4.1.2	Usa1 und Hrd1 bilden einen stabilen Komplex <i>in vitro</i>	50
4.1.3	Biophysikalische Charakterisierung	51
4.1.4	Verkürzte Konstrukte	55
4.1.5	Kristallisationsversuche	58

4.2	Diskussion	59
5	Yos9	62
5.1	Ergebnisse	62
5.1.1	Expression und Reinigung	62
5.1.2	CD-Spektroskopie	64
5.1.3	Limitierte Proteolyse	65
5.1.4	Kristallisation	67
5.1.5	Strukturanalyse der Dimerisierungs-Domäne von Yos9	70
5.1.6	Selbst-Assoziation von Yos9	75
5.1.7	Bindungsstudien zwischen Yos9 und Hrd3	80
5.1.8	Substratabbau	81
5.2	Diskussion	82
5.2.1	Struktur	82
5.2.2	Assoziation mit Hrd3	83
5.2.3	Selbst-Assoziation	84
6	Abschließendes Modell	86
7	Zusammenfassung / Abstract	88
7.1	Zusammenfassung	88
7.2	Abstract	89
	Literaturverzeichnis	99
	Abbildungsverzeichnis	100
	Tabellenverzeichnis	102
	Abkürzungsverzeichnis	103
	Anhang	105
	Unordnungs-Vorhersage	105
	Publikationen	106
	Anhang	106
	Danksagung	107

1 Einleitung: Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum

Sekretorische Proteine passieren während ihrer Reifung das endoplasmatische Retikulum (ER), wo Modifikationen wie Glykosylierungen und die Ausbildung von Disulfidbrücken stattfinden. Zusätzlich unterstützen Chaperone den Faltungsprozess der Proteine. Dennoch erreichen ca. 30% aller neu synthetisierten Proteine nicht ihre native Konformation (Schubert *et al.* 2000). Im ER verhindert ein Qualitätskontrollsystem ihre Akkumulation, die andernfalls die Reifung weiterer Proteine behindern würde. Fehlgefaltete Proteine werden aussortiert und zurück in das Cytosol transportiert, wo sie im Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden (Hammond und Helenius 1995), ein Vorgang, der als ER-assoziierte Protein-Degradation (ERAD) bezeichnet wird.

Im Folgenden wird auf die Qualitätskontrolle im ER des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) Bezug genommen, sofern nicht anders angegeben.

1.1 Erkennung fehlgefalteter Proteine

Fehlgefaltete Proteine unterscheiden sich in allgemeinen Merkmalen wie exponierten hydrophoben Bereichen und freien Thiolgruppen nicht von neu synthetisierten, faltungskompetenten Proteinen. Um nicht fälschlicherweise faltungskompetente Proteine abzubauen, werden zusätzliche Kriterien zur Erkennung herangezogen. Zudem wird der Abbau verzögert eingeleitet, sodass neu synthetisierten Proteinen Zeit für die Faltung und den Export bleibt.

Eine Methode, um in der Faltung begriffene Proteine vor dem vorzeitigen Abbau zu schützen, ist die Bindung an Chaperone. Zusätzlich wird dadurch verhindert, dass neu synthetisierte Proteine aufgrund exponierter hydrophober Bereiche aggregieren (Nishikawa *et al.* 2001). Allein eine langanhaltende Bindung an Chaperone reicht allerdings nicht aus, um ein Protein dem Abbauweg zuzuführen. Tatsächlich sind mehrere Fälle bekannt, bei denen fehlgefaltete Proteine unter bestimmten Bedingungen stabil im ER verbleiben (Knop *et al.* 1996; Loayza *et al.* 1998).

Zur Erkennung fehlgefalteter Glykoproteine steht ein weiteres Kriterium zur Verfügung: Hier dient eine spezifische Oligosaccharidstruktur als Markierung für den Abbau (Jakob *et al.* 1998; Hebert *et al.* 2005; Aebi *et al.* 2010). Während des Imports in das

ER transferiert das mit dem Importkomplex Sec61 assoziierte Enzym Oligosaccharyltransferase (OST) an der Membran vorsynthetisierte Oligosaccharide auf naszierende Glykoproteine. Die Glykosylierung findet an Asparaginen in der Sequenz N-X-S/T statt (X: beliebige Aminosäure außer Prolin). Die Oligosaccharide auf der Proteinoberfläche werden während des Reifungsprozesses des Proteins im ER schrittweise abgebaut, bis die Zuckerstruktur erreicht ist, die als Signal für den Abbau dient (Abb.1.1). Bis vor kurzem galt der Man₈-Zucker als Degradationssignal in Hefe (Jakob *et al.* 1998). Inzwischen ist bekannt, dass der Man₈-Zucker durch das Enzym Htm1 weiter zum Man₇-Zucker abgebaut wird, der wiederum vom Lektin Yos9 erkannt wird (Quan *et al.* 2008; Clerc *et al.* 2009).

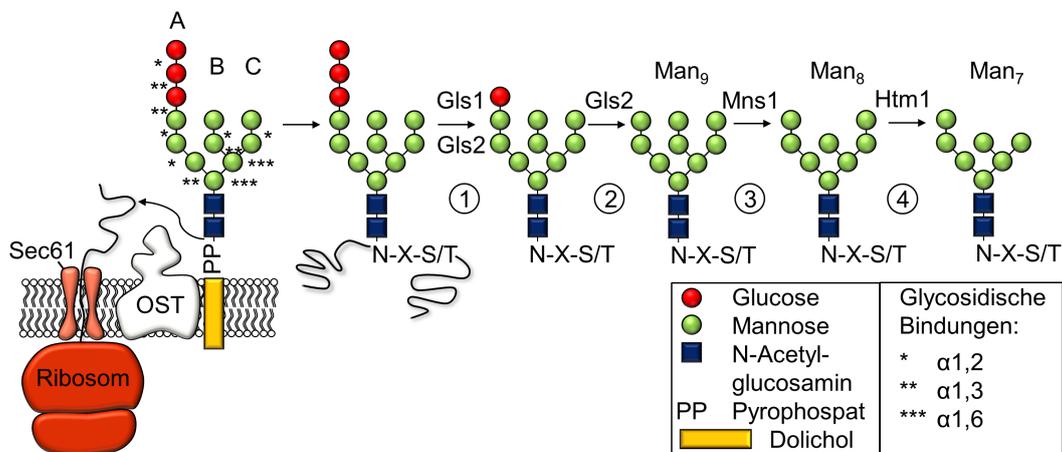


Abb. 1.1: Prozessierung von N-Glykosylierungen im Hefe-ER. OST transferiert Zuckerbäume von einem Dolicholanker auf Asparaginseitenketten in Asn-X-Ser/Thr-Motiven naszierender Peptide. Zunächst werden die zwei äußersten Glucosereste des A-Zweiges durch Glucosidase I und II (Gls1/Gls2) abgespalten (1). Gls2 entfernt einen weiteren Glucoserest, wodurch ein Man₉-Zucker entsteht (2). Bei längerer Verweildauer des Proteins im ER entfernt die ER Mannosidase Mns1 einen Mannoserest vom B-Zweig des Glykans, wodurch ein Man₈-Zucker entsteht (3). Htm1 spaltet schließlich einen Mannoserest vom C-Zweig des Zuckerbaums ab, sodass ein Man₇-Zucker verbleibt (4). (Abbildung nach Hirsch *et al.* 2009)

In Säugerzellen ist die Prozessierung der N-Glykane um den Calnexin-Calreticulin-Zyklus erweitert (Helenius 1994). Nach der Abspaltung der ersten zwei Glucosereste durch Glucosidase I und II werden reife Glykoproteine zunächst an das membranständige Lektin Calreticulin oder sein lösliches Homolog Calnexin gebunden. Die Abspaltung des dritten Glucoserests durch Glucosidase II führt zur Ablösung des Proteins von Calnexin bzw. Calreticulin. Fehlgefaltete Proteine werden durch UDPGlucose:Glykoprotein-Glycosyltransferase (GT) anhand freiliegender hydrophober Oberflächen erkannt und reglykosyliert, wodurch eine erneute Bindung an Calnexin bzw. Calreticulin erfolgen kann (Helenius und Aebi 2004). Die Proteine verlassen den Zyklus, wenn sie soweit gefaltet sind, dass sie nicht mehr durch GT reglykosyliert werden, oder wenn der erste Mannoserest durch ER-Mannosidase I (ERMan I) abgespalten wurde. Im Unterschied zur

Hefe werden N-Glycane im Säuger-ER noch weiter getrimmt, zum Teil bis hin zu einem Man₅-Zucker. Daran beteiligt sind ERMan I und Mitglieder der EDEM-Familie (Hercovics *et al.* 2002; Molinari 2007).

Die Dauer der enzymatischen Reaktionen, die zur Abspaltung der Zuckerreste führen, gewährt den Proteinen dabei ausreichend Zeit, ihre native Konformation einzunehmen. Dieser Effekt stützt sich vor allem auf eine langsame Reaktionskinetik der ER-Mannosidasen (Helenius 1994; Lederkremer und Glickman 2005). Darüber hinaus wurde in Studien mit dem Modellsubstrat Carboxypeptidase Y (CPY) festgestellt, dass nicht nur die Struktur der Oligosaccharide, sondern auch ihre Position für die Funktion als Abbausignal entscheidend sind (Kostova und Wolf 2005; Spear und Ng 2005; Xie *et al.* 2009).

1.1.1 EDEM und Htm1

Das Hefeprotein Htm1 beeinflusst die Abbaurate glykosylierter ERAD-Substrate (Jakob *et al.* 2001; Nakatsukasa *et al.* 2001). Trotz seiner durch Sequenzvergleich identifizierten Mannosidase-ähnlichen Domäne wurde in ersten Untersuchungen keine katalytische Aktivität festgestellt (Jakob *et al.* 2001). Nachdem eine Splice-Variante des humanen Homologs EDEM katalytische Aktivität zeigte (Hirao *et al.* 2006), wurde auch die mögliche Mannosidase-Funktion von Htm1 näher untersucht. Zunächst wurde Htm1 als stromaufwärts von Yos9 agierend eingestuft (Quan *et al.* 2008), und kurz darauf konnte auch die Mannosidase-Aktivität des Proteins nachgewiesen werden (Clerc *et al.* 2009). Htm1 generiert dabei einen endständigen α -1,6-Mannose-Rest an einem Oligosaccharid, das bereits von den Enzymen Gls1, Gls2 und Mns1 getrimmt wurde (Abb. 1.1, Schritt 4).

1.1.2 Yos9

Auch Yos9 beeinflusst den Abbau glykosylierter ERAD-Substrate (Buschhorn *et al.* 2004). Das Protein besitzt eine zum Mannose-6-Phosphat-Rezeptor homologe Domäne (MRH-Domäne), welche die Hypothese begründete, dass das Protein Oligosaccharide bindet. Die Funktion wurde zunächst indirekt nachgewiesen (Bhamidipati *et al.* 2005; Kim *et al.* 2005; Szathmary *et al.* 2005) und führte zu der Modellvorstellung, dass fehlgefaltete Glykoproteine von Yos9 erkannt und der ER-assoziierten Degradation zugeführt werden.

Die Bindung von Yos9 an Oligosaccharide wurde inzwischen *in vitro* nachgewiesen, und es wurde eine Spezifität für Man₇-Strukturen festgestellt, die von Htm1 generiert werden (Quan *et al.* 2008). Dabei ist der endständige α -1,6-Mannoserest für die Bindungsaffinität von besonderer Bedeutung. Mittlerweile wurde die Struktur der MRH-Domäne des humanen Orthologs OS-9 in Komplex mit einem Oligosaccharid aufgeklärt (Satoh *et al.* 2010). Die Struktur der MRH-Domäne, ein abgeflachtes β -Fass, entspricht einer

typischen P-Typ-Lektin-Faltung (Abb. 1.2 A). Das Oligosaccharid bindet mit der endständigen α -1,6-Mannose an einen hochkonservierten Bereich an einer der Öffnungen des β -Fasses. Eine besondere Rolle spielt dabei ein Doppeltryptophan (WW)-Motiv, das die Spezifität für die α -1,6-Verknüpfung vermittelt (Abb. 1.2 B). In Yos9 tritt ein Phenylalanin an die Stelle des ersten Tryptophans.

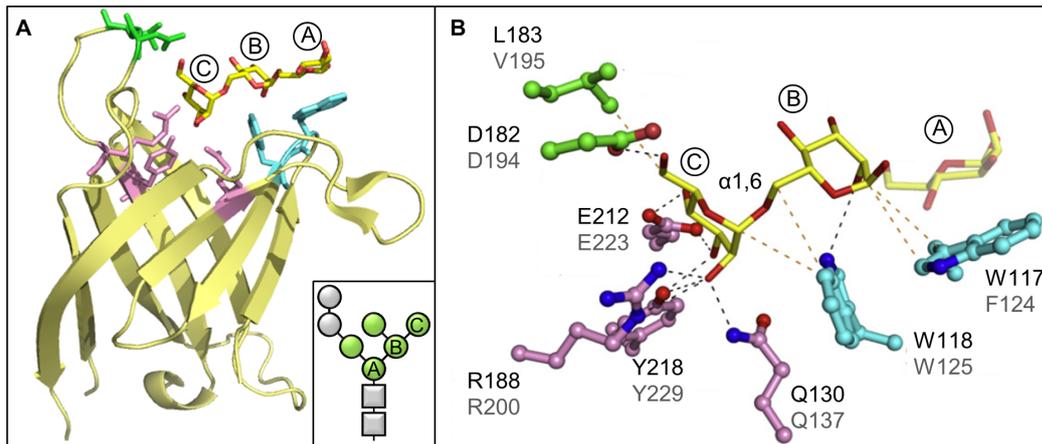


Abb. 1.2: Struktur der MRH-Domäne von OS-9 im Komplex mit einem Oligosaccharid. OS-9 ist in hellgelb dargestellt, mit den an der Bindung beteiligten Seitenketten in grün, violett und hellblau, das Oligosaccharid in gelb und rot. **A.** Die MRH-Domäne weist eine abgeflachte β -Fass-Struktur auf, mit der Oligosaccharidbindungsstelle an einer der Öffnungen. Rechts unten: Schematische Darstellung des Man₇-Oligosaccharids. OS-9 wurde mit dem grün dargestellten Man₅-Zucker kristallisiert. Die Reste A, B und C waren in der Elektronendichte sichtbar. **B.** Die an der Bindung beteiligten Aminosäuren sind zwischen OS-9 und Yos9 weitgehend konserviert (schwarz: OS-9, grau: Yos9). Der Mannoserest C bildet zahlreiche Wasserstoffbrücken zu OS-9 aus. Die Spezifität für α -1,6-verknüpfte Mannose wird durch das WW-Motiv (hellblau) vermittelt. (Abbildung nach Satoh *et al.* 2010)

Yos9 ist ein integraler Bestandteil des HRD-Komplexes, eines der zentralen Ubiquitinligase-Komplexe des ERAD-Weges (Abb. 1.3). Die Integration in den HRD-Komplex erfolgt über eine direkte Interaktion mit der luminalen Domäne von Hrd3 (Carvalho *et al.* 2006; Gauss *et al.* 2006a).

Mit der Beobachtung, dass glykosylierte und unglykosylierte Substrate unabhängig von Yos9 mit Hrd3 interagieren können (Carvalho *et al.* 2006; Denic *et al.* 2006; Gauss *et al.* 2006b), wurde die Vorstellung verworfen, dass Yos9 dem HRD-Komplex fehlgefaltete Glykoproteine zuführt. Stattdessen wird ein Modell bevorzugt, bei dem fehlgefaltete Proteine aufgrund von Eigenschaften innerhalb ihres Proteinanteils an Hrd3 binden und Yos9 die Oligosaccharide der fixierten Substrate überprüft (Carvalho *et al.* 2006; Denic *et al.* 2006; Gauss *et al.* 2006a). Proteine, bei denen ein endständiger α -1,6-Mannose-Rest Fehlfaltung signalisiert, werden dem Abbauweg zugeführt (Quan *et al.* 2008). Befindet sich die Oligosaccharidstruktur in einem früheren Trimmungsstadium, wird das Protein wieder freigegeben und kann den Reifungsprozess gegebenenfalls abschliessen.

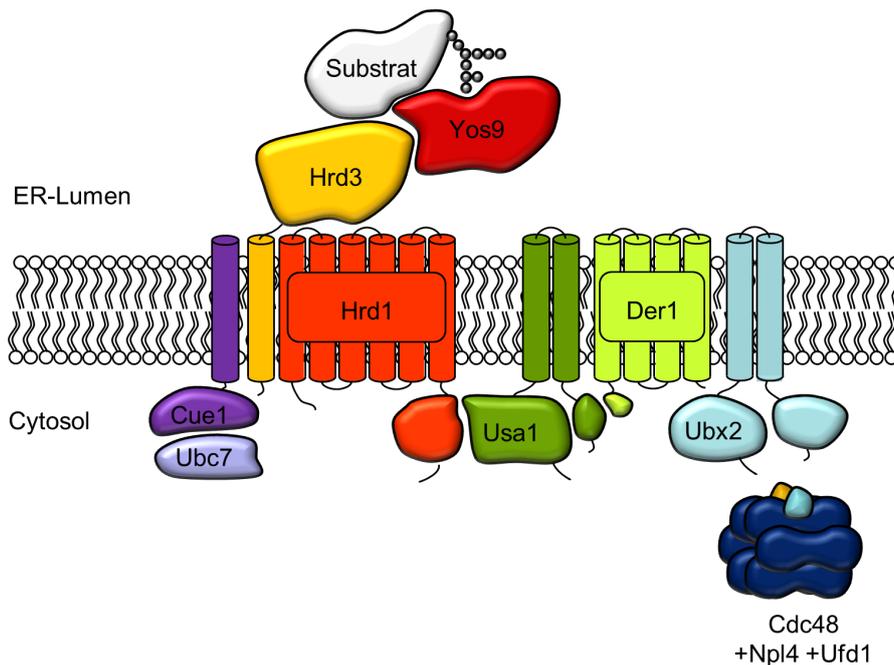


Abb. 1.3: Der HRD-Komplex mit allen bekannten Bestandteilen, die für den Abbau luminal fehlgefalteter Proteine benötigt werden, und mit gebundenem Substrat. (Abbildung nach Ismail und Ng 2006)

Über die Assoziation mit Glykoproteinen hinaus bindet Yos9 auch unglykosylierte Substrate (Bhamidipati *et al.* 2005), und dies unabhängig von Hrd3 (Denic *et al.* 2006). Yos9 assoziiert jedoch auch mit dem Chaperon Kar2 (Denic *et al.* 2006), das an der Substratbindung im Rahmen von ERAD beteiligt ist (Kabani *et al.* 2003). Eine direkte Bindung von Yos9 an unglykosylierte Substrate ist somit noch nicht nachgewiesen.

1.2 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg

Um fehlgefaltete Proteine für den Abbau durch das Proteasom zu markieren, werden sie im Cytosol durch Ubiquitin modifiziert. Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren großes, globuläres Protein. Die Ubiquitinierung erfolgt schrittweise durch drei Enzyme, die nach ihrer Abfolge als E1, E2 und E3 bezeichnet werden (Abb. 1.4). Im ersten Schritt wird Ubiquitin unter ATP-Verbrauch an das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) gebunden und damit aktiviert. Im zweiten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Als letzten Schritt überträgt eine Ubiquitin-Ligase (E3) das Ubiquitin auf ein Lysin des abzubauenen Proteins. Pro Organismus findet man ein E1-Enzym (in Hefe: Uba1), mehrere E2-Enzyme (in Hefe unter anderem Ubc7) und viele substratspezifische E3-Enzyme (in Hefe unter anderem Doa10 und Hrd1).

Ubiquitin enthält sieben Lysine, an die weitere Ubiquitin-Einheiten kovalent gebunden werden können, bis hin zu einer Polyubiquitinkette (Hershko und Ciechanover 1992). Die

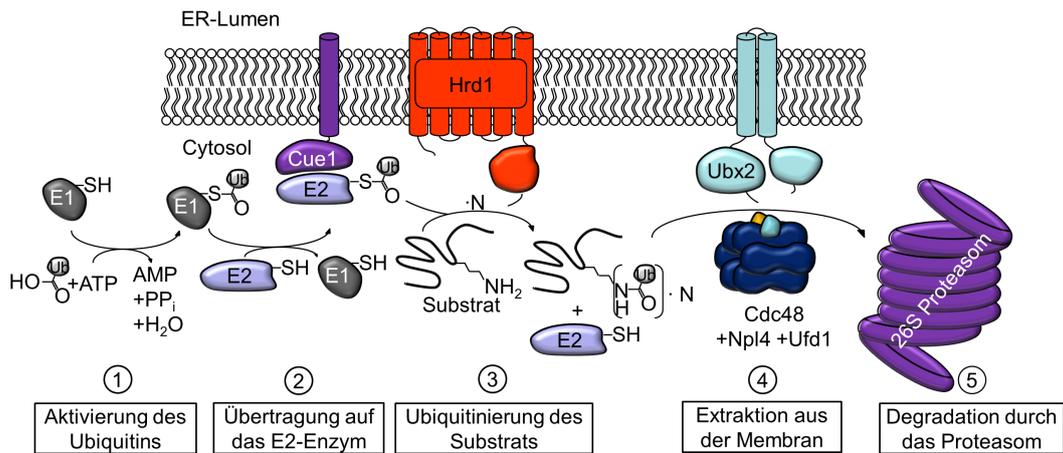


Abb. 1.4: Ubiquitinierung von ERAD-Substraten am HRD-Komplex. **1.** Ubiquitin wird unter ATP-Verbrauch an das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) gebunden. **2.** Ubiquitin wird auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Das Membranprotein Cue1 rekrutiert das E2-Enzym Ubc7 an den HRD-Komplex. **3.** Die E3-Ubiquitin-Ligase Hrd1 überträgt das Ubiquitin auf ein Substratprotein. Durch die Wiederholung der Schritte 1-3 wird das Substrat polyubiquitiniert. **4.** Der Cdc48-Komplex wird durch Ubx2 an den HRD-Komplex rekrutiert und extrahiert das Substrat aus der Membran. **5.** Das polyubiquitinierte Substrat wird im Proteasom abgebaut.

Kettenverlängerung kann durch einen weiteren Faktor (E4) vorangetrieben werden (Koegl *et al.* 1999). Abhängig von der Anzahl der Ubiquitin-Einheiten und der Verknüpfungsart fungiert die Ubiquitinierung von Proteinen als vielfältiges Signal in der Zelle und ist z.B. an DNA-Reparatur und Signaltransduktion beteiligt (Welchman *et al.* 2005). Für diese Regulationsmechanismen treten besonders häufig Monoubiquitinierungen und über Lys63 verknüpfte Ketten auf, *in vitro* wurden aber selbst verzweigte Ubiquitinketten nachgewiesen (Kim *et al.* 2007).

Über Lys48 verknüpfte Ubiquitinketten stellen das Signal für den Abbau durch das Proteasom dar, wobei längere Ketten die Affinität zum Proteasom erhöhen (Thrower *et al.* 2000). Die Proteine binden entweder direkt an Polyubiquitin-Rezeptoren des Proteasoms oder sie werden von Polyubiquitin-bindenden Proteinen wie Rad23 zum Proteasom eskortiert (Hartmann-Petersen *et al.* 2003b; Lederkremer und Glickman 2005). Diese Eskort-Proteine schützen die Ubiquitin-Ketten zugleich vor De-Ubiquitinierungs-Proteinen (DUBs), die das Protein andernfalls dem Abbau im Proteasom wieder entziehen können (Hartmann-Petersen *et al.* 2003a).

1.3 Ubiquitin-Ligase-Komplexe

1.3.1 RING-Finger-Ubiquitinligasen

Der HRD-Komplex gehört zur Gruppe der RING-Finger-Ubiquitinligase-Komplexe. Diese Gruppe bildet zusammen mit den RING-Finger-ähnlichen Ubiquitinligasen die größte

Gruppe der E3-Enzyme in *S. cerevisiae*. RING-Finger gehören zu den Zink-Fingern, einer Gruppe von Strukturmotiven, die die Koordination von Zn^{2+} -Ionen gemein haben. In RING-Finger-Ubiquitinligasen bilden sie die Bindungsplattform für E2-Enzyme, die damit in eine räumliche Nähe zum Substrat gebracht werden, auf das Ubiquitin übertragen wird. RING-Finger-ähnliche E3-Enzyme wie PHD/LAP-Proteine und U-Box Proteine nutzen ähnliche Struktur motive, mit dem Unterschied, dass dem U-Box-Motiv die beiden koordinierten Zn^{2+} -Ionen fehlen (Kostova *et al.* 2007).

HRD-Komplex

Den Kern des HRD-Komplexes bilden die RING-Finger-Ubiquitinligase Hrd1 und ihr Bindungspartner Hrd3 (Gardner *et al.* 2000). Hrd1 enthält 4-6 vorhergesagte Transmembransegmente, während Hrd3 durch eine einzige Transmembranhelix an der ER-Membran verankert ist. Als Adapterprotein für das E2-Enzym Ubc7 fungiert das Membranprotein Cue1 (Biederer *et al.* 1997), während Ubx2 den Kontakt zum Cdc48-Komplex vermittelt (Neuber *et al.* 2005). Diese Zusammensetzung des Komplexes genügt für den Abbau von Substraten mit fehlgefalteten Membranbereichen. Für den Abbau von Substraten mit fehlgefalteten luminalen Domänen werden weitere Proteine benötigt. Usa1 und das durch Usa1 rekrutierte Der1 (Carvalho *et al.* 2006) sowie Yos9 (Carvalho *et al.* 2006; Denic *et al.* 2006; Gauss *et al.* 2006a) sind hier zusätzliche Bestandteile des HRD-Komplexes (Abb. 1.3). Die große luminal Domäne von Hrd3 bietet dabei eine Bindungsplattform sowohl für das Substrat als auch für das substratbindende Protein Yos9 (Carvalho *et al.* 2006; Denic *et al.* 2006; Gauss *et al.* 2006a). Über Yos9 mit dem Komplex assoziiert ist das luminal Chaperon Kar2 (Denic *et al.* 2006).

Doa10-Komplex

Im Rahmen von ERAD ist eine weitere RING-Finger-Ubiquitinligase von Bedeutung: Doa10 ist mit einem Molekulargewicht von 151 kDa deutlich größer als Hrd1 (64 kDa). Das Protein enthält 14 vorhergesagte Transmembransegmente und eine cytosolisch lokalisierte RING-Finger-Domäne. Der Doa10-Komplex besteht neben der E3-Ligase aus den E2-Enzymen Ubc6 und Ubc7 und dem Ubc7-Adapterprotein Cue1, sowie dem Adapter Ubx2, der den Cdc48-Komplex rekrutiert (Swanson *et al.* 2001; Ravid *et al.* 2006).

1.3.2 HECT-Ubiquitinligasen

HECT-Ubiquitinligasen bilden die zweitgrößte Gruppe der E3-Enzyme. Im Gegensatz zu den RING-Finger-Ubiquitinligasen bilden sie vor der Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat ein Intermediat, bei dem das Ubiquitin an einen konservierten Cystein-Rest gebunden wird (Rotin und Kumar 2009). Obwohl HECT-Ubiquitinligasen eher an

regulatorischer Ubiquitinierung als am Abbau beteiligt sind, wurde auch die Beteiligung am Abbau eines überexprimierten ERAD-Substrats beobachtet (Haynes *et al.* 2002).

1.3.3 SCF-Komplexe

Die drittgrößte Gruppe der Ubiquitinligasen, die SCF-Komplexe, befinden sich nicht an der ER-Membran, sondern im Cytosol. SCF-Komplexe bestehen aus den Proteinen Skp1, Cul1, Roc1 und einem F-Box-Protein (Ho *et al.* 2006). Cul1 bildet das Gerüst für den SCF-Komplex, an den ein E2-Enzym und das Substrat rekrutiert werden (Vembar und Brodsky 2008). Die Substratspezifität wird durch die F-Box-Proteine vermittelt, die unter anderem Oligosaccharidstrukturen binden können (Yoshida *et al.* 2003, 2005).

1.4 Unterschiedliche Wege für unterschiedliche Substrattypen

Die unterschiedliche Lokalisation von Fehlfaltungen stellt hohe Anforderungen an das ERAD-System: Cytosolische oder luminal Domänen können betroffen sein, oder aber es liegen Fehler in einem Transmembranbereich vor. Die Substraterkennung muss je nach Lokalisation der Fehlfaltung durch unterschiedliche Komponenten erfolgen, da z.B. die Bindungsplattform aus Hrd3 und Yos9 luminal lokalisiert ist und nicht mit Transmembran- oder cytosolischen Domänen in Kontakt kommt. Auch im Hinblick auf die Retrotranslokation unterscheiden sich luminal und membranständige Substrate. Während Membranproteine direkt aus der Membran extrahiert werden können, muss für den Export luminaler Proteine eine Art Kanal gebildet werden. Der ERAD-Stoffwechselweg unterteilt sich deshalb nach der Lokalisation der Fehlfaltung in drei Teilabschnitte: ERAD-C (cytosolisch), ERAD-L (luminal) und ERAD-M (membranständig) (Abb. 1.5, Taxis *et al.* 2003; Vashist und Ng 2004; Carvalho *et al.* 2006).

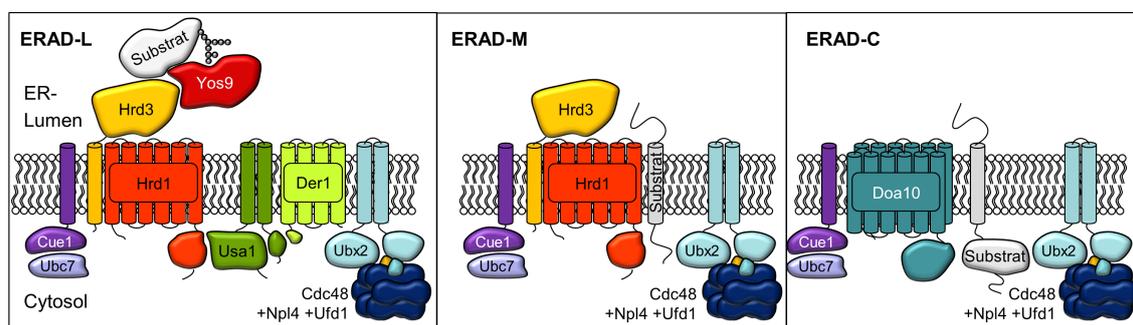


Abb. 1.5: Ubiquitinligase-Komplexe in ERAD-L, -M und -C. Links: Im ERAD-L-Weg wird der gesamte HRD-Komplex benötigt. Mitte: Für den ERAD-M-Weg genügt ein Teil der Komponenten. Rechts: Der ERAD-C-Weg wird über den Doa10-Komplex vermittelt. (Abbildung nach Ismail und Ng 2006)

Die ERAD-Wege unterscheiden sich in den daran beteiligten Ubiquitin-Ligase-Komplexen. Der Doa10-Komplex wird für den ERAD-C-Weg benötigt (Swanson *et al.* 2001; Huyer *et al.* 2004), während der ERAD-L-Weg über den HRD-Komplex vermittelt wird (Bordallo *et al.* 1998; Carvalho *et al.* 2006). Für den ERAD-M-Weg genügt ein Subkomplex des HRD-Komplexes: Die Proteine Usa1 und Der1 werden hier nicht benötigt (Carvalho *et al.* 2006). Die drei Abbauwege konvergieren auf der cytosolischen Seite der ER-Membran beim Cdc48-Komplex.

Bei der Untersuchung von Proteinen mit Defekten in mehr als einer Region wurde festgestellt, dass die ERAD-Wege sequentiell ablaufen. Substrate mit cytosolischen und luminalen Domänen durchlaufen zunächst den Kontrollpunkt ERAD-C und werden, sofern keine Fehlfaltung erkannt wird, anschließend im ERAD-L-Weg untersucht (Vashist und Ng 2004). Die Einführung zusätzlicher Membrandomänen im luminalen Substrat CPY*, einer fehlgefalteten CPY-Variante, führt zum Der1-unabhängigen Abbau (Taxis *et al.* 2003). Dies legt die Vermutung nahe, dass sich auch ERAD-M dominant gegenüber ERAD-L verhält. Eine einfache Erklärung für die Dominanz von ERAD-C und ERAD-M wäre eine kinetische oder energetische Begünstigung der direkten Extraktion membranständiger Substrate gegenüber dem Transport über eine Translokationspore (Carvalho *et al.* 2006).

1.5 Retrotranslokation

Da der Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Weg im Cytosol stattfindet, müssen ERAD-Substrate aus dem ER-Lumen in das Cytosol transportiert werden. Dieser Vorgang wird als Retrotranslokation oder Dislokation bezeichnet. Luminale Proteine müssen dabei zumindest teilweise entfaltet durch einen Kanal die Membran passieren, während Membranproteine direkt aus der Membran extrahiert werden können. Ein gemeinsamer Faktor bei der Retrotranslokation stellt die AAA ATPase Cdc48 dar (p97 in Säugern). Es wird angenommen, dass sie als molekularer Motor wirkt, der die Proteinkette durch die Membran in das Cytosol zieht (Ye *et al.* 2001; Abb. 1.4, Schritt 4). Der Komplex aus Cdc48 und seinen Cofaktoren Npl4 und Ufd1 wird sowohl mit dem Hrd1- als auch dem Doa10-Komplex assoziiert gefunden; an ihm konvergieren die ERAD-Teilwege ERAD-L, -C und -M.

Es gibt mehrere Kandidaten für den postulierten Retrotranslokationskanal, die kontrovers diskutiert werden (Meusser *et al.* 2005; Vembar und Brodsky 2008; Hebert *et al.* 2010). Zum einen scheint der Importkomplex Sec61 auch eine Rolle im ER-assoziierten Abbau zu spielen. So wurden beispielsweise Sec61-Mutanten generiert, die ERAD-Substrate stabilisieren bzw. deren Retrotranslokation hemmen (Plemper *et al.* 1997; Pilon *et al.* 1997). Darüber hinaus wurde eine Assoziation von Sec61 mit Hrd3 und dem Substrat CPY* beobachtet (Schäfer und Wolf 2009).

Die Ubiquitin-Ligase-Komplexe stellen weitere Kandidaten für einen Retrotranslokationskanal dar (Swanson *et al.* 2001; Ye *et al.* 2004). Das Cytomegalievirus (CMV) nutzt die ERAD-Maschinerie, um den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse 1 durch die Zelle abbauen zu lassen und damit die Präsentation von Virus-Antigenen auf der Zelloberfläche zu verhindern. Die Retrotranslokation kann durch das CMV-Protein US11 initiiert werden. Im Komplex mit US11 und der schweren Kette des MHC Klasse 1 findet man das Membranprotein Derlin-1 (Der1 in Hefe; Lilley und Ploegh 2004; Ye *et al.* 2004), einen Bestandteil des HRD-Komplexes, der durch Usa1 rekrutiert wird. Dies und die Interaktion des Komplexes mit dem Cdc48-rekrutierenden Protein VIMP wurde als Hinweis auf eine direkte Beteiligung von Derlin-1 an der Retrotranslokation verstanden (Ye *et al.* 2004). Einen weiteren Hinweis darauf stellt die Blockierung der Retrotranslokation durch Derlin-1-, nicht aber durch Sec61-Antikörper in einem *in vitro*-System dar (Wahlman *et al.* 2007). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung der Isoformen Derlin-1 bzw. -2 an der Dislokation von viralen und bakteriellen Proteinen nachgewiesen (Lilley *et al.* 2006; Schelhaas *et al.* 2007; Bernardi *et al.* 2008).

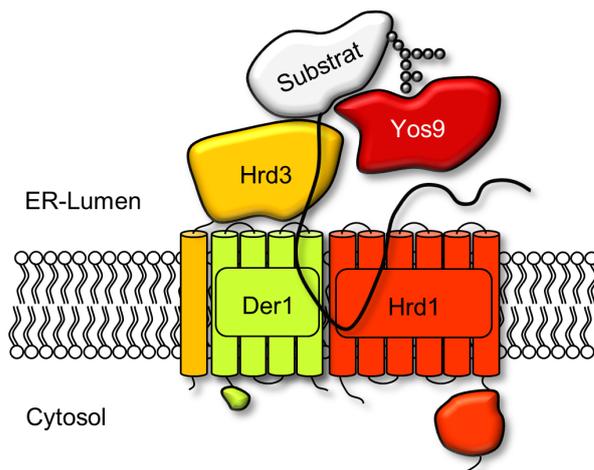


Abb. 1.6: Modell eines Retrotranslokations-Intermediats am HRD-Komplex. Das Substrat bildet durch die sukzessive Bindung an Hrd3, Der1 und Hrd1 eine Schlaufe in der Membran aus. (Abbildung nach Carvalho *et al.* 2010)

Diese Ergebnisse lassen sich auch anders als durch eine direkte Bildung der Retrotranslokationspore durch Der1 erklären. Der Einfluss von Der1 könnte darüber begründet sein, dass Der1 für den Aufbau eines funktionellen HRD-Komplexes benötigt wird, der als Ganzes an der Retrotranslokation beteiligt sein könnte. Die Beobachtung, dass Cholera-Toxin nur bei Anwesenheit von Derlin-1 mit den Ubiquitin-Ligasen Hrd1 und gp78 assoziiert (Bernardi *et al.* 2010), deutet auf eine Rolle von Derlin-1 stromaufwärts der E3-Ubiquitin-Ligasen hin. Photochemische Quervernetzungs-Experimente mit einem in der Retrotranslokation befindlichen Substrat deuten auf eine direkte Assoziation des Substrats mit dem HRD-Komplex hin (Carvalho *et al.* 2010; Stanley *et al.* 2011). Die Studie legt eine schlaufenartige Insertion des Substrats in die Membran nahe, bei der das Substrat auf der luminalen Seite an Hrd3 bindet und stromabwärts Der1 und Hrd1 in der Membran kontaktiert. Der C-Terminus des Substrats verbleibt in diesem Stadium

der Retrotranslokation im ER-Lumen, sodass sich in der Membran eine Substratschleufe bildet (Abb. 1.6).

Die verschiedenen Hypothesen für die Zusammensetzung einer Retrotranslokationspore schließen sich nicht unbedingt gegenseitig aus. Es wird z.B. beobachtet, dass die schwere Kette von MHC Klasse 1-Molekülen unabhängig von Derlin-1 in das Cytosol gelangt, wenn die Translokation nicht über das CMV-Protein US11, sondern über US2 initiiert wird (Lilley und Ploegh 2004). Alternative Retrotranslokationswege mit unterschiedlicher Substratspezifität wären eine mögliche Erklärung für derartige Beobachtungen.

1.6 Fragestellung

Die Erkennung von fehlgefalteten Proteinen und ihre Retrotranslokation sind zwei Bereiche der ER-Qualitätskontrolle, in denen weiterhin viele Fragen offen sind. In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze verfolgt, um zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Qualitätskontrolle im ER beizutragen.

Zum einen sollte die Funktion des noch wenig charakterisierten Proteins Usa1 innerhalb des HRD-Komplexes *in vitro* untersucht werden. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass Der1 durch Usa1 zum HRD-Komplex rekrutiert wird, und die direkte Bindung von Usa1 an Hrd1 wurde postuliert. Der Fokus galt dem Nachweis und der Charakterisierung einer direkten Assoziation zwischen Usa1 und Hrd1. Zusätzlich wurde die Gewinnung struktureller Informationen angestrebt.

Zum anderen sollte die Funktion von Yos9 innerhalb des HRD-Komplexes untersucht werden. Das Hauptaugenmerk galt der Gewinnung struktureller Information und der Charakterisierung der Assoziation zwischen Yos9 und Hrd3.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Agarosegel-Kammer	HG370 / HG330	Savant
Analysenwaage	MR2002/ CP2202S-0CE	Sartorius
analytische Ultrazentrifuge	Optima XL-A	Beckman Coulter
Blot-Apparatur	TE70 PWR	Amersham Biosciences
Brutschrank	MIR-153	SANYO
CD-Spektrometer	J720	Jasco
	Chirascan	Applied Photophysics
Chromatographie-Säulen	HiTrap Q FF 5 ml	GE Healthcare
	HiPrep Desalting 16/60	GE Healthcare
	Superdex 75 bzw. 200, HiLoad 16/60 bzw. 26/60	GE Healthcare
Chromatographie-Systeme	Äkta Explorer	GE Healthcare
	Äkta FPLC	GE Healthcare
DLS-Apparatur	Laser-Spectroscatter 201	RiNA GmbH
Feinwaage	MC1 Analytical AC1205	Sartorius
<i>Fluidizer</i>	Microfluidizer	Microfluidics
Gel- bzw. Blot- dokumentation	LAS 4000	Fujifilm
	UV-Tisch	Biometra
	BDA digital Basis Set	Biometra
Heizblock	Accublock Digital Dry Bath	Labnet
ITC-Gerät	VP-ITC	Microcal
Konzentratoren	Amicon Ultra	Millipore
	Ultrafree 0.5	Millipore
	Vivaspin 500	Sartorius
Kristallbeobachtung	Homebase (20°C)	The Automation Partnership (TAP)
	Rock Imager (4°C)	Formulatrix
	Leuchttisch KL 2500LCD	Leica
	Mikroskop Wild M3C	Leica

	Mikroskop M420	Leica
	Kamera DXC-390P	Sony
Kristallisationsplatten	Crystal quick flat bottom	Greiner Bio-One
Kristallisationsroboter	Hydra II	Matrix Technologies
Kryo-Loops	Mounted Cryoloops	Hampton
	Magnetic CryoVials with DataMatrix CryoCaps	Molecular Dimensions
Kulturenschüttler	HT	INFORS
PAGE-Gelkammer	Mini 2-D System	Biorad
Peristaltikpumpe	P-1	Pharmacia
pH-Meter	CG 840	Schott
	Lab 850	Schott
Photometer	Nanodrop ND 1000	peqlab
	Ultraspec 10	Amersham
RALS-Apparatur	Viscotek 270 Dual Detector	Viscotek
	VE3580 RI detector	Viscotek
Rotationsmischer	34528	Snijders
Spannungsgeneratoren	Power PAC 300	Biorad
	Power Pack P25	Biometra
Thermoblock	Thermomixer 5436 / 5437	Eppendorf
<i>Thermocycler</i>	PTC-200	MJ Research
Ultrafiltrations-Zelle	Model 8400 / 8050	Amicon
Vakuumzentrifuge	Speedvac SVC 200	Savant
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen	5417R	Eppendorf
	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
	Biofuge pico	Heraeus
	Biofuge stratos	Heraeus

2.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kits

2.2.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien von Roth Chemikalien oder Sigma-Aldrich bezogen.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1; 30%)	Roth
Adeninsulfat	Fluka
Agar, granuliert	BD Bioscience

Agarosetabletten	BioLine
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Arginin	LKT Laboratories
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS ³)	Pierce
Bromphenolblau	Serva
Carbenicillin	Roth / AppliChem
Chloramphenicol	Roth
Coomassie G-250	Merck
Coomassie R250	Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	NEB
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem
Eisen(II)-Sulfat	Sigma
Ethidiumbromid-Lösung, 1%	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Express ³⁵ S <i>Labeling Mix</i>	Perkin Elmer
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	AppliChem / BD Bioscience
Hefe-Stickstoff-Basismedium	Difco
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Kanamycinsulfat	Roth
L-Aminosäuren	Fluka
L-Glutathion (GSH)	Roth
Manganchlorid	Merck
Milchpulver (<i>Blotting Grade</i>)	Biorad
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	MP Biomedicals
Ni-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) - Agarose	Qiagen
NP-40	Fluka
Pepton	BD Bioscience
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck / Roth
Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran	GE Healthcare
Proteaseinhibitortabletten, Mini, EDTA-frei	Roche
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
Rubidiumchlorid	Roth
Selenomethionin	Calbiochem
Talon <i>Superflow</i> -Affinitätsmatrix (Co ²⁺)	Clontech
Triton-X 100	Serva
Trypton	AppliChem / BD Bioscience

Tween-20	Merck
Uracil	Fluka
Vitamine	Sigma
Xylencyanol	Fluka

2.2.2 Enzyme und Antikörper

Enzyme		
Glucosidase	N-Glucosidase F	Roche
Ligase	T4 DNA Ligase	NEB
Nuclease	DNaseI	Roche
Phosphatase	antarktische Phosphatase	NEB
Polymerasen	Pfu	Fermentas, Roboklon
	PfuPlus!	Roboklon
	T4 Polymerase	NEB
	Taq	Fermentas, Roboklon
Proteasen	Chymotrypsin	Sigma
	Subtilisin	Sigma
	TEV-Protease	Eigenproduktion
	Thermolysin	Sigma
	Trypsin	Sigma
Restriktionsenzyme	BamHI, DpnI, NotI, XhoI	NEB
Antikörper		
	α -HA Antikörper (Maus)	Sigma
	α -myc Antikörper (Klon 9E10) (Maus)	Sigma
	α -Maus <i>Horseradish peroxidase</i>	Santa Cruz
	(HRP)-Konjugat (Ziege)	Biotechnology
	α -His HRP-Konjugat, α -HRP-Block-Puffer (10x) und -Reagenz	Qiagen

2.2.3 Kits

Molekularbiologie	QIAGEN Plasmid Maxiprep Kit	Qiagen
	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
	QIAquick Gel Extraction-Kit	Qiagen
Immunodetektion	Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit	GE Healthcare
Kristallisation (Initial-Screens)	Anions, Classics, Classics II, ClassicsLite, ComPAS, JCSG+, PEGs I und II, pHClear I und II, Protein Complex Suite	Qiagen / Jena Bioscience

2.3 Nährmedien und Lösungen

2.3.1 Molekularbiologie

Agarosegele	Agarose	1-1,5% (w/v)
	Ethidiumbromid in TAE-Puffer	1 µg/ml
DNA-Probenpuffer 5x	Xylencyanol	0,05% (w/v)
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
	Glycerin in TAE-Puffer	30% (v/v)
DNA-Marker	100 kb bzw. 1 kb Leiter (NEB)	0,5 µg/µl
TAE-Puffer	Tris	40 mM
	EDTA	1 mM
	Essigsäure	20 mM
TFB1-Puffer	RbCl ₂	100 mM
	MnCl ₂	50 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	pH 5,8	
TFB2-Puffer	RbCl ₂	10 mM
	MOPS	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	pH 6,8 (mit NaOH)	

2.3.2 Nährmedien

<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)		
LB-Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
LB-Agar	LB + Agar	1,5% (w/v)
SOB-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	KCl	2,5 mM
SOC-Medium	SOB-Medium + MgCl ₂ / MgSO ₄	je 10 mM

	Glucose	20 mM
TB-Medium, 4x	Hefeextrakt	96 g/l
	Trypton	48 g/l
	Glycerin	16% (v/v)
Puffer für TB Medium	KH ₂ PO ₄	0,34 M
	K ₂ HPO ₄	1,44 M
M9-Medium, 5x	Na ₂ HPO ₄	30 g/l
	KH ₂ PO ₄	15 g/l
	NH ₄ Cl	5 g/l
	NaCl	2,5 g/l
MgSO ₄ -Stammlösung, 1000x	MgSO ₄	1 M
Fe(II)SO ₄ -Stammlösung, 1000x	Fe(II)SO ₄	4,2 g/l
Vitamin-Mix, 1000x	Riboflavin	1 g/l
	Niacinamid	1 g/l
	Pyridoxin-Monohydrochlorid	0,1 g/l
	Thiamin	1 g/l
Aminosäure-Mix, 200x	L-Lysin	20 g/l
	L-Phenylalanin	20 g/l
	L-Threonin	20 g/l
	L-Isoleucin	10 g/l
	L-Leucin	10 g/l
	L-Valin	10 g/l
SeMet-Stammlösung, 200x	L-Selenomethionin	10 g/l
<hr/> <i>S. cerevisiae</i>		
YPD-Medium	Hefeextrakt	10 g/l
	Pepton	20 g/l
	Glucose (40%)	50 ml/l
YPD-Agar	YPD + Agar	20 g/l
SD-Medium	Hefe-Stickstoff Basismedium (<i>yeast nitrogen base</i>) ohne Aminosäuren	6,7 g/l
	Glucose	20 g/l
	Adeninsulfat	0,02 g/l
	Uracil	0,02 g/l
	L-Tryptophan	0,02 g/l
	L-Histidin-HCl	0,02 g/l
	L-Leucin	0,03 g/l
	L-Lysin	0,03 g/l

2.3.3 Proteinreinigung

PBS, 10x	Na ₂ HPO ₄	84,0 mM
	KH ₂ PO ₄	15,3 mM
	NaCl	1,5 M
	pH 7,4	
Native Reinigung		
PBS-Lysepuffer	PBS	1x
	NaCl	0,5 M
	Glycerin	5% (v/v)
His-Waschpuffer	HEPES, pH 7,5	20 mM
	NaCl	250 mM
	Imidazol, pH 8,0	20 mM
His-Elutionspuffer	HEPES, pH 7,5	20 mM
	NaCl	250 mM
	Imidazol, pH 8,0	250 mM
GF-Puffer	HEPES, pH 7,5	20 mM
	NaCl	250 mM
GF200-Puffer	HEPES, pH 7,5	20 mM
	NaCl	200 mM
Denaturierende Reinigung		
IB-Lysepuffer	Tris, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
IB-W1	Tris, pH 8,0	50 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	2% (v/v)
	PMSF	1 mM
IB-W2	Tris, pH 8,0	50 mM
	EDTA	0,5 mM
	PMSF	1 mM
IB-S	Tris, pH 8,0	25 mM
	Harnstoff	8 M
	β-Mercaptoethanol	8 mM
	PMSF	1 mM
IB-His-Waschpuffer	Tris, pH 8,0	25 mM
	Harnstoff	8 M
	β-Mercaptoethanol	8 mM
	PMSF	1 mM

	NaCl	800 mM
IB-His-Elutionspuffer	Tris, pH 8,0	25 mM
	Harnstoff	8 M
	β -Mercaptoethanol	8 mM
	PMSF	1 mM
	Imidazol	200 mM
IB-IEX1	Tris, pH 8,0	50 mM
	Harnstoff	7 M
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
IB-IEX2	Tris, pH 8,0	50 mM
	Harnstoff	7 M
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
IB-DS	NaCl	1 M
	Tris, pH 8,0	50 mM
	Harnstoff	7 M
RF-Puffer	NaCl	300 mM
	Tris, pH 8,5	100 mM
	NaCl	150 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Arginin	0,5 M
	Glutathion, reduziert	5 mM
	Glutathion, oxidiert	0,5 mM
RF-IEX1	HEPES, pH 7,5	10 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Glycerin	10% (v/v)
RF-IEX2	HEPES, pH 7,5	10 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Glycerin	10% (v/v)
RF-GF-Puffer	NaCl	1 M
	HEPES, pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Glycerin	10% (v/v)

2.3.4 Co-Immunpräzipitation

IP-Puffer	HEPES-NaOH, pH 7,5	50 mM
	NaCl	50 mM
	Kaliumacetat, pH 7,5	125 mM
	MgCl ₂	2 mM
	EDTA	2 mM
	CaCl ₂	10 µM
	Glycerin	3% (v/v)
	PMSF	1 mM
IP-NP40-Puffer	IP-32 + NP40	0,5% (v/v)

2.3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Laufpuffer, 10x	Tris-HCl	250 mM
	SDS	1% (w/v)
	Glycin	2,5 M
SDS-Probenpuffer, 4x	Tris-HCl, pH 6,8	200 mM
	SDS	8% (w/v)
	Glycerin	40% (v/v)
	Bromphenolblau	0,004% (w/v)
	DTT	100 mM
<i>Blue Native-</i> Probenpuffer, 4x	Tris-HCl, pH 6,8	200 mM
	Coomassie G-250	0,004% (w/v)
	Glycerin	40% (v/v)
	DTT	100 mM
<i>Blue Native-</i> Laufpuffer, 10x	Tris-HCl	250 mM
	Glycin	250 mM
Schägger-Gelpuffer	Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4% (w/v)
Schägger-Kathodenpuffer, 10x	Tris	1 M
	Tricin	1 M
	SDS	1% (w/v)
	pH 8,2	
Schägger-Anodenpuffer, 10x	Tris, pH 8,9	2 M
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250	0,25% (w/v)
	Ethanol	50% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	Ethanol	50% (v/v)

	Essigsäure	10% (v/v)
Aceton-Stammlösung	Aceton	50% (v/v)
TCA-Stammlösung	Trichloressigsäure	50% (w/v)
Natriumthiosulfat-Stammlösung	Natriumthiosulfat	10% (w/v)
Silbernitrat-Stammlösung	Silbernitrat	20% (w/v)
Silber-Fixierlösung	Aceton-Stammlösung	60 ml
	TCA-Stammlösung	1,5 ml
	Formaldehyd, 37%	25 μ l
Silber-Färbelösung	<i>ddH</i> ₂ O	60 ml
	Silbernitrat-Stammlösung	0,8 ml
	Formaldehyd, 37%	0,6 ml μ l
Silber-Entwicklungslösung	<i>ddH</i> ₂ O	60 ml
	Natriumcarbonat	1,25 g
	TCA-Stammlösung	25 μ l
	Formaldehyd, 37%	25 μ l

2.3.6 Western-Blot und Immunodetektion

Block-Puffer, α -HA / α -myc	PBS-T + Milchpulver	5% (w/v)
Block-Puffer, α -His	10x α -His-HRP-Block-Puffer	10% (v/v)
	α -His-HRP-Block-Reagenz	0,5% (w/v)
	Tween-20	0,1% (v/v)
Blot-Puffer	Tris-Base	25 mM
	Glycin	192 mM
	Isopropanol	10% (v/v)
	pH 8,3	
PBS-T	PBS + Tween-20	0,1% (v/v)

2.4 Plasmide und Stämme

2.4.1 Plasmide

pQLinkH	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit Ampicillin-resistenz, <i>tac</i> Promotor, LINK-Sequenzen, N-terminalem Heptahistidin-Tag und TEV-Protease-Schnittstelle	Scheich <i>et al.</i> 2007
pGEM-T	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor mit Ampicillin-resistenz, T7- und SP6-Promotor und T-Überhängen zur direkten Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen	Promega
pRS416	<i>E. coli</i> - / <i>S. cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor mit URA3-Marker	Stratagene

2.4.2 Bakterienstämme

Klonierung	<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen
	<i>E. coli</i> DH5 α T1 ^R	Invitrogen
Expression	<i>E. coli</i> BL21(DE3) T1 ^R	Sigma
	<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3)	Merck
	<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3) T1 ^R	BL21(DE3)T1 ^R transformiert mit dem pRARE2 Plasmid aus Rosetta2(DE3)

2.4.3 *S. cerevisiae*-Stämme

Die verwendeten Hefestämme waren haploide Nachkommen des Wildtyp-Stamms DF5.

YCH196	HA-Hrd3 Δ Yos9	6xHA-HRD3, Δ <i>yos9</i> ::HIS3, <i>prc1-1</i> , <i>trp1-1</i> (am), <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-3,-112</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ura3-52</i>
YCH231	Yos9-myc	YOS9-1xmyc(kanMX), <i>prc1-1</i> , <i>trp1-1</i> (am), <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-3,-112</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ura3-52</i>

2.5 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, bezogen. Die Bezeichnung der *Primer* steht für Protein_Aminosäureposition. Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichung hervorgehoben. 3'-*Primer* für die Mutagenese entsprachen dem reversen Komplement der 5'-*Primer*.

Klonierung <i>Primer</i>	Sequenz (5'→3'-Richtung)	Restriktions- schnittstelle
Usa1_1_5'	CAGGATCCATGTCTGAATATCTAGCTCAGA CG	BamHI
Usa1_257_5'	CAGGATCCGATGAAGAGAGATTTGTGTTGG AATTC	BamHI
Usa1_346_3'	CACTCACTGCGGCCGCTCACTCTTGGTTGA TTTGTACATGG	NotI
Usa1_386_3'	CACTCACTGCGGCCGCTCATCGTCCTTGCG TCGGAG	NotI
Usa1_535_3'	CACTCACTGCGGCCGCTCACGGGAAGCTGT TTCTCAAGG	NotI
Hrd1_325_5'	CAGGATCCAAACAGCTCGACGACACTCTTG	BamHI
Hrd1_388_5'	CAGGATCCAATTGGATGGAACGTTCTCAGA C	BamHI
Hrd1_539_3'	CACTCACTGCGGCCGCTCACTTGGCAATTT GCTCGCCC	NotI
Hrd1_551_3'	CACTCACTGCGGCCGCTCAGATATGCTGGA TAAATTTATCTGGTATG	NotI
Yos9_24_5'	CAGGATCCGCACCTATAGAAGACCCCATAG TATC	BamHI
Yos9_90_5'	GAGGATCCAGCAATAGTGAAAAGACAGCAT TATTA ACT	BamHI
Yos9_253_5'	CAGGATCCGCCTCACCTATACTTTGCAGGA	BamHI
Yos9_266_5'	GAGGATCCATTGGTAGTAACTCTATTGATT TAATCACCAA	BamHI
Yos9_90_3'	GACTGACTGCGGCCGCTCAGCTATGCTCAT TTGAGTCTTCCAA	NotI
Yos9_262_3'	GACTGACTGCGGCCGCTCATGCGGGCATCC TGCAA	NotI
Yos9_424_3'	GACTGACTGCGGCCGCTCATGACCGAATTT CTGCGGTATTTATATC	NotI
Yos9_539_3'	GACTGACTGCGGCCGCTCAATGTTCGATGA AAACACCAGCT	NotI
FZ62	AGCTCGAGGTATAGCGTCTTTTCGCATCATC	XhoI
FZ63	TAGGATCCGATAACCGATGACTTGGCAAG	BamHI

QuikChange Mutagenese		
<i>Primer</i>	Sequenz (5'→3'-Richtung)	Mutation
Yos9_N380A_5'	GCAGAGATATTTTTCGCCAAGACGTTTACATT TAATG	N380A
Yos9_L393A_5'	GATAATGGAAACTTCGCATCATACAAAATTGG GGAT	L393A
vektorspezifische <i>Primer</i>		
<i>Primer</i>	Sequenz (5'→3'-Richtung)	Vektor
pQLink_5'	TATAAAAATAGGCGTATCACGAGG	pQLink
pQLink_3'	GAATTCATTAAAGAGGAGAAA	pQLink

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) repliziert doppelsträngige DNA-Fragmente von einer Matrize (Mullis *et al.* 1992). Dazu werden zwei Oligonukleotide benötigt, die komplementär zur gewünschten Sequenz sind und diese flankieren (*Primer*).

Im ersten Schritt der PCR wird der DNA-Doppelstrang bei hoher Temperatur aufgeschmolzen. Im nächsten Schritt wird die Temperatur gesenkt, sodass sich die *Primer* an die DNA-Einzelstränge anlagern. Schließlich wird die Temperatur auf das Temperatur-optimum der thermostabilen Polymerase angehoben, sodass die *Primer* komplementär zur Matrize verlängert werden. Die Schritte werden mehrfach wiederholt, wodurch die von den *Primern* flankierte Sequenz amplifiziert wird.

Zur Klonierung wurden DNA-Fragmente in einer präparativen PCR mit korrekturlesefähiger *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Am 3'- bzw. 5'-Ende der genspezifischen *Primer* wurden Restriktionsschnittstellen hinzugefügt. Klone nach einer Ligation wurden durch Kolonie-PCR auf die Größe der eingefügten DNA untersucht. Einzelkolonien wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in den PCR-Ansatz getaucht. Für diese analytische PCR wurden vektorspezifische *Primer* und *Taq*-Polymerase verwendet. Standardreaktionsansätze und -temperaturzyklen sind in Tab. 3.1 und 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.1: PCR-Ansätze

Komponente	Endkonzentration	
	präparative PCR	Kolonie-PCR
<i>ddH</i> ₂ O	<i>ad</i> 50 μ l	<i>ad</i> 20 μ l
Polymerase-Puffer, 10x	1x	1x
dNTPs, je 10 mM	je 200 μ M	je 200 μ M
Matrizen-DNA, 5 ng/ μ l	0,1 ng/ μ l	-
<i>Primer</i> 3', 10 μ M	0,2 μ M	0,25 μ M
<i>Primer</i> 5', 10 μ M	0,2 μ M	0,25 μ M
Polymerase	5 U	1 U

Tabelle 3.2: PCR-Temperaturzyklus. kb: Kilobasen

	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)	Zyklen
Denaturierung	95	0:30	1
Denaturierung	95	0:30	
Anlagerung	55	1:00	28
Extension	72	1 min / kb der Matrize	
Extension	72	6:00	1

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für präparative und analytische Zwecke wurden DNA-Proben zusammen mit einem Größenstandard in 1-1,5%igen Agarosegelen bei 140 V elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Banden wurden durch UV-Licht detektiert.

3.1.3 Restriktionsverdau

Plasmide und PCR-Produkte wurden mit Restriktionsendonukleasen der Klasse II verdaut, die spezifisch an Erkennungssequenzen innerhalb der DNA schneiden. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Enzyme wurden unterschiedliche überhängende Enden am 3'- und 5'-Ende produziert. Ein PCR-Produkt mit den gleichen überhängenden Enden wie im geschnittenen Plasmid kann somit orientierungsspezifisch in den Vektor ligiert werden. Restriktionsansätze wurden nach dem in Tab. 3.3 angegebenen Schema zusammengestellt und 3-16 h bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 3.3: Restriktionsverdau

	Menge
<i>ddH</i> ₂ O	<i>ad</i> 50 µl
DNA	38 µl PCR-Produkt oder 1-5 µg Plasmid
Puffer, 10x	5 µl
BSA, 100x	0,5 µl
Enzym 1	1,0 µl
Enzym 2	1,0 µl

3.1.4 Reinigung von DNA

PCR-Produkte und geschnittene Plasmide wurden mit dem QIAquick PCR Purification-Kit nach Herstellerangaben (Qiagen) gereinigt. Zur Isolierung von DNA aus einem Gemisch unterschiedlich großer Spezies wurde die DNA zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Die betreffende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) extrahiert.

3.1.5 Ligation

Die DNA-Ligase aus dem T4-Phagen katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 3'-Hydroxylgruppe und 5'-Phosphatgruppe unter Verbrauch von ATP (Zimmerman *et al.* 1967; Little *et al.* 1967).

Die Konzentration gereinigter DNA wurde photometrisch bestimmt. 1 µg des Vektors wurde mit 2,5 U antarktischer Phosphatase für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Die Phosphatase wurde durch anschließende Inkubation für 5 min bei 65 °C deaktiviert, und der dephosphorylierte Vektor wurde ohne weitere Reinigung für die Ligation eingesetzt. Reaktionsansätze für die Ligation wurden nach dem Schema in Tab. 3.4 zusammengestellt und 2 - 16 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 3.4: Ligation

	Menge
<i>ddH</i> ₂ O	<i>ad</i> 20 µl
Vektor, geschnitten und dephosphoryliert	20ng
PCR-Produkt, geschnitten	3-5-facher molarer Überschuss
Puffer, 10x	1x
T4 DNA Ligase	0,3 µl

3.1.6 Transformation von *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der RbCl₂-Methode hergestellt (Hananan 1983). Die Über-Nacht-Kultur der Zellen wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von ca. 0,6 im Kulturschüttler inkubiert. Die Kultur wurde im Eisbad gekühlt und für 5 min bei 2.500 ×g abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden mit eisgekühlten Puffern durchgeführt. Das Pellet wurde in 30 ml TFB1 resuspendiert und nach 45 min wie zuvor abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 8 ml TFB2 aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ligations- und QuikChange-Mutagenese-Ansätze wurden in die Stämme DH5α bzw. DH5α T1^R transformiert. Expressionsplasmide wurden in die Stämme Rosetta2(DE3) bzw. Rosetta2(DE3) T1^R transformiert. 50-100 µl Zellen wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut. 5 µl eines Ligations- oder QuikChange-Mutagenese-Ansatzes bzw. 0,5-1 µl Plasmid-DNA wurden zugegeben und für ca. 30 min mit den Zellen inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurde 800 µl LB- oder SOC-Medium zugegeben und ca. 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.7 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit oder dem QIAGEN Plasmid Maxiprep Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen) präpariert. Für Präparationen im kleinen Maßstab wurden 3-5 ml, für Präparationen im großen Maßstab 150 ml Über-Nacht-Kultur verwendet. Die Plasmidkonzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt.

3.1.8 QuikChange-Mutagenese

Mutationen wurden in einem zweistufigen Verfahren durch QuikChange-Mutagenese (Wang und Malcolm 1999) in Expressionsplasmide eingeführt. Ausgehend von *Primern*, welche die gewünschte Mutation beinhalten, wird das gesamte Plasmid durch eine PCR repliziert. Die Replikation der 3'- und 5'-Stränge erfolgt im zweistufigen Verfahren zunächst in getrennten Reaktionsansätzen. Nach einigen PCR-Zyklen werden die Reaktionsansätze gemischt, und die DNA wird durch weitere PCR-Zyklen amplifiziert.

Ausgangsplasmide, die aus dam^+ -Stämmen stammen, liegen im Gegensatz zu den *in vitro* replizierten Plasmiden methyliert vor. Die Ausgangsplasmide werden nach der PCR durch die methylierungsspezifische Endonuklease DpnI verdaut, sodass ausschließlich neu generierte Plasmide zurückbleiben.

Reaktionsansätze wurden wie in Tab. 3.5 angegeben zusammengestellt und dem in Tab. 3.6 aufgeführten PCR-Zyklus unterworfen. Die Proben wurden anschließend für 16 h bei 37 °C mit 1 µl DpnI inkubiert. Je 5 µl der verdauten Reaktionsansätze wurde in *E.coli* DH5α transformiert.

Tabelle 3.5: Reaktionsansätze für die QuikChange-Mutagenese

Komponente	3'	5'
<i>ddH₂O</i>	<i>ad</i> 25 µl	<i>ad</i> 25 µl
<i>Pfu</i> -Puffer, 10x	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs, je 10 mM	1 µl	1 µl
<i>Template</i> -DNA, 10 ng/µl	0,5 µl	0,5 µl
<i>Primer</i> 3', 10 µM	1,2 µl	-
<i>Primer</i> 5', 10 µM	-	1,2 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase, 5 U/µl	0,5 µl	0,5 µl

3.2 Expression und Proteinreinigung

3.2.1 Expression in *E. coli*

Plasmide wurden zur Expression in *E.coli* Rosetta2(DE3) oder Rosetta2(DE3) T1^R transformiert. Die Zellen wurden in Nährmedium mit zur Selektion geeigneten Antibiotika

Tabelle 3.6: Temperaturzyklus der QuikChange-Mutagenese

	Temperatur (°C)	Dauer (min:s)	Zyklen
3'- und 5'-Ansätze getrennt			
Denaturierung	92	0:30	
Denaturierung	92	0:30	
Anlagerung	55	1:00	10
Extension	68	10:00	
Mischen von 3'- und 5'-Ansätzen Zugabe von 0,3 µl <i>Pfu</i> -Polymerase			
Denaturierung	92	0:30	
Anlagerung	55	1:00	14
Extension	68	10:00	
Zugabe von 0,3 µl <i>Pfu</i> -Polymerase, 1 µl dNTPs und je 0,6 µl <i>Primern</i>			
Denaturierung	92	0:30	
Anlagerung	55	1:00	16
Extension	68	10:00	
Extension	68	15:00	

kultiviert (Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml). Über-Nacht-Kulturen in LB-Medium wurden 1:20 in TB-Medium verdünnt und bis zu $OD_{600}=1,5-2,0$ bei 37 °C geschüttelt. Kulturen und Schüttler wurden auf 18 °C heruntergekühlt, und die Expression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach 14-18 h wurden die Zellen bei $5.000 \times g$ für 10 min pelletiert und bis zum Zellaufschluss bei -80 °C gelagert.

Die Synthese von Selenomethionin-markiertem Yos9 erfolgte in Rosetta2(DE3)-T1^R nach einem Protokoll von Van Duyne *et al.* durch Inhibition der Methionin-Biosynthese über die Zugabe eines Überschusses anderer Aminosäuren (Van Duyne *et al.* 1993). M9-Medium wurde mit 0,2% Glucose, MgSO₄- und Fe(II)SO₄-Stammlösung und dem Vitamin-Mix komplettiert und 1:100 mit Über-Nacht-Kultur in LB-Medium angeimpft. Bei Erreichen von $OD_{600}=0,5$ wurden Kultur und Schüttler auf 18 °C heruntergekühlt. Aminosäure-Mix und SeMet-Stammlösung wurden zugegeben, und nach 15 min wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach 16 h wurden die Zellen wie zuvor geerntet.

3.2.2 Expression in *S. cerevisiae*

Über-Nacht-Kulturen von *S. cerevisiae*-Zellen in YPD-Medium wurden auf $OD_{600}=0,3$ verdünnt und bis zu $OD_{600}=1,0-1,5$ bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden bei $2.000 \times g$ für 2 min abzentrifugiert und mit 20 ml 1 mM PMSF in *ddH*₂O je 50 OD_{600} gewaschen.

3.2.3 Zellaufschluss

Bakterienpellets wurden in PBS- bzw. IB-Lysepuffer aufgenommen, der mit einer Spatelspitze DNaseI, 1 mM DTT und 1 mM PMSF oder $\frac{1}{2}$ Proteaseinhibitortablette supplementiert war. Die vollständig resuspendierten Zellen wurden im *Fluidizer* bei etwa 9.000 psi aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei $50.000 \times g$, 30 min bei 4 °C wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Für native Reinigungen wurde der Überstand durch einen 0,45 μm Spritzenfilter filtriert, für denaturierende Reinigungen wurden die pelletierten *Inclusion Bodies* gewaschen.

3.2.4 Reinigung und Solubilisierung von *Inclusion Bodies*

Für die Reinigung unlöslicher Yos9-Konstrukte wurde das Pellet nach der Lyse zweimal mit IB-W1-Puffer und einmal mit IB-W2-Puffer gewaschen. Lösliche und unlösliche Bestandteile wurden jeweils durch Zentrifugation bei $50.000 \times g$ für 30 min voneinander getrennt. Das gewaschene Pellet wurde unter Rühren bei 4 °C für etwa 1 h in ca. 50 ml IB-S-Puffer je 2 l Kultur solubilisiert. Unlösliches Material wurde durch mehrfache Zentrifugation wie zuvor abgetrennt, und der Überstand wurde filtriert.

3.2.5 Affinitätschromatographie

Oligohistidin-Markierungen (*Tags*) besitzen eine Affinität zu zweiwertigen Metallionen. Heptahistidin (His₇)-Fusionsproteine wurden im ersten Reinigungsschritt an eine Matrix mit chelierten Ni²⁺-Ionen gebunden. Die Matrix wurde bei der nativen Reinigung mit einer niedrigen Konzentration des Kompetitors Imidazol, bei der denaturierenden Reinigung mit Hochsalz-Puffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe einer hohen Konzentration des Kompetitors Imidazol eluiert.

Die Reinigung wurde im *Batch*-Verfahren mit 1-2 ml NiNTA-Matrix je ca. 20 g Zellpellet (entsprechend 2 l Kultur) durchgeführt. Die Matrix wurde mit 15 ml His-Waschpuffer (nativ) bzw. IB-His-Waschpuffer (denaturierend) equilibriert und unter Zugabe von 20 mM Imidazol bei 4 °C für 1 h mit dem geklärten Zelllysate bzw. dem solubilisierten Protein auf dem Rotationsmischer inkubiert. Das Gemisch wurde in eine Polypropylen-Säule gegossen, und die Matrix wurde mit 3 x 15 ml His- bzw. IB-His-Waschpuffer gewaschen. Die Elution von der Säule erfolgte in 4-8 ml His- bzw. IB-His-Elutionspuffer. Die Proteinkonzentration im Eluat wurde photometrisch bestimmt.

3.2.6 *Tag*-Verdau

Bei Expression mit dem pQLink-System entsteht ein Fusionsprotein mit dem *Tag* am N-Terminus. Eine TEV-Protease-Schnittstelle zwischen *Tag* und Protein ermöglicht die Entfernung des *Tags* durch Inkubation mit TEV-Protease, wobei ein N-terminaler Überhang von zwei zusätzlichen Aminosäuren (Gly-Ser) zurückbleibt.

Von der Affinitätsmatrix eluierte Proteine wurden für ca. 16 h im Verhältnis 1:30 (w/w, TEV-Protease:Protein) bei 4 °C mit TEV-Protease inkubiert und gegen GF-Puffer dialysiert. Die His₆-markierte TEV-Protease und ungeschnittenes Protein wurden durch erneute Passage über die Affinitätsmatrix abgetrennt.

3.2.7 Ionenaustausch-Chromatographie

Proteine unterschiedlicher Ladung können mit Ionenaustausch-Chromatographie voneinander getrennt werden. Die Bindung an das geladene Säulenmaterial erfolgt bei niedriger Ionenstärke. Mittels eines Salzgradienten können Proteine mit unterschiedlichem isoelektrischen Punkt schrittweise eluiert werden.

Für die Reinigung von Usa1-Konstrukten wurde nach der Affinitätschromatographie ein Anionentauscher (HiTrap Q FF) an einem Äkta-FPLC-System verwendet. Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde mit salzfreiem Puffer verdünnt, um die Ionenstärke herabzusetzen. Das Protein wurde auf die in 90% IEX1 / 10% IEX2 equilibrierte Säule aufgetragen und mit 5 Säulenvolumen desselben Puffers gewaschen. Die Elution erfolgte über ein Gradienten über 10 Säulenvolumen von 10-100% IEX2.

Für die denaturierende Reinigung von Yos9-Konstrukten wurde nach der Affinitätschromatographie ein Reinigungsschritt mit einem Anionentauscher durchgeführt. Die Ionenstärke der Proteinlösung wurde durch Verdünnen mit salzfreiem Puffer herabgesetzt, und die HiTrap Q FF-Säule wurde an einem Äkta-FPLC-System mit fünf Säulenvolumen IB-IEX1-Puffer equilibriert. Das Protein wurde auf die Säule aufgetragen und mit fünf Säulenvolumen desselben Puffers gewaschen. Die Elution erfolgte über einen Gradienten über zehn Säulenvolumen von 0-40% IB-IEX2-Puffer. Nach der Rückfaltung wurde alternativ zu einer abschließenden Gelfiltration ein weiterer Anionentauscher-Schritt unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit den Puffern RF-IEX1 und RF-IEX2 durchgeführt.

3.2.8 Gelfiltration

Die Gelfiltration ermöglicht die Trennung von Molekülen nach ihrem hydrodynamischen Radius. Bei der Passage durch ein poröses Säulenmaterial legen die kleinsten Moleküle den längsten Weg durch sämtliche Poren zurück und eluieren zuletzt, während größere Moleküle weniger Poren passieren und früher eluieren. Ab einer vom Säulenmaterial abhängigen Größe der Moleküle nehmen diese den kürzesten Weg und eluieren im Ausschlussvolumen der Säule.

Gelfiltrationen wurden in der Regel als letzter Schritt einer Proteinreinigung an Äkta-FPLC-Systemen durchgeführt. Je nach Proteingröße und -menge wurden Superdex 75 bzw. 200 Säulen der Größe 16/60 bzw. 26/60 benutzt. Vor dem Probenauftrag wurde die Säule in einem Säulenvolumen GF-Puffer (Usa1, Hrd1, lösliche Yos9-Konstrukte) bezie-

ungsweise RF-GF-Puffer (rückgefaltete Yos9-Konstrukte) equilibriert. Die Elution fand über ein Säulenvolumen Puffer bei einer Flussrate von 0,5-1 ml/min (16/60) beziehungsweise 1-2,5 ml/min (26/60) statt.

Während der denaturierenden Reinigung wurde das Protein zwischen Ionentauscher- und Rückfaltungsschritt im Laufpuffer IB-DS über eine HiPrep 26/10 Desalting Säule entsalzt, um vor der Rückfaltung DTT und EDTA aus dem Puffer zu entfernen. In dieser Säule passieren ausschließlich kleine Moleküle des Lösungsmittels die Matrix, während Makromoleküle im Ausschlußvolumen und damit im Laufpuffer eluieren.

3.2.9 Rückfaltung denaturierter Proteine

Gereinigtes, denaturiertes Protein wurde bei 4 °C rückgefaltet, indem die auf ca. 1 ml ankonzentrierte Proteinlösung über eine Peristaltikpumpe unter Rühren langsam in RF-Puffer getropft wurde. Das Volumen des Rückfaltungspuffers wurde so gewählt, dass eine Endkonzentrationen des Harnstoffs unter 0,2 M und des Proteins unter 0,2 mg/ml erreicht wurde.

3.2.10 Konzentrieren von Proteinlösungen

Große Volumen Proteinlösung wurden in Ultrafiltrations-Zellen bei 70 psi ankonzentriert. Kleinere Volumen wurden in Zentrifugen-Filtereinheiten bei 3.000-4.000 $\times g$ ankonzentriert.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

SDS-PAGE

Proteinproben wurden zu analytischen Zwecken durch diskontinuierliche Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) aufgetrennt. Proteine werden durch das Detergens SDS denaturiert, wobei sich das negative geladene Dodecylsulfat an hydrophobe Bereiche anlagert. Die Anlagerung erfolgt proportional zur molekularen Masse, sodass die Migrationsgeschwindigkeit im elektrischen Feld überwiegend von der Masse und kaum von der Eigenladung des Proteins abhängt.

Je nach benötigtem Auftrennungsbereich wurden 10-15%ige Mini-Gele ($83 \times 73 \times 0,75$ mm, Biorad) hergestellt. Die Proben wurden in reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgekocht. Proteinmassen wurden durch den Vergleich mit einem Massenstandard abgeschätzt. Die Auftrennung fand in SDS-Laufpuffer bei konstanter Spannung von 260 V statt.

Blue Native PAGE

Der Oligomerisierungszustand von Yos9 wurde durch *Blue Native* PAGE untersucht. Gele, Laufpuffer und Probenpuffer enthalten in der nativen Gelelektrophorese kein SDS, sodass Proteine ihre native Konformation beibehalten. Das Migrationsverhalten hängt damit neben der Masse auch von der Ladung und der Faltung des Proteins ab. In der *Blue Native* PAGE wird ein verbessertes Laufverhalten der Proteine durch die Anlagerung des negativ geladenen Farbstoffs Coomassie G-250 erreicht (Schägger und von Jagow 1991).

Proteinproben wurden mit *Blue Native*-Probenpuffer versetzt und auf 5%ige Mini-Gele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in *Blue Native*-Laufpuffer über 3-5 h bei 4 °C und 100 V.

Schägger-Gele

Proteine mit einer Molmasse unter 10 kDa (Yos9₂₆₆₋₅₃₉) wurden statt auf Laemmli-Gelen auf denaturierenden Schägger-Gelen aufgetrennt, um eine bessere Auflösung der kleinen Molmassen zu erzielen (Schägger und von Jagow 1987). Mini-Gele wurden nach Tab. 3.7 hergestellt. Das Innere der Elektrophorese-Kassette wurde mit Schägger-Kathodenpuffer befüllt, außerhalb wurde Schägger-Anodenpuffer eingefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 40 mA während der Migration durch das Sammelgel und 80 mA während der Migration durch das Trenngel.

Tabelle 3.7: Schägger-Gele

Gesamtvolumen		Trenngel, 12,5%	Sammelgel, 4%
<i>dd</i> H ₂ O	(ml)	6,0	6,70
Schägger-Gelpuffer	(ml)	8,0	2,75
Acrylamid/Bisacrylamid, 30% (w/v)	(ml)	10,0	1,55
APS, 10%	(μ l)	300	150
TEMED	(μ l)	22	16

Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Zum Anfärben der Proteinbanden mit Coomassie wurden die Gele nach der Elektrophorese erst in Coomassie-Färbelösung erhitzt, mit Wasser gespült und anschließend in Entfärbelösung aufgeköcht.

Silberfärbungen wurden nach einem Protokoll von Nesterenko *et al.* durchgeführt (Tab. 3.8, Nesterenko *et al.* 1994).

Tabelle 3.8: Silberfärbung

Schritt	Lösung	Wiederholungen und Dauer
Fixierung	Silber-Fixierlösung	5 min
Spülen	<i>ddH</i> ₂ O	3 x 5 s
Waschen	<i>ddH</i> ₂ O	5 min
Spülen	<i>ddH</i> ₂ O	3 x 5 s
Vorbehandlung I	Aceton-Stammlösung	5 min
Vorbehandlung II	100 µl Natriumthiosulfat-Stammlösung in 60 ml <i>ddH</i> ₂ O	1 min
Spülen	<i>ddH</i> ₂ O	3 x 5 s
Imprägnieren	Silber-Färbelösung	8 min
Spülen	<i>ddH</i> ₂ O	2 x 5 s
Entwicklung	Silber-Entwicklungslösung	10 - 20 s
Stoppen	1% Essigsäure	30 s
Spülen	<i>ddH</i> ₂ O	10 s

3.3.2 TCA-Präzipitation

Niedrig konzentrierte Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das SDS-Gel mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert.

Vier Volumen Proteinlösung wurden mit einem Volumen 100% (w/v) TCA-Lösung versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden bei $21.000 \times g$ für 5 min abzentrifugiert und das Pellet wurde zweimal mit 200 µl kaltem Aceton (-20 °C) gewaschen. Überschüssiges Lösungsmittel wurde durch Inkubation des offenen Gefäßes bei 95 °C für 10 min entfernt. Das Pellet wurde in 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 95 °C aufgekocht.

3.3.3 Quervernetzung (*Crosslinking*)

Zur Analyse des Oligomerisierungszustandes wurde Yos₉₂₆₆₋₄₂₄ mit Bis(sulfosuccinimidyl)-suberat (BS³) quervernetzt. BS³ ist ein homobifunktioneller N-Hydroxysuccinimid-Ester, der mit primären Aminen unter Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid stabile Amidbindungen bildet. Die funktionellen Gruppen befinden sich in einem Abstand von ca. 11 Å zueinander. Somit können zwei Proteine, die primäre Amine (Lysine oder N-Termini) in einem räumlichen Abstand von maximal 11 Å zueinander besitzen, kovalent miteinander verknüpft werden.

0,15 bis 2,95 µg Yos₉₂₆₆₋₄₂₄ in GF-Puffer wurden in einem Gesamtvolumen von 7 µl mit einem 50-fachen molaren Überschuss von BS³ für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl 4x SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden sofort mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

3.3.4 Präparation von mikrosomalem Extrakt aus *S. cerevisiae*

Zellextrakte wurden mit auf 4 °C gekühlten Puffern und Zentrifugen hergestellt. 50 OD Hefezellen wurden in 400 µl IP-Puffer resuspendiert, in Eppendorfgläsern auf 1 ml mit 0,25-0,5 mm Glasperlen aufgefüllt und durch Vortexen für 2 min aufgeschlossen. Nach Zugabe von 1 ml IP-Puffer wurden bei 1.000 ×g für 5 min Zelltrümmer abgetrennt. Aus dem Überstand wurden bei 21.000 ×g für 20 min die Mikrosomen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml IP-NP40-Puffer je 50-150 OD resuspendiert und 20 min bei 4 °C auf dem Rotationsmischer inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 21.000 ×g für 20 min aus dem mikrosomalen Extrakt abgetrennt.

3.3.5 Co-Immunpräzipitation

15 µl einer 50%igen Protein-A-Sepharose-Suspension wurde bei 4 °C für 1-16 h auf dem Rotationsmischer mit 1 µl Antikörper, 1 ml Zellextrakt und 10 µg rekombinantem Protein inkubiert. Die Sepharose-Matrix wurde durch Zentrifugation bei 1.000 ×g für 30 sec sedimentiert und dreimal mit 500 µl IP-NP40-Puffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch Aufkochen der Matrix in 50 µl SDS-Probenpuffer eluiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Western-Blot und Immundetektion analysiert.

3.3.6 Western-Blot

Für der Immundetektion wurden Proteine aus Polyacrylamid-Gelen im *Semi-Dry*-Verfahren auf PVDF-Membranen geblottet. Die Membranen wurden vor dem Transfer für 1 min in 100% Ethanol aktiviert. Gele und Filterpapier wurden mit Blot-Puffer getränkt. Der Western-Blot wurde bei 44 mA je 9 × 6 cm Gel für 1 h durchgeführt.

3.3.7 Immundetektion

Nach dem Transfer wurden freie Bindungsstellen auf den Membranen durch Inkubation in Block-Puffer für 1-16 h abgesättigt.

Zur Detektion von Heptahistidin-Fusionsproteinen wurde die Membran 1 h mit α-His-HRP-Konjugat (1:2000 in Block-Puffer) inkubiert und dreimal mit 20 ml PBS-T für 15 min gewaschen. Für die Detektion von HA- bzw. myc-Fusionsproteinen wurde die Membran für 1 h mit α-HA- bzw. α-myc-Antikörper inkubiert (jeweils 1:10.000 in Block-Puffer) und dreimal für 15 min mit PBS-T gewaschen. Die Membran wurde für 1 h mit α-Maus HRP-Konjugat inkubiert (1:10.000 in Block-Puffer) und wie zuvor gewaschen.

Die Membranen wurden für 1 min mit 2 ml ECL-Reagenz inkubiert, und die Chemilumineszenz wurde im LAS-4000 Geldokumentationssystem detektiert.

3.3.8 Limitierte Proteolyse

Die Stabilität von Proteinen und ihre Fähigkeit, regelmäßige Kristallgitter auszubilden, können unter anderem durch flexible Bereiche eingeschränkt werden. Eine Eigenschaft dieser intrinsisch ungeordneten oder hochbeweglichen Bereiche ist eine erhöhte Anfälligkeit für proteolytischen Abbau. Dies kann zur Generierung stabilerer oder leichter kristallisierbarer Konstrukte genutzt werden, indem die Proteine unter kontrollierten Bedingungen geringen Mengen Proteasen ausgesetzt und die Abbauprodukte massenspektrometrisch analysiert werden (Cohen *et al.* 1995). Im Idealfall, wenn das Protein nicht weiter als bis zu einem stabilen Kernbereich abgebaut wird, können die Proteasen auch direkt im Kristallisationstropfen eingesetzt werden (*in situ*, Dong *et al.* 2007; Wernimont und Edwards 2009).

Usa₁₋₅₃₅ wurde einer *in situ*-Proteolyse in den Initial-Screens Classic, PEG I und ProComplex unterzogen. Dazu wurde den Kristallisationsansätzen Trypsin im Verhältnis 1:100.000 (w/w) zugesetzt.

Für die limitierte Proteolyse von Usa₁₋₅₃₅ und Hrd₁₃₂₅₋₅₅₁ *in vitro* wurden 100 µg Protein bei 4 °C mit Trypsin im Verhältnis 1:10.000 (w/w) versetzt. Nach 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h wurden Proben abgenommen und die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Banden stabiler Abbauprodukte wurden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert.

Yos₉₂₅₃₋₄₂₄ wurde bei 4 °C bzw. 20 °C mit Trypsin im Verhältnis 1:10.000 bis 1:1.000 (w/w) verdaut. Yos₉₂₄₋₅₃₉ wurde bei 4 °C mit Trypsin, Subtilisin, Chymotrypsin beziehungsweise Thermolysin im Verhältnis 1:5.000 (w/w) verdaut. Im Verlauf von 24-48 h wurden Proben abgenommen, und die Abbauprodukte wurden wie zuvor massenspektrometrisch untersucht.

3.3.9 Analytische Gelfiltration

Zur Analyse der Bindung zwischen Usa1 und Hrd1 wurden Gelfiltrationen im analytischen Maßstab durchgeführt. Eine Superose 6-Säule wurde in GF-Puffer equilibriert, die Proteine wurden auf die Säule aufgetragen und in GF-Puffer eluiert. Zur Abschätzung der molekularen Massen wurden separate Gelfiltrationen mit Standardproteinen durchgeführt.

3.3.10 Pulse-Chase-Experimente

Pulse-Chase-Experimente wurden von Franziska Zimmermann entsprechend einem Protokoll von Gauss *et al.* durchgeführt (Gauss *et al.* 2006b). Zur Generierung von Plasmiden für die Expression von Yos9-Mutanten in *S. cerevisiae* wurde der für Yos9 kodierende DNA-Abschnitt durch eine PCR mit den *Primern* FZ62 und FZ63 von genomischer DNA

amplifiziert und in den Vektor pGEM-T ligiert. Die DNA wurde durch Restriktionsverdau mit den Enzymen XhoI und BamHI ausgeschnitten und in das Expressions-Plasmid pRS416 ligiert. Plasmide zur Expression von Yos9 (Wildtyp, L393A- bzw. L393A / N380A-Mutante) wurden mit der Lithiumacetat-Methode (Gauss *et al.* 2005) in einen Yos9-deletierten Hefestamm transformiert.

Die Hefezellen wurden in SD-Medium bei 30 °C kultiviert. Durch Zugabe des Express ³⁵S *Labeling Mix* im exponentiellen Wachstumsstadium für 10 min wurden neu synthetisierte Proteine metabolisch markiert (*Pulse*). Nach dem Puls wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen (*Chase*). Aus dem Zellysate wurde CPY* nach dem Verdau mit N-Glucosidase F immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und Autoradiographie detektiert.

3.4 Proteinkristallographie

Die Kenntnis der Struktur von Makromolekülen ermöglicht Einsichten in ihre Funktionsweise, die allein mit biochemischen Methoden nicht zu erreichen wären. Hocho aufgelöste Strukturinformationen lassen sich durch Kristallographie und Kernmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie gewinnen. Die hier angewandten kristallographischen Methoden sind nachfolgend zusammengefasst.

3.4.1 Kristallisation

Eine gängige Methode zur Kristallisation von Proteinen ist die Dampfdiffusion. Ein Tropfen Proteinlösung wird mit einem Tropfen Kristallisationslösung gemischt und durch Dampfdiffusion gegen ein größeres Volumen Kristallisationslösung (Reservoir) equilibriert. Die Konzentration des Präzipitanten, z.B. Salz oder Polyethylenglycol, ist durch die Mischung mit der Proteinlösung im Kristallisationstropfen geringer als im Reservoir. Aufgrunddessen diffundiert Wasser über die Gasphase vom Tropfen zum Reservoir, die Konzentrationen des Präzipitanten in Reservoir und Tropfen nähern sich einander an. Damit erhöht sich im Kristallisationstropfen die Konzentration des Präzipitanten und des Proteins. Wird ein Zustand erreicht, bei dem die Lösung an Protein übersättigt ist, aber noch keine Präzipitation einsetzt, können sich Kristallisationskeime bilden. Bei einer geordneten Anlagerung weiterer Moleküle wachsen die Kristallisationskeime zu Kristallen heran (Abb. 3.1).

Geeignete Kristallisationsbedingungen müssen empirisch ermittelt werden. Dazu wird in der Regel als erster Schritt ein *Screening* mit dünnbesetzten Matrizen durchgeführt (*Sparse-Matrix-Screens*), die eine große Anzahl unterschiedlicher Bedingungen enthalten (*Initial-Screens*). Bilden sich erste Kristalle in einem *Initial-Screen*, kann die entsprechende Kristallisationsbedingung durch systematische Variation der Parameter, in der Regel pH-Wert und Konzentration des Präzipitanten, optimiert werden (*Fein-Screen*).

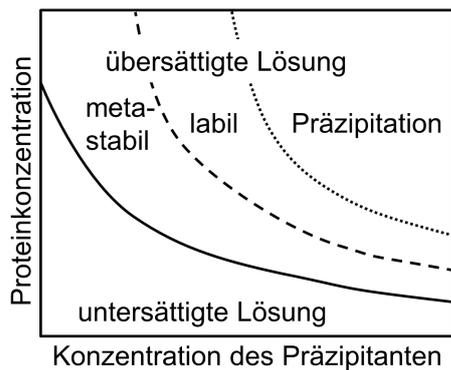


Abb. 3.1: Phasendiagramm der Kristallisation. Die Bildung von Kristallisationskeimen tritt in der labilen Zone auf. Das Wachstum der Kristalle setzt sich in der metastabilen Zone fort. (Adaptiert nach McPherson 1999)

3.4.2 Datensammlung

Grundlage der Röntgenstrukturanalyse ist die elastische Streuung von Röntgenstrahlung am Kristall. Durch den regelmäßigen Aufbau des Kristallgitters interferieren von den Gitterebenen reflektierte Wellen konstruktiv und destruktiv miteinander. Die Reflexe (konstruktive Interferenz) und Auslöschungen (destruktive Interferenz) bilden das reziproke Gitter des Kristalls ab. Durch Drehung des Kristalls im Röntgenstrahl erhält man Diffraktionsbilder, die die einzelnen reziproken Gitterebenen abbilden (Abb. 3.2). Die Intensität der Reflexe wird durch die lokale Elektronendichte am Ort der Streuung bestimmt.

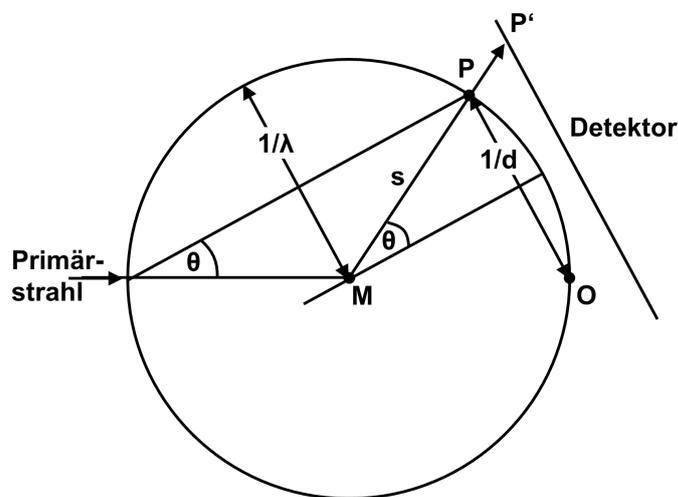


Abb. 3.2: Die Ewald-Kugel. Der Kristall bildet den Ursprung der Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ und dem Mittelpunkt M. Der Schnittpunkt O des Primärstrahls mit der Ewald-Kugel bildet den Ursprung des reziproken Gitters. Ein Punkt P des reziproken Gitters, der auf der Ewald-Kugel liegt, führt zur positiven Interferenz des reflektierten Strahls s und kann als Reflex P' detektiert werden. $1/d$: Abstand der Gitterebenen im reziproken Gitter. (Adaptiert nach McPherson 2003)

Um Strahlenschäden an den Proteinkristallen zu reduzieren, wird die Datensammlung in der Regel mit gefrorenen Kristallen bei 100 K durchgeführt. Dazu wird der Kristall mit einem Kryoloop aus dem Kristallisationstropfen gefischt und in flüssigem Stickstoffschockgefroren. In der sich um den Kristall befindlichen Mutterlauge bilden sich häufig Mikrokristalle beim Gefrieren, die den Kristall beschädigen und das Diffraktionsbild überlagern. Um dies zu vermeiden, wird der Kristall vor dem Einfrieren in einer Lösung aus der Mutterlauge und einem Kryo-Protektans, z.B. Glycerin, equilibriert. Durch den Zu-

satz der Kryo-Protoktantien gefriert die Flüssigkeit um den Kristall zu einem amorphen Glas ohne Diffraktionseigenschaften. Da nicht jeder Proteinkristall in allen Lösungen stabil ist, müssen geeignete Kryo-Protoktantien und die einzusetzenden Konzentrationen empirisch ermittelt werden.

3.4.3 Datenprozessierung

Aus den Auslöschungen des Diffraktionsmusters werden die Punktgruppe des Kristalls, die Orientierung des reziproken Gitters und die Einheitszellparameter (Achsenlängen und Winkel) bestimmt. Die Reflexe werden mit den Miller-Indizes hkl indiziert, und es wird über ihre Intensität integriert. Die mehrfache Messung der gleichen Reflexe auf mehreren Diffraktionsbildern und die Messung symmetrieverwandter Reflexe ermöglicht die Skalierung der Daten. Redundante Messungen werden zusammengefasst, sodass ein Datensatz nicht-redundanter Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ und ihrer Standardabweichungen entsteht. Die Qualität der Daten kann unter anderem durch den R_{meas} -Wert ausgedrückt werden (Diederichs und Karplus 1997, Gl. 3.1).

$$R_{meas} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{n_{hkl}}{(n_{hkl}-1)}} \sum_i^{n_{hkl}} |\overline{I_{hkl}} - I_{hkl,i}|}{\sum_{hkl} \sum_i^{n_{hkl}} I_{hkl,i}} \quad (3.1)$$

mit n_{hkl} : Multiplizität des Reflexes hkl, $\overline{I_{hkl}}$: gemittelte Intensität des Reflexes hkl, $I_{hkl,i}$: Intensität des Einzelreflexes i. R_{meas} stellt somit ein Maß für die Abweichungen zwischen den Intensitäten mehrfach gemessener Reflexe unabhängig von der Multiplizität des Datensatzes dar.

3.4.4 Phasierung

Dem Strukturfaktor F_{hkl} im reziproken Raum entspricht die Elektronendichte ρ im realen Raum:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| \cdot e^{i\alpha_{hkl}} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (3.2)$$

mit V =Volumen der Elementarzelle und α =Phase. Allein aus den Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ lässt sich die Elektronendichte demnach nicht berechnen, auch die Phasen α_{hkl} werden benötigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Phasierung durch Multiple Anomale Diffraktion (MAD) durchgeführt (Hendrickson *et al.* 1985). Bei einfacher Streuung gilt, dass ein Reflexpaar bei hkl und bei -h-k-l gleiche Intensität aufweist (Friedelsches Gesetz). Im Resonanzfall, wenn die Frequenz der Strahlung nahe an der Eigenfrequenz der streuenden Elektronen liegt, verschiebt sich die Phase der gestreuten Welle, und der atomare

Streufaktor erhält eine anomale, imaginäre Komponente:

$$f(\theta, \lambda) = f_0(\theta) + f'(\lambda) + if''(\lambda) \quad (3.3)$$

mit f_0 : normaler atomarer Streufaktor, winkelabhängig; f' : dispersiver Term, wellenlängenabhängig und if'' : Absorptionsterm, wellenlängenabhängig und um $+90^\circ$ phasenverschoben.

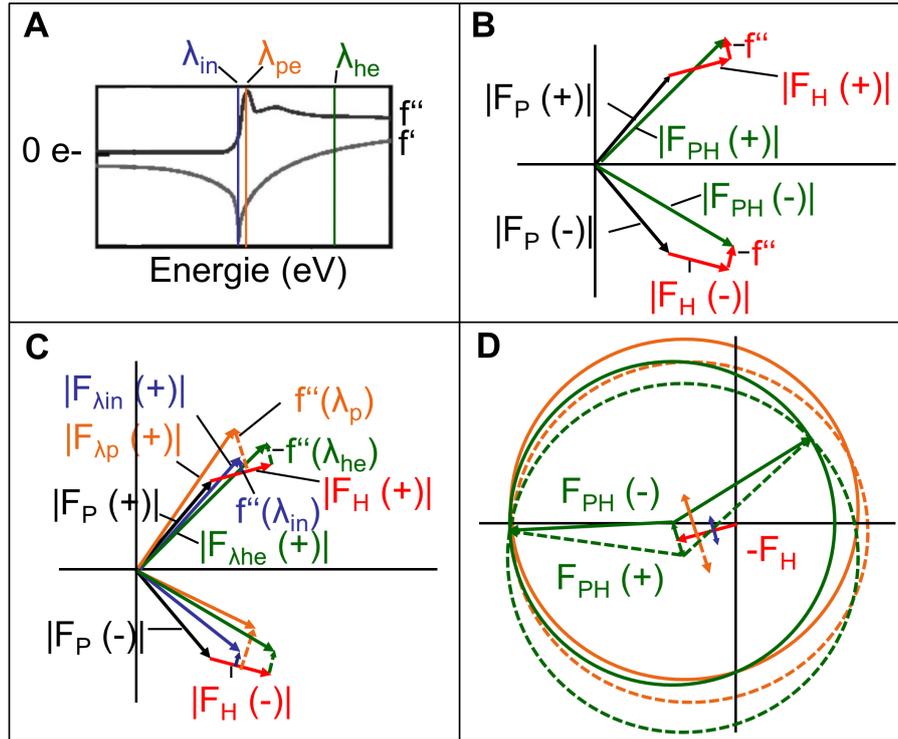


Abb. 3.3: **A.** Typische Absorptions- (f'') und Dispersionskurve (f') eines Proteins. in: *inflection point*, pe: *Peak*, he: *high energy*. **B.** Argand-Diagramm beim Vorliegen anomaler Streuung. $|F|$: Strukturfaktoramplitude, (+): Reflex bei hkl , (-): Reflex bei $-h-k-l$, P: Protein ohne anomale Streuer, H: anomale Streuer, PH: Protein mit anomalen Streuern. **C.** Argand-Diagramm eines MAD-Experiments, **D.** Harker-Konstruktion des MAD-Experiments. (Adaptiert nach Taylor 2003)

Eine typische Absorptions- und Dispersionskurve ist in Abb. 3.3 A dargestellt. Die Auswirkung der Phasenverschiebung wird im Argand-Diagramm deutlich (Abb. 3.3 B): Das Friedelsche Gesetz verliert seine Gültigkeit ($F_{hkl} \neq F_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$).

Im MAD-Experiment werden anomale Daten bei mehreren Wellenlängen gemessen, in der Regel am Wendepunkt (*inflection point*), an der Absorptionskante (*peak*) und bei hoher Energie (*high energy*). Durch die Wellenlängenabhängigkeit von f' und f'' ändern sich $|F_H(+)|$ und die Länge des Vektors f'' (Abb. 3.3 C). Diese Differenzen können zur Bestimmung der Phasen herangezogen werden. Die Harker-Konstruktion verdeutlicht, dass

mindestens zwei Wellenlängen für eine eindeutige Phasenbestimmung benötigt werden (Abb. 3.3 D).

Zur Phasierung müssen zunächst die Positionen der anomalen Streuer bestimmt werden. Da der Resonanzeffekt für die leichten Atome eines Proteins vernachlässigbar ist, reduziert sich das Problem auf die Lagen von Atomen mit ausreichendem anomalen Streufaktor. Häufig müssen dafür anomale Streuer in das Protein integriert werden, z.B. durch die Herstellung eines Selenomethionin-Derivats. Die Lage der anomalen Streuer kann durch Patterson-Methoden bestimmt werden (Rossmann und Blow 1962, Gl. 3.4).

$$P_{uvw} = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}|^2 \cdot \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad (3.4)$$

Unabhängig von den Phasen liefert die Patterson-Funktion (Gl. 3.4) den interatomaren Vektoren entsprechende Maxima. Durch Verwendung der anomalen Differenz $||F_{hkl}(+)| - |F_{hkl}(-)||$ in der Patterson-Funktion kann die Schweratom-Substruktur ermittelt werden.

3.4.5 Modellbau und Verfeinerung

Die experimentell ermittelte Elektronendichte wird durch ein Atommodell interpretiert. Je größer der Winkel, unter dem die äußersten messbaren Reflexe liegen, desto höher die Auflösung der gewonnenen Daten, und desto mehr Details werden in der Elektronendichtekarte erkennbar. Die Qualität der Karte kann darüber hinaus durch Dichtemodifikation verbessert werden, z.B. durch Abflachung des Solvens-Bereichs und durch Mitteln zwischen Bereichen, die durch nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) verbunden sind.

Zusätzlich zum manuellen Einpassen des Atommodells in die Dichte werden mathematische Methoden der Verfeinerung eingesetzt. Atomkoordinaten, B-Faktoren und das Solvens-Modell werden in mehreren Zyklen verfeinert, bis die Lösung konvergiert. Der Einsatz von stereochemischen und NCS-*Restraints* erhöht dabei die Zahl der Beobachtungen und verbessert damit das Verhältnis von gemessenen Daten zu verfeinerten Parametern. Aus dem verfeinerten Modell wird eine neue Elektronendichtekarte mit verbesserten Phasen berechnet, auf deren Grundlage weitere manuelle Verbesserungen des Modells vorgenommen werden. Modellbau und Verfeinerung werden iterativ durchgeführt, bis sich die Übereinstimmung zwischen Modell und Daten nicht mehr weiter verbessert.

Eine Möglichkeit, Differenzen zwischen Modell und Daten zu quantifizieren, stellt der kristallographische *R*-Faktor dar (Gl. 3.5):

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad (3.5)$$

mit $|F_{obs}|$: beobachtete Strukturfaktoramplituden und $|F_{calc}|$: aus dem Modell berech-

nete Strukturfaktoramplituden. Ein Teil der experimentellen Daten, in der Regel 5-10%, wird aus der Verfeinerung ausgenommen. Der aus diesen Daten berechnete R_{free} ist weitgehend unabhängig vom Modellbau, und seine Minimierung kann als Kriterium für den Fortschritt der Verfeinerung herangezogen werden. Das Auseinanderstreben von R und R_{free} andererseits kann als Hinweis auf eine Überinterpretation der Dichte verstanden werden.

3.4.6 Validierung

Das verfeinerte Modell wird in Hinblick auf die Übereinstimmung mit stereochemischen Standardwerten validiert. Ein Aspekt dabei sind Bindungslängen und -winkel, deren Abweichung von den Standardwerten auf problematische Bereiche in der Struktur hinweisen kann, die sich aber wegen ihrer Verwendung als Verfeinerungs-*Restraints* nur bedingt als Gütekriterium eignen.

Weitere Aspekte der Validierung sind die Torsionswinkel der Peptidbindungen und der Seitenketten sowie chemisch nicht sinnvolle Atomkontakte (*Clashes*). Die Torsionswinkel der Peptidbindungen φ und ψ werden als Verteilung im Ramachandran-Plot dargestellt und nach bevorzugten, erlaubten und verbotenen Regionen unterteilt. Torsionswinkel der Seitenketten werden auf Abweichungen von der Rotamer-Bibliothek untersucht. Atomkontakte werden auf Überlappung von Van-der-Waals-Radien, die kein Donor-Akzeptor-Paar darstellen, analysiert.

Einige Abweichungen von den Standardwerten können inhärente Merkmale der Struktur darstellen. Beim gehäuftem Auftreten von Abweichungen aber sollte das Modell in diesen Bereichen besonders kritisch auf mögliche Fehler untersucht werden.

3.4.7 Strukturanalyse von Yos9₂₆₆₋₄₂₄

Kristallisations-*Screens* wurden im *Sitting-Drop*-Verfahren im 96er Format mithilfe eines Kristallisationsroboters angesetzt. Dabei wurden 75 μl *Screen*-Lösung ins Reservoir und 0,5 μl Proteinlösung in die Schalen vorgelegt. 0,5 μl Reservoirlösung wurde zur Proteinlösung zupipettiert, und die Platten wurden mit selbstklebender Folie verschlossen. Für die Kristallisation von Yos9 wurden *Fein-Screens* manuell im 24er Format in 3+3 μl Tropfen angesetzt, um die Bildung größerer Kristalle zu erzielen.

Yos9₂₆₆₋₄₂₄ wurde bei 20 °C im *Hanging-Drop*-Verfahren kristallisiert. Auf einem silikonisierten Deckglas wurde 3 μl Proteinlösung vorgelegt (8,6 mg/ml in GF-Puffer) und 3 μl Kristallisationslösung zugegeben (0,55 M NaH_2PO_4 , 0,55 M KH_2PO_4 , 0,1 M Tris, pH 5,05). Das Deckglas wurde mit dem Kristallisationstropfen nach unten über eine Polypropylen-Schale mit 750 μl Reservoirlösung gelegt, wobei zur Abdichtung eine Schicht Silikon zwischen Deckgläschen und Schale aufgebracht wurde. Einzelne Kristalle wurden mit *Kryo-Loops* aus den Tropfen gefischt, wenige Sekunden in einem Tropfen Mutterlauge

mit 20% (v/v) Glycerin inkubiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Diffractionsexperimente wurden an *Beamline* 14.1 (Heinemann *et al.* 2003) des Helmholtz-Zentrums Berlin für Materialien und Energie und der Freien Universität Berlin am Elektronenspeicherring BESSY II durchgeführt. Diffractionsdaten wurden mit dem Programm XDS (Kabsch 2010) prozessiert. Die Phasierung wurde über Multiple Anomale Diffraction (MAD) an Kristallen des Selenomethionin-Derivats vorgenommen. Mit dem Programm Phenix (Adams *et al.* 2010) wurden Phasenbestimmung und Dichtemodifikation durchgeführt, und es wurde ein erstes Modell automatisch in die Dichte gebaut. Das Modell wurde mit dem Programm Coot (Emsley *et al.* 2010) manuell korrigiert und erweitert. TLS Gruppen wurden mithilfe des TLSMD Webservers bestimmt (Painter und Merritt 2006). TLS-Parameter, Atomkoordinaten und individuelle isotrope B-Faktoren wurden unter Verwendung von stereochemischen und NCS-Restraints mit dem Programm Phenix verfeinert. Das Modell wurde mit dem Molprobit-Statistik-Webserver validiert (Chen *et al.* 2010).

3.5 Biophysikalische Methoden

3.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden UV-Spektren aufgenommen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz hängt die Absorption linear von der Konzentration des absorbierenden Stoffs ab:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \epsilon cd \quad (3.6)$$

mit A : Absorption, I : Intensität, ϵ : Extinktionskoeffizient, c : Konzentration und d : Schichtdicke der Küvette. Der Extinktionskoeffizient der Proteine bei 280 nm wird durch den Anteil an aromatischen Aminosäuren bestimmt und wurde mit dem Programm ProtParam (Gasteiger *et al.* 2005) aus der Aminosäuresequenz berechnet (Tab. 3.9).

3.5.2 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation beruht auf der Untersuchung der Sedimentation von gelösten Molekülen unter Einwirkung von Zentrifugalkräften. Die Methode ermöglicht die Ableitung von Molekulargewichten und Assoziationskonstanten anhand der hydrodynamischen Eigenschaften von Makromolekülen.

Die Diffusion wirkt der Sedimentation im Zentrifugalfeld entgegen. Sedimentations- und Diffusionskoeffizient sind durch die Svedberg-Gleichung mit der Molmasse der gelösten Stoffe verknüpft (Svedberg und Pedersen 1940):

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{RT} \quad (3.7)$$

Tabelle 3.9: Molare Extinktionskoeffizienten zur Bestimmung der Proteinkonzentration. A_{280} : Absorption bei 280 nm.

Protein	ϵ_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)	A_{280} bei 1 mg/ml
His7-Usa1 ₁₋₅₃₅	49280	0,769
His7-Usa1 ₁₋₃₈₆	36330	0,764
His7-Usa1 ₁₋₃₄₆	29340	0,682
His7-Usa1 ₂₅₇₋₃₄₆	7450	0,542
His7-Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁	22460	0,784
His7-Hrd1 ₃₈₈₋₅₃₉	16960	0,859
His7-Yos9 ₂₄₋₅₃₉	57300	0,931
His7-Yos9 ₂₄₋₄₂₄	55810	1,150
His7-Yos9 ₉₀₋₄₂₄	45840	1,117
His7-Yos9 ₉₀₋₂₆₂	27390	1,212
Yos9 ₂₅₃₋₄₂₄	18450	0,940
His7-Yos9 ₂₅₃₋₄₂₄	21430	0,953
Yos9 ₂₆₆₋₄₂₄	18450	1,011
His7-Yos9 ₂₆₆₋₄₂₄	21430	1,016
His7-Yos9 ₂₄₋₂₆₂	37360	1,241
His7-Yos9 ₂₆₆₋₅₃₉	22920	0,672
Yos9 ₂₄₋₉₀	9970	1,284
His7-Yos9 ₂₄₋₉₀	12950	1,219

mit s : Sedimentationskonstante, D : Diffusionskoeffizient, M : Molmasse, \bar{v} : partielles spezifisches Volumen, ρ : Lösungsmitteldichte, R : Gaskonstante und T : Temperatur.

In Sedimentations-Gleichgewichts-Experimenten wird mit einer Winkelgeschwindigkeit zentrifugiert, bei der noch keine vollständige Sedimentation eintritt. Es entsteht ein radialer Konzentrationsgradient, der einer Boltzmann-Verteilung entspricht (Svedberg und Pedersen 1940). Die Molmasse einer nicht interagierenden idealen Spezies lässt sich aus dem radialen Konzentrationsprofil nach Gleichung 3.8 ableiten (Behlke *et al.* 1997):

$$c_r = c_0 e^{\frac{M(1-\rho\bar{v})\omega^2(r^2-r_0^2)}{2RT}} \quad (3.8)$$

mit r : Radius, r_0 : Radius am ersten Punkt des Datensatzes, c_r : Konzentration am Radius r , c_0 : Konzentration am Radius r_0 und ω : Winkelgeschwindigkeit.

Beim Vorliegen mehrerer nicht interagierender Spezies entspricht das Konzentrationsprofil der Summe der Konzentrationsprofile der Komponenten. In einem selbst-assoziierenden System sind die Konzentrationen der einzelnen Spezies durch die Assoziationskonstante K_A miteinander verknüpft, und es ergibt sich ein Konzentrationsprofil nach Gleichung 3.9 (Lebowitz *et al.* 2002):

$$c_r = \sum_n n K_n (c_{1,0})^n e^{\frac{nM_1(1-\rho\bar{v})\omega^2(r^2-r_0^2)}{2RT}} \quad (3.9)$$

mit n : Selbst-Assoziations-Spezies, K_n : Assoziationskonstante der n -ten Spezies.

Stehen ausreichende Daten zur Verfügung, lässt sich somit die Assoziationskonstante der Selbst-Assoziation bestimmen. Alternativ lassen sich auch die Konzentrationsprofile eines selbst-assoziiierenden Systems mit Gleichung 3.8 als ideale, nicht interagierende Spezies behandeln, sodass für jede eingesetzte Konzentration die apparente Molmasse M_{app} bestimmt wird.

Proben für die analytische Ultrazentrifugation wurden über Nacht gegen Puffer dialysiert (Yos9₂₆₆₋₄₂₄: GF-Puffer, Yos9₂₄₋₅₃₉: RF-GF-Puffer, Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁: GF-Puffer mit 1 mM DTT und 5% Glycerin). Alle Sedimentations-Gleichgewichts-Experimente wurden unter Verwendung der Absorptionsoptik der analytischen Ultrazentrifuge Beckman Optima XL-A bei 10 °C durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils mit 70 µl Proteinlösung und Puffer im Dialysegleichgewicht in Proben- bzw. Referenzsektor befüllt. Experimente mit Yos9₂₆₆₋₄₂₄-Mutanten wurden bei 18.000, 21.000 und 24.000 *rpm* über 24-30 h je Rotorgeschwindigkeit durchgeführt. Experimente mit Usa1, Hrd1 und Wildtyp-Yos9 wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Behlke durchgeführt. Nach einer zweistündigen *Overspeed*-Prozedur wurde nach ca. 24-30 h das Sedimentationsgleichgewicht bei 16.000 *rpm* (Usa1), 20.000 *rpm* (Hrd1 bzw. Yos9₂₄₋₅₃₉), 18.000 *rpm* (Usa1-Hrd1-Komplex) bzw. 24.000 *rpm* (Yos9₂₆₆₋₄₂₄) erreicht. Je nach Konzentration wurden bei 230, 280, 290 oder 295 nm alle 2-4 h Absorptionsscans mit radialen Inkrementen von 0,001 cm und 9 Replikaten durchgeführt. Molmassen wurden aus den radialen Absorptionsprofilen mit dem Programm POLYMOLE (Behlke *et al.* 1997) in Zusammenarbeit mit Hr. Dr. Ristau (Yos9₂₆₆₋₄₂₄-Mutanten) beziehungsweise Prof. Dr. Behlke berechnet. Dichte und Viskosität des Lösungsmittels sowie das partielle spezifische Volumen der Proteine wurden mit dem Programm SEDNTERP aus der Aminosäurezusammensetzung berechnet (Hayes *et al.* 1995).

3.5.3 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie wurde zur Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen eingesetzt. Chirale Moleküle besitzen unterschiedliche Absorptionskoeffizienten ϵ für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht. Linear polarisiertes Licht wird somit beim Durchtritt durch eine chirale Probe elliptisch polarisiert. Die resultierende Elliptizität θ verhält sich proportional zur Differenz der Absorptionskoeffizienten $\epsilon_L - \epsilon_R$ und findet als Messgröße Verwendung (Gleichung 3.10).

$$\theta(\text{Grad}) = \ln 10 \frac{180}{4\pi} (\epsilon_L - \epsilon_R) c_M d \quad (3.10)$$

mit ϵ : Absorptionskoeffizient, c_M : molare Konzentration und d : Pfadlänge.

Zum Vergleich von CD-Spektren unterschiedlicher Proteine wird die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest θ_{MRE} verwendet, die sich nach Gleichung 3.11 aus der Elliptizität θ berechnet:

$$\theta_{MRE}(\text{Grad} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}) = \frac{100 \cdot \theta \cdot MRW}{d \cdot c} \quad (3.11)$$

mit θ in Grad, MRW : mittleres Molekulargewicht pro Aminosäurerest in g/mol, d : Pfadlänge in cm und c : Proteinkonzentration in mg/ml.

Die Proteinproben wurden gegen CD-Puffer (10 mM Na/K-Phosphat, pH 7,4) dialysiert und auf etwa 0,1 mg/ml verdünnt. In 0,1 cm Küvetten wurden bei 10 °C mit drei Replikaten Spektren über einen Wellenlängenbereich von 260 nm bis 180 nm aufgenommen.

Sekundärstrukturelemente in Proteinen führen zu charakteristischen CD-Spektren (Adler *et al.* 1973). Durch Dekonvolution experimenteller Spektren können die Anteile an α -Helix, β -Faltblatt und ungeordneter Struktur (*random coil*) abgeschätzt werden. Die Dekonvolution der CD-Spektren wurde mit dem Dichroweb-Server (Whitmore und Wallace 2008) mit dem Algorithmus CDSSTR und Referenzset 3 durchgeführt (Johnson 1999; Sreerama und Woody 2000).

3.5.4 Dynamische Lichtstreuung

Proteinpräparationen wurden durch dynamische Lichtstreuung (DLS) auf Aggregation untersucht. An Partikeln mit einem kleinen Radius relativ zur Wellenlänge findet Rayleigh-Streuung statt. Die Brown'sche Bewegung gelöster Proteine führt zur Fluktuation des durch die Rayleigh-Streuung entstehenden Interferenzmusters. Bei Messung der Streulichtintensität an einem festen Winkel führen kleine, rasch diffundierende Partikel zu schnellen Schwankungen, während größere Partikel zu langsameren Schwankungen der Streulichtintensität führen. Unter Annahme eines näherungsweise kugelförmigen Proteins hängt seine Diffusionsgeschwindigkeit nach der Stokes-Einstein-Beziehung (Gl. 3.12) bei konstanter Temperatur von der Lösungsmittelviskosität und seinem hydrodynamischen Radius ab.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (3.12)$$

mit D : Diffusionskoeffizient, k : Boltzmann-Konstante, T : Temperatur, η : Lösungsmittelviskosität und r : hydrodynamischer Radius des Partikels.

Vor der Messung wurden größere Partikel durch Zentrifugation für 10 min bei $21.000 \times g$ und 4 °C entfernt. Die Streulichtintensität wurde bei einem Winkel von 90° mit 10 Replikaten über einen Zeitraum von 30 s gemessen. Der hydrodynamische Radius der in Lösung vorliegenden Partikel wurde mit der Hersteller-Software (RiNA GmbH) berechnet.

3.5.5 Statische Lichtstreuung

Im Gegensatz zur dynamischen Lichtstreuung werden bei der statischen Lichtstreuung zeitlich gemittelte Streulichtintensitäten gemessen. Das mittlere Molekulargewicht gelöster Proteine kann durch die Rayleigh-Beziehung beschrieben werden (Slotboom *et al.* 2008):

$$\Delta LS = \left(\frac{I_\theta}{I_0} \right)_{\text{Protein}} - \left(\frac{I_\theta}{I_0} \right)_{\text{Puffer}} = K(dn/dc)^2 M_W C \quad (3.13)$$

mit ΔLS : Lichtstreuung, I_θ : Streulichtintensität unter dem Winkel θ , I_0 : Intensität des einfallenden Lichts, dn/dc : Refraktionsindexinkrement, M_W : Gewichtsmittel der Molmasse und C : Konzentration des Makromoleküls. Die Konstante K wird dabei durch folgende Gleichung definiert:

$$K = \frac{2\pi^2 n^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{r^2} \right) \quad (3.14)$$

mit n : Refraktionsindex des Lösungsmittels, λ : Wellenlänge, N_A : Avogadrozahl, θ : Streuwinkel und r : Abstand zwischen Streuzentrum und Detektor.

Voraussetzung für die Gültigkeit von Gleichung 3.13 ist ein ideales Verhalten der Lösung und ein näherungsweise winkelunabhängiges Streuverhalten, was in verdünnten Proteinlösungen beides gegeben ist.

Statische Lichtstreuung wurde in Kombination mit analytischer Gelfiltration (RALS-GF) mit einem System der Firma Viscotek durchgeführt. Zusätzlich zum UV-Detektor der Äkta-Anlage beinhaltet das System ein Refraktometer und einen Detektor für die Lichtstreuung bei einem Winkel von 90° (RALS: *right angle light scattering*). Für Usa1 und Hrd1 wurde eine Superdex 200 10/30, für Yos₉₂₆₆₋₄₂₄ eine Superdex 75 10/30-Säule verwendet. Auf die equilibrierte Säule wurden 100 μ l Proteinlösung aufgetragen (Usa1₁₋₅₃₅: 3,5 mg/ml, Hrd1₃₂₅₋₅₅₁: 4,3 mg/ml, Usa1-Hrd1-Komplex: 3,5 mg/ml, Yos₉₂₆₆₋₄₂₄: 1,1 mg/ml). Die Auswertung erfolgte über die Software OmniSec mit der Annahme eines Refraktionsindexinkrements von $dn/dc=0,185$ ml/g.

3.5.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) misst die Wärmetönung bei der Mischung zweier Lösungen, aus der thermodynamische Daten zu Bindungs- und Dissoziationsereignissen gewonnen werden können (Wiseman *et al.* 1989). Direkter Messwert sind Wärmeänderungen im System beim Zutritieren einer Lösung. Aus der daraus berechneten Enthalpieänderung ΔH lassen sich über Gleichung 3.15 Änderungen der freien Enthalpie ΔG und der Entropie ΔS berechnen.

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T \Delta S \quad (3.15)$$

mit R : Gaskonstante, T : Temperatur und K_A : Assoziationskonstante.

Die Messungen wurden in einem VP-ITC-Instrument bei 10 °C vorgenommen. Die Proteinlösungen wurden vor der Messung gegen GF-Puffer dialysiert und entgast. Usa1₁₋₅₃₅ wurde in einer Konzentration von 18,4 µM in die Kalorimeter-Zelle vorgelegt. In 40 Schritten mit Intervallen von 240 s wurden je 6 µl einer 155 µM Lösung von Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ in die Zelle injiziert. Die thermodynamischen Daten wurden mit dem Programm Origin 7.0 wie vom Hersteller (MicroCal, LLC) beschrieben ausgewertet. Nach der Subtraktion der Grundlinie und der *Peak*-Integration wurde die Titrationskurve basierend auf einem *One-Site*-Bindemodell nicht-linear angepasst.

4 Usa1 und Hrd3

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Expression und Reinigung

Usa1 enthält einen großen N-terminalen cytosolischen Bereich, zwei Transmembranhelices und eine kleinere C-terminale cytosolische Domäne (c3, Abb. 4.1). Der N-terminale Bereich wird durch eine mittig gelegene Ubl-Domäne in insgesamt drei Domänen unterteilt (c1, Ubl, c2). Hrd1 besteht aus einem ca. 200 Aminosäuren (AS) umfassenden Transmembranbereich und einer C-terminalen cytosolischen Domäne, die durch ein RING-Finger-Motiv unterteilt wird.

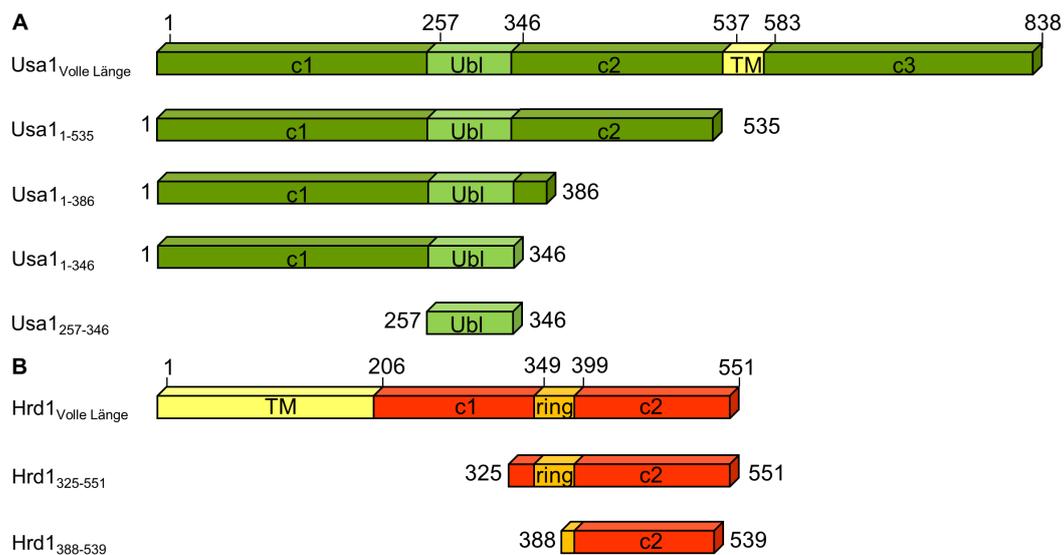


Abb. 4.1: Domänenorganisation und Expressionskonstrukte von Usa1 (A) und Hrd1 (B). Zahlen bezeichnen die Aminosäurepositionen der Domänengrenzen. TM: Transmembranbereich, c1-c3: cytosolische Domänen, ring: RING-Finger-Domäne, Ubl: Ubl-Domäne.

Expressionskonstrukte von Usa1 umfassten den N-terminalen cytosolischen Bereich (Usa1₁₋₅₃₅), die Ubl-Domäne (Usa1₂₅₇₋₃₄₆) bzw. den N-Terminus bis einschließlich der UBL-Domäne (c1+Ubl, Usa1₁₋₃₄₆). Vom Interaktionspartner Hrd1 wurden zwei Konstrukte des cytosolischen Bereichs exprimiert, eines mit intaktem RING-Finger (Hrd1₃₂₅₋₅₅₁) und ein an beiden Termini verkürztes Konstrukt (Hrd1₃₈₈₋₅₃₉).

Usa1- und Hrd1-Konstrukte wurden, ausgehend von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*, mit BamHI / NotI-Restriktionsschnittstellen in den bakteriellen Expressionsvektor pQLinkH kloniert. Die Expression fand bei 18 °C für 16 h in *E. coli* Rosetta2(DE3) T1^R statt. Die Proteine wurden nativ durch Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt. Für die Reinigung von Usa1-Konstrukten wurde ein zusätzlicher Anionenaustauscherschritt durchgeführt. Als repräsentatives Beispiel ist der Verlauf der Reinigung von Usa1₁₋₅₃₅ in Abb. 4.2 A zusammengefasst. Eine SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Proteine ist in Abb. 4.2 B dargestellt.

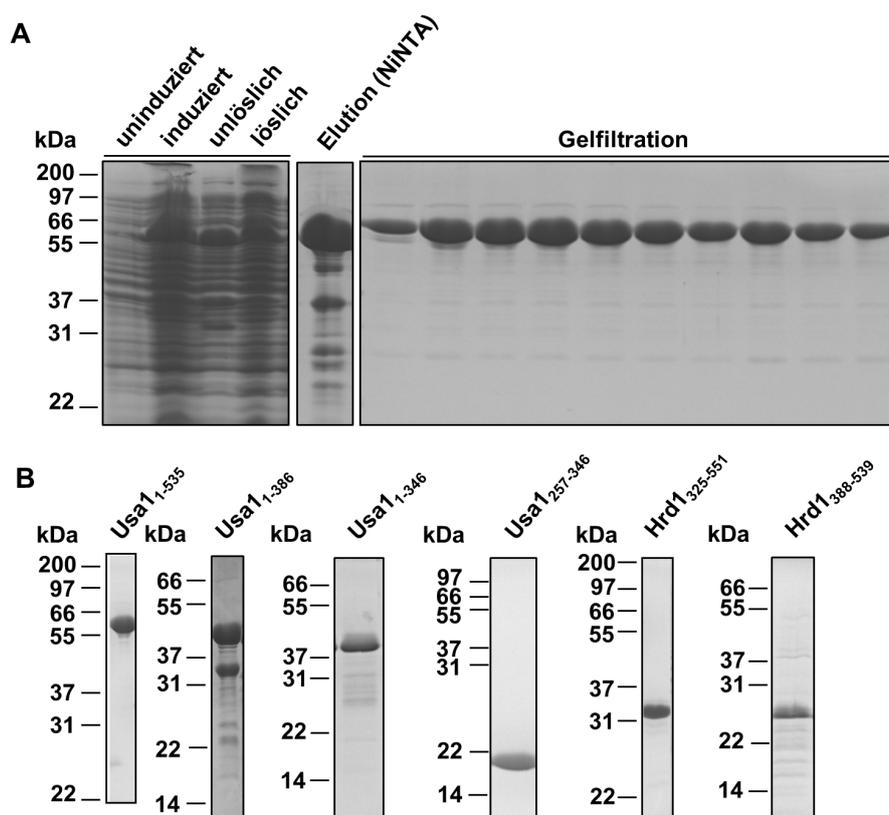


Abb. 4.2: Reinigung von Usa1 und Hrd1-Konstrukten. **A:** Verlauf der Reinigung am Beispiel von Usa1₁₋₅₃₅. SDS-PAGE von Fraktionen der wichtigsten Reinigungsschritte. **B:** SDS-PAGE der gereinigten Usa1- und Hrd1-Konstrukte.

4.1.2 Usa1 und Hrd1 bilden einen stabilen Komplex *in vitro*

Die gereinigten Proteine Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ wurden in einem molaren Verhältnis von ca. 3:1 gemischt und für etwa 60 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf eine präparative Gelfiltrationssäule (Superdex 200 26/60) aufgetragen. Ein kleiner Teil der Proteine eluierte beim gleichen Retentionsvolumen wie Usa1₁₋₅₃₅, der überwiegende Teil jedoch eluierte in einem *Peak* bei einem kleineren Retentionsvolumen als die Einzelproteine (Abb. 4.3 A). Die Analyse der Fraktionen auf einem SDS-Gel zeigte,

dass der Haupt-*Peak* den Komplex beider Proteine beinhaltet, während der zweite *Peak* überschüssiges $Usa1_{1-535}$ enthielt (Abb. 4.3 B). Durch Vergleich mit Standardproteinen wurde das Molekulargewicht des Komplexes auf 320 kDa abgeschätzt. Das Molekulargewicht der Einzelproteine wurde auf 120 kDa ($Usa1_{1-535}$) bzw. 60 kDa ($Hrd1_{325-551}$) abgeschätzt, was jeweils in etwa der Molmasse des Dimers entspricht. Der Komplex entspricht demnach in etwa einem 2+2 Komplex der Einzelproteine. Der Oligomerisierungszustand lässt sich jedoch nicht allein anhand der Gelfiltrationsdaten bestimmen, da neben dem Molekulargewicht auch die Form der Moleküle und eventuelle Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial Einfluss auf das Laufverhalten nehmen.

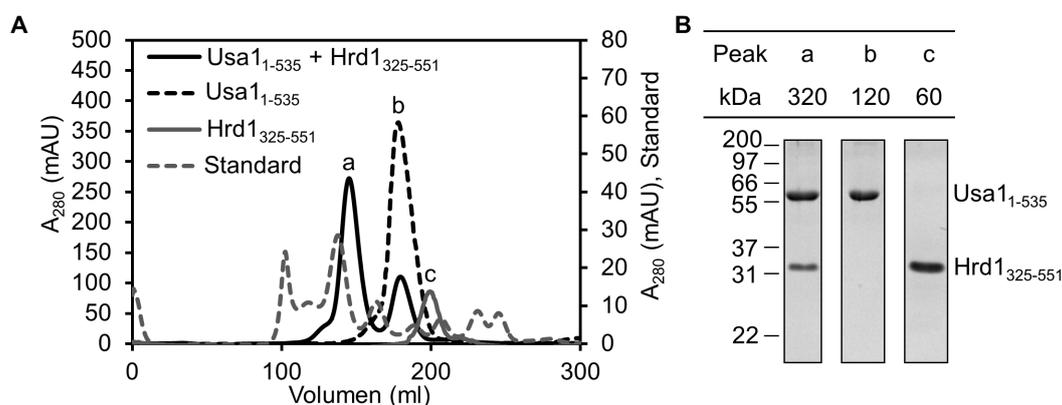


Abb. 4.3: Präparative Gelfiltration des Usa1-Hrd1-Komplexes. A_{280} : Absorption bei 280 nm. **A:** Elutionsprofil der Einzelproteine $Usa1_{1-535}$ und $Hrd1_{325-551}$ sowie des Komplexes. **B:** SDS-PAGE der Gelfiltrationsfraktionen.

4.1.3 Biophysikalische Charakterisierung

CD-Spektroskopie

Anhand von CD-Spektren wurden die Einzelproteine und der Komplex auf ihre Sekundärstrukturanteile untersucht (Abb. 4.4 A, Tab. 4.1). Die Spektren wurden dazu mit dem CDSSTR-Algorithmus des Dichroweb-Servers dekonvolviert (Whitmore und Wallace 2008). Die Einzelproteine weisen eine gemischte α -Helix- / β -Strang-Struktur mit Unterschieden im α -helikalen Anteil auf ($Usa1_{1-535}$: 20%, $Hrd1_{325-551}$: 36%). Die Sekundärstrukturanteile des Komplexes entsprechen weitgehend den Mittelwerten der Einzelproteine, mit einem leicht erhöhten α -helikalen und einem leicht verringerten β -Strang-Anteil. Im Differenzspektrum zwischen experimentellen und additiven Daten verdeutlichen sich die Abweichungen in Form eines Maximums bei 198 nm und eines Minimums bei 215 nm (Abb. 4.4 B). Die Differenzen sind dabei so gering, dass von einer weitgehend unveränderten Sekundärstruktur der Proteine im Komplex ausgegangen werden kann.

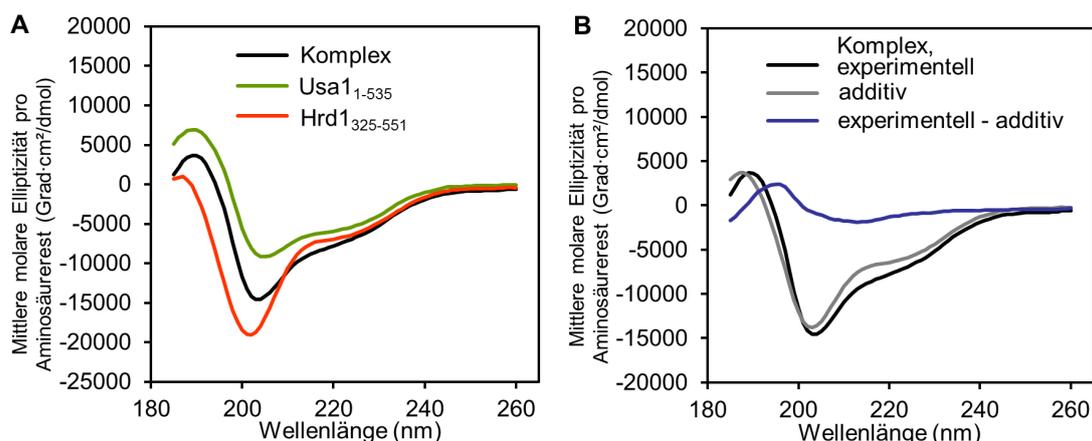


Abb. 4.4: CD-Analyse von Usa1₁₋₅₃₅, Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ und dem Komplex. **A:** CD-Spektren, **B:** Vergleich des experimentellen Komplex-Spektrums mit einem Spektrum, das durch Addition der Einzelprotein-Spektren generiert wurde.

Tabelle 4.1: Sekundärstrukturanteile des Usa1₁₋₅₃₅-Hrd1₃₂₅₋₅₅₁-Komplexes. Experimentellen Werten für den Komplex sind Mittelwerten von Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ gegenübergestellt.

	α -Helix	β -Strang	Turn	ungeordnet
Usa1 ₁₋₅₃₅	0,20	0,26	0,20	0,33
Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁	0,36	0,22	0,19	0,23
Mittelwert	0,28	0,24	0,20	0,28
Komplex	0,34	0,17	0,23	0,26

ITC

Zur Charakterisierung der Komplexbildung wurde ein ITC-Experiment durchgeführt. 18,4 μ M Usa1₁₋₅₃₅ in GF-Puffer wurde in der Titrationszelle vorgelegt, und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ wurde in einer Konzentration von 155 μ M zutitriert.

Die Bindung ist enthalpisch und entropisch getrieben mit einer Enthalpieänderung von $\Delta H = (-6213 \pm 87)$ cal/mol und einer Entropieänderung von $\Delta S = 7,55$ cal/mol/Grad (Abb. 4.5). Die Daten stimmen gut mit dem Modell einer 1:1-stöchiometrischen Bindung bei einer Dissoziationskonstante von $K_D = (357 \pm 51)$ nM überein.

Die Dissoziationskonstante im oberen nanomolaren Bereich deutet auf eine spezifische Bindung zwischen den beiden Proteinen hin. Das molare Verhältnis zwischen Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ innerhalb des Komplexes wurde als 1:1-Stöchiometrie charakterisiert, eine weitergehende Bestimmung des Oligomerisierungszustands des Komplexes ist durch diese Methode jedoch nicht möglich.

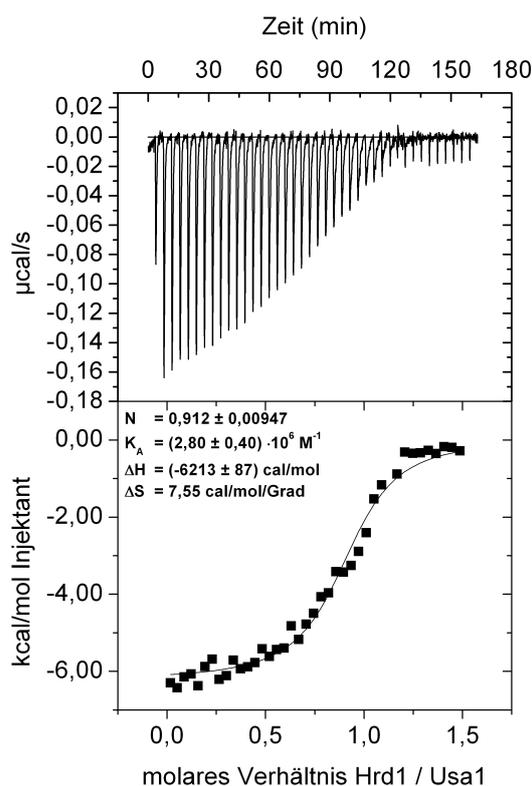


Abb. 4.5: ITC-Experiment zur Bindung zwischen Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁. Oben: Rohdaten, unten: Bindungsisotherme. Die Bindung entspricht einer 1:1-Stöchiometrie mit enthalpischen und entropischen Anteilen. Die Dissoziationskonstante beträgt $K_D = 1/K_A = (357 \pm 51)$ nM. N : Stöchiometrie, K_A : Assoziationskonstante, ΔH : Enthalpieänderung und ΔS : Entropieänderung.

RALS-GF

Das Elutionsprofil von Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ auf der Gelfiltrationssäule wies auf einen oligomeren Zustand der Proteine hin. Die anhand von Standardproteinen abgeschätzte molekulare Masse entsprach jeweils in etwa der Masse des Dimers. Zur genaueren Molmassenbestimmung wurden der Komplex und die Einzelproteine durch statische Lichtstreuung in Kombination mit analytischer Gelfiltration untersucht (RALS-GF). Beide Einzelproteine eluierten als Monomer von der Säule (Abb. 4.6 C und D). Die Molmasse des Komplexes entsprach mit 180 kDa im Mittel dem Doppelten der Summe der Einzelproteinmassen (Abb. 4.6 B).

Unter Berücksichtigung der ITC-Daten, die eine 1:1-Stöchiometrie des Komplexes nahelegen, reduzieren sich die möglichen Zusammensetzungen des Komplexes auf ein 1+1-, 2+2- oder 3+3-Assoziationsmuster. Vor diesem Hintergrund stimmt die mittlere Molmasse des Komplexes mit 180 kDa sehr gut mit einer 2+2-Assoziation der Proteine überein (theoretischen Molmasse: 185 kDa), wohingegen die Daten weder mit einem 1+1- noch mit einem 3+3-Assoziationsmuster (278 kDa) zu erklären sind.

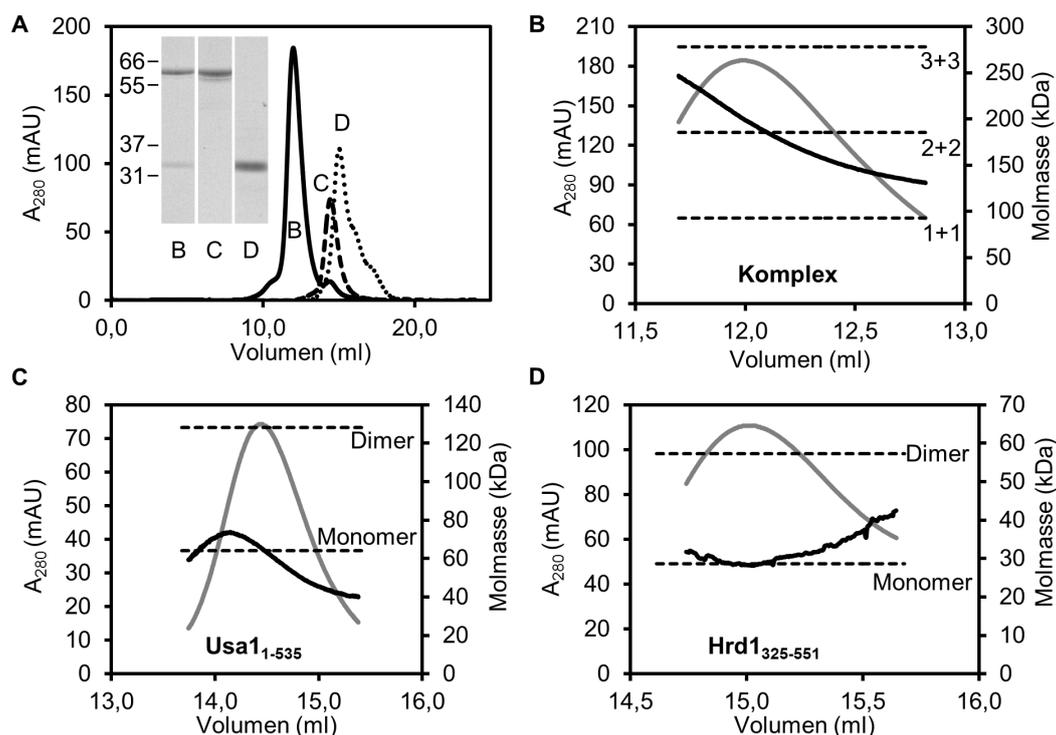


Abb. 4.6: Untersuchung des Komplexes mittels RALS-GF. A_{280} : Absorption bei 280 nm. **A:** Absorptionsprofil der Gelfiltration. Durchgezogene Linie: Komplex, gestrichelte Linie: *Usa1*₁₋₅₃₅, gepunktete Linie: *Hrd1*₃₂₅₋₅₅₁. Eingefügt: SDS-Gel von Fraktionen aus den mit B, C und D bezeichneten *Peaks*. **B-D:** *Peaks* des Absorptions-Signals (graue Linien) mit den zugehörigen Molmassen (schwarze Linien), berechnet aus dem Signal der statischen Lichtstreuung und dem Refraktionssignal. B: Komplex, C: *Usa1*₁₋₅₃₅, D: *Hrd1*₃₂₅₋₅₅₁. Gestrichelte Linien: Theoretisches Molekulargewicht der in Frage kommenden Oligomere.

Analytische Ultrazentrifugation

Als weitere Methode zur Analyse des Oligomerisierungszustands des Komplexes wurden Sedimentations-Gleichgewichts-Experimente durchgeführt. Übereinstimmend mit den RALS-GF-Daten lagen die Einzelproteine innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs bis 1 mg/ml als Monomere vor (Abb. 4.7 A und B).

Der Komplex zwischen *Usa1*₁₋₅₃₅ und *Hrd1*₃₂₅₋₅₅₁ wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. In einem Titrationsexperiment wurde *Hrd1*₃₂₅₋₅₅₁ im Verhältnis (0,7 - 5,0):1 mit *Usa1*₁₋₅₃₅ einer konstanten Konzentration gemischt. Die resultierende Bindungskurve entsprach, übereinstimmend mit den ITC-Daten, der Bildung eines 1:1-Komplexes mit einer Dissoziationskonstante von (216 ± 13) nM (Abb. 4.7 C). In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Proteine in equimolaren Konzentrationen eingesetzt. Die Masse des Komplexes verhielt sich konzentrationsunabhängig und entsprach einer 1+1-Assoziation zwischen den Monomeren (Abb. 4.7 D).

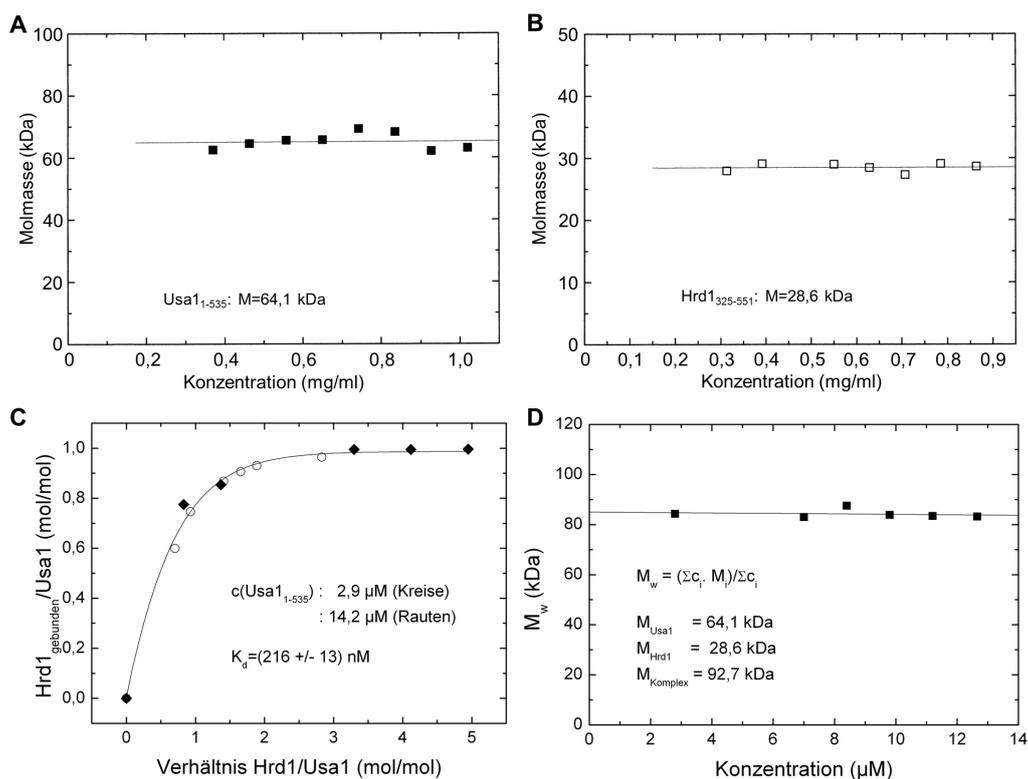


Abb. 4.7: Untersuchung der Stöchiometrie des Komplexes durch analytische Ultrazentrifugation. **A-B:** Die Molmasse der Einzelproteine Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ entspricht jeweils einem Monomer. **C:** Titration von Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ zu Usa1₁₋₅₃₅. Die Proteine assoziieren in einem 1:1-Verhältnis mit einer Dissoziationskonstante von $(216 \pm 13) \text{ nM}$. Usa1₁₋₅₃₅ wurde in einer Konzentration von $2,9 \mu\text{M}$ (Kreise) bzw. $14,2 \mu\text{M}$ (Rauten) eingesetzt. **D:** Beim Einsatz equimolarer Konzentrationen der Einzelproteine besteht keine Konzentrationsabhängigkeit. M : molekulare Masse, M_w : Gewichtsmittel der molekularen Masse; c_i : Konzentration der Komponente i ; M_i : molekulare Masse der Komponente i .

4.1.4 Verkürzte Konstrukte

Limitierte Proteolyse

Zur Generierung geeigneterer Konstrukte für die Kristallisation wurden Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ durch limitierter Proteolyse verdaut. Parallel zu den Initial-Screens von Usa1₁₋₅₃₅ wurden den gleichen Screens für einen *in situ*-Verdau in einem Verhältnis 1:100.000 (w/w) Trypsin zugegeben, es wuchsen jedoch auch hier keine Kristalle. Zur Bestimmung geeigneter Domänengrenzen für besser kristallisierbare Konstrukte wurde die limitierte Proteolyse zusätzlich *in vitro* mit Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ und 1:10.000 (w/w) Trypsin durchgeführt. Aliquots wurden zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und auf einem SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 4.8). Die Abbaubanden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die N- und C-terminalen Grenzen der Abbauprodukte wurden abgeschätzt, und auf dieser Grundlage wurden die Konstrukte Hrd1₃₈₈₋₅₃₉ und Usa1₁₋₃₈₆ entworfen.

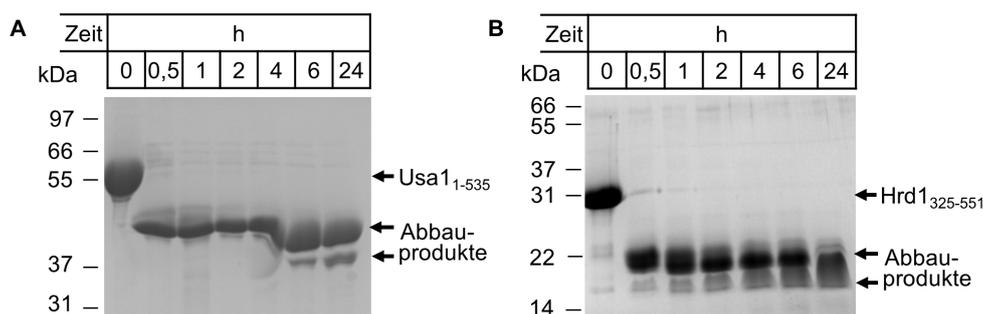


Abb. 4.8: Limitierte Proteolyse von *Usa1*₁₋₅₃₅ (links) und *Hrd1*₃₂₅₋₅₅₁ (rechts).

Reinigung und Charakterisierung

Die Proteine wurden wie zuvor beschrieben gereinigt. Die verkürzten Konstrukte erwiesen sich dabei nicht als stabiler als die Ausgangskonstrukte. Im Gegenteil traten vermehrt Schwierigkeiten während der Reinigung durch proteolytischen Abbau, anhaftende Wirtsproteine und Aggregation auf.

*Usa1*₁₋₃₈₆ ließ sich nur zu einer Homogenität von ca. 60% reinigen. Bereits zum Zeitpunkt der Ernte war eine zweite Überexpressionsbande im SDS-Gel zu sehen, die auf einen proteolytischen Abbau oder eine zum Teil unvollständige Synthese des Proteins hindeutete. Da beide Banden mit dem anti-His-Antikörper detektiert wurden, scheint es sich um ein C-terminal verkürztes Fragment zu handeln. Da die vollständige Trennung der Fragmente nicht gelang, wurde die weitere Arbeit mit *Usa1*₁₋₃₈₆ zugunsten des C-terminal stärker verkürzten Konstrukts *Usa1*₁₋₃₄₆ aufgegeben.

In der dynamischen Lichtstreuung zeigte *Hrd1*₃₈₈₋₅₃₉ einen Doppel-*Peak* (Abb. 4.9), der auf eine Aggregationsneigung des Proteins hindeutet. Die Aggregation konnte auch durch Variation der Pufferbedingungen nicht vollständig verhindert werden.

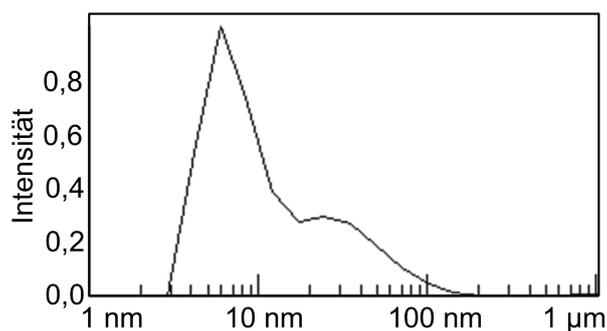


Abb. 4.9: Dynamische Lichtstreuung an *Hrd1*₃₈₈₋₅₃₉. Der zweite *Peak* bei höherem Stokes-Radius deutet auf beginnende Aggregation hin. Die Abbildung stellt das Experiment mit dem geringsten Aggregationsausmaß dar.

Analytische Gelfiltration

Um die Bereiche von Usa1 und Hrd1 näher zu bestimmen, die für die Komplexbildung benötigt werden, wurde die Bindungsfähigkeit der verkürzten Konstrukte Usa1₁₋₃₄₆ (N-Terminus bis einschließlich der UBL-Domäne), Usa1₂₅₇₋₃₄₆ (UBL-Domäne) und Hrd1₃₈₈₋₅₃₉ (c2-Domäne mit unvollständigem RING-Finger) durch analytische Gelfiltration untersucht (Abb. 4.10). Usa1₂₅₇₋₃₄₆ bildet keinen Komplex mit Hrd1, was darauf hinweist, dass die Bindung nicht über die UBL-Domäne vermittelt wird (Abb. 4.10 B). Bei einer Verkürzung des N- und C-Terminus von Hrd1 (Hrd1₃₈₈₋₅₃₉) blieb die Bindungsfähigkeit an Usa1 erhalten (Abb. 4.10 C). Demzufolge scheint sich die Bindungsstelle für Usa1 innerhalb der c2-Domäne von Hrd1 zu befinden. Mit der fehlenden c2-Domäne in Usa1₁₋₃₄₆ dagegen geht auch die Bindung an Hrd1 verloren (Abb. 4.10 D), was darauf hindeutet, dass die Region Usa1₃₄₇₋₅₃₅ eine wichtige Rolle in der Bildung des Usa1-Hrd1-Komplexes spielt.

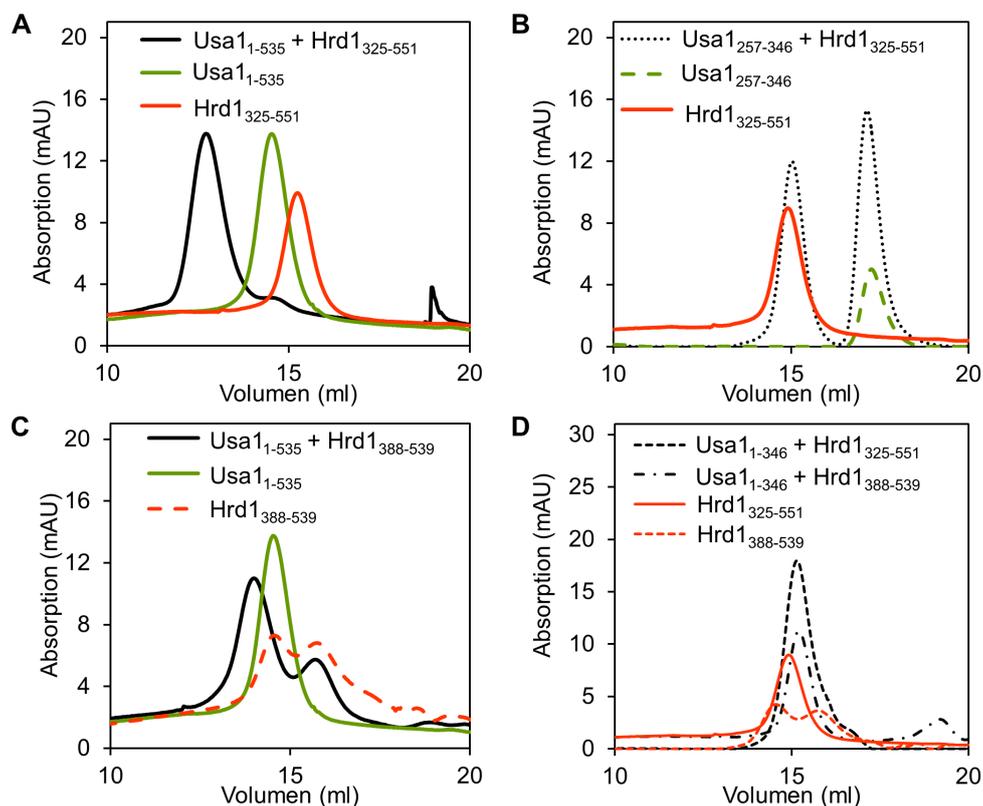


Abb. 4.10: Absorptionsprofile der analytischen Gelfiltration von Usa1- und Hrd1-Konstrukten bei 280 nm. **A:** Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ laufen als Komplex auf der Säule. **B:** Die Ubl-Domäne Usa1₂₅₇₋₃₄₆ bindet nicht an Hrd1₃₂₅₋₅₅₁. **C:** Das verkürzte Konstrukt Hrd1₃₈₈₋₅₃₉ bindet an Usa1₁₋₅₃₅. **D:** Das verkürzte Konstrukt Usa1₁₋₃₄₆ bindet an keines der Hrd1-Konstrukte.

4.1.5 Kristallisationsversuche

Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁

Kristallisationsversuche mit Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ wurden bei 20 °C durchgeführt. Gereinigtes Usa1₁₋₅₃₅ wurde in GF-Puffer mit 1 mM DTT und 5% Glycerin auf 5,5 mg/ml konzentriert. Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ wurde im gleichen Puffer auf 5,3 mg/ml konzentriert. Die Proteine wurden mit den *Initial-Screens* Classic, PEG I und ProComplex im 96er Format bei Tropfengrößen von 200 + 200 nl zur Kristallisation angesetzt. Der gereinigte Komplex wurde im gleichen Puffer auf 7,2 mg/ml konzentriert und mit den *Screens* Classic I und II, pHClear I und II, JCSG und ProComplex im 96er Format bei Tropfengrößen von 300 + 300 nl zur Kristallisation angesetzt.

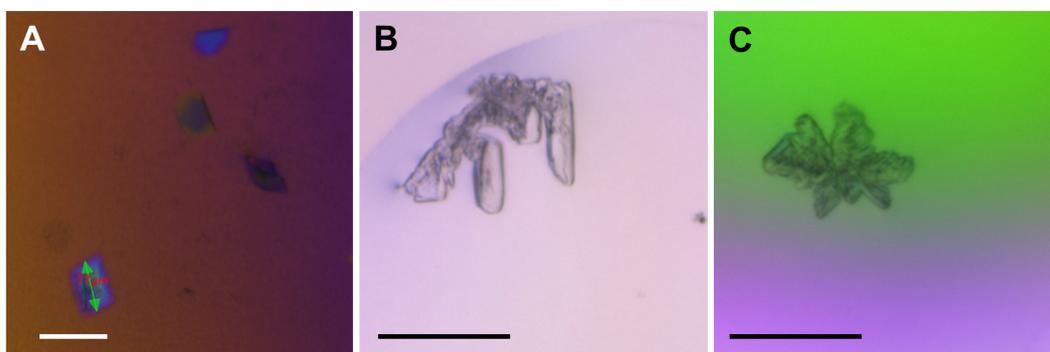


Abb. 4.11: Kristallisationsversuche mit dem Komplex aus Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁. Die Balken entsprechen einer Länge von ca. 100 μm . **A:** Erste Kristalle in einem Tropfen Proteinlösung ohne Reservoir. **B-C:** Verwachsene Kristalle in Proteinlösung ohne Reservoir.

Weder Usa1₁₋₅₃₅ noch Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ kristallisierte unter den Bedingungen der *Initial-Screens*. Abgesehen von klaren Tropfen entstanden ausschließlich Phasentrennungen und Präzipitat. Ähnliche Resultate wurden mit dem Komplex erzielt. Einzig in einem Kristallisationsansatz, in dem aufgrund eines Pipettierfehlers keine Reservoirlösung vorgelegt wurde, bildeten sich kleine Kristalle, die sich jedoch beim Überführen in Kryo-Puffer auflösten (Abb. 4.11 A). In nachfolgenden Kristallisationsansätzen ohne Reservoirlösung konnten die Kristalle näherungsweise reproduziert werden (Abb. 4.11 B-C), jedoch verhinderte eine gelartige Konsistenz der Kristallisationstropfen das unbeschadete Herausfischen der verwachsenen Kristalle.

Verkürzte Konstrukte

Kristallisationsversuche mit den verkürzten Konstrukten Usa1₁₋₃₄₆ und Hrd1₃₈₈₋₅₃₉ wurden bei 20 °C und 4 °C durchgeführt. Die Proteine wurden in GF200-Puffer mit 1 mM DTT auf 6,8 mg/ml (Usa1₁₋₃₄₆) bzw. 5,1 mg/ml (Hrd1₃₈₈₋₅₃₉) konzentriert und in den *Initial-Screens* Classic I, Classic II, PEG I, PEG II und JCSG Suite im 96er Format bei Tropfengrößen von 500 + 500 nl (Usa1₁₋₃₄₆) bzw. 300 + 300 nl (Hrd1₃₈₈₋₅₃₉) zur Kristallisation

angesetzt. In einigen Bedingungen entstanden feine Nadeln und kleine, zum Teil verwachsene Kristalle, die jedoch noch nicht für Diffraktionsexperimente geeignet schienen (Abb. 4.12).

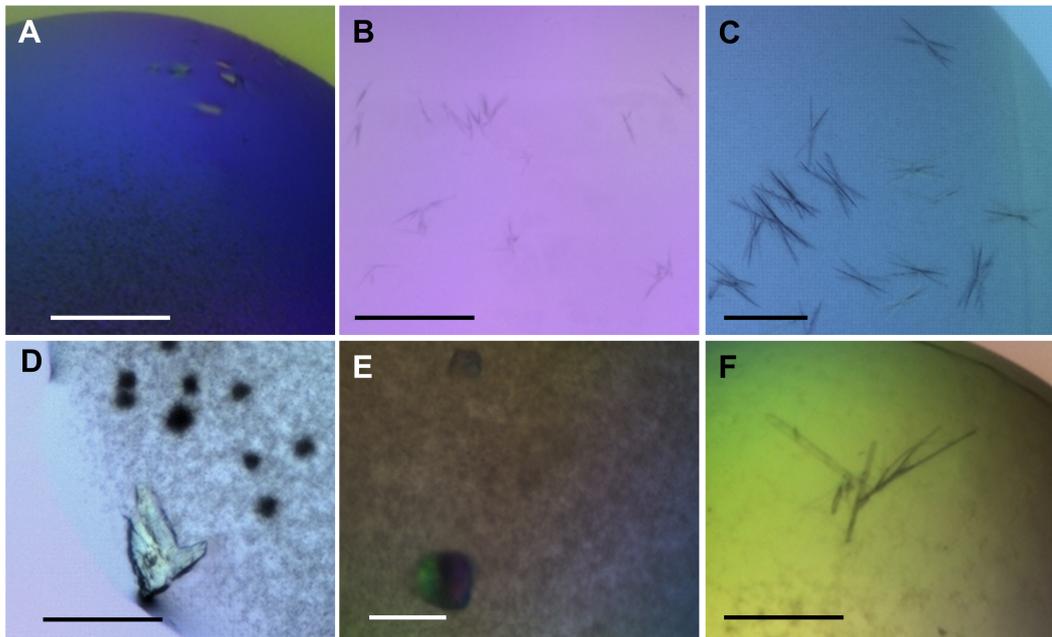


Abb. 4.12: Kristallisationsversuche mit Usa1₁₋₃₄₆ (A-B) und Hrd1₃₈₈₋₅₃₉ (C-F). Die Balken entsprechen einer Länge von ca. 100 μm . **A:** Kleine Kristalle bei 20 °C in 2 M Ammoniumsulfat, 0,1 M bis-Tris (pH 5,5). **B:** Nadeln bei 20 °C in 25%(v/v) tert-Butanol, 0,1 M Tris (pH 8,5) **C:** Nadeln bei 4 °C in 0,2 M Magnesiumchlorid, 3,4 M 1,6-Hexandiol, 0,1 M Tris (pH 8,5). **D:** Verwachsener Kristall bei 4 °C in 0,2 M Calciumchlorid, 20%(v/v) Isopropanol, 0,1 M Natriumacetat (pH 4,6). **E:** Kristalline Struktur bei 20 °C in 0,14 M Calciumchlorid, 14% (v/v) Isopropanol, 30% (v/v) Glycerin, 0,07 M Natriumacetat (pH 4,6). **F:** Nadeln bei 20 °C in 26% PEG 3350, 0,3 M Ammoniumphosphat (pH 7,5).

4.2 Diskussion

Die Zusammensetzung des HRD-Komplexes wurde kurz vor Beginn dieser Arbeit durch Affinitätsreinigung der bekannten Komponenten aus Zellextrakten und anschließende massenspektrometrische Analyse der co-gereinigten Proteine untersucht (Carvalho *et al.* 2006), wodurch Usa1 erstmalig als Bestandteil des Komplexes identifiziert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufklärung der Interaktionen innerhalb des HRD-Komplexes beigetragen, indem die direkte Bindung zwischen den cytosolischen Domänen von Usa1 und Hrd1 *in vitro* nachgewiesen wurde. Parallel zu den hier dargestellten *in vitro*-Experimenten wurden von unseren Kooperationspartnern native Co-Immünpräzipitations-Studien mit Zellextrakten aus Deletions-Stämmen durchgeführt, um die Wechselwirkungen von Usa1 mit den anderen Bestandteilen des HRD-Komplexes zu charakterisieren (Horn *et al.* 2009). Durch den Nachweis einer stabilen Interaktion zwischen den

rekombinanten Proteinen Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ konnte insbesondere die Beteiligung vermittelnder Faktoren ausgeschlossen werden. Mit einer Dissoziationskonstante im oberen nanomolaren Bereich kann von einer spezifischen Interaktion zwischen den cytosolischen Domänen von Usa und Hrd1 ausgegangen werden. Darüber hinaus wurden einige Ausgangsbedingungen für die Kristallisation von Konstrukten der cytosolischen Domänen von Usa1 und Hrd1 ermittelt. Eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen und der Konstruktwahl könnte letztendlich strukturelle Einblicke ermöglichen.

Die für die Interaktion notwendigen Segmente von Usa1 bzw. Hrd1 wurden durch analytische Gelfiltration mit verkürzten Proteinen kartiert (Usa1: AS 347-551, Hrd1: AS 388-539). Die Ergebnisse stimmen mit nativen Co-Immünpräzipitations-Studien überein, die innerhalb von Usa1 den N-terminalen Bereich (AS 1-535) ohne Beteiligung der UBL-Domäne (Horn *et al.* 2009) bzw. ein Segment der c2-Domäne (AS 351-525, Kim *et al.* 2009) als Interaktionsbereich bestimmen. In einer neueren Studie wurde die Kartierung auf AS 437-490 von Usa1 verfeinert (Carvalho *et al.* 2010). Auf Seiten von Hrd1 wurden *in vivo* die C-terminalen 34 Aminosäurereste als Interaktionssegment kartiert (AS 517-551, Horn *et al.* 2009). In Kombination mit den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration schränkt sich der für die Interaktion essentielle Bereich auf AS 517-539 von Hrd1 ein.

Weiterhin wurden die Stöchiometrie und der Oligomerisierungszustand des Usa1-Hrd1-Komplexes untersucht. Das molare Verhältnis von Usa1₁₋₅₃₅ und Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ innerhalb des Komplexes wurde durch ITC und analytische Ultrazentrifugation übereinstimmend als 1:1-Stöchiometrie charakterisiert. Nicht übereinstimmend waren RALS-GF und analytische Ultrazentrifugation im Hinblick auf die Gesamtgröße des Komplexes. Bei vergleichbaren Konzentrationen von ca. 1,4 mg/ml deuten die Daten der RALS-GF auf eine 2+2-Assoziation hin, während die Sedimentations-Gleichgewichtsexperimente mit equimolaren Konzentrationen von Hrd1 und Usa1 eine 1+1-Assoziation nahelegen. Die RALS-GF-Daten befinden sich dabei in Übereinstimmung zu Sucrose-Gradienten-Zentrifugations- (Carvalho *et al.* 2006; Horn *et al.* 2009) und Gelfiltrations-Experimenten (Horn *et al.* 2009), die auf eine Dimerisierung des HRD-Komplexes hinweisen.

Die Frage nach dem Oligomerisierungszustand des HRD-Komplexes bzw. des Subkomplexes aus Usa1 und Hrd1 ist im Zusammenhang mit der inzwischen *in vivo* nachgewiesenen Selbst-Assoziation von Usa1 und Hrd1 zu sehen. Unter Überexpressionsbedingungen oligomerisiert Hrd1 unabhängig von Usa1 (Carvalho *et al.* 2010), unter endogenen Expressionsbedingungen aber wird Usa1 für die Selbst-Assoziation benötigt (Horn *et al.* 2009; Carvalho *et al.* 2010). Dies spricht für eine intrinsische Selbst-Assoziations-Tendenz von Hrd1, die jedoch schwächer ausgeprägt ist als die Selbst-Assoziation von Usa1. Weiterhin beeinflusst die Oligomerisierung des HRD-Komplexes seine Ubiquitinligase-Funktion, wie für membrangebundene (Horn *et al.* 2009) und luminalen Substrate (Carvalho *et al.* 2010) gezeigt wurde. Die Selbst-Assoziation von Usa1 wird *in vivo* durch die Aminosäurereste 372 bis 418 in der Domäne c2 vermittelt (Carvalho *et al.* 2010).

Das Vorliegen von Hrd1₃₂₅₋₅₅₁ als Monomer im RALS-GF- und Sedimentations-Gleichgewichts-Experiment entspricht demnach weitgehend den Erwartungen. Usa1₁₋₅₃₅ lag jedoch sowohl im RALS-GF- als auch im Sedimentations-Gleichgewichts-Experiment als Monomer vor, obwohl das für die Selbst-Assoziation von Usa1 benötigte Segment im Protein enthalten ist. Das Ergebnis der RALS-GF ist dadurch zu erklären, dass schwache Wechselwirkungen den in einer Gelfiltrationssäule auftretenden Scherkräften häufig nicht standhalten. Im Gegensatz dazu gilt die analytische Ultrazentrifugation als robuste Methode zur Bestimmung des Oligomerisierungszustands von Proteinen, sieht man von selten auftretender druckinduzierter Dissoziation ab (Harrington und Kegeles 1973). Eine mögliche Ursache für das Vorliegen von Usa1₁₋₅₃₅ als Monomer in der Ultrazentrifugation stellen die unterschiedlichen Pufferbedingungen dar, die im nativen Co-Immunpräzipitations- und im Sedimentations-Gleichgewichts-Experiment verwendet wurden, so enthielt der Ultrazentrifugationspuffer beispielsweise keine zweiwertigen Kationen. Eine Abhängigkeit des Oligomerisierungszustands von zweiwertigen Kationen wird für einige Proteine beschrieben (Jakob *et al.* 1995; Herrera *et al.* 1996), und ist auch für Usa1 nicht auszuschließen.

Während sich das Vorliegen von Usa1₁₋₅₃₅ als Monomer in RALS-GF und analytischer Ultrazentrifugation erklären lässt, geben die widersprüchlichen Daten aus dem RALS-GF- und dem Sedimentations-Gleichgewichts-Experiment des Usa1-Hrd1-Komplexes Rätsel auf. Effekte durch unterschiedliche Pufferkomponenten konnten durch RALS-GF-Experimente mit Ultrazentrifugationspuffer ausgeschlossen werden, eine druckinduzierte Dissoziation des Komplexes in der Ultrazentrifuge ist jedoch nicht vollständig auszuschließen. Vor dem Hintergrund der Selbst-Assoziation von Usa1 und Hrd1 *in vivo* ist anzunehmen, dass die im RALS-GF-Experiment beobachtete 2+2-Assoziation des Usa1-Hrd1-Komplexes dem Oligomerisierungszustand in der Zelle eher entspricht als die im Sedimentations-Gleichgewichts-Experiment beobachtete 1+1-Assoziation.

5 Yos9

5.1 Ergebnisse

5.1.1 Expression und Reinigung

Yos9 besteht aus 542 Aminosäuren, von denen die ersten 21 die Signalsequenz für den Import in das ER darstellen. Eingeschlossen von zwei funktionell nicht charakterisierten Bereichen am N- und C-Terminus befinden sich im N-terminalen Bereich die MRH-Domäne (AS 90-250) und C-terminal daran anschließend der als Hrd3-Interaktionsdomäne kartierte Bereich (AS 250-420). Diese postulierte Hrd3-Interaktionsdomäne wird nachfolgend in Vorwegnahme ihrer in dieser Arbeit neu bewerteten Funktion als Dimerisierungs-Domäne (DD) bezeichnet. Domänengrenzen und Konstrukte von Yos9 sind in Abb. 5.1 dargestellt.

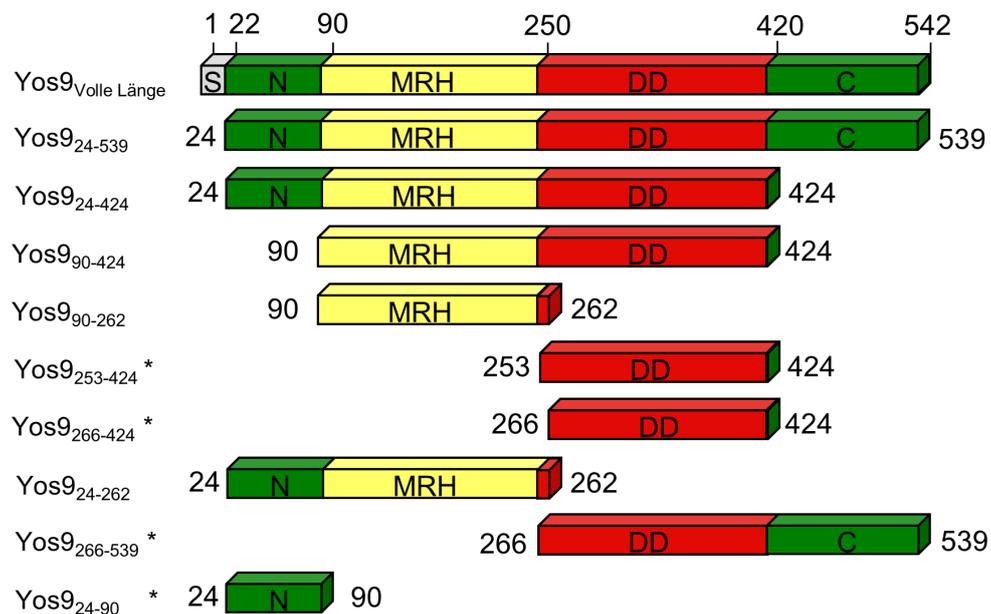


Abb. 5.1: Domänenorganisation und Expressionskonstrukte von Yos9. Zahlen bezeichnen Aminosäurepositionen der Domänen- bzw. Konstruktgrenzen. S: Signalsequenz, MRH: Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Homologie-Domäne, DD: Dimerisierungs-Domäne, N/C: N- bzw. C-terminale Domäne, *: lösliche Konstrukte.

Die Konstrukte von *Yos9* wurden ausgehend von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* mit BamHI / NotI-Restriktionsschnittstellen in den bakteriellen Expressionsvektor pQ-LinkH kloniert. Die Expression wurde bei 18 °C für 16 h in *E. coli* Rosetta2(DE3) T1^R durchgeführt. Ein Selenomethionin-Derivat von *Yos9*₂₆₆₋₄₂₄ wurde nach einer Methode von Van Duyne *et al.* in Minimalmedium unter gleichen Bedingungen wie das native Protein hergestellt (Van Duyne *et al.* 1993).

Die löslichen Konstrukte *Yos9*₂₅₃₋₄₂₄, *Yos9*₂₆₆₋₄₂₄, *Yos9*₂₆₆₋₅₃₉ und *Yos9*₂₄₋₉₀ wurden nativ gereinigt (Abb. 5.2). Bereits nach der Affinitätschromatographie und dem Abspalten des Oligohistidin-*Tags* wurde eine hohe Homogenität erreicht. Bei Präparationen, die für Bindungsstudien oder Western-Blots eingesetzt werden sollten, wurde der *Tag* nicht entfernt. Als abschließender Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration durchgeführt.

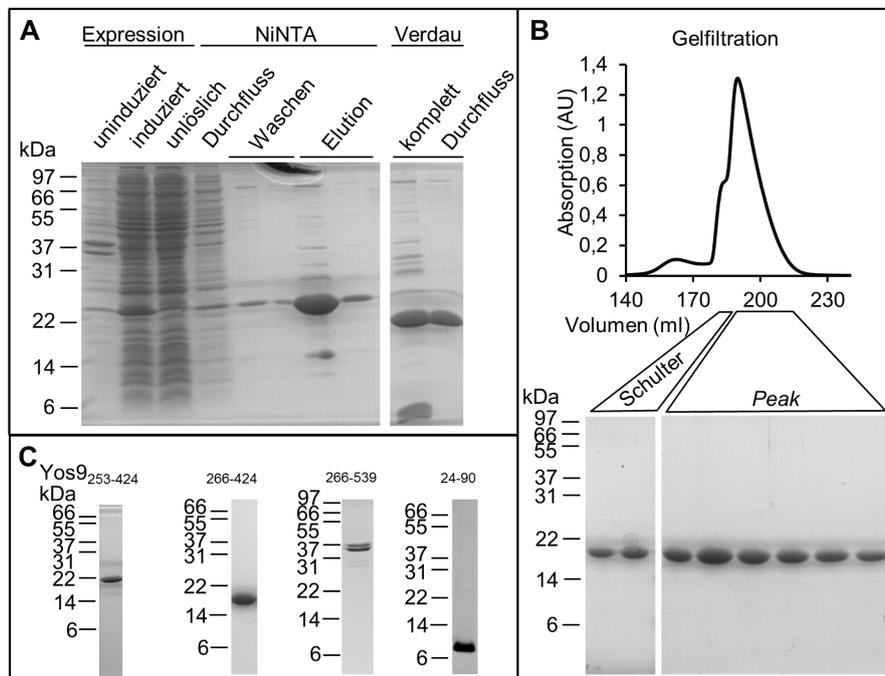


Abb. 5.2: Reinigung löslicher *Yos9*-Konstrukte am Beispiel von *Yos9*₂₆₆₋₄₂₄. **A:** SDS-Gel von Fraktionen der Expression, der Affinitätschromatographie mit NiNTA-Matrix und des *Tag*-Verdau. **B:** Chromatogramm und SDS-Gel der Gelfiltration. Die Schulter unterscheidet sich auf dem Gel nicht von den restlichen Fraktionen und wurde mit dem *Peak* vereinigt. **C:** SDS-PAGE der gereinigten Proteine.

Die unlöslichen Konstrukte *Yos9*₂₄₋₅₃₉, *Yos9*₂₄₋₄₂₄, *Yos9*₉₀₋₄₂₄, *Yos9*₉₀₋₂₆₂ und *Yos9*₂₄₋₂₆₂ wurden nach einer Methode von Quan *et al.* denaturierend gereinigt und rückgefaltet (Quan *et al.* 2008, Abb. 5.3). Nach dem Waschen der *Inclusion Bodies* wurden die Proteine in IB-S-Puffer denaturiert und über Affinitätschromatographie mit NiNTA-Matrix und einen Anionentauscher unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Zur Rückfaltung wurde die konzentrierte Proteinlösung unter Rühren in RF-Puffer verdünnt. Als

abschließende Reinigung wurde eine erneute Anionenaustausch-Chromatographie oder eine Gelfiltration unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

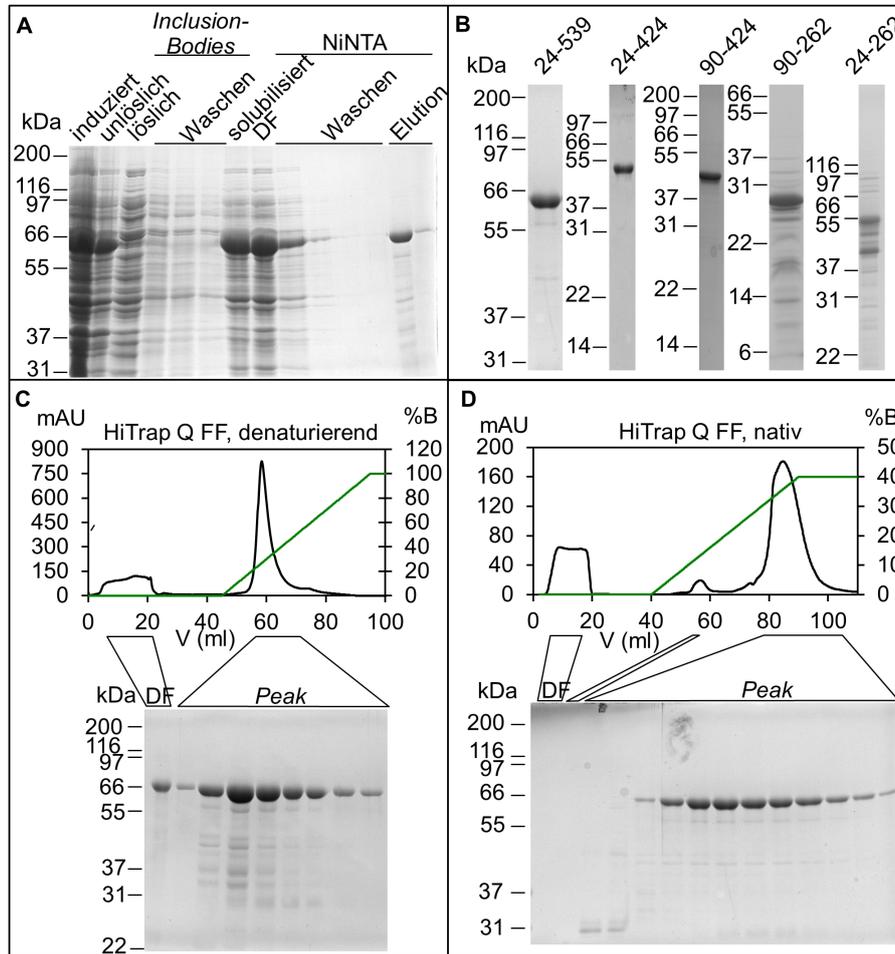


Abb. 5.3: Reinigung unlöslicher Yos9-Konstrukte am Beispiel von Yos9₂₄₋₅₃₉. DF: Durchfluss. **A:** Expression, *Inclusion-Body*-Reinigung und Affinitätschromatographie. **B:** SDS-PAGE der gereinigten Proteine. **C:** Chromatogramm und SDS-PAGE des Anionenauschersschritts unter denaturierenden Bedingungen. **D:** Chromatogramm und SDS-PAGE des Anionenauschersschritts unter nativen Bedingungen nach der Rückfaltung.

Yos9₂₅₃₋₄₂₄ eluierte von der Gelfiltrationssäule in zwei *Peaks*, die nach Vergleich mit Standardproteinen in etwa dem Monomer- und dem Dimer-Molekulargewicht zuzuordnen waren. Im Gegensatz zur Dimerfraktion verhielt sich die Monomerfraktion monodispers in der DLS und wurde für Kristallisationsversuche eingesetzt.

5.1.2 CD-Spektroskopie

Gereinigte Proteine wurden durch CD-Spektroskopie hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur untersucht (Abb. 5.4). Die CD-Spektren wurden mit dem CDSSTR-Algorithmus des

Dichroweb-Servers (Whitmore und Wallace 2008) dekonvolutiert (Tab. 5.1). Die CD-Spektren und ihre Dekonvolution legen nahe, dass alle Konstrukte zumindest partiell gefaltet vorliegen. Mit 38% weist dabei $Yos9_{24-90}$ den höchsten Anteil an ungeordneten Bereichen auf.

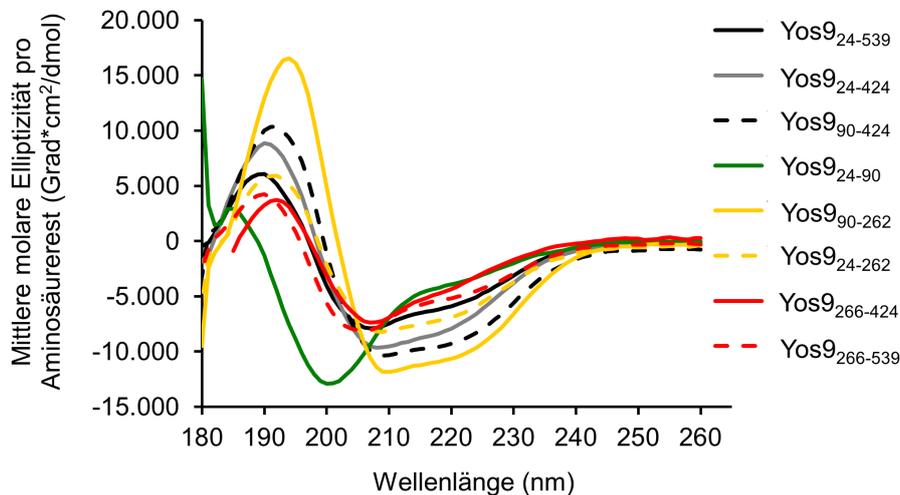


Abb. 5.4: CD-spektroskopische Analyse von Yos9-Konstrukten.

Tabelle 5.1: Sekundärstrukturanteile der Yos9-Konstrukte, abgeschätzt aus CD-Spektren.

	α -Helix	β -Strang	Turn	ungeordnet
$Yos9_{24-539}$	0,16	0,29	0,21	0,32
$Yos9_{24-424}$	0,20	0,27	0,22	0,31
$Yos9_{90-424}$	0,28	0,22	0,22	0,29
$Yos9_{24-90}$	0,07	0,33	0,22	0,38
$Yos9_{90-262}$	0,34	0,21	0,21	0,25
$Yos9_{24-262}$	0,18	0,29	0,22	0,31
$Yos9_{266-424}$	0,14	0,33	0,30	0,25
$Yos9_{266-539}$	0,15	0,30	0,21	0,33

5.1.3 Limitierte Proteolyse

$Yos9_{253-424}$ (DD)

Erste Kristallisationsversuche mit dem DD-Konstrukt $Yos9_{253-424}$ ergaben überwiegend Präzipitat und wenige Quasikristalle (siehe Abschnitt 5.1.4). Um ein geeigneteres Konstrukt für die Kristallisation zu gewinnen, wurde eine limitierte Proteolyse mit 1:10.000 bis 1:1000 (w/w) Trypsin bei 4 °C bzw. 20 °C durchgeführt. Der zeitliche Verlauf des Abbaus wurde auf SDS-Gelen beobachtet (Abb. 5.5).

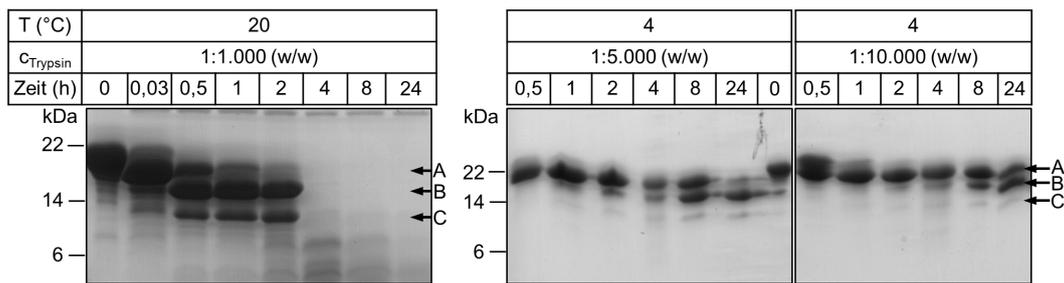


Abb. 5.5: Limitierte Proteolyse der Yos9-DD (Yos9₂₅₃₋₄₂₄).

Es entstanden drei prominente Abbaubanden, wobei die Banden A und B bei 4 °C über mehrere Stunden stabil blieben. Mit dem Gemisch der Abbauprodukte wurde eine N-terminale Edman-Sequenzierung durchgeführt und die Gesamtmasse der enthaltenen Proteine wurde massenspektrometrisch bestimmt. Anhand dieser Daten wurden die N- und C-terminalen Grenzen der Abbauprodukte ermittelt. Es handelte sich um ein Gemisch aus vier Proteinen, die eine N-terminale Verkürzung des Ausgangskonstrukts um 11 bzw. 13 Aminosäuren und eine C-terminale Verkürzung um eine bzw. keine Aminosäure darstellten. Für weitere Kristallisationsversuche wurde das Konstrukt Yos9₂₆₆₋₄₂₄ ausgewählt und wie zuvor kloniert und gereinigt.

Yos9₂₄₋₅₃₉ (Volle-Länge-Protein)

Zur Ermittlung weiterer stabiler Konstrukte wurde das rückgefaltete Volle-Länge-Protein Yos9₂₄₋₅₃₉ bei 4°C proteolytisch abgebaut und die Abbauprodukte auf SDS-Gelen aufgetrennt (Abb. 5.6). Im Gegensatz zur limitierten Proteolyse der Yos9-DD wurden keine stabilen Abbauprodukte identifiziert. Einige der resultierenden Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Die aus den Ergebnissen abgeleiteten Konstrukte Yos9₉₅₋₄₂₄ und Yos9₁₀₈₋₄₂₄ umfassten die MRH- und die DD-Domäne. Die Konstrukte wurden wie zuvor in den Vektor pQLinkH kloniert, konnten jedoch nicht überexprimiert werden.

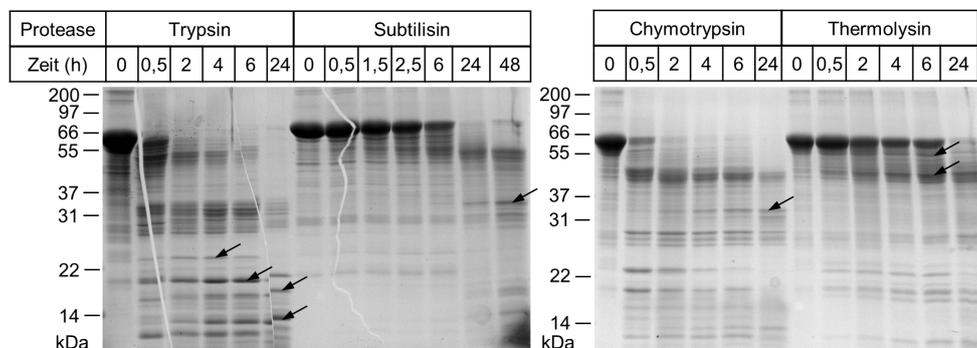


Abb. 5.6: Limitierte Proteolyse des Volle-Länge-Yos9 (Yos9₂₄₋₅₃₉). Pfeile kennzeichnen massenspektrometrisch analysierte Abbauprodukte.

5.1.4 Kristallisation

Yos9₂₅₃₋₄₂₄

Erste Kristallisationsversuche wurden mit dem DD-Konstrukt Yos9₂₅₃₋₄₂₄ zunächst im 96er Format in den Initial-*Screens* Classics, ClassicII und JCSG Suite (Qiagen) durchgeführt. Bei einer moderaten Proteinkonzentration von 5,9 mg/ml in GF-Puffer mit 1 mM DTT entstand in den meisten Bedingungen rasch Präzipitat. Nach einer Woche hatten sich Quasikristalle in einer Hochsalzbedingung der Classic Suite gebildet (Abb. 5.7 A). Zur Optimierung der Kristallisationsbedingung wurden die Salzkonzentration und der pH-Wert in einem Fein-*Screen* systematisch variiert, die quasikristallinen Strukturen blieben jedoch unverändert.

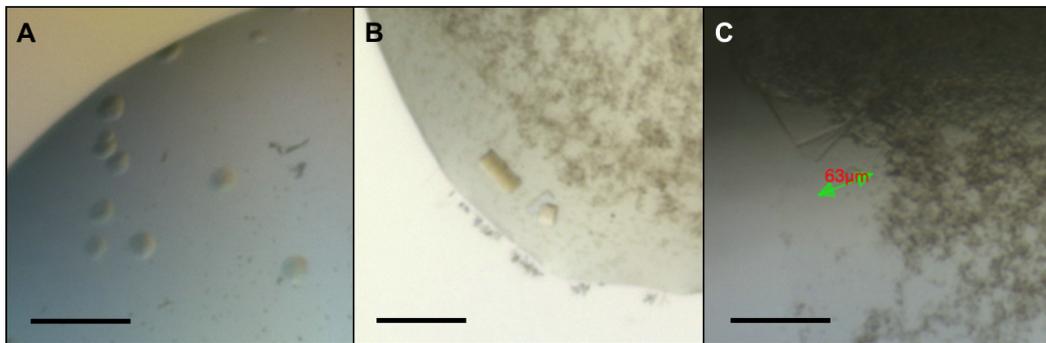


Abb. 5.7: Kristallisationsversuche mit Yos9₂₅₃₋₄₂₄. Die Balken entsprechen einer Länge von ca. 100 µm. **A:** Quasikristalle in 1 M Ammoniumphosphat, 0,1 M Natriumcitrat (pH 5,6). **B:** Plättchen in 0,6 M Natriumfluorid, 0,1 M Natriumacetat (pH 4,6). **C:** Nadeln in 17,5% (v/v) tert-Butanol, 0,1 M Natriumcitrat (pH 5,6).

Mit dem Anions Suite-*Screen* sollte eine größere Bandbreite an Hochsalzbedingungen abgedeckt werden. Nach 77 Tagen wuchsen in einem der Tropfen neben starkem Präzipitat kleine Plättchen (Abb. 5.7 B). Weiterhin wurde ein ClassicsLite *Screen* angesetzt, um der starken Präzipitation entgegenzuwirken. Nach 42 Tagen wuchsen in einem weiteren Kristallisationsansatz kleine Nadeln aus dem Präzipitat (Abb. 5.7 C). Die zwei Bedingungen wurden nicht weiter verfeinert, da zu diesem Zeitpunkt bereits aussichtsreichere Ergebnisse mit dem Abbauprodukt der limitierten Proteolyse (Yos9₂₆₆₋₄₂₄) erzielt wurden und kein Informationsgewinn durch die zusätzlichen 13 Aminosäuren in Yos9₂₅₃₋₄₂₄ erwartet wurde.

Yos9₂₆₆₋₄₂₄

Das optimierte DD-Konstrukt Yos9₂₆₆₋₄₂₄ wurde in GF-Puffer mit 1 mM DTT bei einer Konzentration von 8,7 mg/ml zur Kristallisation eingesetzt. Initial-*Screens* wurden im 96er Format bei 20 °C mit den *Screens* Classics, Classics II, Anions und JCSG+ Suite durchgeführt. In verschiedenen Hochsalzbedingungen bildeten sich trigonale Kris-

talle mit einer Kantenlänge von maximal 50 μm . Die Kristallform schien sich in den verschiedenen Bedingungen nicht zu unterscheiden, und die Größe der Kristalle genügte zum Teil bereits für Diffraktionsversuche am Synchrotron. Aus unterschiedlichen Bedingungen wurden Kristalle geerntet, mit 20% Glycerin kryoprotectiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Diffraktionseigenschaften der Kristalle wurden an *Beamline* 14.2 (Heinemann *et al.* 2003) des Helmholtz-Zentrums Berlin für Materialien und Energie und der Freien Universität Berlin am Elektronenspeicherring BESSY II getestet.

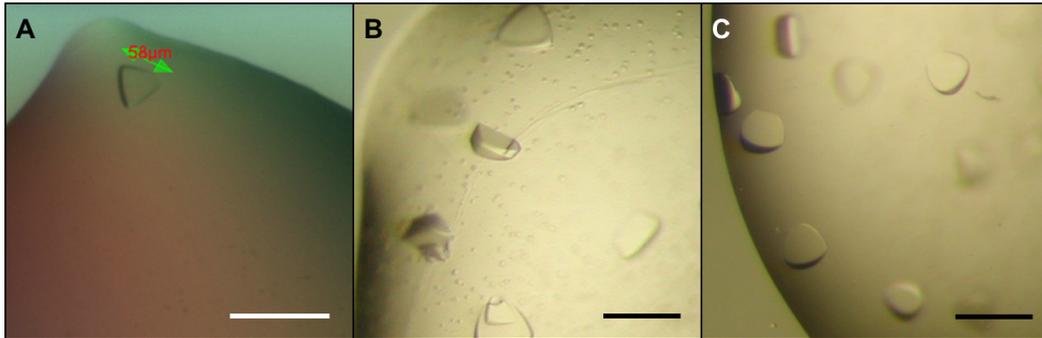


Abb. 5.8: Kristallisation von $\text{Yos9}_{266-424}$. Die Balken entsprechen einer Länge von ca. 100 μm . **A:** Initialer Kristall in 0,45 M NaH_2PO_4 , 0,45 M KH_2PO_4 , 0,1 M Tris, pH 5,05. **B:** Native Kristalle im Fein-Screen mit 3+3 μl Tropfen (0,55 M NaH_2PO_4 , 0,55 M KH_2PO_4 , 0,1 M Tris, pH 5,05). **C:** Kristalle des Selenomethionin-Derivats.

Die Kristallisationsbedingung des Kristalls mit den besten Diffraktionseigenschaften (Abb. 5.8 A) wurde durch systematische Variation der Salzkonzentration und des pH-Wertes verfeinert. Die Fein-Screens wurden zunächst im 96er Format durchgeführt. Da die Kristalle in diesem Format nicht über eine Kantenlänge von ca. 50 μm hinauswuchsen, wurden 3+3 μl Tropfen im 24er Format manuell angesetzt. Die Kristalle in den manuellen Ansätzen erreichten eine maximale Kantenlänge von bis zu 100 μm innerhalb von ca. zwei Wochen (Abb. 5.8 B). Das Selenomethionin-Derivat kristallisierte unter den gleichen Bedingungen wie das native Protein mit einer ähnlichen, jedoch weniger klar definierten trigonalen Kristallform (Abb. 5.8 C).

Weitere *Yos9*-Konstrukte

Kristallisationsversuche mit den Konstrukten Yos9_{24-539} , Yos9_{24-424} und $\text{Yos9}_{266-539}$ wurden im 96er Format bei 4 $^\circ\text{C}$ und Tropfengrößen von 400+400 nl durchgeführt. Das Voll-Länge-Protein Yos9_{24-539} wurden in RF-GF-Puffer bei einer Konzentration von 9,2 mg/ml zur Kristallisation mit den Initial-Screens ComPAS, Classic II und JCSG+ angesetzt. Unter keiner der eingesetzten Bedingungen entstanden Kristalle.

Yos9_{24-424} wurde in RF-GF-Puffer bei einer Konzentration von 8,4 mg/ml zur Kristallisation mit den Initial-Screens JCSG+ und Classics Suite eingesetzt. Unter verschiedenen Bedingungen bildeten sich als präkristallin bis kristallin einzustufende Strukturen (Abb.

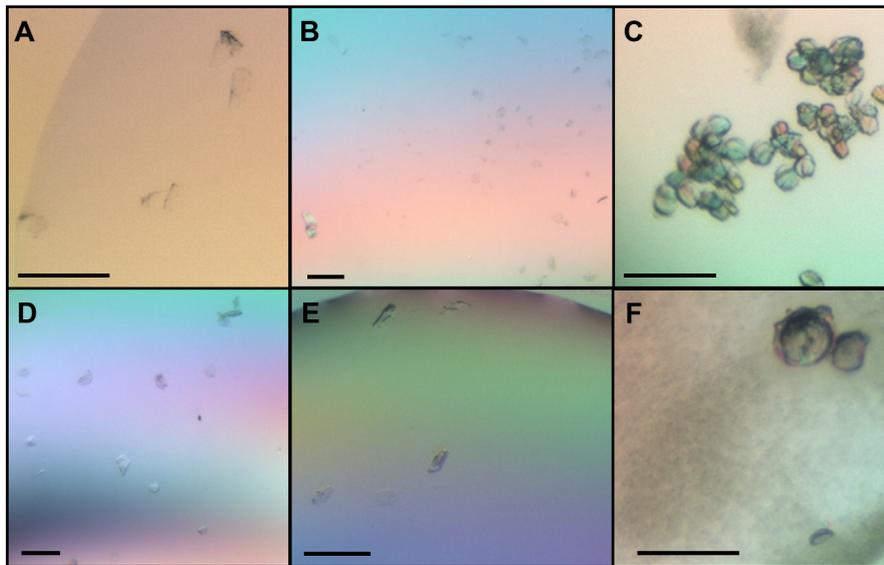


Abb. 5.9: Kristalline Strukturen in Kristallisationsversuchen mit *Yos9*₂₄₋₄₂₄ (A-E) und *Yos9*₂₆₆₋₅₃₉ (F). **A:** 30% PEG 400, 200 mM Magnesiumchlorid, 100 mM HEPES (pH 7,5). **B:** 10% 2-Propanol, 200 mM Natriumchlorid, 100 mM HEPES (pH 7,5). **C:** 1 M Di-Ammoniumhydrogen-Phosphat, 100 mM Natriumacetat (pH 4,5). **D:** 10% v/v MPD, 100 mM Bicin (pH 9). **E:** 22% Polyacrylsäure 5100 (Natriumsalz), 200 mM Magnesiumchlorid, 100 mM HEPES (pH 7,5). **F:** 50% v/v PEG 200, 200 mM Natrium- / Kaliumphosphat (pH 6,2).

5.9 A-E). Auf Basis der am vielversprechendsten erscheinenden Kristallisationsbedingung (Abb. 5.9 C) wurde ein *Fein-Screen* zusammengestellt, in dem die Konzentration des Präzipitanten und der pH-Wert variiert wurden. Nur in wenigen Tropfen des *Fein-Screens* bildeten sich kristalline Strukturen einer ähnlichen Größe wie im *Initial-Screen*. Mehrere Kristalle aus dem *Initial-Screen* wurden zum Test ihrer Diffraktionseigenschaften mit 25% Glycerin kryoprotectiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kristalle wurden an *Beamline* 14.1 des Elektronenspeicherrings BESSY II getestet. Diese *Beamline* ist mit einem Microdiffractometer ausgestattet, das Diffraktionsexperimente mit sehr kleinen Kristallen ermöglicht. Es wurde keine Streuung beobachtet, was darauf hindeutet, dass es sich nicht um Salzkristalle handelte. Auch in wiederholten *Fein-Screens* mit frischen Proteinpräparationen wurde keine Verbesserung der Kristalle erzielt.

*Yos9*₂₆₆₋₅₃₉ wurde bei einer Konzentration von 8,9 mg/ml in GF-Puffer zur Kristallisation mit den *Initial-Screens* Classics, JCSG+, ComPAS und PEGs Suite eingesetzt. Eine Bedingung enthielt neben Präzipitat wenige verwachsene Kristalle (Abb. 5.9 F). Der größte Kristall wurde in Mutterlauge schockgefroren und an *Beamline* 14.1 des Elektronenspeicherrings BESSY II auf seine Diffraktionseigenschaften getestet. Es wurde keine Streuung beobachtet, was darauf hindeutet, dass es sich nicht um einen Salzkristall handelte. In einem *Fein-Screen* wurde die Konzentration des Präzipitanten PEG 200 und der pH-Wert des Puffers variiert, die Kristalle konnten jedoch nicht reproduziert werden.

5.1.5 Strukturanalyse der Dimerisierungs-Domäne von Yos9

Datensammlung und Prozessierung

Die Diffraktionseigenschaften von ca. 60 nativen Kristallen des DD-Konstrukts Yos9₂₆₆₋₄₂₄ wurde am Elektronensynchrotron BESSY getestet. Der beste Kristall streute bis 2,5 Å (Abb. 5.10 A). Mit dem Programm iMosflm wurden zwei bei einem Winkel von 0° und 90° aufgenommene Diffraktionsbilder indiziert, die Punktgruppe wurde bestimmt und eine Strategie zur Sammlung eines vollständigen Datensatzes entwickelt. Diffraktionsdaten wurden über eine Rotation von 90° mit einer Oszillation von 1° je Diffraktionsbild aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programm XDS (Kabsch 2010) in der Raumgruppe R32 prozessiert (Tab. 5.2).

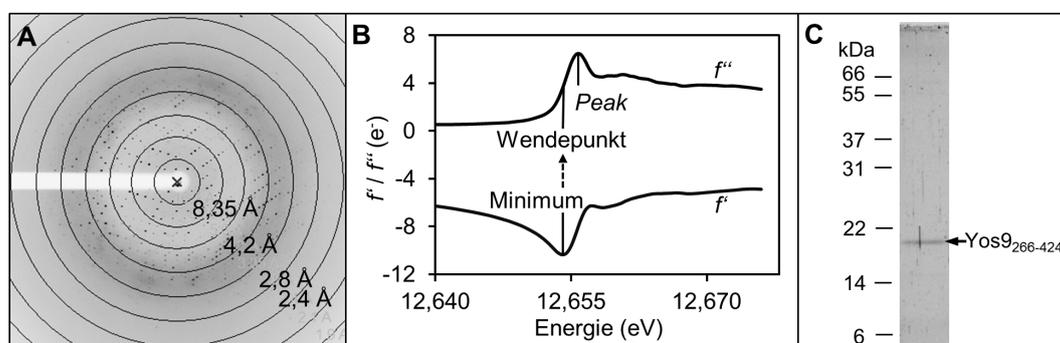


Abb. 5.10: Datensammlung. **A:** Diffraktionsbild des am besten streuenden nativen Yos9₂₆₆₋₄₂₄-Kristalls. **B:** Plot der anomalen Streufaktortermine f' und f'' in Abhängigkeit von der Energie. **C:** Silbergefärbtes SDS-Gel eines aufgelösten Yos9₂₆₆₋₄₂₄-Kristalls.

Der beste Kristall des Selenomethionin-Derivats von Yos9₂₆₆₋₄₂₄ streute bis 2,9 Å. Ein Röntgen-Fluoreszenz-Spektrum wurde aufgenommen, aus dem die anomalen Streufaktortermine f' und f'' mit dem Program CHOCH ermittelt wurden (Evans und Petti-fer 2001, Abb. 5.10 B). Bei der Wellenlänge mit maximalem f'' (*Peak*), minimalem f' (*Wendepunkt*) und bei hoher Energie wurden Datensätze mit einer Redundanz von 3,6 aufgenommen und mit XDS in der Raumgruppe R32 prozessiert (Tab. 5.2).

Phasierung, Modellbau und Verfeinerung

Die Anzahl der Moleküle pro asymmetrischer Einheit wurde anhand des Matthews-Koeffizienten abgeschätzt. Als wahrscheinlichste Kristallpackung stellte sich eine Anzahl von drei Molekülen in der asymmetrischen Einheit bei einem Solvensanteil von 45%, als zweitwahrscheinlichste Packung eine Anzahl von zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit bei 63% Solvensanteil.

Phasierung und automatischer Modellbau wurden mit der AutoSol-Routine des Programms Phenix durchgeführt (Adams *et al.* 2010). In der Schweratomsstruktur- suchung wurden insgesamt acht Selenatome gefunden, entsprechend zwei Molekülen in der asym-

Tabelle 5.2: Datensammlung und Verfeinerung.

	Nativ	Selenomethionin		
Datensammlung				
Raumgruppe	R32	R32		
Zellgröße				
$a/b/c$ (Å)	160,5/160,5/96,9	160,8/160,8/96,8		
		<i>Peak</i>	Wendepunkt	hohe Energie
Wellenlänge (Å)	0,91841	0,97969	0,97979	0,91841
Auflösung (Å)	100 - 2,5	100 - 2,9	100 - 3,1	100 - 3,0
R_{meas} (%)	5,5 (59,9)	9,8 (73,0)	9,2 (58,7)	10,8 (84,2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	22,2 (2,9)	11,6 (2,2)	13,2 (2,7)	13,8 (1,9)
Vollständigkeit (%)	99,4 (99,8)	99,8 (99,9)	99,8 (99,8)	99,8 (99,9)
Redundanz	5,6	3,6	3,6	3,6
Verfeinerung				
Auflösung (Å)	2,5			
Unabhängige Reflexe	15.831			
R_{work} / R_{free} (%)	18,1 / 22,0			
Atome	2124			
Protein	2074			
Wasser	50			
Mittlerer B-Faktor (Å ²)	68,18			
Protein	68,32			
Wasser	62,67			
Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung				
Bindungslängen (Å)	0,007			
Bindungswinkel (°)	1,145			
Ramachandran-Statistik				
bevorzugt (%)	97,3			
verboten (%)	0			

metrischen Einheit mit je vier Selenomethionin-Resten. Nach einer Dichtemodifikation und mehreren Zyklen automatischen Bauens und Verfeinerns bestand das Atommodell aus 219 Resten in fünf Ketten, davon 105 mit Seitenketten.

Das Modell wurde mit dem Programm Coot manuell korrigiert und auf 232 von 320 Aminosäureresten erweitert. Nach der Platzierung in die zu dem Zeitpunkt besten verfügbaren Daten bei 2,8 Å Auflösung wurde das Modell auf 257 von 320 Aminosäuren erweitert und mit dem Programm Phenix auf R -Werte von 23%/17% (R_{work}/R_{free}) verfeinert. Die Validierung zeigte, dass das Modell eine problematische Region enthielt, beginnend bei einer schlecht definierten Schleifenregion ab Aminosäure 370. Geometrien der Seitenketten und Torsionswinkel des Peptidrückgrats wichen bei einer großen Zahl von Resten von den erwarteten Werten ab.

Das Problem wurde gelöst, nachdem ein neuer Datensatz bei 2,5 Å Auflösung gemessen wurde. Nach der Korrektur mehrerer Rasterverschiebungen der Aminosäurekette

war die zuvor problematische Region unauffällig in der Ramachadran-Statistik und in der Rotameranalyse. Das Modell wurde auf R -Werte von 18 bzw. 22% verfeinert mit Abweichungen der Bindungslängen um 0,007 Å und der Bindungswinkel um 1,15° von den erwarteten Werten. Das verfeinerte Modell enthielt 267 von 322 Resten des kristallisierten Konstrukts sowie 50 geordnete Wassermoleküle und wurde unter der Identifikationsnummer 2YMA in der Proteindatenbank wwPDB (Berman *et al.* 2003) hinterlegt.

Struktur

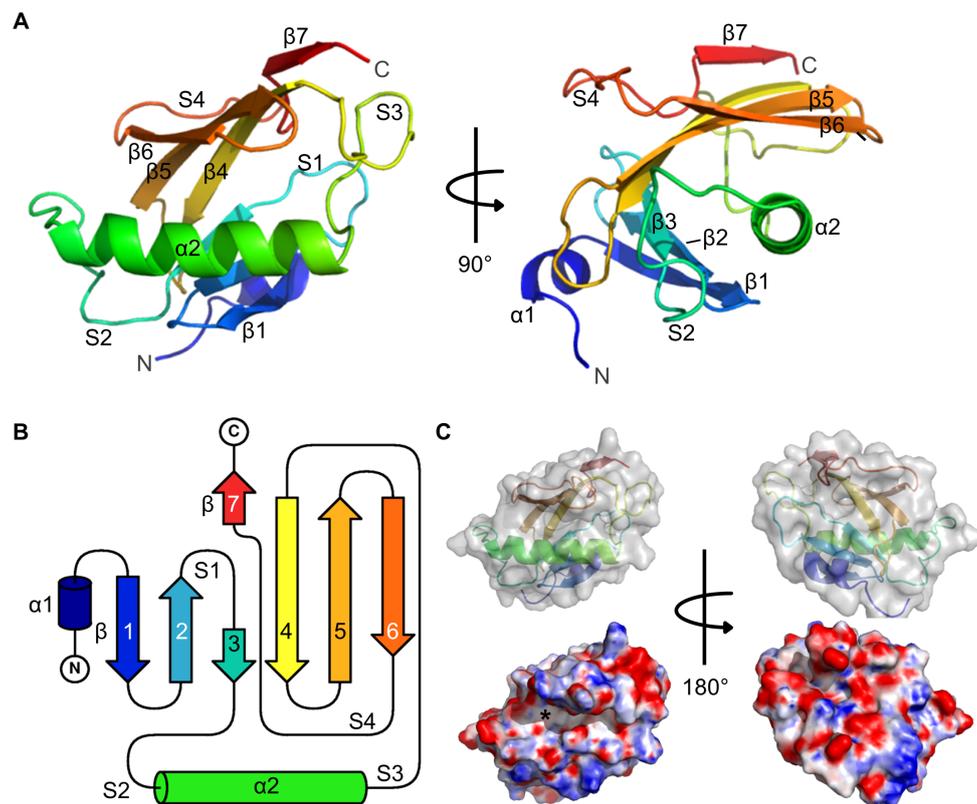


Abb. 5.11: Struktur der Dimerisierungs-Domäne von Yos9. Sekundärstrukturelemente sind mit $\alpha 1-2$ bzw. $\beta 1-7$, Schleifen mit S1-4 gekennzeichnet. **A:** Zwei um 90° um die vertikale Achse gedrehte Ansichten der Struktur. Die Färbung entspricht der Aminosäuresequenz vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot). **B:** Topologie der Struktur. **C:** Oberfläche der Dimerisierungs-Domäne. Die Ansichten auf der rechten Seite sind um 180° um die vertikale Achse gedreht. Oben: Schematische Darstellung der Struktur mit halbtransparenter Oberfläche. Unten: Elektrostatisches Oberflächenpotential, dargestellt von -10 kT (rot) bis +10 kT (blau). *: Hydrophobe Furche zwischen $\alpha 2$ und $\beta 4-6$.

Die Struktur von Yos9₂₆₆₋₄₂₄ lässt sich nach der CATH-Klassifikation (Cuff *et al.* 2009) als eine α - β -Roll-Architektur beschreiben. Die hydrophobe Seite der amphipatischen α -Helix 2 wird von einem gekrümmten β -Faltblatt umschlossen (Abb. 5.11 A). Das β -Faltblatt setzt sich aus zwei antiparallelen β -Faltblättern zusammen, die durch einen kurzen parallelen Abschnitt miteinander verbunden sind und insgesamt sieben β -Stränge

enthalten (Abb. 5.11 B). Das erste Faltblatt besteht aus drei β -Strängen in *up-and-down*-Topologie, während das zweite β -Faltblatt vier β -Stränge beinhaltet, die in einer *Greek-Key*-Topologie des C-Typs vorliegen (Hutchinson und Thornton 1993). Darüber hinaus enthält die Struktur vier größere Schleifenregionen, von denen Schleife S1 und S4 Verbindungen zwischen β -Strängen darstellen, während die Schleifen S2 und S3 die Helix $\alpha 2$ mit den Faltblättern verbinden.

In der Kristallstruktur stellt sich die *Yos9*-DD als eine kompakt gefaltete Domäne mit einer gleichmäßig geladenen Oberfläche dar (Abb. 5.11 C). Eine Vertiefung, die zwischen $\alpha 2$ und den Strängen $\beta 4$ bis 6 des zweiten β -Faltblatts entsteht, wird von überwiegend hydrophoben Resten ausgekleidet. In Molekül A der asymmetrischen Einheit wird diese Furche durch den langgestreckten N-Terminus eines benachbarten Moleküls A ausgefüllt, während sie in Molekül B abgesehen von einem kurzen Segment unerklärter Elektronendichte unausgefüllt bleibt (siehe Abschnitt 5.2.1, Abb. 5.23).

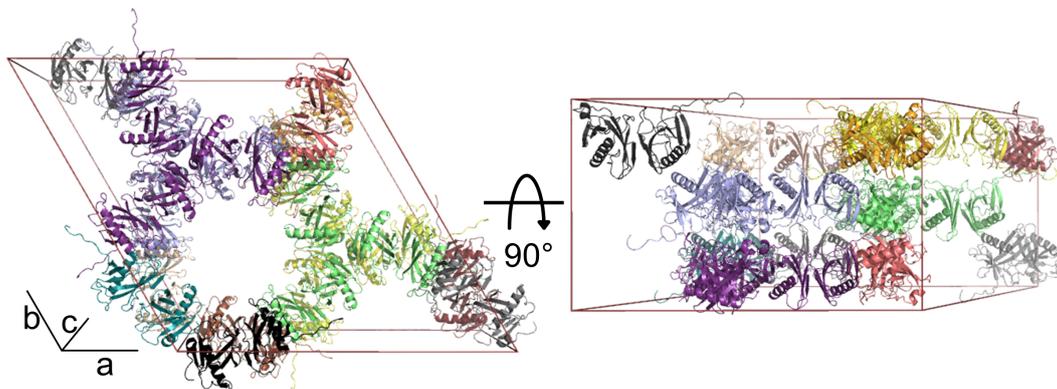


Abb. 5.12: Kristallpackung. Dargestellt ist eine Elementarzelle in hexagonaler Aufstellung mit den enthaltenen 18 asymmetrischen Einheiten. Die Ansicht auf der rechten Seite ist um 90° um die horizontale Achse gedreht.

Zwischen den Proteinmolekülen in der Kristallpackung besteht eine Vielzahl an Kontakten, wie die Darstellung der Elementarzelle verdeutlicht (Abb. 5.12). Die Kontaktflächen wurden mithilfe des ePISA Servers analysiert (Krissinel und Henrick 2007, Tab. 5.3). Nach dieser Analyse ist die wahrscheinlichste biologische Einheit das Dimer, das aus den beiden Molekülen in der asymmetrischen Einheit besteht. Die Kontaktfläche entsteht dabei aus der *Greek-Key*-Schleife S4 und den zweiten β -Faltblättern, die ein β -*Sandwich* miteinander bilden (Abb. 5.13 A). Ein alternatives, aber weniger wahrscheinliches Oligomer stellt das Trimer dar, das über die dreizählige kristallographische Achse entsteht. Die Kontaktfläche des Trimers verteilt sich über α -Helix 1, die benachbarten Schleifen S1 und S2 und das erste β -Faltblatt (Abb. 5.13 B).

Beide Kontaktflächen beinhalten mit etwa 10% den gleichen Anteil an der Gesamtoberfläche des Proteins, und beide enthalten einen großen Anteil hydrophober Reste, wie am negativen Wert der freien Solvatationsenergie ΔG^i abzulesen ist (Tab. 5.3). Die

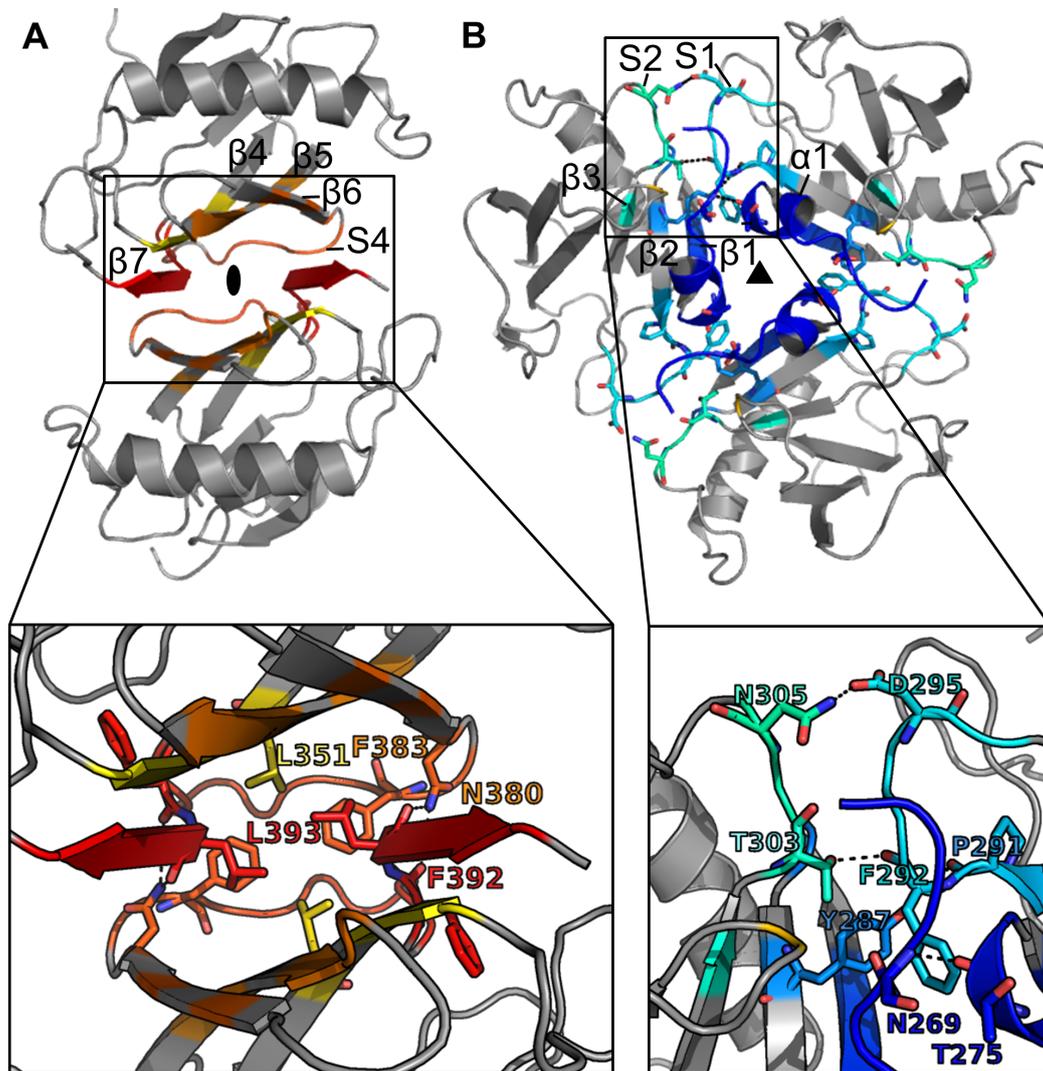


Abb. 5.13: Oligomerisation in der Kristallstruktur von Yos9₂₆₆₋₄₂₄. Die Färbung entspricht Abb. 5.11, wobei Reste, die nicht an der Oligomerisierung beteiligt sind, grau dargestellt sind. Oben: Aufsicht auf die Symmetrie-Achse des jeweiligen Oligomers. Unten: Nahaufnahme der Oligomerisierungsfläche. **A:** Nicht-kristallographisches Dimer der beiden Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Der langgestreckte N-Terminus des oberen Moleküls ist zur besseren Übersicht nicht abgebildet. Seitenketten, die im Rahmen dieser Arbeit als für die Dimerisierung relevant identifiziert wurden (N380 und L393), und die Seitenketten direkt kontaktierender Aminosäurereste sind dargestellt. **B:** Trimer an der dreizähligen kristallographischen Achse. An Wasserstoffbrücken beteiligte Seitenketten sind abgebildet.

Oberflächen sind zudem hydrophober als ein zufällig gewählter Oberflächenbereich (ΔG^i P-Wert < 0,5). Der Hauptunterschied zwischen den Dimer- und Trimerkontaktflächen liegt in den polaren Wechselwirkungen. Während an der Dimer-Kontaktfläche 20 Wasserstoffbrücken und vier Salzbrücken beteiligt sind, bildet eine Trimer-Kontaktfläche nur vier Wasserstoffbrücken aus. Damit wird nur das Dimer mit einer positiven freien Energie der Dissoziation ΔG_{diss} als thermodynamisch stabil eingestuft.

Tabelle 5.3: PISA-Analyse der wichtigsten Kontaktflächen in der Kristallstruktur. ΔG^i : Gewinn Freier Solvatationsenergie pro Kontaktfläche, ΔG_{int} : Gewinn Freier Solvatationsenergie pro Oligomer, ΔG_{diss} : Freie Energie der Dissoziation, $T\Delta S_{\text{diss}}$: Entropie-Änderung durch Dissoziation.

Oligomer		Dimer	Trimer
Kontaktfläche	Aminosäurereste	49	31
	Atome	180	116
	Fläche (\AA^2)	884	504
	ΔG^i (kcal/mol)	-7,3	-5,5
	P-Wert	0,278	0,192
	Wasserstoffbrücken	20	4
	Salzbrücken	4	0
Oligomer	ΔG_{int} (kcal/mol)	-7,3	-16,6
	ΔG_{diss} (kcal/mol)	4,9	-2,0
	$T\Delta S_{\text{diss}}$ (kcal/mol)	11,9	23,9

5.1.6 Selbst-Assoziation von Yos9

RALS-GF

In der präparativen Gelfiltration lief Yos9₂₆₆₋₄₂₄ bei einer molekularen Masse, die knapp oberhalb der molekularen Masse des Monomers lag. Die Folgerung, die Domäne Yos9₂₆₆₋₄₂₄ läge unter Gelfiltrationsbedingungen als Monomer vor, wurde durch ein RALS-GF-Experiment bestätigt (Abb. 5.14). Wie jedoch bereits an anderer Stelle erwähnt, halten schwache Wechselwirkungen den in einer Gelfiltrationssäule auftretenden Scherkräften häufig nicht stand, weshalb der Oligomerisierungszustand der Dimerisierungs-Domäne durch weitere Methoden untersucht wurde.

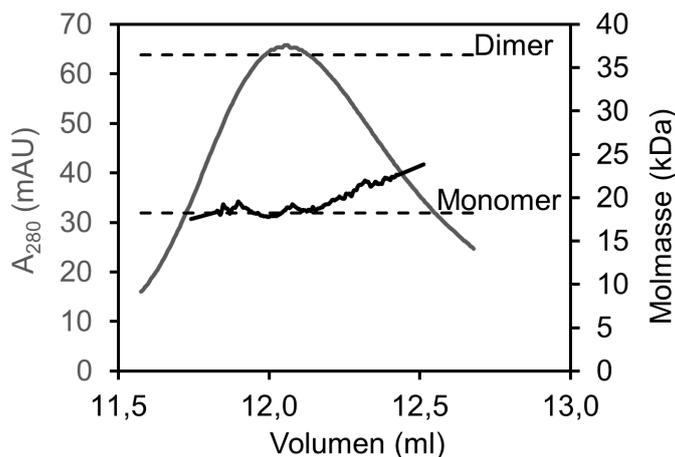


Abb. 5.14: RALS-GF der Yos9-DD (Yos9₂₆₆₋₄₂₄).

Blue Native PAGE

Als weitere Methode zur Analyse des Oligomerisierungszustands der Yos9-DD wurden *Blue Native PAGE*-Experimente durchgeführt. Yos9₂₆₆₋₄₂₄ migrierte dabei in einer einzelnen Bande. In der Regel wird eine solche Einzelbande als das Vorliegen einer einzelnen Spezies interpretiert, zum Beispiel des Monomers oder des Dimers. Bei einer raschen Kinetik der Selbst-Assoziation kann aber auch ein Protein im Monomer-Oligomer-Gleichgewicht in einer einzelnen Bande migrieren, deren Geschwindigkeit dem Mittel der Geschwindigkeiten der beteiligten Spezies entspricht (Nemoto und Sato 1998).

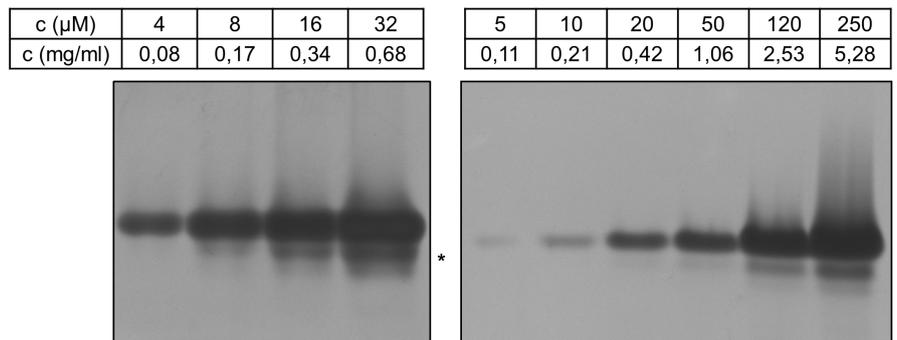


Abb. 5.15: *Blue Native PAGE* der Yos9-DD (Yos9₂₆₆₋₄₂₄). Das Protein migriert in einer Hauptbande ohne konzentrationsabhängige Retardierung. Links: Silberfärbung, rechts: Coomassie-Färbung, *: Kontamination / Degradation.

Das Vorliegen eines Monomer-Oligomer-Gleichgewichts unter den Bedingungen der *Blue Native PAGE* wurde durch eine Konzentrationsreihe nicht bestätigt. Bei steigenden Konzentrationen erhöht sich der Oligomeranteil im Fall eines Monomer-Oligomer-Gleichgewichts. Damit steigt die mittlere Masse bzw. Größe, und es sollte eine Retardierung der Bande auftreten. Da keine konzentrationsabhängige Retardierung von Yos9₂₆₆₋₄₂₄ zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass die Yos9-DD in der *Blue Native PAGE* als Monomer migriert (Abb. 5.15). Die zweite Bande bei niedrigerem Molekulargewicht zeigt sich bei hohen Proteinkonzentrationen sowohl in der nativen PAGE als auch in der SDS-PAGE. Sie ist auf eine Kontamination, möglicherweise durch ein Degradationsprodukt, zurückzuführen. Für die native Gelelektrophorese gilt allerdings die gleiche Einschränkung wie für die Gelfiltration: Die im Gel auftretenden Scherkräfte können schwächer assoziierte Moleküle wieder trennen.

Pulldown-Experimente

Der Oligomerisierungszustand der Yos9-DD wurde zusätzlich durch *Pulldown*-Experimente mit gereinigtem Yos9₂₆₆₋₄₂₄ untersucht. Oligohistidin-Fusionsprotein wurde an Talon-Matrix gebunden und mit unmarkiertem Protein inkubiert. Nach dreifachem Waschen der Matrix wurden gebundene Proteine durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer

eluiert. Geringe Mengen der unmarkierten Dimerisierungs-Domäne banden auch in Abwesenheit des Oligohistidin-Fusionsproteins an die Matrix. Eine über diesen Hintergrund hinausgehende Bindung konnte nicht festgestellt werden (Abb. 5.16 A).

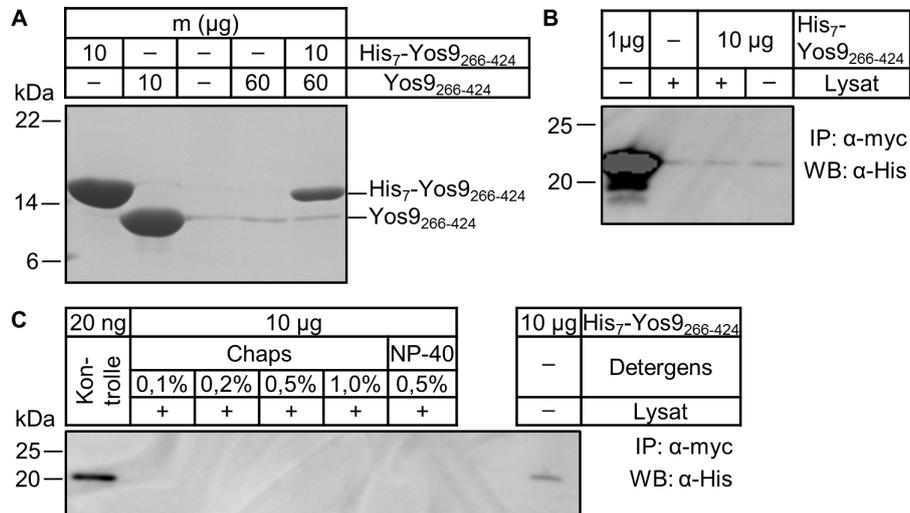


Abb. 5.16: *Pulldown*-Experimente mit der Yos9-DD (Yos9₂₆₆₋₄₂₄). **A:** Pulldown zwischen rekombinantem Oligohistidin-markiertem und unmarkiertem Yos9₂₆₆₋₄₂₄ (Coomassie-gefärbtes Gel). **B/C:** Co-IP von rekombinantem, Heptahistidin-markiertem Yos9₂₆₆₋₄₂₄ mit myc-markiertem Yos9 aus Hefezell-Lysat. IP: Immunpräzipitation, WB: Immundetektion im Western-Blot. In der ersten Spur befindet sich jeweils eine Kontrollprobe des rekombinanten Proteins.

Weiterhin wurden Co-Immunpräzipitations (Co-IP)-Versuche mit Oligohistidin-Fusionsprotein und Hefezelllysate durchgeführt. Aus einem Hefestamm, der myc-markiertes Yos9 unter dem endogenen Promoter exprimiert, wurde mikrosomales Extrakt präpariert. Das Extrakt wurde mit Protein-A-Sepharose, monoklonalen anti-myc-Antikörpern und rekombinantem Oligohistidin-Yos9₂₆₆₋₄₂₄ inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Matrix wurden gebundene Proteine durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer eluiert. Auch in diesem Versuch wurde keine über den Hintergrund hinausgehende Bindung beobachtet (Abb. 5.16 B). Um eine mögliche Störung der Bindung durch das zur Extraktion verwendete Detergens zu minimieren, wurden statt NP-40 verschiedene Konzentrationen des milderen Detergens Chaps eingesetzt. Eine Selbst-Assoziation von Yos9 wurde auch unter diesen Bedingungen nicht beobachtet (Abb. 5.16 C).

Quervernetzung

Die gereinigte Yos9-DD wurde mit dem *Crosslinking*-Reagenz Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³) quervernetzt. Eine mögliche Abhängigkeit der Quervernetzungsreaktion von der Proteinkonzentration wurde durch eine Konzentrationsreihe bei konstantem *Crosslinking*-Reagenz:Protein-Verhältnis untersucht (Abb. 5.17). Bei den beiden höchsten einge-

setzten Konzentrationen (10 bzw. 20 μM) wurde ein signifikanter Anteil des Proteins als Dimer quervernetzt. Neben einem großen Monomeranteil wurde bei der höchsten Proteinkonzentration auch ein kleiner Anteil höhermolekularer Spezies detektiert, was auf eine abnehmende Spezifität der Quervernetzungsreaktion in diesem Konzentrationsregime hindeutet.

Dass das Dimer den größten Anteil der Quervernetzungsprodukte ausmachte, kann als erster Hinweis auf den Oligomerisierungszustand der Dimerisierungs-Domäne in Lösung verstanden werden.

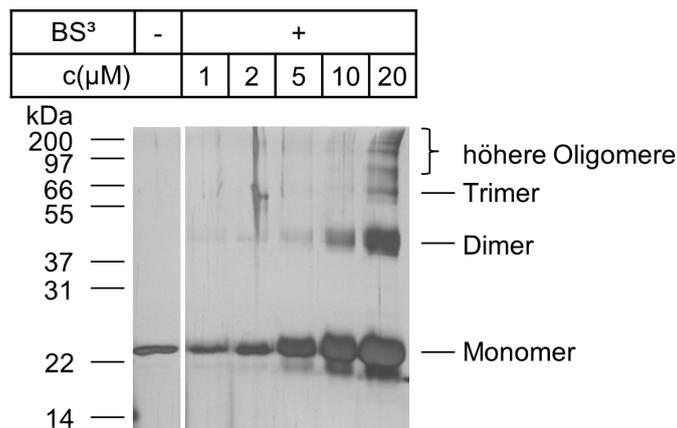


Abb. 5.17: Quervernetzungs-Experimente mit der Yos9-DD (Yos9₂₆₆₋₄₂₄).

Analytische Ultrazentrifugation

Zur genauen Bestimmung des Oligomerisierungszustands von Yos9 in Lösung wurden Sedimentations-Gleichgewichts-Experimente mit dem Volle-Länge-Protein Yos9₂₄₋₅₃₉ und der DD Yos9₂₆₆₋₄₂₄ durchgeführt. Beide Proteine wiesen über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich hinweg ein dem Dimer entsprechendes Molekulargewicht auf (Abb. 5.18). Yos9 liegt demnach auch in Lösung als Dimer vor, und weiterhin ist die Yos9-DD an der Dimerisierung beteiligt.

Um zu untersuchen, ob das Dimer in der asymmetrischen Einheit des Kristalls dem Dimer in Lösung entspricht, wurden zur Destabilisierung des Dimers Mutationen in das Konstrukt Yos9₂₆₆₋₄₂₄ durch QuikChange-Mutagenese eingeführt. Die Proteine wurden wie zuvor beschrieben in Rosetta2(DE3) T1^R rekombinant hergestellt und gereinigt. Sedimentations-Gleichgewichts-Experimente mit den mutierten Proteinen zeigten, dass zwei Mutationen innerhalb des β -Sandwichs (N380 bzw. L393) die Dimerisierung der Yos9-DD innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs verhinderten (Abb. 5.18). Die CD-spektroskopische Untersuchung lieferte keinen Hinweis auf eine veränderte Faltung der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5.19). Eine Störung der Selbst-

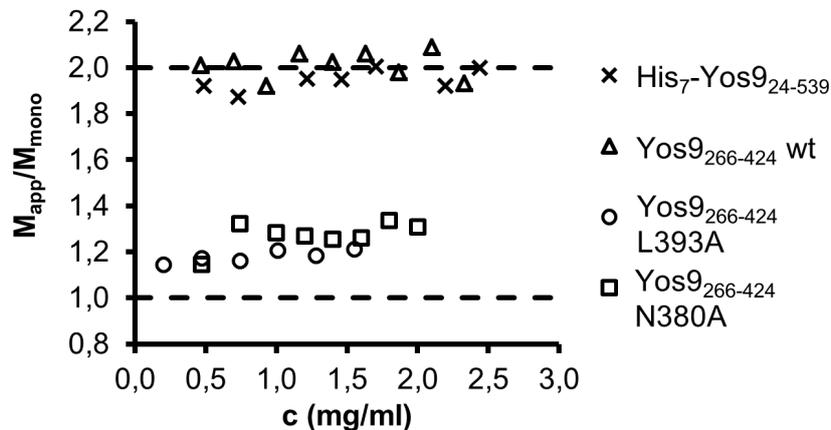


Abb. 5.18: Sedimentations-Gleichgewichts-Experimente mit Yos9. Aufgetragen sind der Quotient zwischen der apparenten Molmasse M_{app} und der Molmasse des Monomers M_{mono} gegen die Konzentration.

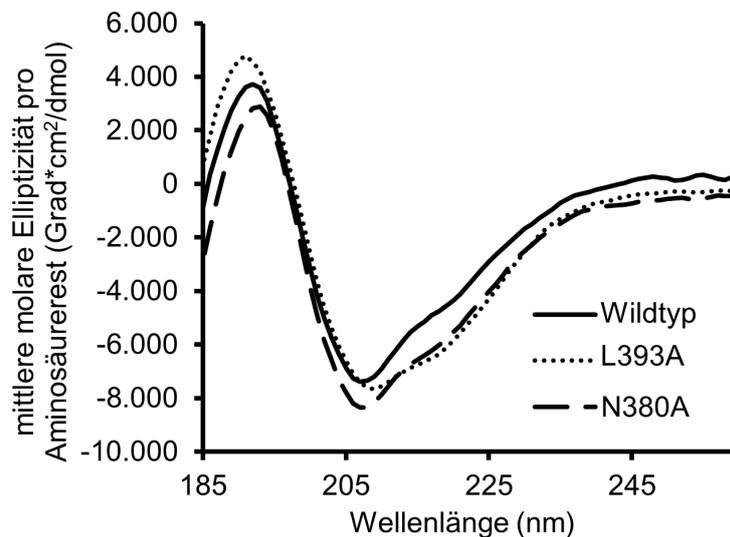


Abb. 5.19: CD-Spektren der Yos9₂₆₆₋₄₂₄-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Assoziation allein aufgrund einer möglichen Fehlfaltung der Mutanten ist damit weitgehend ausgeschlossen.

Der Aminosäurerest N380 liegt am Ende von β -Strang 6. Seine Seitenketten-Amidgruppe bildet Wasserstoffbrücken zur Carbonylgruppe von F392 und L393 und ist damit an vier von insgesamt 20 Wasserstoffbrücken in der Dimerisierungsfläche beteiligt. L393 liegt am Beginn von β -Strang 7. Seine Seitenkette steht in Kontakt mit den Seitenketten der Aminosäurereste L351 und F383 und trägt damit durch hydrophobe Interaktion zur Stabilisierung des Dimers bei.

Die Sedimentations-Gleichgewichts-Experimente zeigen, dass die Dimerisierung der Yos9-DD durch die Mutation von N380 bzw. L393 zu Alanin stark gestört wird. Da

beide Aminosäurereste an keinen anderen im Kristall beobachteten Kontakten beteiligt sind, entspricht das in Lösung vorliegende Dimer mit großer Wahrscheinlichkeit dem Dimer in der asymmetrischen Einheit des Kristalls.

5.1.7 Bindungsstudien zwischen *Yos9* und *Hrd3*

Pulldown-Experimente

In vorangegangenen Co-Immunpräzitations-Versuchen führte die Deletion von *Yos9*₂₅₀₋₄₂₀ *in vivo* zur Aufhebung der Interaktion zwischen *Yos9* und *Hrd3* (Gauss *et al.* 2006a). Daraus wurde der Schluss gezogen, dass diese Domäne von *Yos9* die Bindung zu *Hrd3* vermittelt. In dem darauf aufbauenden funktionellen Modell wird *Yos9* durch die direkte Bindung an *Hrd3* in die Nähe des ebenfalls an *Hrd3* gebundenen Substrats gebracht. Bindet die MRH-Domäne von *Yos9* einen endständigen α -1,6-verknüpften Mannoserest an der Substratoberfläche, wird das Substrat der Retrotranslokation zugeführt.

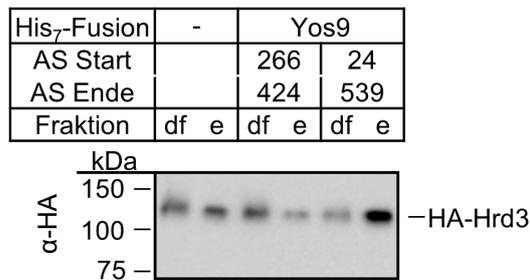


Abb. 5.20: Pulldown zwischen *Yos9* und *Hrd3*. Rekombinant hergestelltes und gereinigtes Heptahistidin-Fusionsprotein (*Yos9*) wurde mit mikrosomalem Extrakt eines *Yos9*-deletierten Hefestamms inkubiert, der *Hrd3* als HA-Fusion exprimiert. Links: Kontrolle ohne *Yos9*; Hintergrundbindung von HA-*Hrd3* an die Affinitätsmatrix. df: Durchfluss, e: Eluat.

Um die Interaktion der *Yos9*-DD an *Hrd3* *in vitro* zu überprüfen, wurden *Pulldown*-Versuche mit gereinigtem *Yos9* und mikrosomalem Extrakt eines *Yos9*-deletierten Hefestamms durchgeführt. Die rekombinant in *E. coli* hergestellten und gereinigten Heptahistidin-Fusionsproteine *Yos9*₂₄₋₅₃₉ (Volle-Länge-Protein) bzw. *Yos9*₂₆₆₋₄₂₄ (DD) wurden an eine Co^{2+} -Affinitätsmatrix (Talon) gebunden und mit mikrosomalem Extrakt aus einem *Yos9*-deletierten Hefestamm inkubiert, der *Hrd3* als HA-Fusionsprotein exprimiert (Abb. 5.20). Nach dem Waschen der Affinitätsmatrix wurden gebundene Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion mit anti-HA-Antikörper analysiert. Während ein deutliches Signal für die Bindung von HA-*Hrd3* an das Volle-Länge-Protein beobachtet wurde, konnte keine über das Hintergrundsignal hinausgehende Bindung an die *Yos9*-DD festgestellt werden.

Um die *Hrd3*-Bindestelle von *Yos9* *in vitro* zu charakterisieren, wurden weitere Versuche mit verkürzten *Yos9*-Varianten durchgeführt. Wegen des starken Hintergrundsignals in *Pulldown*-Versuchen mit Talon-Material (Abb. 5.20) wurden stattdessen Co-Immunpräzitations-Versuche durchgeführt. *Hrd3* wurde wie zuvor als HA-Fusion in einem *Yos9*-deletierten Hefestamm exprimiert und in Anwesenheit von Heptahistidin-fusioniertem *Yos9* aus mikrosomalem Extrakt immunpräzipitiert. Nach dem Waschen

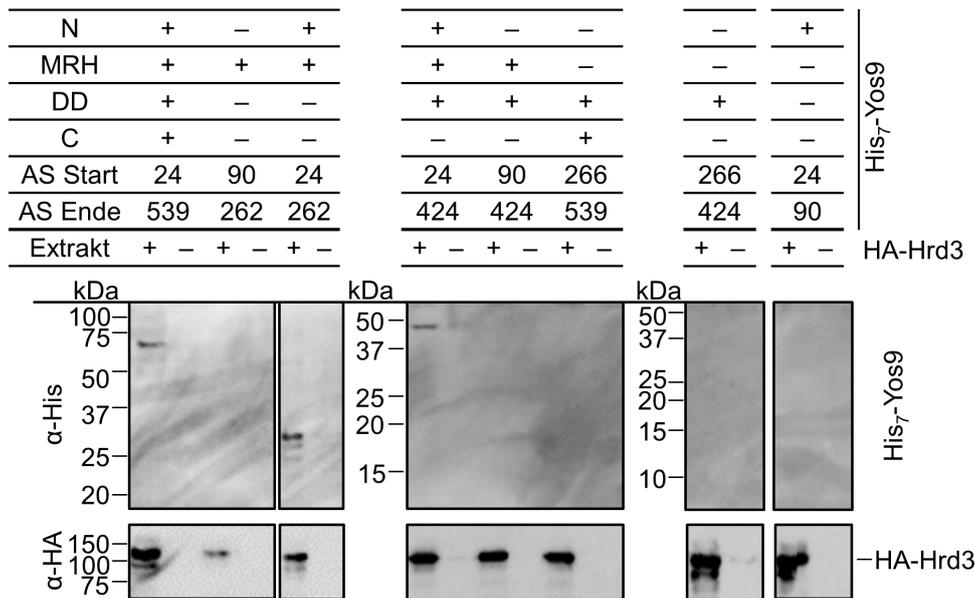


Abb. 5.21: Co-Immunpräzipitations-Versuche mit verkürzten Yos9-Varianten. HA-markiertes Hrd3 wurde in Anwesenheit von Heptahistidin-markierten Yos9-Konstrukten aus mikrosomalem Extrakt immunpräzipitiert. Oberer Blot: anti-His-, unterer Blot: anti-HA-Immundetektion. Start- und End-Aminosäure der Yos9-Konstrukte und die enthaltene Domänen sind im oberen Bereich angegeben. N: N-Terminus, MRH: MRH-Domäne, DD: Dimerisierungs-Domäne, C: C-Terminus.

der Matrix wurden gebundene Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE, Western-Blot und Immundetektion mit anti-His- bzw. anti-HA-Antikörper untersucht. Auch in diesem Experiment interagierte das Volle-Länge-Protein Yos9₂₄₋₅₃₉, nicht aber die DD Domäne Yos9₂₆₆₋₄₂₄ mit Hrd3. Mit HA-Hrd3 wurden ausschließlich Yos9-Konstrukte co-immunpräzipitiert, die sowohl den N-Terminus (AS 24-90) als auch die MRH-Domäne (AS 90-262) enthielten. Somit deuten die mit rekombinantem Yos9 durchgeführten Interaktionsstudien darauf hin, dass nicht die Yos9-DD, sondern der N-terminale Bereich von Yos9 (AS 24-262) mit Hrd3 interagiert.

5.1.8 Substratabbau

Der Einfluss einer Destabilisierung des Yos9-Dimers auf den Substratabbau wurde durch *Pulse-Chase*-Experimente mit dem luminalen ERAD-Substrat CPY* untersucht. Die Abbaukinetik der Yos9-Mutante N380A und der Doppelmutante N380A / L393A wurde mit dem Wildtyp-Protein und mit einem Yos9- bzw. Hrd3-Deletionsstamm verglichen (Abb. 5.22).

Die Mutanten weisen eine dem Wildtyp entsprechende Abbaukinetik auf, was darauf hindeutet, dass die Dimerisierung der Yos9-DD keinen entscheidenden Einfluss auf seine Funktion innerhalb des HRD-Komplexes ausübt. Es wurde hier jedoch nicht ausgeschlossen, dass weitere Domänen von Yos9 an der Dimerisierung beteiligt sind. Demnach

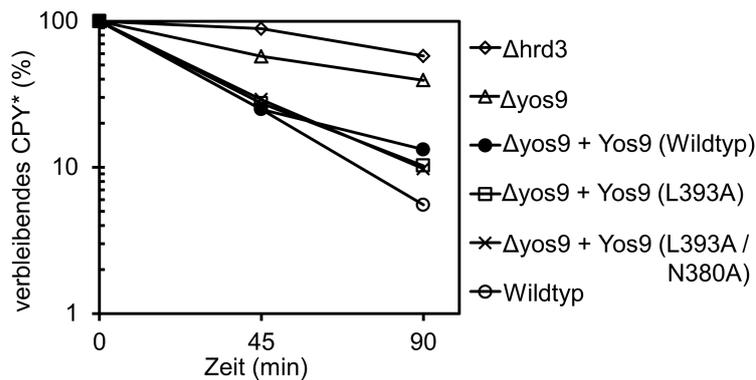


Abb. 5.22: *Pulse-Chase*-Experiment von Franziska Zimmermann zum Einfluss von Mutationen innerhalb der Dimerisierungsfläche der Yos9-DD auf den Substratabbau. Der zeitliche Verlauf des Abbaus des luminalen ERAD-Substrats CPY* wird mit Wildtyp- und Deletions-Stämmen verglichen.

besteht die Möglichkeit, dass die Volle-Länge-Mutanten weiterhin zur Dimerisierung fähig sind.

5.2 Diskussion

Erst seit kurzem stehen mit der Struktur der MRH-Domäne des homologen Säugerproteins OS-9 (Sato *et al.* 2010) erste strukturelle Informationen zu Yos9 zur Verfügung, die über die Homologie zu Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren hinausgehen. Die Bestimmung der Struktur der Yos9-DD in dieser Arbeit hat somit einen ersten strukturellen Einblick in die funktionell kaum charakterisierten Domänen des Proteins eröffnet (N, C, DD in Abb. 5.1). Anhand der Struktur der Yos9-DD konnten Rückschlüsse auf die Funktion dieser Domäne bei der Selbst-Assoziation von Yos9 gezogen werden. Die postulierte Funktion der Yos9-DD, die Bindung an Hrd3, konnte dagegen *in vitro* nicht verifiziert werden. Im Gegensatz zu den Co-Immünpräzipitations-Versuchen *in vivo* (Gauss *et al.* 2006a) deuten die hier durchgeführten Interaktionsstudien mit rekombinantem Yos9 auf eine Beteiligung der N-terminalen Domänen (AS 24-262) an der Bindung zu Hrd3 hin.

5.2.1 Struktur

Ein kleiner Teil der Elektronendichte wird durch das Modell nicht erklärt. Diese Elektronendichte befindet sich in der Furche zwischen $\alpha 2$ und $\beta 6$ von Molekül B in der asymmetrischen Einheit und kann durch keines der im Kristallisationsansatz befindlichen Moleküle wie Glycerin und DTT zufriedenstellend ausgefüllt werden. Möglicherweise handelt es sich um ein unbekanntes Molekül, das z.B. aus der Kristallisationsplatte in den Tropfen diffundiert ist. Wahrscheinlicher jedoch handelt es sich um einen Teil des flexiblen C-Terminus des Konstrukts, für den ansonsten keine Elektronendichte vorhanden ist. Diese Erklärung wird dadurch unterstützt, dass diese Furche in Molekül A ebenfalls durch ein Peptid ausgefüllt wird, nämlich durch den langgestreckten N-Terminus eines benachbarten Moleküls. Die nicht erklärte Elektronendichte ist nicht ausreichend definiert, um eine Peptidsequenz zuzuordnen, jedoch lässt sich ein Peptid mit einer Länge von vier Amino-

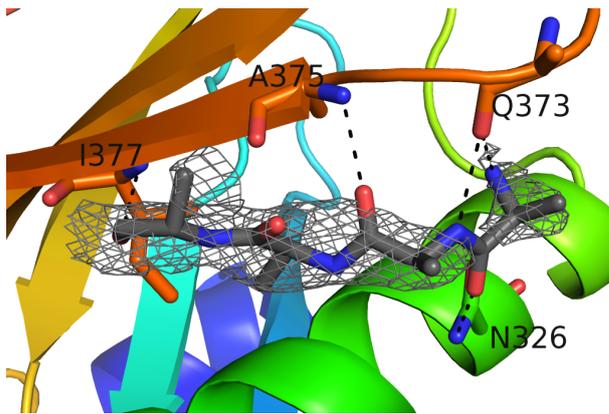


Abb. 5.23: Nicht erklärte Elektronendichte zwischen $\alpha 2$ und $\beta 6$ von Molekül B, konturiert bei 1σ . Dargestellt ist ein in die Elektronendichte eingepasstes Tetraalanin-Peptid mit polaren Kontakten zu benachbarten Aminosäureresten.

säureresten einpassen (Abb. 5.23). Naheliegender wäre, dass es sich um einen Teil der als geordnet vorhergesagten C-terminalen Reste des Konstrukts handelt (Anhang, Abb. A).

Um eine möglicherweise verbesserte Auflösung durch eine geeignetere Kristallpackung zu erreichen, wurde ein Konstrukt ohne den ungeordneten C-terminalen Bereich entworfen (*Yos9*₂₆₆₋₃₉₄), jedoch wurde keine ausreichende Expression erzielt. Durch das Weiterverfolgen dieses Ansatzes mit anderen Konstruktgrenzen, zum Beispiel *Yos9*₂₆₆₋₃₉₉, könnte eine dichtere Kristallpackung und eine möglicherweise höher aufgelöste Struktur erreicht werden. Die Kristallisation in einer anderen Kristallform könnte darüber hinaus die Uneindeutigkeit in der Konformation des N-Terminus der *Yos9*-DD beseitigen.

5.2.2 Assoziation mit Hrd3

Die Funktion der *Yos9*-DD wurde durch vorangegangene Co-Immunpräzipitations-Versuche mit verkürzten Konstrukten von *Yos9* zunächst als Hrd3-Bindungsstelle charakterisiert (Gauss *et al.* 2006a). Diese funktionelle Zuordnung konnte durch die hier durchgeführten *in vitro*-Experimente nicht bestätigt werden. Nur solche rekombinanten *Yos9*-Konstrukte assoziierten mit Hrd3, die den N-Terminus des Proteins inklusive der MRH-Domäne beinhalteten (AS 24-262), während die *Yos9*-DD nicht für die Bindung benötigt wurde. In den nativen Co-Immunpräzipitations-Versuchen dagegen war die MRH-Domäne verzichtbar, und eine Verkürzung von *Yos9* C-terminal von Aminosäure 250 führte zur Aufhebung der Bindung zu Hrd3 (Gauss *et al.* 2006a).

Demgegenüber stimmt die in dieser Arbeit beobachtete Beteiligung der MRH-Domäne an der Bindung mit Ergebnissen zur Bindung des humanen Ortholog von *Yos9* (OS-9) an das humane Hrd3-Ortholog (SEL1L) überein, für die eine funktionsfähige MRH-Domäne benötigt wird (Christianson *et al.* 2008). Da die CD-spektroskopische Untersuchung des isolierten N-Terminus (*Yos9*₂₄₋₉₀) einen Anteil von etwa 38% ungeordneter Struktur nahelegt (Abb. 5.4 und Tab. 5.1), ist es allerdings denkbar, dass die Bindung an Hrd3 zwar vom N-Terminus von *Yos9* vermittelt wird (AS 24-90), für dessen Stabilisierung aber zusätzlich die MRH-Domäne benötigt wird.

In den *in-vivo*-Bindungsstudien an Yos9 wurde eine Instabilität von Yos9₁₋₂₅₀ beobachtet, von der vermutet wurde, dass sie auf einer Fehlfaltung des Konstrukts beruht (Gauss *et al.* 2006a). Bei einer tatsächlichen Fehlfaltung von Yos9₁₋₂₅₀ im *in-vivo*-System ist es möglich, dass die Aufhebung der Bindung an Hrd3 durch eine Fehlfaltung der Bindungsstelle verursacht wurde und nicht durch das Fehlen der Bindungsstelle im Konstrukt. Dies würde die Diskrepanz zu den *in-vitro*-Bindungsstudien in dieser Arbeit erklären, in denen Yos9₂₄₋₂₆₂ mit Hrd3 co-immunpräzipitierte und die DD nicht an der Bindung beteiligt war. Eine Substrat-vermittelte Bindung der verkürzten Konstrukte mit enthaltener MRH-Domäne ist zwar nicht vollständig auszuschließen, jedoch sollte sie unterhalb des Detektionsniveaus liegen, da weder die isolierte MRH-Domäne (Yos9₉₀₋₂₆₂) noch die MRH-Domäne in Kombination mit der DD (Yos9₉₀₋₄₂₄) mit Hrd3 co-immunpräzipitierte.

5.2.3 Selbst-Assoziation

Auf der Basis der Kristallstruktur der Yos9-DD mit ergänzenden biophysikalischen Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine Selbst-Assoziation auf luminaler Seite des HRD-Komplexes nachgewiesen. Entgegen vorhergehender Gelfiltrationsergebnisse, die eine Trimerisierung von Yos9 nahelegten (Quan *et al.* 2008), wurde in Sedimentations-Gleichgewichts-Versuchen eine Dimerisierung der Yos9-DD und des Volle-Länge-Proteins beobachtet. Die Übereinstimmung zwischen dem Dimer in der asymmetrischen Einheit der Kristallstruktur mit dem Dimer in Lösung wurde durch Mutagenese-Studien bestätigt.

Selbst-Assoziation von Komponenten des HRD-Komplexes wurde bisher für Derlin1, das Säuger-Homolog von Der1 (Lilley und Ploegh 2005; Ye *et al.* 2005), und für die cytosolischen Domänen von Usa1 und Hrd1 beschrieben (Horn *et al.* 2009; Carvalho *et al.* 2010, Abschnitt 4). In der Studie zu Derlin1 wurde dabei nicht gezeigt, dass das Protein unabhängig von Usa1 und Hrd1 oligomerisiert, da deren Selbst-Assoziationsfähigkeit noch nicht bekannt war. Obwohl der Oligomerisierungszustand des HRD-Komplexes nicht abschließend geklärt ist, gibt es Hinweise auf das Vorliegen des HRD-Komplexes (Carvalho *et al.* 2006; Horn *et al.* 2009) bzw. des Usa1-Hrd1-Subkomplexes (Abschnitt 4.1.3) als Dimer. Eine Dimerisierung der Ubiquitinligase Hrd1 wäre zudem aufgrund der beschriebenen Homo-Dimerisierung anderer RING-Finger-Ubiquitinligasen zu erwarten (Knipscheer und Sixma 2007; Horn *et al.* 2009). Die hier *in vitro* nachgewiesene Dimerisierung der luminalen Komponente Yos9 kann damit als ein weiteres Indiz für eine Dimerisierung des HRD-Komplexes verstanden werden.

Die Destabilisierung des Yos9-Dimers durch die Mutationen N380A und L393A zeigte keinen Einfluss auf den Abbau des luminalen ERAD-Substrats CPY*. Die Funktion der HRD-Ligase hängt zwar von ihrem Oligomerisierungs-Zustand ab, jedoch scheint die Selbst-Assoziation des Komplexes überwiegend durch Usa1 induziert zu werden (Horn *et al.* 2009; Carvalho *et al.* 2010). Für die Störung der Selbst-Assoziation einer weni-

ger zentralen Komponente wie *Yos9* ist vor diesem Hintergrund kein deutlicher Einfluss auf die HRD-Ligase-Funktion zu erwarten. Darüber hinaus ist es möglich, dass weitere Dimerisierungs-Stellen innerhalb von *Yos9* existieren, die eine Dimersierung des Voll-Länge-Proteins auch bei einer destabilisierten Dimerisierungsfläche innerhalb der *Yos9*-DD ermöglichen.

6 Abschließendes Modell

Die Ergebnisse dieser Arbeit können in einem Modell zusammengefasst werden, in dem der HRD-Komplex ausgehend von der zentralen Komponente Usa1 dimerisiert, wobei die intrinsische Selbst-Assoziation weiterer Komponenten zur Dimerisierung beiträgt (Abb. 6.1).

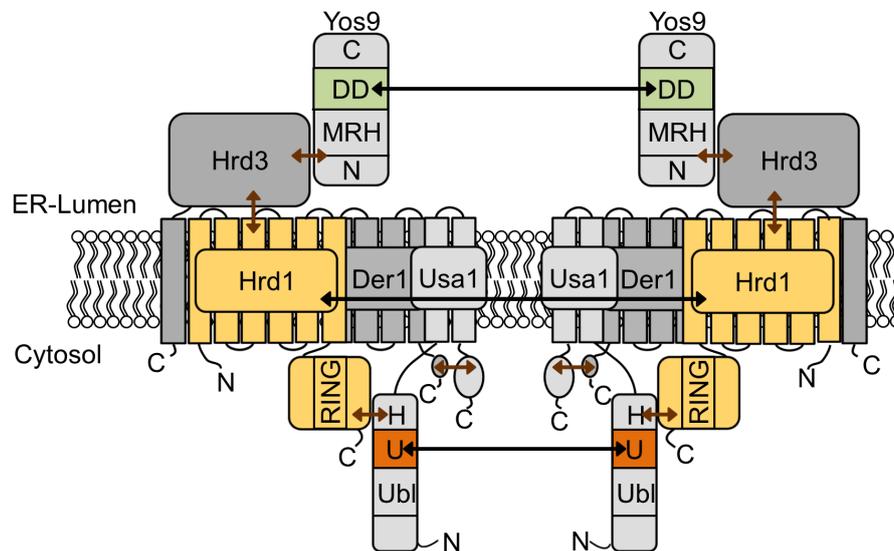


Abb. 6.1: Modell zur Dimerisierung des HRD-Komplexes. Braune Pfeile weisen auf Hetero-Assoziation, schwarze Pfeile auf Selbst-Assoziation der betreffenden Proteine hin. Selbst-assoziiierende Proteine oder, sofern bekannt, ihre beteiligten Domänen sind farbig hervorgehoben. Gelb: Hrd1, orange: U-Segment der N-terminalen cytosolischen Domäne von Usa1 (Carvalho *et al.* 2010), grün: Yos9-DD. Der1 ist im Hintergrund von Usa1 und Hrd1 dargestellt, um die Nähe zwischen Der1, Hrd1 und Hrd3 zu verdeutlichen, die durch Quervernetzungs-Experimente mit Substrat nahegelegt wird (Carvalho *et al.* 2010; Stanley *et al.* 2011).

Vor dem Hintergrund, dass die von Usa1 induzierte Selbst-Assoziation für die Ubiquitin-Ligase-Funktion des HRD-Komplexes essentiell ist (Carvalho *et al.* 2010), erscheint es plausibel, dass die Selbst-Assoziation des HRD-Komplexes überwiegend von Usa1 abhängt. Andererseits werden Protein-Protein-Interaktionen in der Regel durch viele schwache Wechselwirkungen stärker stabilisiert als durch wenige starke. Übertragen auf die Selbst-Assoziation des HRD-Komplexes bedeutet dies einen Zugewinn an Stabilität aufgrund der unabhängigen Selbst-Assoziation seiner Komponenten. Es gibt Hinweise darauf, dass die Bindung von Substrat an den HRD-Komplex der Usa1-induzierten Selbst-

Assoziation entgegenwirkt (Carvalho *et al.* 2010). Bei einer Dissoziation des Dimers aufgrund der Bindung von Substrat könnte die autonome Selbst-Assoziation peripherer Komponenten eine raschere Dimerisierung des Gesamtkomplexes ermöglichen, als es bei einer allein von Usa1 ausgehenden Selbst-Assoziation der Fall wäre.

Eine Selbst-Assoziation ist auch für Hrd3 zu erwarten, das in einem 1:1-Verhältnis zu Hrd1 vorliegt (Gardner *et al.* 2000), wurde aber noch nicht unabhängig von Usa1 und Hrd1 nachgewiesen. Zukünftige Studien zur Quantifizierung der Selbst-Assoziationsbeiträge der einzelnen Komponenten des HRD-Komplexes und zum Einfluss der Oligomerisierung auf Substratbindung und -prozessierung könnten weitere wertvolle Einblicke in die Funktion der HRD-Ligase ermöglichen.

7 Zusammenfassung / Abstract

7.1 Zusammenfassung

Fehlgefaltete Proteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) aussortiert und in einem Vorgang, der als ER-assoziierte Protein-Degradation (ERAD) bezeichnet wird, dem Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg im Cytosol zugeführt. In Hefe spielt dabei der HRD-Komplex eine zentrale Rolle. Dieser Ubiquitinligase-Komplex besteht aus der RING-Finger E3-Ubiquitinligase Hrd1 und ihrem Interaktionspartner Hrd3, Der1, das durch Usa1 rekrutiert wird, und Yos9. Das Substrat-erkennende Protein Yos9 bindet auf der luminalen Seite des Komplexes an die luminaire Domäne des Membranproteins Hrd3. Hrd3 interagiert mit ERAD-Substraten unabhängig von ihrem Glykosylierungsstatus, während Yos9 spezifische Oligosaccharidstrukturen gebundener Substrate erkennt, die eine Fehlfaltungen signalisieren. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen zwischen Usa1 und Hrd1 sowie zwischen Yos9 und Hrd3. Darüber hinaus sollten Einblicke in die molekulare Struktur dieser Proteine gewonnen werden.

Die direkte Interaktion zwischen den cytosolischen Domänen von Usa1 und Hrd1 wurde mit biophysikalischen Methoden *in vitro* nachgewiesen. Die Proteine assoziieren in einer 1:1-Stöchiometrie mit einer Dissoziationskonstante im oberen nanomolaren Bereich. Der Oligomerisierungszustand des Komplexes konnte nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Während die Masse des Komplexes im statischen Lichtstreu-Experiment auf eine 2+2-Assoziation hindeutet, entspricht sie in der analytischen Ultrazentrifugation einer 1+1-Assoziation. Vor kurzem wurde eine Selbst-Assoziation von Usa1 und Hrd1, basierend auf ihren cytosolischen Domänen, nachgewiesen. Vor diesem Hintergrund scheint der 2+2-Assoziationsmodus der Realität in der Zelle näherzukommen, dies sollte jedoch durch weitere Untersuchungen validiert werden.

Die Kristallstruktur der postulierten Hrd3-Bindedomäne von Yos9, nachfolgend DD (Dimerisierungs-Domäne) benannt, wurde bei einer Auflösung von 2,5 Å bestimmt. Basierend auf der Dimerisierung der DD in der Struktur wurde die Selbst-Assoziation von Yos9 untersucht. Die Dimerisierung der Yos9-DD und des Volle-Länge-Proteins in Lösung wurde durch analytische Ultrazentrifugation nachgewiesen. Mutagenese-Studien bestätigten eine übereinstimmende Dimer-Anordnung im Kristall und in Lösung.

Zusätzliche biochemische Untersuchungen konnten eine Beteiligung der Yos9-DD an der Interaktion zu Hrd3 nicht bestätigen. Stattdessen wurde die Interaktion *in vitro* durch

den N-terminalen Bereich von Yos9 inklusive der MRH-Domäne (aa 24-262) vermittelt.

Die Struktur der Yos9-DD stellt den ersten strukturellen Einblick in die funktionell wenig charakterisierten Domänen von Yos9 dar. Darüber hinaus wurde hier erstmalig eine Selbst-Assoziation auf der luminalen Seite des HRD-Komplexes beschrieben. Die Dimerisierung von Yos9 unterstützt damit das Modell eines dimeren HRD-Komplexes.

7.2 Abstract

In the endoplasmic reticulum (ER), misfolded proteins are targeted for degradation by a pathway frequently called ER-associated protein degradation (ERAD). In yeast, the HRD complex plays a central role in this pathway. This ubiquitin ligase complex consists of the RING-finger E3 ubiquitin ligase Hrd1 and its binding partner Hrd3, Der1, which is recruited by Usa1, and Yos9. The recognition factor Yos9 resides on the luminal side of the complex, where it binds to the luminal domain of the membrane anchored Hrd3. Hrd3 interacts with ERAD substrates regardless of their glycosylation state, while Yos9 scans bound substrates for glycan structures that indicate misfolding. This thesis aimed at elucidating protein-protein interactions between Usa1 and Hrd1 and between Yos9 and Hrd3, as well as gaining insights into the molecular structure of these components.

A direct interaction between the cytosolic domains of Usa1 and Hrd1 was demonstrated *in vitro* using biophysical methods. The proteins interact in a 1:1 stoichiometry with a dissociation constant in the upper nanomolar range. Data concerning the oligomeric state of the complex are inconsistent, with static light scattering indicating a 2+2 association mode, while analytical ultracentrifugation indicates a 1+1 association. As both Usa1 and Hrd1 were recently shown to self-associate based on their cytosolic domains, the 2+2 association mode is more likely to represent the situation within the cell, but this still has to be validated.

The crystal structure of the postulated Hrd3 binding domain of Yos9, here denoted DD (dimerization domain), was analyzed at 2.5 Å resolution. Based on the dimeric arrangement in this structure, the self-association of Yos9 was studied. Analytical ultracentrifugation demonstrated the dimeric assembly of both the DD and full-length Yos9 in solution. Mutagenesis studies confirmed that the dimeric arrangement in the crystal structure is consistent with the arrangement in solution.

Additional biochemical assays indicated that the Yos9-DD does not confer binding to the HRD complex, as suggested by previous experiments. Instead, the N-terminal part of Yos9 including the MRH domain (aa 24-262) mediated the interaction *in vitro*.

The Yos9-DD structure represents the first structural insight into the sparsely annotated regions of Yos9. Furthermore, this is the first time that self-association on the luminal side of the HRD complex has been reported. Finally, the dimeric arrangement of Yos9 supports the model of a dimeric state of the HRD complex.

Literaturverzeichnis

- Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D* **66**: 213–221
- Adler AJ, Greenfield NJ, Fasman GD (1973) Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol* **27**: 675–735
- Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M (2010) N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* **35**: 74–82
- Behlke J, Ristau O, Schönfeld HJ (1997) Nucleotide-dependent complex formation between the Escherichia coli chaperonins GroEL and GroES studied under equilibrium conditions. *Biochemistry* **36**: 5149–5156
- Berman H, Henrick K, Nakamura H (2003) Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol* **10**: 980
- Bernardi KM, Forster ML, Lencer WI, Tsai B (2008) Derlin-1 facilitates the retrotranslocation of cholera toxin. *Mol Biol Cell* **19**: 877–884
- Bernardi KM, Williams JM, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz EJ, Ye Y, Tsai B (2010) The E3 ubiquitin ligases Hrd1 and gp78 bind to and promote cholera toxin retrotranslocation. *Mol Biol Cell* **21**: 140–151
- Bhamidipati A, Denic V, Quan EM, Weissman JS (2005) Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol Cell* **19**: 741–751
- Biederer T, Volkwein C, Sommer T (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* **278**: 1806–1809
- Bordallo J, Plemper RK, Finger A, Wolf DH (1998) Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* **9**: 209–222

- Buschhorn BA, Kostova Z, Medicherla B, Wolf DH (2004) A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins. *FEBS Lett* **577**: 422–426
- Carvalho P, Goder V, Rapoport TA (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**: 361–373
- Carvalho P, Stanley AM, Rapoport TA (2010) Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell* **143**: 579–591
- Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D* **66**: 12–21
- Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR (2008) OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* **10**: 272–282
- Clerc S, Hirsch C, Oggier DM, Deprez P, Jakob C, Sommer T, Aebi M (2009) Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **184**: 159–172
- Cohen SL, Ferré-D’Amaré AR, Burley SK, Chait BT (1995) Probing the solution structure of the DNA-binding protein Max by a combination of proteolysis and mass spectrometry. *Protein Sci* **4**: 1088–1099
- Cuff AL, Sillitoe I, Lewis T, Redfern OC, Garratt R, Thornton J, Orengo CA (2009) The CATH classification revisited—architectures reviewed and new ways to characterize structural divergence in superfamilies. *Nucleic Acids Res* **37**: D310–D314
- Denic V, Quan EM, Weissman JS (2006) A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* **126**: 349–359
- Diederichs K, Karplus PA (1997) Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol* **4**: 269–275
- Dong A, Xu X, Edwards AM, for Structural Genomics MC, Consortium SG, Chang C, Chruszcz M, Cuff M, Cymborowski M, Leo RD, Egorova O, Evdokimova E, Filippova E, Gu J, Guthrie J, Ignatchenko A, Joachimiak A, Klostermann N, Kim Y, Korniyenko Y, Minor W, Que Q, Savchenko A, Skarina T, Tan K, Yakunin A, Yee A, Yim V, Zhang R, Zheng H, Akutsu M, Arrowsmith C, Avvakumov GV, Bochkarev A, Dahlgren LG, Dhe-Paganon S, Dimov S, Dombrowski L, Finerty P, Flodin S, Flores A, Gräslund S, Hammerström M, Herman MD, Hong BS, Hui R, Johansson I, Liu Y, Nilsson M, Nedyalkova L, Nordlund P, Nyman T, Min J, Ouyang H, won Park H, Qi C, Rabeh

- W, Shen L, Shen Y, Sukumard D, Tempel W, Tong Y, Tresagues L, Vedadi M, Walker JR, Weigelt J, Welin M, Wu H, Xiao T, Zeng H, Zhu H (2007) In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. *Nat Methods* **4**: 1019–1021
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D* **66**: 486–501
- Evans G, Pettifer RF (2001) CHOOCH: A program for deriving anomalous scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *J Appl Crystallogr* **34**: 82–86
- Gardner RG, Swarbrick GM, Bays NW, Cronin SR, Wilhovsky S, Seelig L, Kim C, Hampton RY (2000) Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol* **151**: 69–82
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins M, Appel R, Bairoch A (2005) *The Proteomics Protocols Handbook*, Kap. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server, 571–607. Humana Press
- Gauss R, Jarosch E, Sommer T, Hirsch C (2006a) A complex of Yos9p and the HRD ligase integrates endoplasmic reticulum quality control into the degradation machinery. *Nat Cell Biol* **8**: 849–854
- Gauss R, Sommer T, Jarosch E (2006b) The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-luminal substrate selection and Cdc48p recruitment. *EMBO J* **25**: 1827–1835
- Gauss R, Trautwein M, Sommer T, Spang A (2005) New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**: 1–12
- Hammond C, Helenius A (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 523–529
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580
- Harrington WF, Kegeles G (1973) Pressure effects in ultracentrifugation of interacting systems. *Methods Enzymol* **27**: 306–345
- Hartmann-Petersen R, Hendil KB, Gordon C (2003a) Ubiquitin binding proteins protect ubiquitin conjugates from disassembly. *FEBS Lett* **535**: 77–81
- Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C (2003b) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* **28**: 26–31
- Hayes D, Laue T, Philo J (1995) Program Sednterp: Sedimentation Interpretation Program, Thousand Oaks, CA

- Haynes CM, Caldwell S, Cooper AA (2002) An HRD/DER-independent ER quality control mechanism involves Rsp5p-dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. *J Cell Biol* **158**: 91–101
- Hebert DN, Bernasconi R, Molinari M (2010) ERAD substrates: which way out? *Semin Cell Dev Biol* **21**: 526–532
- Hebert DN, Garman SC, Molinari M (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol* **15**: 364–370
- Heinemann U, Büssov K, Mueller U, Umbach P (2003) Facilities and methods for the high-throughput crystal structural analysis of human proteins. *Acc Chem Res* **36**: 157–163
- Helenius A (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **5**: 253–265
- Helenius A, Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 1019–1049
- Hendrickson WA, Smith JL, Sheriff S (1985) Direct phase determination based on anomalous scattering. *Methods Enzymol* **115**: 41–55
- Herrera JE, Correia JJ, Jones AE, Olson MO (1996) Sedimentation analyses of the salt- and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23. *Biochemistry* **35**: 2668–2673
- Herscovics A, Romero PA, Tremblay LO (2002) The specificity of the yeast and human class I ER alpha 1,2-mannosidases involved in ER quality control is not as strict as previously reported. *Glycobiology* **12**: 14G–15G
- Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**: 761–807
- Hirao K, Natsuka Y, Tamura T, Wada I, Morito D, Natsuka S, Romero P, Sleno B, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K, Hosokawa N (2006) EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J Biol Chem* **281**: 9650–9658
- Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T (2009) The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* **458**: 453–460
- Ho MS, Tsai PI, Chien CT (2006) F-box proteins: the key to protein degradation. *J Biomed Sci* **13**: 181–191

- Horn SC, Hanna J, Hirsch C, Volkwein C, Schütz A, Heinemann U, Sommer T, Jarosch E (2009) Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase. *Mol Cell* **36**: 782–793
- Hutchinson EG, Thornton JM (1993) The Greek key motif: extraction, classification and analysis. *Protein Eng* **6**: 233–245
- Huyer G, Piluek WF, Fansler Z, Kreft SG, Hochstrasser M, Brodsky JL, Michaelis S (2004) Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispinning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* **279**: 38369–38378
- Ismail N, Ng DTW (2006) Have you HRD? Understanding ERAD is DOAble! *Cell* **126**: 237–239
- Jakob CA, Bodmer D, Spirig U, Battig P, Marcil A, Dignard D, Bergeron JJ, Thomas DY, Aebi M (2001) Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* **2**: 423–430
- Jakob CA, Burda P, Roth J, Aebi M (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* **142**: 1223–1233
- Jakob U, Meyer I, Bügl H, André S, Bardwell JC, Buchner J (1995) Structural organization of procaryotic and eucaryotic Hsp90. Influence of divalent cations on structure and function. *J Biol Chem* **270**: 14412–14419
- Johnson WC (1999) Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* **35**: 307–312
- Kabani M, Kelley SS, Morrow MW, Montgomery DL, Sivendran R, Rose MD, Gierasch LM, Brodsky JL (2003) Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol Biol Cell* **14**: 3437–3448
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D* **66**: 125–132
- Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowyra D, Gygi SP, Goldberg AL (2007) Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* **282**: 17375–17386
- Kim I, Li Y, Muniz P, Rao H (2009) Usa1 protein facilitates substrate ubiquitylation through two separate domains. *PLoS One* **4**: e7604
- Kim W, Spear ED, Ng DT (2005) Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol Cell* **19**: 753–764

- Knipscheer P, Sixma TK (2007) Protein-protein interactions regulate Ubl conjugation. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 665–673
- Knop M, Hauser N, Wolf DH (1996) N-Glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of a mutated derivative of carboxypeptidase yscY in yeast. *Yeast* **12**: 1229–1238
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**: 635–644
- Kostova Z, Tsai YC, Weissman AM (2007) Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 770–779
- Kostova Z, Wolf DH (2005) Importance of carbohydrate positioning in the recognition of mutated CPY for ER-associated degradation. *J Cell Sci* **118**: 1485–1492
- Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**: 774–797
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lebowitz J, Lewis MS, Schuck P (2002) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. *Protein Sci* **11**: 2067–2079
- Lederkremer GZ, Glickman MH (2005) A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends Biochem Sci* **30**: 297–303
- Lilley BN, Gilbert JM, Ploegh HL, Benjamin TL (2006) Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *J Virol* **80**: 8739–8744
- Lilley BN, Ploegh HL (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**: 834–840
- Lilley BN, Ploegh HL (2005) Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14296–14301
- Little JW, Zimmerman SB, Oshinsky CK, Gellert M (1967) Enzymatic joining of DNA strands, II. An enzyme-adenylate intermediate in the dpn-dependent DNA ligase reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**: 2004–2011
- Loayza D, Tam A, Schmidt WK, Michaelis S (1998) Ste6p mutants defective in exit from the endoplasmic reticulum (ER) reveal aspects of an ER quality control pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**: 2767–2784

- McPherson A (1999) *Crystallization of Biological Macromolecules*,. CSHL Press, Cold Spring Harbor
- McPherson A (2003) *Introduction to Macromolecular Crystallography*. Wiley-Liss
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**: 766–772
- Molinari M (2007) N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat Chem Biol* **3**: 313–320
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**: 17–27
- Nakatsukasa K, Nishikawa S, Hosokawa N, Nagata K, Endo T (2001) Mnl1p, an alpha -mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *J Biol Chem* **276**: 8635–8638
- Nemoto T, Sato N (1998) Oligomeric forms of the 90-kDa heat shock protein. *Biochem J* **330** (Pt 2): 989–995
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ (1994) A simple modification of Blum’s silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**: 239–242
- Neuber O, Jarosch E, Volkwein C, Walter J, Sommer T (2005) Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* **7**: 993–998
- Nishikawa SI, Fewell SW, Kato Y, Brodsky JL, Endo T (2001) Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* **153**: 1061–1070
- Painter J, Merritt EA (2006) *TLSMD* web server for the generation of multi-group TLS models. *J Appl Crystallogr* **39**: 109–111
- Pilon M, Schekman R, Römisch K (1997) Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* **16**: 4540–4548
- Plempner RK, Böhmeler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**: 891–895

- Quan EM, Kamiya Y, Kamiya D, Denic V, Weibezahn J, Kato K, Weissman JS (2008) Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Cell* **32**: 870–877
- Ravid T, Kreft SG, Hochstrasser M (2006) Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *EMBO J* **25**: 533–543
- Rossmann MG, Blow DM (1962) The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica* **15**: 24–31
- Rotin D, Kumar S (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 398–409
- Satoh T, Chen Y, Hu D, Hanashima S, Yamamoto K, Yamaguchi Y (2010) Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation. *Mol Cell* **40**: 905–916
- Scheich C, Kümmel D, Soumailakakis D, Heinemann U, Büssow K (2007) Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins. *Nucleic Acids Res* **35**: e43
- Schelhaas M, Malmström J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grünewald K, Helenius A (2007) Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* **131**: 516–529
- Schäfer A, Wolf DH (2009) Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *EMBO J* **28**: 2874–2884
- Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**: 368–379
- Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**: 223–231
- Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**: 770–774
- Slotboom DJ, Duurkens RH, Olieman K, Erkens GB (2008) Static light scattering to characterize membrane proteins in detergent solution. *Methods* **46**: 73–82
- Spear ED, Ng DT (2005) Single, context-specific glycans can target misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *J Cell Biol* **169**: 73–82

- Sreerama N, Woody RW (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**: 252–260
- Stanley AM, Carvalho P, Rapoport T (2011) Recognition of an ERAD-L substrate analyzed by site-specific in vivo photocrosslinking. *FEBS Lett*
- Svedberg T, Pedersen K (1940) *The Ultracentrifuge*. Oxford University Press, London
- Swanson R, Locher M, Hochstrasser M (2001) A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* **15**: 2660–2674
- Szathmary R, Biemann R, Nita-Lazar M, Burda P, Jakob CA (2005) Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol Cell* **19**: 765–775
- Taxis C, Hitt R, Park SH, Deak PM, Kostova Z, Wolf DH (2003) Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* **278**: 35903–35913
- Taylor G (2003) The phase problem. *Acta Crystallogr D* **59**: 1881–1890
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**: 94–102
- Van Duyne GD, Standaert RF, Karplus PA, Schreiber SL, Clardy J (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol* **229**: 105–124
- Vashist S, Ng DTW (2004) Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* **165**: 41–52
- Vembar SS, Brodsky JL (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 944–957
- Wahlman J, DeMartino GN, Skach WR, Bulleid NJ, Brodsky JL, Johnson AE (2007) Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system. *Cell* **129**: 943–955
- Wang W, Malcolm BA (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* **26**: 680–682
- Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 599–609

- Wernimont A, Edwards A (2009) In situ proteolysis to generate crystals for structure determination: an update. *PLoS One* **4**: e5094
- Whitmore L, Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**: 392–400
- Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* **179**: 131–137
- Xie W, Kanehara K, Sayeed A, Ng DTW (2009) Intrinsic conformational determinants signal protein misfolding to the Hrd1/Htm1 endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Mol Biol Cell* **20**: 3317–3329
- Yang ZR, Thomson R, McNeil P, Esnouf RM (2005) RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* **21**: 3369–3376
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**: 652–656
- Ye Y, Shibata Y, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Rapoport TA (2005) Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14132–14138
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**: 841–847
- Yoshida Y, Adachi E, Fukiya K, Iwai K, Tanaka K (2005) Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates. *EMBO Rep* **6**: 239–244
- Yoshida Y, Tokunaga F, Chiba T, Iwai K, Tanaka K, Tai T (2003) Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J Biol Chem* **278**: 43877–43884
- Zimmerman SB, Little JW, Oshinsky CK, Gellert M (1967) Enzymatic joining of DNA strands: a novel reaction of diphosphopyridine nucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**: 1841–1848

Abbildungsverzeichnis

1.1	Prozessierung von N-Glykosylierungen im Hefe-ER.	2
1.2	Struktur der MRH-Domäne von OS-9	4
1.3	Der HRD-Komplex	5
1.4	Ubiquitinierung von ERAD-Substraten am HRD-Komplex	6
1.5	Ubiquitinligase-Komplexe in ERAD-L, -M und -C	8
1.6	Modell eines Retrotranslokations-Intermediats am HRD-Komplex	10
3.1	Phasendiagramm der Kristallisation	38
3.2	Ewald-Kugel	38
3.3	Multiple Anomale Diffraktion (MAD)	40
4.1	Expressionskonstrukte von Usa1 und Hrd1	49
4.2	Reinigung von Usa1 und Hrd1-Konstrukten	50
4.3	Präparative Gelfiltration des Usa1 ₁₋₅₃₅ -Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁ -Komplexes	51
4.4	CD-Analyse von Usa1 ₁₋₅₃₅ , Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁ und dem Komplex	52
4.5	ITC-Experiment zur Usa1 ₁₋₅₃₅ -Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁ -Bindung	53
4.6	RALS-GF des Usa1 ₁₋₅₃₅ -Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁ -Komplexes	54
4.7	Analytische Ultrazentrifugation von Usa1 ₁₋₅₃₅ und Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁	55
4.8	Limitierte Proteolyse von Usa1 ₁₋₅₃₅ und Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁	56
4.9	Dynamische Lichtstreuung von Hrd1 ₃₈₈₋₅₃₉	56
4.10	Analytische Gelfiltration von verkürzten Usa1- und Hrd1-Konstrukten	57
4.11	Kristallisationsversuche mit dem Usa1 ₁₋₅₃₅ -Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁ -Komplex	58
4.12	Kristallisationsversuche mit verkürzten Usa1- und Hrd1-Konstrukten	59
5.1	Expressionskonstrukte von Yos9	62
5.2	Reinigung löslicher Yos9-Konstrukte	63
5.3	Reinigung unlöslicher Yos9-Konstrukte	64
5.4	CD-Analyse von Yos9-Konstrukten	65
5.5	Limitierte Proteolyse der Yos9-DD (Yos9 ₂₅₃₋₄₂₄)	66
5.6	Limitierte Proteolyse des Volle-Länge-Yos9 (Yos9 ₂₄₋₅₃₉)	66
5.7	Kristallisationsversuche mit Yos9 ₂₅₃₋₄₂₄	67
5.8	Kristallisation von Yos9 ₂₆₆₋₄₂₄	68
5.9	Kristallisationsversuche mit Yos9 ₂₄₋₄₂₄ und Yos9 ₂₆₆₋₅₃₉	69

5.10	Datensammlung	70
5.11	Struktur der Yos9-DD	72
5.12	Kristallpackung	73
5.13	Oligomerisation in der Kristallstruktur	74
5.14	RALS-GF der Yos9-DD	75
5.15	<i>Blue Native</i> PAGE der Yos9-DD	76
5.16	<i>Pulldown</i> -Experimente mit der Yos9-DD	77
5.17	Quervernetzungs-Experimente mit der Yos9-DD	78
5.18	Sedimentations-Gleichgewichts-Experimente mit Yos9	79
5.19	CD-Spektren der Yos9-DD-Mutanten	79
5.20	<i>Pulldown</i> -Experiment zwischen Yos9 und Hrd3	80
5.21	Co-IP-Versuche mit verkürzten Yos9-Varianten	81
5.22	<i>Pulse-Chase</i> -Experiment	82
5.23	Nicht erklärte Elektronendichte	83
6.1	Modell zur Dimerisierung des HRD-Komplexes	86
A	Unordnungs-Vorhersage von Yos9	105

Tabellenverzeichnis

3.1	PCR-Ansätze	25
3.2	PCR-Temperaturzyklus	26
3.3	Restriktionsverdau	26
3.4	Ligation	27
3.5	Reaktionsansätze für die QuikChange-Mutagenese	28
3.6	Temperaturzyklus der QuikChange-Mutagenese	29
3.7	Schägger-Gele	33
3.8	Silberfärbung	34
3.9	Extinktionskoeffizienten	44
4.1	Sekundärstrukturanteile des Usa1 ₁₋₅₃₅ -Hrd1 ₃₂₅₋₅₅₁ -Komplexes	52
5.1	Sekundärstrukturanteile der Yos9-Konstrukte	65
5.2	Datensammlung und Verfeinerung	71
5.3	PISA-Analyse	75

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
CPY	Carboxypeptidase Y
CPY*	aufgrund des <i>prc1-1</i> -Allels fehlgefaltete Carboxypeptidase Y
CD	Circulardichroismus
DD	Dimerisierungs-Domäne
<i>dd</i> H ₂ O	Reinstwasser
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemoluminescence</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Protein-Degradation
GF	Gelfiltration
Gls1	Glucosidase I
Gls2	Glucosidase II
GT	UDPGlucose:Glycoprotein-Glycosyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His ₇	Heptahistidin- <i>Tag</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IB	Einschlusskörper in Bakterien (<i>Inclusion Bodies</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
kb	Kilobasen (DNA/RNA)
MRH	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Homologie
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie

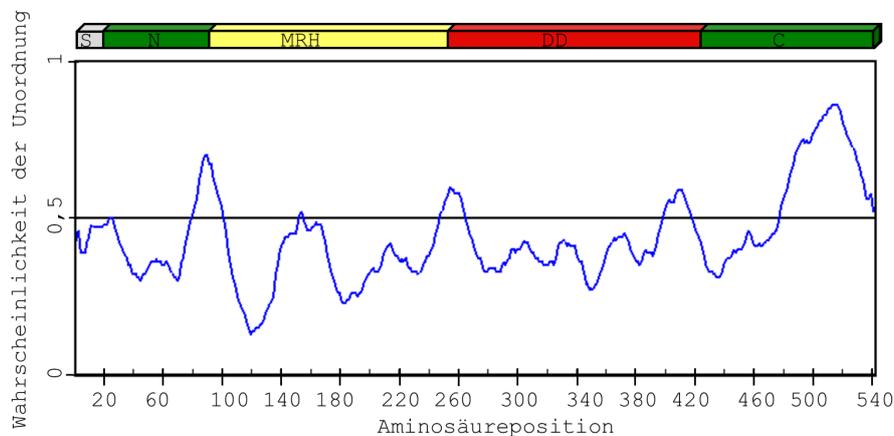
Abkürzungsverzeichnis

NiNTA	Ni-Nitrilotriessigsäure
NMR	Kernmagnetresonanz
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OST	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
RALS	<i>right angle light scattering</i> , statische Lichtstreuung bei 90°
RALS-GF	statische Lichtstreuung in Verbindung mit analytischer Gelfiltration
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	statische Lichtstreuung
TCA	Trichloressigsäure
TEV	<i>Tobacco etch-Virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WW-Motiv	Doppel-Tryptophan-Motiv

Anhang

Unordnungs-Vorhersage

Ungeordnete Bereiche von Yos9 wurden anhand der Primärstruktur mit dem RONN Disorder Prediction Server vorhergesagt (Yang *et al.* 2005, Abb. A).



1	MQAKIYYALS	AISALIP LGS	SL LAPIEDPI	VSNKY LISYI	DEDDWSDRIL	50
51	Q Q SVMNSGY	IVNMGDDLEC	FIQ N ASTQLN	DVLEDSNEHS	NSEKTALLTK	100
			*	*****	*****	
101	TLN Q VKTIF	DKLNERCIF Y	QAGFWIYEYC	PGIEFVQFHG	RVN T KTGEIV	150
	*					
151	NRDESLVYRL	GKPKANVEER	EFELLYDDVG	YYISEIIGSG	DICDVTGAER	200

201	MVEIQYVCGG	SNSGPSTIQW	VRETKICVYE	AQVTIPELCN	LELLAKNEDQ	250

251	KNASPILCRM	PAKSKIGSNS	IDLITKYEPI	FLGSGIYFLR	PFNTDERDKL	300
	*****	*****				
301	MVTDNAMSN	DEITETYYQK	FGNAINKMLS	LRLVSLPNGH	ILQPGDSCVW	350
351	LAEVDMKDR	FQTTLSNIL	NSQRAEIFFN	KTFTFNEDNG	NFLSYKIGDH	400
					*	
401	GESTELGQIT	HSNKADINTA	EIRSDEYLIN	TDNELFLRIS	KEIAEVKELL	450
	*****	*****				
451	NEIVSPHEME	VIFENMRNQP	N N DFELALMN	KLKSSLNDDN	KVEQINNARM	500
			***	*****	*****	
501	DDE S TSH T	RDIGEAGSQT	TG N TESEVTN	VAAGVFIEHD	EL	542
	*****	*****	*****	*****	**	

Abb. A: Unordnungs-Vorhersage von Yos9. Oben: Domänen von Yos9, Mitte: Grafische Darstellung der Vorhersage, Unten: Aminosäuresequenz von Yos9. Das kristallisierte DD-Konstrukt Yos9₂₆₆₋₄₂₄ ist durch Fettdruck hervorgehoben. *: als ungeordnet eingestufte Aminosäuren.

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikationen:

Horn SC, Hanna J, Hirsch C, Volkwein C, Schütz A, Heinemann U, Sommer T, Jarosch E (2009) Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase. *Mol Cell* **36**: 782–793

Hanna J, Schütz A, Zimmermann F, Behlke J, Sommer T, Heinemann U (2011) Structural basis for Yos9-mediated self-association on the luminal side of the HRD complex. *Manuskript in Vorbereitung*

Danksagung

Ich danke allen, die auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Udo Heinemann, Sarbani Bhattacharya, Kerstin Böhm, David Carter, Birgit Cloos, Tracy Dornblut, Ulrich Gohlke, Claudia Haas, Andreas Knespel, Bettina König, Daniel Kümmel, Silke Kurths, Ulf Lenski, Klaas Max, Florian Mayr, Jürgen Müller, Michaela Projahn, Yvette Roske, Anja Schütz, Harald Striegl, Janett Tischer und Chengcheng Wang

Thomas Sommer, Robert Gauss, Christian Hirsch, Sabine Horn, Ernst Jarosch und Franziska Zimmermann

Joachim Behlke, Janko Brand, Oliver Daumke, Verena Ezerski, Katja Fälber, Chris Fröhlich, Song Gao, Nadine Jahnke, Marcel Jurk, Sandro Keller, Ulrike Maschke, Uwe Müller, Albrecht Otto, Otto Ristau, David Schwefel, Claudio Shah und Sabine Werner

Thomas und Linus Konnerth

Familie Hanna