

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion  
der *class C Vps Tethering*-Komplexe  
HOPS und CORVET**

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

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

vorgelegt von  
Heide Behrmann, geb. Peters  
aus Cottbus

Berlin, im November 2014

Die vorliegende Arbeit wurde am Max Delbrück Centrum für molekulare Medizin in Berlin-Buch in der Abteilung Makromolekulare Strukturen und Interaktionen von Prof. Dr. Udo Heinemann durchgeführt. Der experimentelle Teil wurde vom 1. Juni 2010 bis zum 31. August 2014 durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann
2. Gutachter: PD Dr. Michael Veit

Disputation am 13. März 2015

**Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikation:**

**Behrmann, H.,** Lürick, A., Kuhlee, A., Kl. Balderhaar, H., Bröcker, C., Kümmel, D., Engelbrecht-Vandré, S., Gohlke, U., Raunser, S., Heinemann, U. und Ungermann, C., Structural identification of the Vps18  $\beta$ -propeller reveals a critical role in the HOPS complex stability and function. *J. Biol. Chem.* (2014)

**Koordinaten und Strukturfaktoren wurden in der Proteindatenbank (PDB) unter folgendem Eintrag hinterlegt:**

**4uuy:** Structure of the Vps18- $\beta$ -propeller

In Erinnerung an Karl-Heinz Schnittler (1923-2013)

**Inhaltsverzeichnis:**

1	Einleitung.....	9
1.1	Eukaryotisches Endomembransystem.....	9
1.1.1	Vesikulärer Transport.....	10
1.1.2	Proteine des <i>Tethering</i> -Schrittes.....	13
1.2	HOPS- und CORVET-Komplex.....	16
1.2.1	Struktur von Vps33.....	19
1.2.2	Komplexarchitektur.....	21
1.3	Fragestellung.....	25
2	Materialien und Methoden.....	26
2.1	Materialien.....	26
2.1.1	Geräte.....	26
2.1.2	Chemikalien.....	27
2.1.3	Enzyme und Antikörper.....	27
2.1.4	Kits.....	27
2.1.5	Bakterienstämme.....	28
2.1.6	Nährmedien.....	28
2.1.7	Vektoren.....	29
2.1.8	Lösungen und Puffer.....	29
2.2	Arbeitsmethoden.....	30
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.2	Biochemische Methoden.....	38
2.2.3	Biophysikalische Methoden.....	45
2.2.4	Proteinkristallographie.....	47
3	C-terminaler Unterkomplex Vps39•Vps11.....	54
3.1	Ergebnisse und Diskussion.....	54
3.1.1	Expressions- und Löslichkeitstest der Unterkomplexe.....	54
3.1.2	Reinigung der Unterkomplexe.....	57
3.1.3	Kristallisationsversuche.....	59
3.1.4	Kristallisation von Vps39 <sub>875-1049</sub> •Vps11 <sub>778-1008</sub> .....	68
3.2	Fazit.....	68

---

4	N-terminale Domänen von Vps11 und Vps18.....	70
4.1	Ergebnisse und Diskussion .....	70
4.1.1	Expressions- und Löslichkeitstest der Einzelkonstrukte .....	70
4.1.2	Reinigung N-terminale Domäne von Untereinheit Vps11 .....	71
4.1.3	Reinigung der N-terminale Domäne von Untereinheit Vps18.....	73
4.1.4	Strukturbestimmung .....	74
4.1.5	Interaktion der N-terminalen Domänen von Vps18 und Vps11.....	81
4.1.6	Lipidinteraktionen der N-terminalen Domänen .....	84
4.2	Fazit.....	92
5	Zusammenfassung / Summary .....	94
5.1	Zusammenfassung.....	94
5.2	Summary .....	95
6	Literaturverzeichnis .....	97
7	Anhang.....	105
8	Abkürzungsverzeichnis.....	108
9	Danksagung .....	110
10	Selbstständigkeitserklärung .....	111

**Tabellenverzeichnis:**

2.1:	Pipettierschema für PCR-Ansätze. ....	31
2.2:	PCR-Temperaturzyklus von der genomischen Matrize. ....	31
2.3:	Mengenangaben für den Verdau des Vektors. ....	32
2.4:	Mengenangaben für den Verdau des PCR-Produkts. ....	32
2.5:	Mengenangaben für die Dephosphorylierungsreaktion. ....	33
2.6:	Mengenangaben für die T4-DNA-Polymerase Behandlung. ....	34
2.7:	Pipettierschema für die Herstellung des PCR-Mix. ....	36
2.8:	PCR-Programm zur Durchführung der Kolonie-PCR. ....	36
2.9:	Pipettierschema für PCR-Ansätze. ....	36
2.10:	PCR-Temperaturzyklus für Mutagenese. ....	37
2.11:	Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels. ....	41
2.12:	Pipettierschema für ThermoFluor. ....	47
3.1:	Ergebnisse der statischen Lichtstreuung. ....	67
4.1:	Übersicht der geklonten, löslichen und gereinigten Konstrukte. ....	71
4.2:	Anomale Streufaktortermine bei <i>Peak</i> - und <i>IP</i> - Wellenlängen. ....	76
4.3:	Datensammlung von Vps18 <sub>2-349</sub> und Vps18 <sub>2-349</sub> SeMet. ....	77
4.4:	Sekundärstrukturgehalt der $\beta$ -Propeller von Vps18 und Vps11. ....	86
4.5:	Ermittelten Schmelztemperaturen. ....	87
4.6:	Ergebnisse der statischen Lichtstreuung. ....	89
7.1:	Fortschrittsübersicht der designten Konstrukte. ....	105

## Abbildungsverzeichnis:

1.1:	Kompartimentalisierung der eukaryotischen Zelle. ....	10
1.2:	Schematische Darstellung des vesikulären Transports. ....	11
1.3:	Transportwege in einer eukaryotischen Zelle. ....	14
1.4:	Schematische Darstellung der CORVET- und HOPS-Funktion. ....	17
1.5:	Kristallstrukturen von Vps33-Vps16 Komplexen. ....	19
1.6:	Struktur des <i>Tethering</i> -Komplexes HOPS. ....	22
1.7:	Domänenarchitektur der <i>class C-Vps</i> -Komplexe. ....	23
2.1:	CD-Spektren von Modellpeptiden. ....	46
2.2:	Proteinkristallisation a) sitting drop-Methode b) hanging drop-Methode. ....	49
2.3:	Röntgenbeugungsaufnahme vom nativen Kristall von Vps18 <sub>NTD</sub> . ....	50
3.1:	Domänenarchitektur und Expressionskonstrukte von Vps11 und Vps39. ....	54
3.2:	Expressions- und Löslichkeitstest der Co-Expressionskonstrukte von Vps39 mit Vps11. ....	55
3.3:	Expressions- und Löslichkeitstest der Co-Expressionskonstrukte von Vps39 mit Vps11. ....	56
3.4:	Reinigung der Co-Expressionskonstrukte von Vps39 mit Vps11. ....	57
3.5:	Kristallisationsversuche mit Vps39 <sub>677-1023</sub> •Vps11 <sub>778-1008</sub> . ....	59
3.6:	Kristallisationsversuche mit Vps39 <sub>875-1023</sub> •Vps11 <sub>778-1008</sub> . ....	60
3.7:	Kristallisationsversuche mit Vps39 <sub>875-1023</sub> •Vps11 <sub>778-1008</sub> . ....	61
3.8:	Kristallisationsversuche mit Vps39 <sub>875-1023</sub> •Vps11 <sub>778-1008</sub> und Additiven. ....	63
3.9:	Ausgewählte Ergebnisse des <i>Thermofluor</i> -Experiments mit Vps39 <sub>875-1023</sub> •Vps11 <sub>778-1008</sub> . ....	63
3.10:	Diffractionsbilder des Hydratationsexperiments mit Kristallen von Vps39 <sub>875-1023</sub> •Vps11 <sub>778-1008</sub> . ....	64
3.11:	Sequenzvergleich und Sekundärstrukturvorhersage der C-terminalen Bereiche. ....	66
3.12:	Chromatogramme der statischen Lichtstreuung. ....	67
3.13:	Kristallisationsversuche mit den Komplexen. ....	68
4.1:	Domänenarchitektur und verwendete Expressionskonstrukte von Vps11 und Vps18. ....	70
4.2:	Reinigung von Vps11 <sup>wt</sup> <sub>ΔCTD</sub> . ....	72
4.3:	Reinigung von Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub> . ....	73
4.4:	Kristallisationsversuche mit Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub> und SeMet-Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub> . ....	75
4.5:	Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte des Vps18 <sub>NTD</sub> . ....	76
4.6:	Kristallstruktur des siebenblättrigen β-Propellers von Vps18 (Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub> ). ....	78
4.7:	Interaktion zwischen Untereinheiten des kristallographischen Dimers. ....	79
4.8:	Oberflächendarstellung des β-Propellers. ....	80
4.9:	Konservierung des β-Propellers von Vps18. ....	81
4.10:	<i>Pulldown</i> Experimente mit Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub> gegen verschiedene Vps11-Konstrukte. ....	82

---

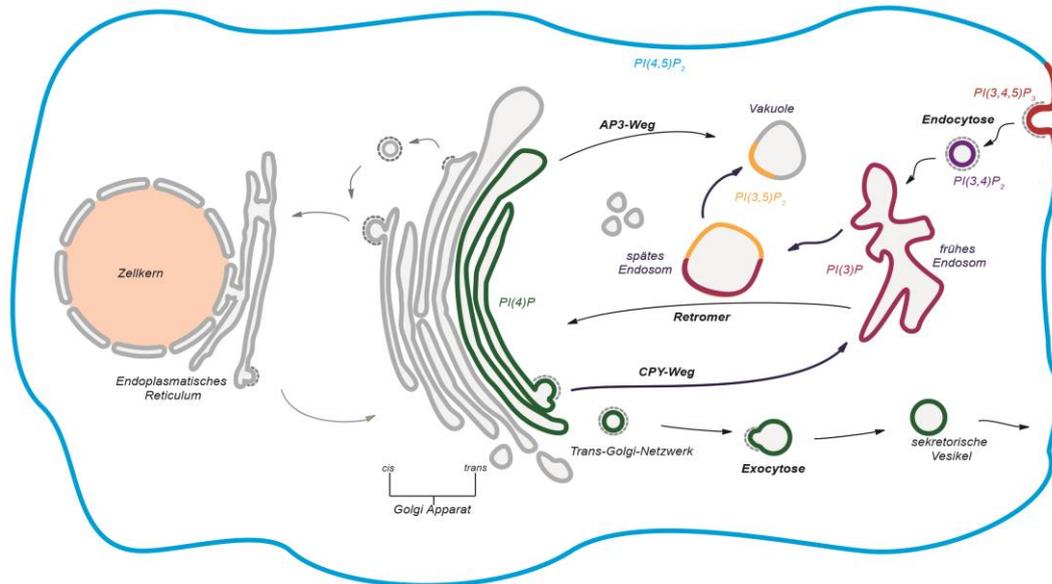
4.11:	<i>Pulldown</i> Experimente mit Vps18 <sub>NTD</sub> gegen verschiedene Vps11-Konstrukte.....	83
4.12:	Interaktionsexperimente mit Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub> -GST.....	84
4.13:	CD-Spektren sowie Differenzspektren der N-terminalen Domänen.....	85
4.14:	Schmelzkurven der N-terminalen Domänen.....	87
4.15:	Chromatogramme der statischen Lichtstreuung.....	88
4.16:	Chromatogramme der statischen Lichtstreuung.....	89
4.17:	Co-Sedimentationsexperimente mit 800 nm Vesikeln.....	90
4.18:	Co-Sedimentationsexperimente zur Analyse der N-terminalen Mutanten von Vps18 und Vps11.....	91
4.19:	Co-Sedimentationsexperimente mit Vesikeln.....	91
7.1:	Sequenzvergleich und Sekundärstrukturvorhersage der C-terminalen Bereiche.....	106
7.2:	Konservierung des $\beta$ -Propellers von Vps18.....	107

## 1 Einleitung

Das Leben benötigt Grenzen. Ein entscheidender Schritt in der Entwicklung des Lebens war die Ausbildung von Hüllen, welche es erlaubten, die Diffusion von Reaktionsprodukten zu kontrollieren und somit Reaktionen unabhängig von der Umgebung ermöglichen.<sup>[1, 2]</sup> In der Evolution haben sich, mit Ausnahmen der meisten Viren, Lipide als primärer Baustein dieser Barrieren durchgesetzt. Der Grund hierfür ist, dass aus Lipiden gebildete Membranen sehr flexibel sind: durch Assemblierung kleinster Bausteine können Barrieren unterschiedlichsten Ausmaßes gebildet werden, sie sind stabil und dennoch verformbar, und sie bilden eine Permeationsbarriere für hydrophile Stoffe. Im Laufe der Evolution wurden diese biologischen Barrieren immer komplexer.<sup>[3]</sup> Speziell durch den Einbau verschiedenster Proteine wurde es möglich, die gesamte Membran oder nur Teilbereiche durch gezielte Modellierung anzupassen. Ein Beispiel hierfür ist die Einstülpung kleiner Membranbereiche als Vesikel, welche die Aufnahme von extrazellulärem Medium und somit Nährstoffen ermöglichen. Auch gestatten Proteine einen definierten Austausch von Reaktionsprodukten über die Membran. In Eukaryoten wurde das Prinzip der Reaktionsbegrenzung durch Membranen noch einen Schritt weiterentwickelt: durch eine Kompartimentalisierung des Zellinnern mittels interner Membranen wurden spezialisierte Bereiche abgetrennt, z.B. für die Lagerung und Verarbeitung der genetischen Information.<sup>[3]</sup> Dieses Membransystem bezeichnet man als das Endomembransystem.

### 1.1 Eukaryotisches Endomembransystem

Das eukaryotische Endomembransystem definiert einen Zellkern als Speicher- und Verarbeitungsort der genetischen Information, ein endoplasmatisches Retikulum (ER) als Ort der Membranproteinsynthese und Qualitätskontrolle sowie der Lipidsynthese, einen Golgi-Apparat als wichtige Weichenstelle des vesikulären Transportes sowie als Prozessierungsort vieler Proteine, Endosomen als Sortierstelle von aufgenommenen Stoffen und Proteinen, Lysosomen (bzw. Vakuole in Hefen) als Orte der Protein- und Peptiddegradation, sowie Peroxisomen, welche eine wichtige Rolle bei oxidativen Prozessen spielen.<sup>[4]</sup>



**Abb. 1.1: Kompartimentalisierung der eukaryotischen Zelle.** Schematische Darstellung der Verteilung der Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) an spezifischen Kompartimente. Zur Vereinfachung werden nur die dominanten PIPs dargestellt. Abbildung nach [5-7]. Vergleiche auch Abb. 1.3.

Einzelne Kompartimente unterscheiden sich nicht nur durch ihr Inneres, sondern weisen definierte Oberflächen auf (Abb. 1.1). Neben bestimmten Membran-(assozierten-) Proteinen, welche für die Kompartimente spezifisch sind, unterscheiden sie sich auch in ihrer Lipidzusammensetzung. Beispielsweise bildet das Sterollipid Cholesterin einen Gradienten vom ER zur Plasmamembran, in welcher es die höchste Konzentration aufweist.<sup>[7]</sup> Eine weitere Lipidklasse, die zur Definition von Kompartimenten beiträgt, sind die Phosphatidylinositolphosphate (PIPs, Abb. 1.1). PIPs unterscheiden sich in Anzahl sowie Position der Phosphatgruppen am Zucker. Spezifische Kinasen und Phosphatasen erlauben somit dynamische Umwandlungen.<sup>[5, 6]</sup>

Damit die Zelle als Ganzes funktionieren kann, müssen die einzelnen Kompartimenten miteinander kommunizieren. Eines der Hauptkommunikationsmittel ist der vesikuläre Transport, durch welchen Metabolite, Proteine als auch Lipide zwischen den einzelnen membranumschlossenen Kompartimenten ausgetauscht werden können.

### 1.1.1 Vesikulärer Transport

Der vesikuläre Transportweg beruht auf kleinen Membranbläschen welche von Donormembranen abgeschnürt, dann entlang des Zytoskeletts transportiert, um schlussendlich gezielt mit einer Akzeptormembran verschmolzen zu werden (Abb. 1.2).

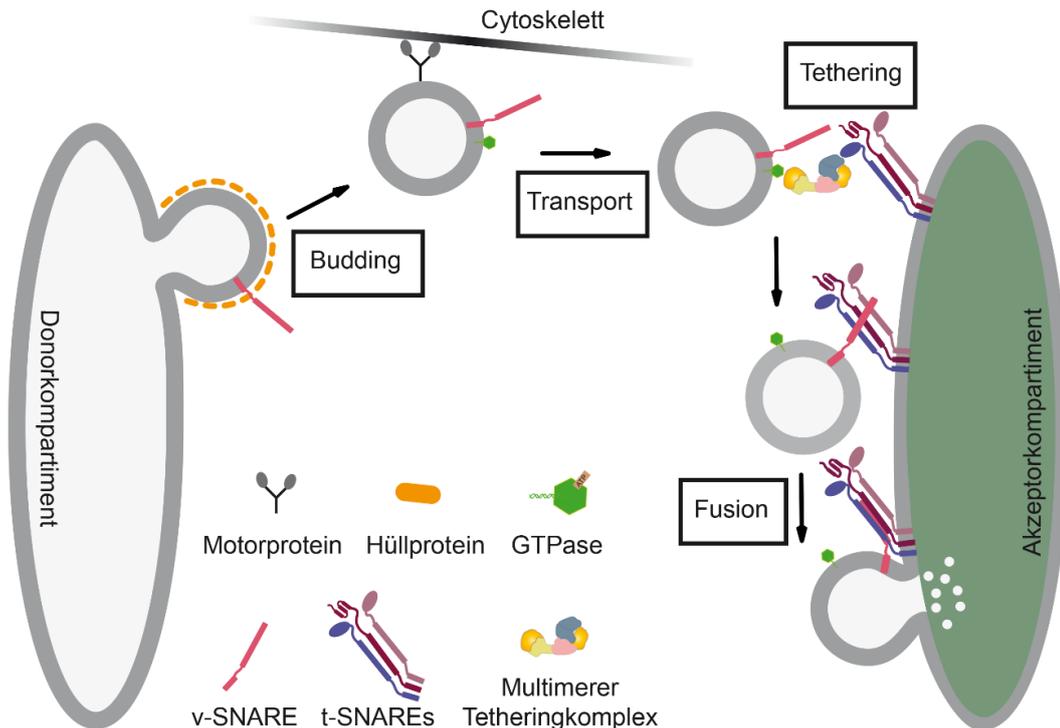


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des vesikulären Transports. Abbildung nach [6, 8].

### 1.1.1.1 Vesikelbildung

Vesikel sind kleine, kugelförmig in sich geschlossene Membranen mit einem Durchmesser von meist 50 bis 120 nm. Ihre Oberfläche weist durch den geringen Durchmesser im Vergleich zur Kompartiment- bzw. Donormembran eine hohe Krümmung auf, welche energetisch ungünstig ist. Die Bildung der Vesikel kann somit nicht spontan erfolgen. Initiatoren sind integrale Membranproteine, sogenannte Rezeptoren, welche sowohl mit löslicher Fracht als auch mit Hüllproteinen, vermittelt über Adapterproteine, interagieren und diese lokal konzentrieren. Die Hüllproteine stabilisieren bzw. induzieren die hohe Krümmung der Lipidmembran. Die schlussendliche Abschnürung (*Budding*) des Vesikels erfolgt energieabhängig durch spezialisierte Proteine. Auch wenn der generelle Mechanismus gleich ist, so unterscheiden sich die einzelnen involvierten Proteine je nach Ziel und Transportweg. Bei den Transportwegen werden endozytische, biosynthetisch-sekretorische sowie lysosomal/vakuoläre Transportwege unterschieden. Insbesondere die verwendeten Hüllproteine sind für die jeweiligen Transportwege charakteristisch.

Der endozytische Weg zwischen Plasmamembran und frühem Endosom, sowie zwischen trans-Golgi und frühem Endosom, verwendet das Hüllprotein Clathrin (Abb. 1.3). Die kleinste Untereinheit der Clathrin-Hülle (*coat*) ist ein Hexamer aus drei

leichten Proteinketten mit je 25 kDa sowie drei schwere Ketten mit je 190 kDa. Zusammen bilden diese eine „Dreibein“-Anordnung.<sup>[9, 10]</sup> An der Plasmamembran polymerisieren mehrere „Dreibein“-Einheiten zu einem gekrümmten Polygonnetz, welches durch Adapterproteinkomplexe an der Membran gehalten wird. Diese Vorstufen der Vesikelabschnürung werden an der Plasmamembran als *clathrin-coated pits* bezeichnet.<sup>[11]</sup> Die Spezifität vermittelnden Adapterproteine sind AP1<sup>[12]</sup>, AP3<sup>[13]</sup> und AP4<sup>[14]</sup> am Golgi, wobei letztere beide auch Clathrin-unabhängige Transportwege induzieren können<sup>[15]</sup>, sowie AP2<sup>[16]</sup> an der Plasmamembran.

Der biosynthetisch-sekretorische und retrograd-anterograde Transport zwischen ER und Golgi-Apparat weist zwei verschiedene Hüllproteine auf, welche als COPI- bez. COPII (*COat Protein*)-Hüllen bezeichnet werden. Im Gegensatz zu Clathrin erkennen die COP-Hüllproteine direkt die Sortiersignalsequenzen ihrer Frachtproteine und sind somit nicht auf Adapterproteine angewiesen. COPI ist für den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER<sup>[17]</sup> verantwortlich und besitzt einen heptameren Aufbau aus  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\varepsilon$ -,  $\zeta$ -COP.<sup>[18]</sup> Der Gesamtkomplex wird auch als *coatamer* bezeichnet. COPII, welches aus den Proteinen Sec23, Sec24, Sec13 und Sec31 gebildet wird, ist für den anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat verantwortlich.<sup>[19]</sup>

### 1.1.1.2 Vesikel-Tethering

Mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 15-30  $\mu\text{m}$  sind eukaryotische Zellen zu groß, als dass ein reiner Diffusionsmechanismus für den Vesikeltransport ausreichend wäre.<sup>[20]</sup> Stattdessen werden Vesikel aktiv mittels Motorproteinen entlang des Cytoskeletts transportiert. Für die finale Zielerkennung sind spezielle GTPasen, welche sich auf dem Vesikel befinden, im Zusammenspiel mit sogenannten Anheftungs- (*Tethering*-) Faktoren notwendig. Bis jetzt sind zwei Gruppen von *Tethering*-Faktoren bekannt. Zum einen sind dies lange, stabförmige, monomere *coiled-coil Tethering*-Faktoren und zum anderen die multimeren *Tethering*-Komplexe.<sup>[21-23]</sup> Jeder Transportweg wird dabei durch eine Kombination aus GTPase und spezifischem *Tethering*-Faktor adressiert. Eine Übersicht über die bekannten *Tethering*-Faktoren wird in Kapitel 1.1.2.2 gegeben. Nach erfolgreicher Adressierung erfolgt die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran durch SNARE- (*soluble NSF [N-ethylmaleimide-sensitive factor] attachment protein receptor*) Proteine.<sup>[24]</sup>

### 1.1.1.3 Vesikelfusion

Durch das *Tethering* werden Vesikel zwar in die Nähe der Zielmembran gebracht, die Fusion zweier Lipidmembranen ist aber energetisch ungünstig. Um die für die Fusion benötigte Aktivierungsenergie aufzubringen, werden die SNARE-Proteine benötigt. Der energetisch treibende Faktor ist dabei die Bildung eines *trans*-SNARE-Komplexes aus den SNAREs der Donormembran (auch *vesicle*-SNAREs, v-SNAREs) und der Akzeptormembran (auch *target*-SNAREs, t-SNAREs). Dieser Komplex weist ein energetisch sehr günstiges superhelikales „Vier-Helix Bündel“ auf, bei dem je Helix 16 Aminosäuren an der Interaktion partizipieren.<sup>[25]</sup> In monomeren SNAREs liegen diese, als SNARE-Motiv bezeichneten Aminosäuren unstrukturiert vor.<sup>[26-28]</sup> Je nach der zentralen Aminosäure, Glutamin bzw. Arginin, im SNARE Motiv werden SNAREs in Q- bzw. R-SNAREs eingeteilt.<sup>[29]</sup> Q-SNAREs können anhand ihrer Sequenz weiter in Q<sub>a</sub>-, Q<sub>b</sub>- und Q<sub>c</sub>-SNAREs eingeteilt werden.<sup>[30]</sup> SNARE-Komplexe werden immer aus vier SNAREs mit verschiedenen SNARE Motiven gebildet, so dass ein Q<sub>a</sub>Q<sub>b</sub>Q<sub>c</sub>R-SNARE Komplex entsteht, in dessen Zentrum ein charakteristisches Muster aus Wasserstoffbrücken zwischen einer Arginin- und drei Glutamin-Seitenketten ausgebildet wird.

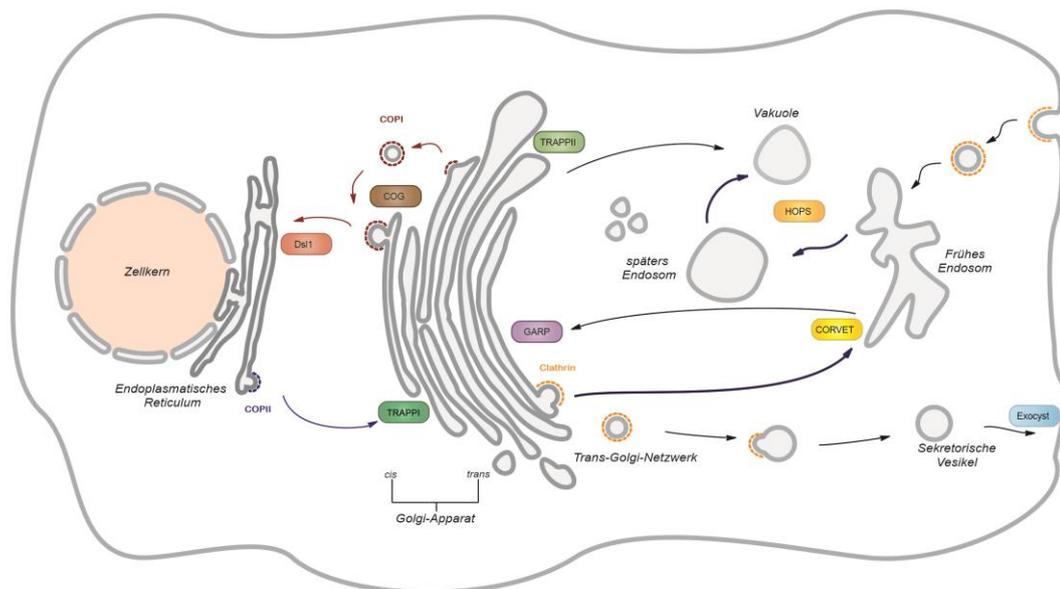
## 1.1.2 Proteine des *Tethering*-Schrittes

### 1.1.2.1 Rab-GTPasen

Rab-Proteine sind GDP/GTP-bindende Proteine der Ras-Superfamilie. Es sind 72 verschiedene Rab-Proteine in humanen Zellen und 11 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bekannt.<sup>[31-34]</sup> Sie alle sind an der Regulierung des intrazellulären vesikulären Transports beteiligt. Jedes Rab-Protein ist dabei nur einem einzigen Kompartiment zugeordnet. Beispielsweise sind Rab5- und Rab7-GTPase (Guanosin-Triphosphatase) an der Regulierung des intrazellulären vesikulären Transports zum Endosom und zum Lysosom beteiligt.<sup>[35-37]</sup> Während dieser Regulierung durchlaufen die Rab-Proteine zyklisch verschiedene funktionelle Stadien. Die Substratbindung der GTPasen erfolgt über einen GDP-Austausch-Faktor (GEF, *GDP exchange factor*).<sup>[38, 39]</sup> Dieser Faktor bindet inaktives Protein (GDP-gebunden) und öffnet die Nukleotidbindungstasche. Somit wird die Verweildauer gebundenen Nukleotids in der Bindungstasche stark reduziert und ein Austausch mit Nukleotiden aus der Umgebung ermöglicht. Durch die höhere Konzentration an GTP im Vergleich zu GDP in der Zelle wird GTP präferiert von der

GTPase gebunden. Die so aktivierten Rab-Proteine (GTP-gebunden) aktivieren ihrerseits Effektorproteine, die an der Vesikelreifung und dem Vesikeltransport beteiligt sind. Während des gesamten Transports von der Donormembran zur Akzeptormembran verbleibt die GTPase an der Vesikelmembran. Nach der Fusion des Vesikels mit der Membran hydrolysiert das Rab-Protein GTP zu GDP und wird damit in seinen inaktiven Zustand überführt. Die Hydrolyse wird durch ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) stimuliert, welches die intrinsische Hydrolyserate des Rab-Proteins stark erhöht.<sup>[40-43]</sup> Für den Rücktransport des Rab-Proteins werden GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI) benötigt. Diese besitzen nur eine Affinität für GDP-gebundene Rab-Proteine und können diese durch Komplexbildung solubilisieren und zur Donormembran zurückbringen.<sup>[33, 44]</sup> Danach steht die GTPase wieder für einen weiteren Transportzyklus zur Verfügung.

### 1.1.2.2 Tethering-Komplexe



**Abb. 1.3:** Transportwege in einer eukaryotischen Zelle. Einige der unterschiedlichen Hüllproteine sind farbig dargestellt: COPI (rot), COPII (blau) und Clathrin (orange). Die bekannten multimeren *Tethering*-Komplexe sind durch farbige Ovale hervorgehoben: Dsl1, *Dependence on SLY1-20*; COG, *conserved oligomeric Golgi complex*; CORVET, *class C core vacuole/endosome tethering complex*; GARP, *Golgi-associated retrograde protein complex*; HOPS, *homotypic fusion and vacuole protein sorting (or class C vacuolar protein sorting) complex*; TRAPP, *transport protein particle*; Exocyst. Abbildung nach [45]. Vergleiche auch Abb. 1.1.

#### 1.1.2.2.1 TRAPP-Komplex

Der TRAPP (*TRAnsport Protein Particle*) Komplex ist einer der funktionell<sup>[46]</sup> und strukturell<sup>[47]</sup> am besten charakterisierten *Tethering*-Komplexe. In Hefe unterscheidet

man den für den Transportweg vom ER zum *cis*-Golgi zuständigen TRAPPI-Komplex mit den Untereinheiten Trs20, Trs23, Trs31, Trs33, Bet3, Bet5 und Trs85 vom TRAPP-II-Komplex, welcher zusätzlich Trs130, Trs120 sowie Trs65 enthält und für den Transport vom *trans*- zum *cis*-Golgi zuständig ist.<sup>[48]</sup> Dass eine Untereinheit, nämlich Bet3, in zwei Kopien vorkommt, ist eine Besonderheit von TRAPP und wurde für keinen weiteren *Tethering*-Komplex beschrieben. Für den Menschen wurde nur ein TRAPP-Komplex identifiziert. Dieser wurde in zwei Subkomplexen fast vollständig kristallisiert sowie mittels Elektronenmikroskopie dargestellt.<sup>[47]</sup> Interessanterweise konnte bis heute nur für den TRAPP Komplex eine GEF Funktion, für die Rab-GTPase Ypt1, direkt nachgewiesen werden.<sup>[49, 50]</sup> Eine SNARE-Bindung konnte für den TRAPP-Komplex nicht gezeigt werden.

#### 1.1.2.2.2 COG-Komplex

Der COG- (*Conserved Oligomeric Golgi*)- Komplex ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion des Golgi-Apparates und dient dem (retrogradem) *intra*-Golgi-Transport.<sup>[51]</sup> Wie auch TRAPP interagiert COG mit Ypt1, besitzt aber keine nachgewiesene GEF-Funktion. Jedoch bindet COG spezifisch Ypt1-GTP gegenüber Ypt1-GDP, ist mithin also ein GTPase-Effektor und kein Austauschfaktor.<sup>[52]</sup> Auch interagiert COG mit ähnlichen Golgi-SNAREs sowie Golgi-Hüllproteinen, nämlich COPI, wie der TRAPP-Komplex.<sup>[52]</sup> Der *Tethering*-Komplex wird aus den Untereinheiten COG1 bis 8 gebildet von denen bislang nur die Struktur von COG2, und hiervon auch nur eine Fragment ohne 100 Aminosäuren des N-Terminus, mittels NMR aufgeklärt werden konnte<sup>[53]</sup>, sowie der C-Terminus von COG4 mittels Proteinkristallographie.<sup>[54]</sup> Die Gesamtstruktur des Komplexes aus der Kuh konnte bei niedriger Auflösung durch elektronenmikroskopische Untersuchungen aufgeklärt werden. Sie zeigt eine zweigeteilte Struktur aus COG2-4 sowie COG5-7, welche durch ein COG1/COG8-Heterodimer zusammengehalten wird.<sup>[55, 56]</sup>

#### 1.1.2.2.3 GARP-Komplex

Der GARP- (*Golgi Associated Retrograde Protein*)- Komplex ist mit dem retrograden Transport vom späten Endosom zum Golgi-Apparat assoziiert.<sup>[57]</sup> GARP besteht aus den drei Kernuntereinheiten Vps52, Vps53 und Vps54 sowie, zumindest in Hefe, aus Vps51. Letztere Untereinheit konnte jedoch nicht als entscheidend für die Stabilität des

Komplexes nachgewiesen werden.<sup>[58]</sup> Für das humane Ortholog von Vps52, hVps52, konnte eine direkte Interaktion mit der GTPase Rab6 nachgewiesen werden.<sup>[59]</sup> In Hefe gibt es Indikationen, dass der GARP-Komplex eine Interaktion mit der GTPase Ypt6 eingeht.<sup>[60]</sup>

#### 1.1.2.2.4 Exocyst-Komplex

Der Exocyst-Komplex besteht aus den acht Untereinheiten Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 und Exo84 und ist an dem sekretorischen Transportweg vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran beteiligt.<sup>[61]</sup> Es konnte eine direkte Interaktion von Sec15 mit der GTPase Sec4 nachgewiesen werden<sup>[62]</sup>, aber auch andere Untereinheiten interagieren mit GTPasen, z.B. Sec3 mit Rho1<sup>[63]</sup>. Mehrere Domänen der Untereinheiten, z.T. auch mit ihren Interaktionspartnern, konnten kristallisiert werden und zeigten alle elongierte *coiled-coil*-Strukturen.<sup>[64]</sup> Eine Besonderheit des Exocyst *Tethering*-Komplexes ist, dass Sec3 auf der Akzeptormembran wartet und der vollständige Komplex so erst während des Anheftungsvorgangs ausgebildet wird.<sup>[65]</sup>

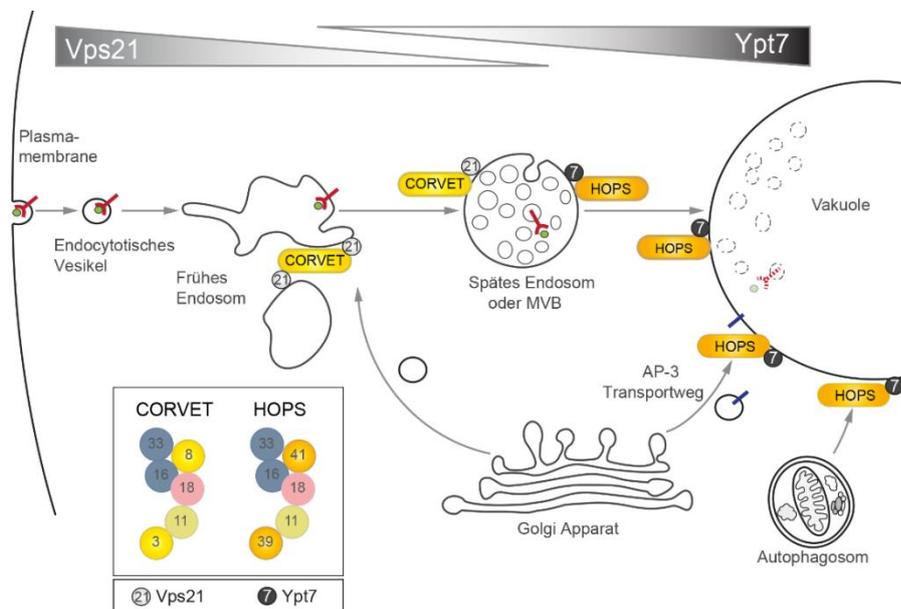
#### 1.1.2.2.5 Dsl1-Komplex

Mit nur drei Untereinheiten ist der Dsl1-Komplex der kleinste bekannte *Tethering*-Komplex. Er bestehend aus den Untereinheiten Dsl1, Dsl3 (auch bekannt als Sec39) sowie Tip20 und ist strukturell sehr gut charakterisiert. So ist die Kristallstruktur von isoliertem Tip20 in vollständiger Länge sowie als N-terminales Peptid zusammen mit dem N-terminalen Bereich von Dsl1 bekannt.<sup>[66]</sup> Der C-terminale Bereich von Dsl1 wurde zusammen mit Dsl3 kristallisiert.<sup>[67]</sup> Alle drei Untereinheiten lokalisieren am ER und fangen dort vermutlich vom Golgi-Apparat abgeschnürte Vesikel ein.<sup>[68, 69]</sup> Der Dsl1-Komplex ist der einzige *Tethering*-Komplex, für den keine interagierenden GTPasen bekannt sind.

## 1.2 HOPS- und CORVET-Komplex

Die im Fokus dieser Arbeit stehenden *Tethering*-Komplexe HOPS (*HO*motypic *f*usion and *v*acuole *P*rotein *S*orting) und CORVET (*class C cOR*e *V*acuole/*E*ndosome *T*ethering) besitzen einen gemeinsamen Kern gebildet aus den *class C-Vps*-Proteinen Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33. Beide Komplexe agieren im endolysosomalen Transportweg, wobei CORVET *Tethering* am frühen Endosom vermittelt,<sup>[71]</sup> während

HOPS für das *Tethering* an der Vakuole zuständig ist<sup>[70]</sup> (Abb. 1.4). Deletion einer der Kernuntereinheiten resultiert in einem Phänotyp mit fragmentierter Vakuole.<sup>[70-72]</sup> Des Weiteren wurde eine Störung der Assemblierung von SNARE-Komplexen beobachtet, wenn eine der Kernuntereinheit deletiert wird.<sup>[73]</sup>



**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung der CORVET- und HOPS-Funktion im endolysosomalen Transportweg. Adapterprotein in rot, Frachtprotein in grün. Die reziproke Verteilung der GTPasen Vps21 und Ypt7 wird durch zwei Graustufen-Gradienten angedeutet. Abbildung nach [74].

Diese Beobachtung wurde als Hinweis auf eine Interaktion mit SNARE-Proteinen gedeutet. Für die zur Sec1/Munc18-Proteinfamilie gehörende Untereinheit Vps33 konnte eine Interaktion mit dem vakuolären  $Q_a$ -SNARE Vam3 nachgewiesen werden, jedoch nur außerhalb eines SNARE-Komplexes.<sup>[73, 75]</sup> Zusätzlich konnten auch Interaktionen mit dem SNARE-Protein Vam7 sowie direkt zu PIPs für den HOPS-Komplex nachgewiesen werden.<sup>[76]</sup> Vam3 interagiert wiederum mit den SNAREs Vti1 sowie Vam7.<sup>[73]</sup> Durch diese Interaktion wird vermutlich die Vesikel-Annäherung eingeleitet. HOPS/CORVET sind die einzigen *Tethering*-Komplexe, für die nachgewiesen ist, dass sie eine direkte Interaktion mit SNAREs eingehen können.

Neben den Kernuntereinheiten weisen beide Komplexe je zwei weitere, Spezifität vermittelnde Untereinheiten auf: CORVET die Untereinheiten Vps3 sowie Vps8 und HOPS die Untereinheiten Vps39 sowie Vps41.<sup>[21]</sup> Interessanterweise ist die CORVET-Untereinheit Vps3 die einzige, welche nur in Hefe gefunden wurde und für welche noch

kein direktes Homolog in anderen Organismen identifiziert werden konnte. Die restlichen Untereinheiten sind sehr gut zwischen Spezies konserviert und könnten dort auch analoge Komplexe bilden.<sup>[77]</sup> Für die Untereinheiten Vps16, Vps33 und für die HOPS-spezifische Untereinheit Vps39 wurden für den Menschen sogar je zwei Isoformen identifiziert.<sup>[74]</sup> Nur im Falle von Vps39 besteht eine hohe Sequenzidentität zwischen den Isoformen. Wie genau der Komplexaufbau in Säugern abläuft, ist aufgrund dieser Homologe noch reine Spekulation.

Vps8<sup>[78, 79]</sup> und auch Vps3<sup>[80]</sup> interagieren mit der Rab-GTPase Vps21, deren humanes Homolog Rab5 ist, und vermitteln so die Spezifität für das frühe Endosom (Abb. 1.4).<sup>[81]</sup> Im Unterschied dazu interagieren die HOPS-spezifischen Untereinheiten Vps39 und Vps41 mit Ypt7, einer für das späte Endosom und die Vakuole spezifischen und zum humanen Rab7 homologen GTPase. Dabei interagiert Vps39 sowohl mit Ypt7-GTP als auch mit Ypt7-GDP<sup>[82]</sup>, während Vps41 spezifisch für Ypt7-GTP ist<sup>[83]</sup>. Aufgrund der Interaktion von Vps39 mit Ypt7 in der Nukleotid-freien als auch in der GDP- und GTP-Form wurde zunächst eine GEF-Aktivität vermutet<sup>[82]</sup>, auch wenn die gefundene 8-fache Beschleunigung des GDP/GTP-Austausches für eine GEF-Funktionalität sehr gering ist. So weist Mon1-Ccz1 eine weitaus höhere GEF-Aktivität (1600-fache Beschleunigung) für Ypt7 auf, jedoch nur in der Gegenwart von Membranen<sup>[38, 84]</sup>. Vps41 kann auch außerhalb von HOPS eine Aktivität haben, da diese Untereinheit ebenfalls die  $\delta$ -Untereinheit des AP-3 (*Adapter Protein-3*)-Komplexes, ein Protein des Endosom-unabhängigen Transportweges zur Vakuole, bindet.<sup>[85, 86]</sup> Der Schalter zwischen beiden Transportwegen ist vermutlich ein ALPS (*Amphipathic Lipid-Packing Sensor*)-Motiv in Vps41, welches entweder die Membran bindet und so die Bindungsstelle zur  $\delta$ -Untereinheit maskiert, oder aber phosphoryliert vorliegt und die Bindungsstelle somit verfügbar macht. Entweder könnte die Eigenschaft der jeweiligen Membran, das ALPS-Motiv zu binden, entscheidend sein<sup>[87]</sup>, oder aber die Lokalisierung der Casein-Kinase Yck3<sup>[74]</sup>, welche für die Phosphorylierung von Vps41 zuständig ist<sup>[88, 89]</sup>. *In vitro* konnte für isoliertes Vps41 auch außerhalb des HOPS-Komplexes eine Phosphorylierung nachgewiesen werden.<sup>[87]</sup>

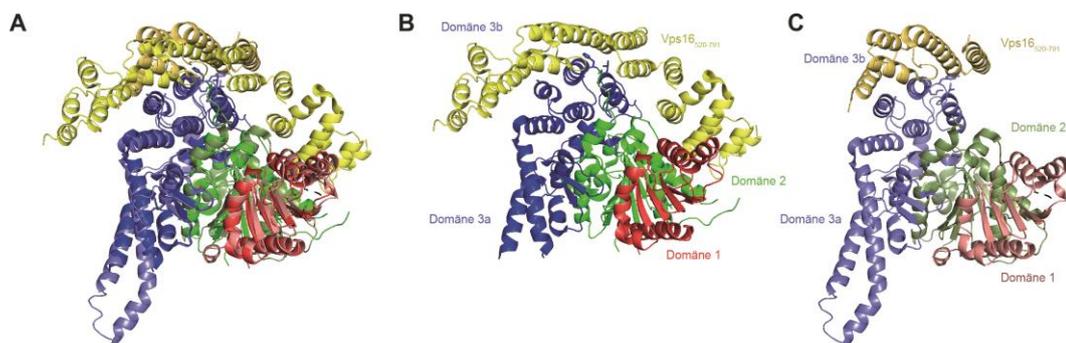
Da HOPS und CORVET den gleichen Kern an Untereinheiten aufweisen, wurde manchmal vermutet, dass beim Übergang vom frühen zum späten Endosom nicht der

komplette Komplex getauscht wird, sondern nur die spezifischen Untereinheiten ersetzt werden.<sup>[83, 90, 91]</sup> Diese Frage konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden.

### 1.2.1 Struktur von Vps33

Vps33 stellt einen Sonderfall der HOPS/CORVET-Untereinheiten dar, da es eine von den restlichen Untereinheiten unterschiedlich vorhergesagte Domänenstruktur aufweist (Kapitel 1.1.2.). Im Gegensatz zu den anderen Komplexuntereinheiten weist Vps33 eine Homologie zur Sec1/Munc18- (SM-) Proteinfamilie auf (ca. 20% Sequenzkonservierung)<sup>[92]</sup>. Diese Proteinfamilie bindet Q<sub>a</sub>-SNAREs und kann deren Aktivität modulieren.<sup>[93]</sup> Daher ist Vps33 ein wahrscheinlicher Kandidat für die Interaktion mit den SNAREs Vam3 und Vam7. Vam3 interagiert weiterhin mit den SNAREs Vti1 und Vam7<sup>[73]</sup>. Durch diesen Mechanismus könnte Vps33 diejenige Untereinheit des Komplexes sein, die bei der Einleitung der Vesikel-Annäherung mitwirkt.

Vps33 ist ebenfalls ein Sonderfall, da es die einzige HOPS/CORVET-Untereinheit ist, deren Vollängenstruktur bekannt ist.<sup>[94, 95]</sup> Wie für andere Proteine der SM-Familie bekannt, zeigt Vps33 einen Torbogen-artigen Aufbau und kann in drei Domänen aufgeteilt werden (Abb. 1.5). Zwischen der Domänen 1 (rot) und einem Teil der Domäne 3 (blau) liegt ein Riss bzw. Spalt. Den Torbogen bilden die Domäne 2 (grün) und der restliche Teil von Domäne 3.



**Abb. 1.5:** Kristallstrukturen von Vps33-Vps16 Komplexen. **A)** Strukturvergleich des Vps33-Vps16<sub>520-791</sub>-Komplexes von *Chaetomium thermophilum* (kräftige Farben) und des humanen Vps33-Vps16<sub>642-736</sub>-Komplexes (blassere Farben). **B-C)** Einzelstrukturen der Komplexe von **B)** *C. thermophilum* und **C)** Mensch. Strukturen sind nach Domänen eingefärbt: Domäne 1 in rot, Domäne 2 in grün, Domäne 3 in blau, Vps16-Fragmente in gelb. In **C)** wird nur die physiologisch relevante Interaktion zwischen Vps33 und Vps16 dargestellt. Abbildung nach [96] und [92].

Bei Munc18, welches als erstes SM-Protein strukturell aufgeklärt wurde<sup>[95]</sup>, bindet in der Spalte inaktives Syntaxin1A, ein Q<sub>a</sub>-SNARE. Die inaktive Form liegt dabei ebenfalls als „Vier-Helix-Bündel“ vor, ähnlich dem eines *trans*-SNARE-Komplexes, hier jedoch durch Munc18 stabilisiert.<sup>[95]</sup> Für Vps33 wurde noch kein Komplex mit einem SNARE-Protein publiziert. Strukturvergleiche sowie ein fehlender Nachweis einer direkten Interaktion zwischen Vps33, außerhalb der *class C-Vps*-Komplexe, und SNARE-Proteinen hat zu der Vermutung geführt, dass Vps33, trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zu SM-Proteinen, keine SNAREs direkt bindet.<sup>[92]</sup> Es ist jedoch gelungen, Vps33 nicht nur alleine zu kristallisieren, sondern ebenfalls zusammen mit seinem Bindungspartner Vps16: für den Menschen<sup>[92]</sup> hVps33A mit hVps16A<sub>520-791</sub> und für den Pilz *C. thermophilum*<sup>[96]</sup> Vps33 mit Vps16<sub>642-739</sub>. Die Bindung des C-terminalen Bereichs von Vps16 induziert jedoch keine strukturellen Änderungen in Vps33. Ein Vergleich der Kristallstrukturen von Vps33 mit und ohne Vps16 ergibt einen RMSD (*root-mean-square deviation*) unter 0,6 Å.<sup>[96]</sup> Über Strukturänderungen in Vps16 kann keine Aussage getroffen werden, da keine Einzelstruktur von Vps16 bekannt ist. Der Vergleich von Vps33 zwischen den Spezies zeigt auch nur geringe Unterschiede mit einem RMSD von 1,4 Å zwischen äquivalenten C $\alpha$ -Atomen von Vps33 in der Komplexstruktur. Es gibt jedoch Unterschiede in der Anordnung der Proteine im Kristall: Während beide Vps33-Proteine alleine in der Raumgruppe P2<sub>1</sub> kristallisieren und in der asymmetrischen Einheit ein kristallographisches Dimer von Vps33 aufweisen, ändert sich dies bei der Kristallisation der Komplexe. Der Komplex von Vps33-Vps16 aus *C. thermophilum* kristallisiert in der Raumgruppe P3<sub>1</sub>21, der humane hVps33A-hVps16A-Komplex dagegen in der Raumgruppe P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2. Das humane Vps16-Fragment hat so Kontakt zu insgesamt vier verschiedenen Vps33-Molekülen im Kristall. Jedoch erscheint nur eine der Interaktionen physiologisch relevant. Der Grund für die unterschiedlichen Anordnungen im Kristall liegt vermutlich an dem längeren Vps16-Fragment des Pilzkomplexes, welches Interaktionen von Vps33-Molekülen im Kristallgitter verhindert. In Gelfiltrationsexperimenten wurden 1:1-Komplexe zwischen Vps33 und Vps16 sowohl für humane Komplexe als auch für den Pilzkomplex gefunden.<sup>[92, 96]</sup>

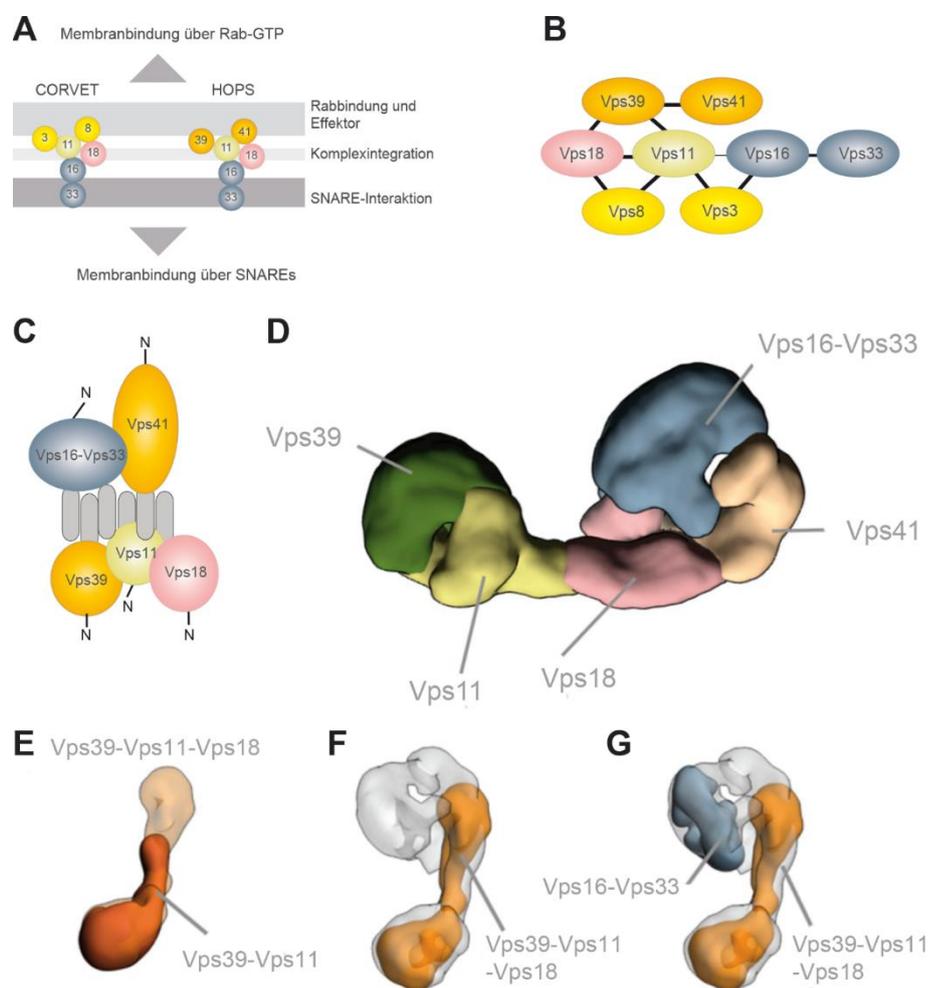
Es ist zu beachten, dass, wie eingangs erwähnt, zwei Isoformen von Vps33 und Vps16 im Menschen bekannt sind (hVps33A und hVps33B sowie hVps16A und VIPAR). Im humanen Komplex kristallisierte Vps33A mit dem Vps16A-Fragment.

Dieses wurde in *Pulldown*-Experimenten bestätigt, in welchen GST-Vps16A nur eine Interaktion mit hVps33A zeigt, nicht jedoch mit hVps33B. Vps33 zeigt eine analoge Präferenz. So ist Vps33A-GST nur in der Lage, mit Vps16A, und nicht mit VIPAR (Vps16B), zu interagieren.<sup>[92]</sup> Anhand der Kristallstrukturen konnte erkannt werden, dass im humanen Komplex die Aminosäuren K429, Y438 und I441 von Vps33A sowie R725 von Vps16A entscheidend für die Komplexbildung sind. Dieses konnte in anschließenden *Pulldown*-Experimenten bestätigt werden, da selbst Einzelmutanten die Interaktion unterbrechen.<sup>[92]</sup> Auch für den Pilzkomplex ermöglichte die Kristallstruktur eine gezielte Mutagenese: hier waren A411, H451 sowie L454 von Vps33 entscheidend für die Stabilität des Komplexes. Jedoch waren Doppelmutanten (A411/H451 und A411/L454) notwendig, um die Komplexbildung zu unterbinden.<sup>[96]</sup> Auch wenn dieses auf eventuelle divergierende Eigenschaften des Interaktionsbereiches hinweist, so sind die beteiligten Aminosäuren chemisch ähnlich und entsprechen sich nach Strukturvergleich.

### 1.2.2 Komplexarchitektur

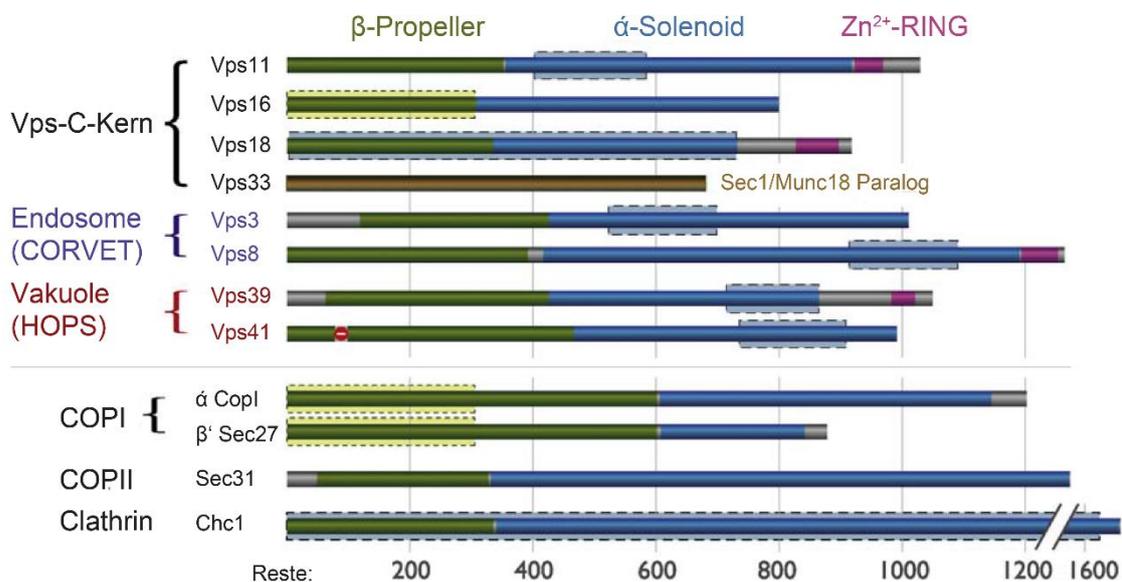
Insgesamt sechs Untereinheiten bilden zusammen den HOPS- oder CORVET-Komplex in der Hefe. Die Assemblierung der Komplexe ist jedoch noch unbekannt. Auffällig ist dabei, dass der Kernkomplex aus Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33 weder aus Hefe isoliert, noch *in vitro* gebildet werden kann.<sup>[83]</sup> Beim *Knockout* der zentralen Untereinheit Vps18 zerfällt der Komplex in zwei stabile Unterkomplexe. Zum einen in einen Unterkomplex bestehend aus den beiden Kernuntereinheiten Vps16 mit Vps33<sup>[73, 83]</sup> sowie einen Unterkomplex bestehend aus der Kernuntereinheit Vps11 zusammen mit der spezifischen HOPS-Untereinheit Vps39<sup>[83]</sup>. Erste Einblicke in die Architektur, insbesondere in die Interaktionen zwischen den einzelnen Untereinheiten, lieferten *Pulldown*-Experimente mit Deletionsstämmen im Jahr 2010 (Abb. 1.5A).<sup>[83]</sup> Die Ergebnisse wurden jedoch bereits im folgenden Jahr durch eine *Yeast-Two-Hybrid*- (Y2H-) Analyse teilweise in Frage gestellt (Abb. 1.5B).<sup>[97]</sup> Im Jahr 2013 wurde ein weiterer Interaktionsassay publiziert, aus welchem ein deutlich unterschiedlicher Komplexaufbau abgeleitet wurde (Abb. 1.5C).<sup>[98]</sup> Erste strukturelle Einblicke in den Komplex lieferten niedrig aufgelöste elektronenmikroskopische Strukturen des HOPS-Komplexes sowie einiger Unterkomplexe (Abb. 1.5D).<sup>[99]</sup> Erschwert wurde die Interpretation der 29-Å- Elektronendichtekarte dadurch, dass für alle Untereinheiten des

HOPS-Komplexes, mit der Ausnahme von Vps33, ähnliche Domänenarchitekturen vorhergesagt werden (Abb. 1.6).<sup>[100]</sup> Somit gibt es bis auf die im vorherigen Kapitel beschriebene Interaktion zwischen Vps33 und Vps16 keine genauen Informationen über die Interaktionen im Komplex und somit auch keine gesicherten Aussagen über die exakte Komplexarchitektur. Interessanterweise bietet die beschriebene Kristallstruktur des Vps33-Vps16-Komplexes den ersten Beweis für die Korrektheit der Strukturvorhersage, zumindest für den C-terminalen Bereich, da das Vps16-Fragment eine rein helikale Struktur aufweist.



**Abb. 1.6:** **Struktur des Tethering-Komplexes HOPS.** A-C) Modelle des Komplexaufbaus auf Grundlage von *Pulldown*- (A), *Yeast-Two-Hybrid*- (B) und *Pulldown*-Experimenten mit *in vitro* hergestellten Proteinen (C). D) Segmentierte Struktur des Volllänge-Komplexes HOPS eingefärbt nach den putativen Untereinheiten. E-G) Elektronendichte der Unterkomplexe. E) Vps39-Vps11-Dimer eingepasst in die Elektronendichte des Vps39-Vps11-Vps18-Trimers. F) Vps39-Vps11-Vps18-Trimer und G) Vps16-Vps33-Dimer eingepasst in die Elektronendichte von HOPS. Abbildung nach [83, 97-99].

Ein Abgleich mit dem Dali-Server<sup>[101]</sup> zeigt eine geringe Strukturhomologie zu sogenannten HEAT-repeats, welche zu den  $\alpha$ -solenoiden Domänen gezählt werden. N-terminal von der  $\alpha$ -Solenoid-Domäne wird ein  $\beta$ -Propeller vorhergesagt und für Vps11, Vps18 und Vps8 C-terminal noch eine RING-Domäne (Abb. 1.7). Der Gesamtaufbau der *class C-Vps*-Proteine, bis auf Vps33, ist ähnlich zu Hüllproteinen oder auch Nukleoporinen.<sup>[100, 102]</sup> Im Folgenden wird näher auf die drei in HOPS/CORVET-Untereinheiten vorkommenden Strukturelemente eingegangen:



**Abb. 1.7:** Domänenarchitektur der *class C-Vps-Komplexe*. Zusammenfassung der Tertiärstrukturvorhersage durch den Rosetta-Algorithmus<sup>[103]</sup> für die HOPS/CORVET-Untereinheiten und einige Hüllproteine. Die Einfärbung erfolgte nach der Domänenvorhersage. Aminosäurehomologien zwischen den *class C-Vps*-Proteinen und Clathrin sind durch blaue Boxen hervorgehoben. Homologie des N-terminus von Vps16 zu COPI-Untereinheit hervorgehoben durch grüne Boxen. COP/Cop: coat protein; Sec: secretory; Chc: clathrin heavy chain. Abbildung nach [100].

Für Vps39 wird eine partielle RING-Domäne vorhergesagt. Es gibt jedoch auch Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies. Während Vps41 der Hefe keine RING-Domäne aufweist, wird für das humane Homolog diese vorhergesagt. Die Deletion der RING-Domäne, welche zur H2-Variante<sup>[104]</sup> gehört, bei der das vierte Zink-chelatierende Cystein durch ein Histidin ersetzt ist, von Vps8, Vps11 und Vps18 führt zu verschiedensten Defekten in der Proteinsortierung in Hefe.<sup>[97]</sup> Die RING-Domänen wurden auch als E3-Ubiquitin-Ligasen beschrieben, und zumindest hVps18 kann die Ubiquitinylierung des Adapterprotein Gga3 stimulieren.<sup>[105, 106]</sup>

Generell haben  $\alpha$ -solenoidale Strukturen häufig eine Rolle in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen<sup>[107]</sup>, vermutlich bedingt durch ihre hohe strukturelle Flexibilität<sup>[108]</sup> und durch die Ausbildung konkaver Oberflächen. Zusätzlich wurden Interaktionen mit DNA als auch mit Lipiden beschrieben.<sup>[109]</sup> Die  $\alpha$ -solenoidalen Bereiche können elastisch auf mechanische Kräfte reagieren und sich nach Entfaltung wieder zurückfalten.<sup>[110]</sup> Die strukturelle Flexibilität wird durch die Wiederholung von Paaren anti-paralleler  $\alpha$ -Helices gegeben.<sup>[109, 111]</sup>

Nicht nur  $\alpha$ -Solenoid-Domänen sondern ebenfalls  $\beta$ -Propeller als Protein-Protein-Interaktionen vermittelnde Strukturelemente bekannt. Der  $\beta$ -Propeller kann aus 4 bis 10 Wiederholungen von viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen, die jeweils ein Blatt (*blade*) des Propellers darstellen.<sup>[112]</sup> Am häufigsten sind dabei 7 Wiederholungen, dagegen sind Propeller mit 9 Blättern noch nicht bekannt.<sup>[112]</sup> Bei dem sogenannten Klettverschluss- (*velcro closure*-)  $\beta$ -Propeller wird das letzte Blatt aus dem ersten N-terminalen Faltblattstrang sowie den letzten drei C-terminalen Faltblattsträngen gebildet. Es gibt aber auch  $\beta$ -Propeller, bei denen dies nicht der Fall ist. Interaktionen wurden mit allen Bereichen dieses Elementes beschrieben: so können Proteine, sowie Nukleinsäuren am Rand des Propellers, an der inneren Pore als auch an beide Seitenoberflächen binden.<sup>[113]</sup> Die Interaktionen werden dabei häufig durch Schleifenregionen zwischen den einzelnen Faltblattsträngen vermittelt. Jüngst wurden auch  $\beta$ -Propeller-Lipid-Interaktionen beschrieben für eine Klasse von  $\beta$ -Propellern, die als PROPPINs (*PROpellers that bind PhosPhoInositols*) bezeichnet wurden.<sup>[114]</sup> Bezeichnend für sie ist ein FRRG-Motiv in einer Schleifenregion.<sup>[115]</sup> Die beiden Arginine des Motivs binden vermutlich an die Phosphatgruppen der Phosphoinositole und vermitteln so die Interaktion.<sup>[114, 116]</sup> Dieses konnte durch Mutationsstudien belegt werden, jedoch noch nicht strukturell aufgeklärt werden.

### 1.3 Fragestellung

Mit Ausnahme von Vps33 wurden für alle Untereinheiten der *class C Vps Tethering*-Komplexe HOPS und CORVET ähnliche Domänenarchitekturen vorhergesagt. Dieses könnte potentiell auf eine Entstehung des Komplexes durch Genduplikationen hinweisen.<sup>[117]</sup> Jedoch basiert diese Annahme bislang nur auf Sequenzinformationen. Erst jüngst konnte das Vorliegen einer C-terminalen  $\alpha$ -Solenoid-Domäne durch Kristallstrukturanalyse des C-terminalen Bereichs von Vps16 bestätigt werden.<sup>[92, 96]</sup> Auch bezüglich der Funktion der einzelnen Untereinheiten sowie ihrer genauen Organisation im Komplex besteht Klärungsbedarf. So gibt es zumindest partielle Diskrepanzen zwischen einer *Yeast-Two-Hybrid*-Studie von HOPS und CORVET<sup>[97]</sup>, einer elektronenmikroskopischen Struktur des HOPS-Komplexes<sup>[99]</sup> sowie Co-Immunopräzipitationsstudien einzelner Untereinheiten<sup>[98]</sup>. Funktionell ist eindeutig gezeigt, dass HOPS und CORVET ihre *Tethering*-Aktivität an Vesikelmembranen entfalten, jedoch ist noch weitgehend unklar, wie genau der Komplex an Membranen rekrutiert und gebunden wird. Für einzelne Komponenten sind zwar Interaktionen postuliert<sup>[76, 87]</sup>, jedoch fehlt auch hier ein vollständiges Bild.

Die Fragestellung dieser Arbeit war

- die Domänenstruktur der potentiell verwandten Untereinheiten Vps3, Vps8, Vps11, Vps16, Vps18, Vps39 und Vps41 mittels Proteinkristallographie von Einzelkonstrukten strukturell zu charakterisieren.
- mittels Strukturinformation potentielle Funktionen der charakterisierten Domänen zu ermitteln.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Agarosegel-Kammer	HG370 / HG330	Savant
Analysenwaage	MR2002/ CP2202S-OCE	Sartorius
Brutschrank	MIR-153	SANYO
CD-Spektrometer	Chirascan	Applied Photophysics
Chromatographie-Säulen	Superdex 75 bzw. 200, HiLoad 16/60 bzw. 26/60	GE Healthcare
Chromatographie-Systeme	Äkta Explorer	GE Healthcare
	Äkta FPLC	GE Healthcare
Extruder	Mini-Extruder	Avanti Polar Lipids
Feinwaage	MC1 Analytical AC1205	Sartorius
Fluidizer	Microfluidizer	Microfluidics
Gel- bzw. Blot- Dokumentation	LAS 4000	Fujifilm
	UV-Tisch	Biometra
	BDA digital Basis Set	Biometra
Heizblock	Accublock Digital Dry Bath	Labnet
Kristallbeobachtung	Rock Imager (20 °C)	Formulatrix
	Leuchttisch KL 2500LCD	Leica
	Mikroskop Wild M3C	Leica
	Mikroskop M420	Leica
	Kamera DXC-390P	Sony
Kristallisationsroboter	Hydra II	Matrix Technologies
	Gryphon	Art Robbins Instruments
Kulturschüttler	HAT-Multitron	INFORS
	Excella E24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
PAGE-Gelkammer	Mini 2-D System	Biorad
Peristaltikpumpe	P-1	Pharmacia
pH-Meter	Lab 850	Schott
Photometer	Nanodrop ND 1000	peqlab
RALS-Apparatur	Viscotek 270 Dual Detector	Viscotek
	VE3580 RI detector	Viscotek
Rotationsmischer	Test tube rotator 34528	Neolab
	Rotator 2-1175	Neolab
Spannungsgeneratoren	Power PAC 300	Biorad
	Power Pack P25	Biometra
Thermoblock	Thermomixer 5436 / 5437	Eppendorf
Thermocycler	PTC-200	MJ Research
	CFX96 Real-Time System	Biorad

Ultrazentrifuge	Optima™ TLX	Beckman Coulter
Vortexmixer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wipptisch	WT 16	Biometra
Zentrifugen	5417R	Eppendorf
	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
	Biofuge stratos	Heraeus

### 2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Calbiochem (Darmstadt, D), Jena Bioscience (Jena, D), GE Healthcare (Freiburg, D), Roche Applied Science (Penzberg, D), Biochrom (Berlin, D), Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA), AppliChem (Darmstadt, D) and Serva (Heidelberg, D) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

### 2.1.3 Enzyme und Antikörper

Typ	Name	Hersteller
Ligase	T4 DNA Ligase	NEB
Nuclease	DNase I	Roche
Phosphatase	antarktische Phosphatase	NEB
Polymerasen	PfuPlus!-DNA-Polymerase	Roboklon
	Taq	Roboklon
	T4-DNA-Polymerase	NEB
Proteasen	$\alpha$ -Chymotrypsin	Sigma
	TEV-Protease	Eigenproduktion
	Trypsin	Sigma
Restriktionsenzyme	BamHI	NEB
	BglII	NEB
	DpnI	NEB
	NotI	NEB
Antikörper	Anti-TetraHis Anti-Maus Meerrettich-Peroxidase (HRP, <i>horse radish peroxidase</i> ) Konjugat	QIAGEN

### 2.1.4 Kits

Typ	Name	Hersteller
Molekularbiologie	<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
	<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen
Immundetektion	<i>Enhanced Chemiluminescence (ECL)</i>	GE Healthcare
Kristallisation	<i>The Anions Suite</i>	Qiagen

Kristallisation	<i>The Cations Suite</i>	Qiagen
	<i>The Classics II Suite</i>	Qiagen
	<i>The Classics Suite</i>	Qiagen
	<i>The JCSG+ Suite</i>	Qiagen
	<i>The PACT Suite</i>	Qiagen
	<i>The pHClear II Suite</i>	Qiagen
	<i>The pHClear Suite</i>	Qiagen
	<i>Hampton Additive Screen HT</i>	Hampton

### 2.1.5 Bakterienstämme

Die Klonierungs- und Expressionsversuche wurden mit folgenden Bakterienstämmen von Invitrogen und Stratagene durchgeführt:

Stamm	Genotyp	Verwendung
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> F $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 <math>\lambda</math></i>	Plasmidamplifikation
PirHC	<i>E. coli</i> F $\Delta$ <i>lac169 rpoS</i> (Am) <i>robA1 creC510</i> <i>hsdR514 endA recA1 uidA</i> ( $\Delta$ MluI)::pir-116	Plasmidamplifikation
PirLC	<i>E. coli</i> F $\Delta$ <i>lac169 rpoS</i> (Am) <i>robA1 creC510</i> <i>hsdR514 endA recA1 uidA</i> ( $\Delta$ MluI)::pir	Plasmidamplifikation
Rosetta2 (DE3)	<i>E. coli</i> F, <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , Tet <sup>r</sup> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> [ <i>argU ileY leuW Cam</i> <sup>r</sup> ]	Proteinexpression

### 2.1.6 Nährmedien

Name	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB)-Medium:	10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt
LB-Agar:	10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 1,5% (w/v) Agar
2x Luria-Bertani (LB)-Medium:	20 g/l Trypton, 20 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt
SOB Medium:	20 g/l Trypton, 0,58 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub>
SOC Medium:	20 g/l Trypton, 0,5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM Glucose
SeMet-Medium, M9-Medium:	6 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH <sub>4</sub> Cl, 1 ml/l 1000x Spurenelemente, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,2% (w/v) Glucose
Spurenelemente, 1000x:	ZnSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O (100 mg/l), MnCl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O (30 mg/l), H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (300 mg/l), CoCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O (200 mg/l), NiCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O (20 mg/l), CuCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O (10 mg/l), Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O (900 mg/l), Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> (20 mg/l)

### 2.1.7 Vektoren

Name	Beschreibung	Referenz
pQlinkH	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit Ampicillinresistenz, tac Promotor, LINK-Sequenzen, N-terminalem Heptahistidin-Tag und TEV-Protease-Schnittstelle, ColE1 ori	Scheich <i>et al.</i> 2007 <sup>[118, 119]</sup>
pQlinkG	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit Ampicillinresistenz, tac Promotor, LINK-Sequenzen, N-terminalem GST-Tag und TEV-Protease-Schnittstelle, ColE1 ori	Scheich <i>et al.</i> 2007 <sup>[118]</sup>
pACE	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit Ampicillinresistenz, T7 Promotor, Cre-LoxP-Reaktionsstelle, BR322 ori	Bieniossek <i>et al.</i> 2009 <sup>[120]</sup>
pDK	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit Kanamycinresistenz, <i>lac</i> Promotor, Cre-LoxP-Reaktionsstelle, R6K $\gamma$ ori	Bieniossek <i>et al.</i> 2009 <sup>[120]</sup>

### 2.1.8 Lösungen und Puffer

Für die Molekularbiologie:

Name	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure
Agarosegele	1% (w/v) Agarose, 0,01% (w/v) Ethidiumbromid in TAE-Puffer
DNA-Probenpuffer 5x	0,05% (w/v) Xylencyanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin in TAE-Puffer
DNA-Marker	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 1 kb Marker (Roboklon)
TFB1-Puffer	80 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM CaCl <sub>2</sub>
TFB2-Puffer	100 mM CaCl <sub>2</sub> +10% Glycerol

Für Western-Blots und Immunodetektion:

Name	Zusammensetzung
Transferpuffer	50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween
PBS, 1x	84 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 153 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, 3 mM KCl
TBS-T	25 mM Tris, pH 8,0, 192 mM Glycin, 0,04% SDS, 20% Methanol

Für Testexpression, CD-Spektroskopie, *Pulldown*- und Co-Sedimentationsexperimente:

Name	Zusammensetzung
Medium 1	2xLB Medium, 0,5% Glucose
Medium 2	2xLB Medium, 0,6% Lactose, 20 mM HEPES, pH 7.0
CD-Puffer	20 mM KP <sub>i</sub> , pH 7,4, 200 mM NaF
HEPES-Lysepuffer	50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin
HEPES-Waschpuffer 1	50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 0.15% NP-40 (Igepal CA-630)
Vesikel-Puffer	20 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM KCl, 50 mM L-Arginin/L-Glutaminsäure

Für die Proteinreinigung:

Name	Zusammensetzung
PBS-Lysispuffer	1xPBS, 0,5 M NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 0,25% CHAPS, 0,1 mg/ml Lysozym, 2,5 µg/ml DNase I, 1 Proteaseinhibitortablette ( <i>cOmplete</i> , Roche) pro 50 ml Puffer
TeEx-Puffer	20 mM Tris, pH 8,0, 0,2 M NaCl
TeEx-Waschpuffer	20 mM Tris, pH 8,0, 0,2 M NaCl, 20 mM Imidazol
PBS-Lysepuffer	1x PBS, 0,5 M NaCl, 5% (v/v) Glycerin
Puffer W <sub>0</sub> :	10 mM Tris pH 8,0, 0,3 M NaCl, 100 µM ZnSO <sub>4</sub>
Puffer W <sub>1</sub> :	10 mM Tris pH 8,0, 0,3 M NaCl, 100 µM ZnSO <sub>4</sub> , 5 mM Imidazol
Puffer W <sub>2</sub> :	10 mM Tris pH 8,0, 0,3 M NaCl, 100 µM ZnSO <sub>4</sub> , 20 mM Imidazol
Puffer E <sub>1</sub> :	10 mM Tris pH 8,0, 0,3 M NaCl, 100 µM ZnSO <sub>4</sub> , 300 mM Imidazol
Puffer E <sub>2</sub> :	10 mM Tris pH 8,0, 0,3 M NaCl, 100 µM ZnSO <sub>4</sub> , 500 mM Imidazol
Dialysepuffer	20 mM Tris pH 8,0, 0,3 M NaCl, 5% Glycerin, 50 mM L-Arginin/L-Glutaminsäure
GF-Puffer 1	20 mM HEPES pH 7,5, 0,2 M NaCl
GF-Puffer 2	20 mM Tris-Acetat pH 7,5, 0,15 M NaCl
GF-Puffer 3	20 mM HEPES pH 7,5, 0,2 M NaCl, 50 mM L-Arginin/L-Glutaminsäure
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
4xSDS-Probenpuffer	50 mM Tris, 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 0,25% (w/v) Bromphenol Blau, 10% Glycerin
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
Lösung 1	50% Ethanol, 10% Essigsäure
Lösung 2	5% Ethanol, 7,5% Essigsäure
Lösung 3	0,5% Coomassie R250 in Ethanol

## 2.2 Arbeitsmethoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion

Benötigte Genfragmente (Insert) wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) von genomischer Hefe-DNA oder einem Plasmid, welches das Gen enthielt (Matrize) amplifiziert. Die Vervielfältigung erfolgte mittels zweier Oligonukleotide, sogenannter Primer. Die Ansätze wurden wie in Tabelle 2.1 hergestellt und anschließend mit dem Arbeitsprogramm aus Tabelle 2.2 vervielfältigt. Dabei wurde die Hybridisierungstemperatur in Abhängigkeit vom verwendeten Primer gewählt, und die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des Genfragments (750 bp/min).

Um das Insert im präparativen Maßstab zu erhalten, wurden 25 Zyklen aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation verwendet. Zur Optimierung der Spezifität der Amplifizierung von Genfragmente aus genomischer Hefe-DNA wurden zusätzliche *Touchdown*-Schritte in das PCR-Programm eingefügt.

**Tabelle 2.1: Pipettierschema für PCR-Ansätze.**

Reagenz	Konzentration
dNTP, je 5 mM	100-200 $\mu$ M
5'-Primer, 10 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M
3'-Primer, 10 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M
Puffer, 10x	1 x
DNA-Matrize	50 ng
PfuPlus- Polymerase	7 U
<i>ddH</i> <sub>2</sub> O	zu 50 $\mu$ l

Bei diesen *Touchdown*-Schritten wurde zunächst eine 10 °C höhere Hybridisierungstemperatur gewählt, die mit jedem Zyklus um ein Grad reduziert wurde, bis die eigentliche Hybridisierungstemperatur von  $T_M - 5$  °C erreicht wurde.<sup>[121]</sup> Durch dieses Vorgehen wird in den anfänglichen Zyklen eine striktere Basenhybridisierung zwischen Primer und DNA-Matrize, auf Kosten der Ausbeute, erzwungen. Dadurch herrscht in den folgenden Zyklen ein Überschuss des PCR-Produkts gegenüber der Ursprungsmatrize vor, so dass die Hybridisierungsbedingung relaxiert werden können

**Tabelle 2.2: PCR-Temperaturzyklus von der genomischen Matrize.**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung- <i>Touchdown</i>	95 °C	30 s	10
Hybridisierung- <i>Touchdown</i>	$T_M + 10$ °C	45 s	
Elongation- <i>Touchdown</i>	72 °C	750 bp/min	
Denaturierung	95 °C	30 s	25
Hybridisierung	$T_M - 5$ °C	30 s	
Elongation	72 °C	750 bp/min	
Elongation	72 °C	10-20 min	1
Ende	4 °C	$\infty$	

### 2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle des Verlaufs der Amplifizierung der Inserts wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Bei der Agarose-Gelelektrophorese erfolgt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes die Auftrennung der PCR-Produkte nach der Größe der negativ geladenen DNA. Agarose bildet beim Abkühlen ein dreidimensionales, siebartiges Netzwerk aus, wodurch größere Fragmente langsamer zu Anode wandern als kleinere. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 125 V mit einer Agarosekonzentration von 1% in TAE-Puffer. Zur Markierung der DNA-Fragmente enthielt das Gel 0,01% (w/v)

Ethidiumbromid, welches sich in DNA-Stränge einlagert und dadurch unter UV-Licht die Detektion der jeweiligen DNA-Fragmente ermöglicht.

### 2.2.1.3 Restriktion und Ligation

#### 2.2.1.3.1 Restriktionsverdau

Für die Herstellung von Expressionsplasmiden der jeweiligen Einzelkonstrukte wurden die Vektoren pQlinkH (Histidinanker) und pQlinkG (GST-Anker) verwendet. Für diese Vektoren wurde die klassische Klonierungsmethode bestehend aus Restriktion und Ligation gewählt.

Vor der Ligation von zwei DNA-Fragmenten, hier Vektor mit PCR Produkt, wurden diese zunächst durch Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) verdaut. Die Enzyme katalysieren beim Verdau die spezifische Spaltung palindromischer DNA-Sequenzen. Für den Restriktionsverdau wurden folgende Ansätze verwendet:

**Tabelle 2.3: Mengenangaben für den Verdau des Vektors.**

Reagenz	Konzentration
Vektor	3 µg
BamHI	60 U
NotI	30 U
Puffer (10x)	1x
ddH <sub>2</sub> O	zu 80 µl

**Tabelle 2.4: Mengenangaben für den Verdau des PCR-Produkts.**

Reagenz	Konzentration
Genfragment	45 µl
BamHI/BglII	10 U/5 U
NotI	5 U
Puffer (10x)	1x
ddH <sub>2</sub> O	zu 80 µl

Der Ansatz wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion anschließen durch Erhitzen für 20 min auf 65 °C gestoppt.

#### 2.2.1.3.2 DNA-Reinigung

Die Reaktionsprodukte wurden mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben gereinigt. Hierfür wurde die DNA unter Hochsalzbedingungen an die Säulenmatrix gebunden und nach dem Waschen unter Niedrigsalzbedingungen mit 30 µL TE-Puffer eluiert.

#### 2.2.1.3.3 Ligation

Der letzte Schritt der eigentlichen Ligationsreaktion ist die Dephosphorylierung des Vektors mit der Antarktische Phosphatase (AP). Das Enzym katalysiert die Spaltung der Phosphatgruppe vom 5'-Ende der DNA und verhindert damit eine unerwünschte,

spontane Religation des Vektors. Für die Dephosphorylierung wurde folgender Ansatz gewählt:

**Tabelle 2.5: Mengenangaben für die Dephosphorylierungsreaktion.**

Reagenz	Konzentrationen
Vektor	~2500 ng
AP	5 U
Puffer (10x)	1x
ddH <sub>2</sub> O	zu 50 µl

Die Reaktion wurde nach einer halbe Stunde bei 37 °C durch Erwärmung des Ansatzes auf 85 °C für 15 min abgebrochen. Durch das Erwärmen wird die AP vollständig deaktiviert, weswegen ein weiterer Reinigungsschritt nicht notwendig ist.

Vektor und Genfragment wurden mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, die komplementäre überstehende Enden erzeugten. Bei der Ligation lagern sich die Enden des Vektors an die des Genfragments an, und die T4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung des 3'-Hydroxy- mit dem 5'-Phosphatende. Zur Ligation wurde der Vektor mit dem zwei- bis fünffachen molaren Überschuss an Insert gemischt. Das Vektor/Insert-Gemisch wurde vor Zugabe der Ligase und des Ligasepuffers auf 65 °C für 10 min erhitzt und dann langsam auf 16 °C abgekühlt. Durch das Erhitzen sollen mögliche Sekundärstrukturen des Vektors und des Inserts zerstört werden, welche die Ligation inhibieren könnten. Der Ligasepuffer (10x) für ein Volumen von 20 µl und 200 Einheiten T4-DNA-Ligase wurden nach dem Erreichen von 16 °C hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann für 2 h bei 16 °C inkubiert, anschließend in chemisch-kompetente DH5α-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.5) und auf Agarplatten mit einem dem Selektionsmarker des verwendeten Plasmides entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die entstanden Kolonien wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.1.6) auf positive Ligationsergebnisse untersucht.

## 2.2.1.4 Ligase unabhängiges Klonieren (LIC)

### 2.2.1.4.1 T4-DNA-Polymerase Exonuklease Behandlung

Zur Herstellung von Co-Expressionsplasmiden wurden nur der Akzeptorvektor pACE und der Donorvektor pDK von Dr. Imre Berger<sup>[120]</sup> verwendet. Beim Ligase-unabhängigen Klonieren (*Ligase Independent Cloning*, LIC) werden die komplementären Überhänge durch eine T4-DNA-Polymerase erzeugt. Die T4-DNA-Polymerase

katalysiert in Anwesenheit von Matrize und Primer die Synthese von DNA in die 5'-Richtung, hat aber auch eine Exonuklease-Aktivität in der Abwesenheit von dNTP's in die 3'-Richtung. Die Exonuklease-Aktivität wird verwendet, um komplementäre überstehende Enden zu erzeugen.

Hierfür wurden nach erfolgreicher Amplifizierung der Genfragmente die Reaktionsprodukte mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Kapitel 2.2.1.2.3) zur Entfernung von überschüssigen dNTPs und Primern gereinigt.

Die Ansätze für T4-DNA-Polymerase Behandlungen wurden wie in Tabelle 2.6 hergestellt und anschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl EDTA (500 mM) und Erhitzen auf 75 °C wurde die Reaktion gestoppt. Eine weitere Reinigung der PCR-Produkte war nicht notwendig.

**Tabelle 2.6: Mengenangaben für die T4-DNA-Polymerase Behandlung.**

Reagenz	Mengen
Vektor/Insert	28 µl
Puffer (10x)	4 µl
2 M Harnstoff	4 µl
100 mM DTT	2 µl
T4-DNA-Polymerase	0,5 U / 1 µg
ddH <sub>2</sub> O	zu 40 µl

#### **2.2.1.4.2 Annealing**

Für das *Annealing* wurde der Vektor mit einem gleichen molaren Teil Insert gemischt. Der Ansatz wurde auf 65 °C erhitzt und sehr langsam auf 37 °C abgekühlt. Nach Erreichen der 37 °C wurde der Ansatz für eine weitere halbe Stunde bei dieser Temperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in chemisch-kompetente DH5α- für pACE oder Pir-Zellen für pDK transformiert (Kapitel 2.2.1.5) und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die entstanden Kolonien wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR (Kapitel 2.2.1.6) auf positive Ergebnisse untersucht.

#### **2.2.1.4.3 Fusion**

Mit dem Vektorensystem von Imre Berger ist die Erzeugung von Co-Expressionsplasmiden auf verschiedenste Weise möglich, u.a. mittels der Cre-LoxP Reaktion. Diese ist möglich, da sowohl der Akzeptorvektor als auch der Donorvektor 34 bp lange LoxP-Stellen enthalten. Die *Cre-Recombinase* katalysiert die Rekombination

und ermöglicht so die Fusion von Akzeptor mit Donor. Hierfür wurden Akzeptorplasmid mit dem gleichen molaren Teil Donorplasmid gemischt und mit der *Cre-Recombinase* bei 37 °C für 1 h inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde in chemisch-kompetente DH5 $\alpha$  (Pir negativ Zellen) transformiert und auf Agarplatten mit einem Antibiotikum korrespondierend zum Donorplasmid ausplattiert.

#### **2.2.1.5 Transformation in *E. coli***

Mittels einer Transformation kann Fremd-DNA in kompetente Bakterienzellen (z.B. *E. coli* DH5 $\alpha$ , PirLC oder PirHC) eingebracht werden. Zum einen kann eine Transformation mittels Hitzeschock erfolgen: Durch die Behandlung mit Calciumchlorid wird die negative Ladung der Bakterienmembran maskiert, und die negativ geladene DNA kann somit besser aufgenommen werden. Zum anderen kann DNA durch Transformation mittels Elektroschock in Bakterienzellen eingebracht werden. Durch das Anlegen einer hohen Spannung für einige Millisekunden können sich Membranporen öffnen und so die Plasmid-DNA in die Zellen gelangen.

Es wurde in dieser Arbeit nur die Methode der Transformation mittels Hitzeschock verwendet. Hierfür wurde 1-100 ng DNA zu einem Aliquot chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ - oder Pir-Zellen für die Plasmidamplifikation und Rosetta2 (DE3) Zellen für die Proteinexpression gegeben. Diese Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (30 s bei 42 °C) wurden die Aliquots für 2 min auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden in 300  $\mu$ l SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit einem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **2.2.1.6 Kolonie-PCR**

Ligation, *Annealing* als auch die Fusionsreaktion zur Herstellung der Expressions- und Co-Expressionsvektoren wurde mittels Kolonie-PCR kontrolliert. Hierfür wurden Einzelkolonien von der LB-Agarplatte in je 10  $\mu$ l PCR-Mix (Tabelle 2.7) als Matrize gegeben. Anschließend wurde die Matrize mit dem Arbeitsprogramm aus Tabelle 8 vervielfältigt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

**Tabelle 2.7: Pipettierschema für die Herstellung des PCR-Mix.**

Reagenz	Konzentration	Mengen für 10 µl Ansatz
dNTP	5 mM	80 µM
5'-Primer (T7-Promotor)	100 pmol / µl	0,3 µM
3'-Primer (T7-Terminator)	100 pmol / µl	0,3 µM
Puffer	10 x	1 x
Taq-Polymerase	5 U / µl	1,25 U
Wasser		zu 10 µl

Zur Vervielfältigung wurden 25 Zyklen aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation verwendet.

**Tabelle 2.8: PCR-Programm zur Durchführung der Kolonie-PCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	300 s
Denaturierung	95 °C	30 s
Primerhybridisierung	50 °C	30 s
Elongation	72 °C	100 bp/min
finale Elongation	72 °C	300 s
Ende	4 °C	∞

### 2.2.1.7 Mutagenese

Mutationen wurden in einem einstufigen Verfahren durch gezielte Mutagenese nach Zheng et al. (2004)<sup>[122]</sup> eingeführt. Die Primer für die Mutagenese wurden so geplant, dass die Mutationen mindestens vier Basen vom 5'-Ende und nicht unter 6-8 Basen vom 3'-Ende entfernt eingefügt wurden. Zusätzlich wurde beachtet, dass der Primer am 3'-Ende mit 8 nicht-überlappenden Basen endet.

**Tabelle 2.9: Pipettierschema für PCR-Ansätze.**

Reagenz	Mengen
dNTP, je 5 mM	200 µM
5'-Primer, 10 µM	0,4 µM
3'-Primer, 10 µM	0,4 µM
Puffer, 10x	1 x
DNA-Matrize	50 ng
PfuPlus-Polymerase	7 U
ddH <sub>2</sub> O	zu 25 µl

Die Reaktionsansätze wurden wie in Tabelle 2.9 aufgeführt pipettiert und anschließend mit dem Programm aus Tabelle 2.10 vervielfältigt.

**Tabelle 2.10: PCR-Temperaturzyklus für Mutagenese.**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	25
Hybridisierung	50 °C	30 s	
Elongation	72 °C	750 bp/min	
Elongation	72 °C	30 min	1
Ende	4 °C	∞	

Die Matrizen für die Mutagenese wurden aus *dam*<sup>+</sup>-Stämmen isoliert und liegen im Gegensatz zu den *in vitro* replizierten Plasmiden methyliert vor. Nach der PCR wurden die Matrizen durch die methylierungsspezifische Endonuklease DpnI für 4 h bei 37 °C verdaut. Somit bleiben ausschließlich neu generierte Plasmide zurück. Der gesamte Ansatz wurde in *E. coli* DH5a transformiert.

#### 2.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA

Bei einem positiven Ergebnis der Kolonie-PCR wurde zur Amplifizierung des möglichen Expressionsvektors ein Flüssigmedium mit dieser Kolonie angeimpft. Die Kultur wurde in 20 ml LB-Medium mit Antibiotika über Nacht bei 37 °C unter Schütteln vermehrt. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (10000 x g, 10 min) geerntet. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* entsprechend den Herstellerangaben. Dabei werden die Zellen durch alkalische Lyse in Gegenwart des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgeschlossen. Danach fand die Trennung der Plasmid-DNA von den präzipitierten Bestandteilen der Zelle (z.B. chromosomale DNA, Lipide, Proteine) durch Zentrifugieren statt. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA selektiv an eine Silicamatrix gebunden. Nach dem Waschen der Membran wurde die Plasmid-DNA mit TE-Puffer eluiert.

#### 2.2.1.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei 260 nm mit dem NanoDrop Spectrophotometer. Die Basen der Nukleinsäuren besitzen bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum. Eine Absorption von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 37 µg/ml einzelsträngiger DNA oder

40 µg/ml RNA. Die Reinheit der DNA-Probe wurde über den Koeffizient  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt. Bei einem Wert von ca. 1,8 liegt die DNA rein vor. Um die Linearität der photometrischen Messung zu gewährleisten, wurden DNA-Proben so verdünnt, dass die Absorption zwischen 0,1 und 1,0 liegt.

## 2.2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.2.1 Expressions- und Löslichkeitstest

Sowohl die erzeugten Einzelkonstrukte als auch die Co-Expressionskonstrukte wurden im kleinen Maßstab auf ihre Expression und Löslichkeit in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Zellen getestet. Hierfür wurden einige Kolonien in 2,5 ml Medium 1 mit geeigneten Antibiotika bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 kultiviert. Die Kultur wurde mit dem gleichen Volumen Medium 2 mit geeigneten Antibiotika verdünnt. Induziert wurden die Kulturen mit 0,2 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) und danach bei 17 °C für 13-16 Stunden inkubiert.

Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 20000 x g und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS-Lysispuffer resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden durch wiederholtes Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen im Heizblock bei 37 °C aufgeschlossen. Danach wurde die Suspension für 15-40 min bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit  $Co^{2+}$ -Ionen beladenden NTA-*Beads* (Proteine mit Histidinanker) oder GSH-*Beads* (Proteine mit GST-Anker) für 1,5 h bei 6-8 °C unter ständigem Mischen inkubiert. Die *Beads* waren vorab in TeEx-Puffer äquilibriert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Wasser resuspendiert. 10 µl Probe wurden mit 27,5 µl Wasser und 12,5 µl SDS-Probenpuffer vermischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die *Beads* wurden bei 4 °C und 100 x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und anschließend die *Beads* mit 1 ml TeEx-Waschpuffer resuspendiert. Anschließend wurde sie nochmals zentrifugiert und der Überstand wiederum aspiriert.

Schlussendlich wurden die *Beads* mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die gesamte Testexpression wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Hierfür wurden SDS-Proben vor und nach der Induktion mit Proben der löslichen und unlöslichen Fraktionen verglichen.

### 2.2.2.2 Proteinexpression

Lösliche Einzelkonstrukte oder Co-Expressionskonstrukte wurden in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Zellen exprimiert. Zunächst wurde eine Vorkultur (0,02% des Endvolumens) aus mehreren Einzelkolonien in LB-Medium über Nacht bei 37 °C angesetzt. Diese Vorkultur wurde benutzt, um eine Expressionskultur von 2xLB-Medium anzuküpfeln, welche unter ständigem Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 inkubiert wurde.

Die verwendeten LB-Medien für die Vorkultur und die Expressionskultur enthielten Ampicillin (100 mg/l) und Chloramphenicol (34 mg/l) für die Expression von Einzelkonstrukten, und zusätzlich Kanamycin (50 mg/l) für die Co-Expression, um zu gewährleisten, dass sich nur Bakterienzellen mit dem Expressionsvektor und dem pRARE2-Vektor vermehren konnten. Vor der Induktion mit 0,2 mM IPTG wurde die Kultur 30 min bei 6 °C abgekühlt. Die Expression des Zielproteins erfolgte über Nacht bei 17 °C unter ständigem Schütteln.

Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 10 min bei 6500 x g und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen entweder sofort aufgeschlossen und weiter verarbeitet oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Proteinreinigung

Das Zellpellet der Expressionskultur wurde in PBS-Lysispuffer resuspendiert. Vor dem Zellaufschluss durch den Fluidizer wurde die Suspension manuell homogenisiert. Im Fluidizer werden die Zellen durch entstehende Scherkräfte in der Scherkammer lysiert. Mittels Zentrifugation wurden die unlöslichen Bestandteile bei 4 °C und 68000 x g für 70 min von den löslichen Proteinen im Überstand des Lysats getrennt. Zur Entfernung verbliebener Schwebstoffe wurde der Überstand filtriert.

Die Proteinkonstrukte enthielten einen N-terminalen Hepta-Histidinanker, der die Reinigung mittels einer Metallaffinitätssäule ermöglicht. Die Matrix (SiO<sub>2</sub>) der verwendeten Ni<sup>2+</sup>-Beads ist mit Iminodiessigsäure (IDA)-Resten funktionalisiert, die mit zweiwertigen Nickelionen (Ni<sup>2+</sup>) beladen wurden.

Die Reinigung der Einzelkonstrukte oder Co-Expressionskonstrukte erfolgte auf einer Gravitationssäule mit ca. 1-3 ml Ni<sup>2+</sup>-Beads. Die Beads wurden vorab mit Puffer W<sub>0</sub> äquilibriert. Durch die Interaktion der Nickelionen mit dem Imidazolring der

N-terminalen Histidine wurde das Zielprotein beim Beladen der Säule auf dem Säulenmaterial zurückgehalten. Unspezifisch wechselwirkende Proteine wurden durch Waschen mit jeweils 10 Säulenvolumen (SV) von Puffer  $W_0$ ,  $W_1$  und  $W_2$  entfernt. Die Elution erfolgte mit zweimal 3 Säulenvolumina (SV) Puffer  $E_1$  und einmal 3 SV Puffer  $E_2$ . Fraktionen mit dem potenziellen Zielprotein wurden mittels SDS-PAGE identifiziert und vereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der Fraktionen mit Protein erfolgte photometrisch bei 280 nm.

Der Histidinanker wurde bei den Proteinkonstrukten durch TEV-Protease (1 mg Protease auf 3 mg Protein) abgespalten. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 4 °C in der Dialysemembran (MWCO 6000-8000) gegen den Dialysepuffer. Gleichzeitig wurde durch Dialyse die Konzentration des Imidazols verringert.

Das verdaute Protein wurde mittels einer weiteren Metallaffinitätssäule von der verwendeten Protease, unverdaulichem Protein und abgetrenntem Histidinanker getrennt. Die jeweiligen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, um die Fraktion mit dem Zielprotein zu identifizieren. Diese Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (10 kDa Ultrafiltrationsmembran) auf ein adäquates Volumen (2% der verwendeten Größenausschlusschromatographiesäule) konzentriert.

Die Reinigung wurde mit einer Größenausschlusschromatographie abgeschlossen. Hierbei werden Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Radius getrennt, d.h. große Moleküle eluieren eher von der Säule als kleinere. Das Prinzip basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Moleküle in das poröse Trägermaterial mit definierter Porengröße. Die Säule wurde mit 1 SV Gelfiltrationspuffer (abhängig vom verwendeten Proteinkonstrukt) äquilibriert und das Protein in 1 SV eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen mit dem größten Reinheitsgrad und der höchsten Homogenität wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (10 kDa Ultrafiltrationsmembran) konzentriert. Anschließend wurde das Protein aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.2.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ermöglicht Aussagen über die Zusammensetzung und die Reinheit einer Proteinprobe. Das im Probenpuffer enthaltene SDS ist ein anionisches Detergens mit starken denaturierenden Eigenschaften. Durch Hitzedenaturierung im Beisein von SDS werden die Sekundär- und

Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst und das Protein in seine lineare Form überführt. Weiterhin lagert sich SDS an das Protein an (etwa 1,4 g/g Protein) und maskiert dessen intrinsische Ladung. Alle Proteine werden so in Abhängigkeit ihrer Größe negativ geladen und können dadurch im elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt werden.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 15%iges Trenngel verwendet, das nach Polymerisation mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet wurde. Das denaturierende Gel war folgendermaßen zusammengesetzt:

**Tabelle 2.11: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels.**

Komponente	Sammelgel	Trenngel
ddH <sub>2</sub> O	1,43 ml	1,40 ml
Sammelgelpuffer	0,62 ml	---
Trenngelpuffer	---	1,46 ml
30% (w/v) Acrylamid	0,42 ml	2,92 ml
10% (w/v) SDS	25,0 µl	58,3 µl
10% (w/v) APS	20,0 µl	50,0 µl
TEMED	2,5 µl	5,0 µl

Die Proteinproben wurden mit vierfachem SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und im Anschluss auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 260 V für etwa 40 min durchgeführt. Als nächstes wurde das Gel in Lösung 1 kurz aufgekocht. Diese Lösung wurde verworfen. Auf das Gel wurde Lösung 2 gegeben und anschließend noch ca. 1 ml der Lösung 3 hinzugefügt.

Die SDS-Gele wurden im LAS-4000 Geldokumentationssystem abgelichtet.

#### 2.2.2.5 Seleno-L-Methionin markiertes Protein

Eine Methode zur Bestimmung von Proteinkristallstrukturen ist die Herstellung Seleno-L-Methionin (SeMet) markierter Proteine. Der Einbau von schweren Atomen, z.B. Selen statt Schwefel, in ein Protein führt zu einer anomalen Dispersion der Röntgenstrahlen, d.h. Unterschiede in der Intensität der Friedel-Paare<sup>[123]</sup>. Diese Unterschiede können mit Hilfe eines MAD-Experiments (*multiple wavelength anomalous dispersion*) zur Lösung der Kristallstruktur benutzt werden. Zum Einbau von SeMet muss jedoch der endogene Methionin-Syntheseweg inhibiert werden.

Die Expression des SeMet-markierten Proteinkonstrukts erfolgte in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Zellen. Zunächst wurde eine Vorkultur (200 ml LB-Medium mit

Ampicillin (100 mg/l) und Chloramphenicol (34 mg/l)) mit mehreren Kolonien über Nacht bei 37 °C angeimpft. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 10 min bei 3300 x g und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 ml M9-Medium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden gleichmäßig auf fünf sterile Erlenmeyerkolben mit je zwei Liter M9-Medium mit einem Zusatz von Ampicillin (50 mg/l) und Chloramphenicol (17 mg/l) verteilt und unter ständigem Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 (Log-Phase des Bakterienwachstums) inkubiert.

Nach dem Erreichen der Log-Phase wurden der Kultur die Aminosäuren Lysin, Phenylalanin und Threonin in einer Konzentration von je 100 mg/l sowie Isoleucin, Leucin und Valin in einer Konzentration von je 50 mg/l hinzugegeben. Durch die Zugabe dieser Aminosäuren wird die Biosynthese von Methionin inhibiert. Dann wurde die Kultur bei 4 °C für 30 min abgekühlt. Vor der Induktion mit 0,2 mM IPTG wurde der Kultur SeMet in einer Konzentration von 60 mg/l zugegeben. Die Expression des Zielproteins erfolgte für 18 h bei 17 °C unter ständigem Schütteln.

Die Reinigung markierter Proteine wurde analog zum unmarkierten Protein (Kapitel 2.2.2.3) durchgeführt.

#### **2.2.2.6 Co-Sedimentationsexperiment**

Zur Identifizierung von Interaktionen zwischen Proteinen und Lipid-Membranen wurden Co-Sedimentationsexperimente mit Folch-Vesikeln durchgeführt. Folch-Lipide sind Extrakte aus Rinderhirn und enthalten eine Mischung der wichtigsten natürlich vorkommenden Lipide.<sup>[124]</sup> Zur Herstellung der Vesikel wurde zunächst das organische Lösungsmittel der Folch-Mixtur unter einem Stickstofffluss evaporiert. Danach wurden die Folch-Lipide unter Vakuum für mindestens 1 h getrocknet, um Lösungsmittelreste zu entfernen. Die getrockneten Lipide wurden mit Vesikel-Puffer zu einer finalen Konzentration von 4 mg/ml versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur rehydriert. Anschließend wurden sie in kurzen Intervallen in einem Vortex-Schüttler geschüttelt. Es folgten 10 Zyklen Einfrieren/Auftauen im Wechsel zwischen -78 °C und 37 °C. Unilamellare Vesikel wurden aus dieser multilamellaren Vesikelsuspension mittels Extrusion durch Polycarbonat-Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen (800, 200, 100, 50 nm) hergestellt.

Für die Zentrifugationsproben wurden 5-10 µM Protein in einem Volumen von 40 µl mit Folch-Vesikeln gemischt. Es wurden unterschiedliche Vesikelkonzentrationen

(0,5 bis 2,0 mg/ml) sowie verschiedene Durchmesser (50 bis 800 nm) verwendet. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 min bei 70000 rpm ( $213483 \times g$ ) und  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach der Sedimentation der Vesikel wurden 28  $\mu\text{l}$  des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 10  $\mu\text{l}$  4xSDS-Probenpuffer versetzt. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 40  $\mu\text{l}$  Vesikel-Puffer resuspendiert, im Vortex geschüttelt und 28  $\mu\text{l}$  der Suspension mit 10  $\mu\text{l}$  4xSDS-Probenpuffer versetzt. Alle SDS-Proben wurden für fünf min bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt.

### 2.2.2.7 Pulldown-Experiment

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurden die Einzelkonstrukte als GST-Protein oder als His<sub>7</sub>-Protein in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Zellen exprimiert. Dabei diente das GST-Protein als *bait* (Köder-Protein) und das His<sub>7</sub>-Protein als *prey* (Beute-Protein). Hierfür wurden einige Kolonien in Medium 1 mit geeignetem Antibiotikum bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 kultiviert. Die Kulturmenge wurde so gewählt, dass *bait* und *prey* vergleichbare Gesamtexpressionslevel aufweisen. Nach Erreichen der Ziel-OD wurde die Kultur mit der gleichen Menge Medium 2 mit geeignetem Antibiotikum verdünnt. Induziert wurden die Kulturen anschließend mit 0,2 mM IPTG und danach bei  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 13-16 h inkubiert.

Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 15 min bei  $20000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in HEPES-Lysispuffer resuspendiert. Zunächst wurde nur mit den Pellets der GST-Proteine weitergearbeitet. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (20% Amplitude, 45 s) aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei  $20000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  entfernt. Der Überstand wurde auf GSH-Beads gegeben und für 1,5 h bei  $6-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter ständigem Mischen inkubiert. Die *Beads* wurden vorab mit BSA (7 mg/ml) inkubiert, um unspezifische Membranbindung zu minimieren und anschließend mit HEPES-Waschpuffer äquilibriert.

Nach der Inkubation mit dem GST-Protein wurden die *Beads* bei  $100 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und anschließend die *Beads* mit 1 ml HEPES-Waschpuffer resuspendiert. Anschließend wurde sie nochmals zentrifugiert und der Überstand wiederum aspiriert. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt, um ungebundenes Protein zu entfernen.

Danach wurde der Überstand der His-Proteine auf die GSH-*Beads* mit GST-Protein gegeben und für 3 Stunden bei 6-8°C unter ständigem Mischen inkubiert. Die *Beads* wurden im Anschluss bei 100 x g und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und anschließend die *Beads* mit 1 ml HEPES-Waschpuffer resuspendiert. Anschließend wurde sie nochmals zentrifugiert und der Überstand wiederum aspiriert. Diese Prozedur wurde noch sechs- bis 15-mal wiederholt, um ungebundenes oder schwach gebundenes Protein zu entfernen.

Zum Schluss wurden die *Beads* mit 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und Proteine mittels Western-Blot und Immundetektion analysiert.

#### **2.2.2.8 Western-Blot und Immundetektion**

Für die Immundetektion von Proteinen durch Antikörper wurden Protein enthaltende Proben zunächst in einem SDS-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-) Membran im Nass-Verfahren übertragen. Die Membran wurde für den Transfer für 30 s in 100% Methanol aktiviert. Fasertuch und Filterpapier wurden in Transferpuffer getränkt. Der Western-Blot Tank wurde mit Transferpuffer gefüllt und der Transfer bei 100 V für 65 min durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit 3% Milchpulver in TBST-Puffer für 3 h inkubiert. Dadurch werden freie Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Danach wurde die Membran einmal mit 30 ml TBST-Puffer und dann zweimal mit je 30 ml PBS für je 5 min gewaschen. Zur Detektion der His-Proteine wurde die Membran für 90 min mit einem Anti-TetraHis-Antikörper (1:1000 in PBS mit 2% BSA) inkubiert. Danach wurde die Membran wie zuvor gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem Anti-Maus-HRP-Konjugat (1:3000 in TBST mit 3% Milch) für eine Stunde. Die Membran wurde wiederum wie zuvor gewaschen.

Die Membran wurde für 1 min mit 400 µl ECL-Reagenz inkubiert, und die Chemilumineszenz wurde im LAS-4000 Geldokumentationssystem detektiert. Die Belichtungszeit variierte je nach Signalstärke zwischen 2 und 30 min.

## 2.2.3 Biophysikalische Methoden

### 2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte photometrisch bei 280 nm mit einem *NanoDrop* Spektrophotometer. Die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan besitzen bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum. Die Konzentration kann anhand der Absorption über das Lambert-Beer'schen Gesetz errechnet werden:

$$c = \frac{A_{280 \text{ nm}}}{\varepsilon \cdot d} \quad (1)$$

mit  $c$  = Konzentration,  $A$  = Absorption,  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient,  $d$  = Schichtdicke

Der theoretische Extinktionskoeffizient der Proteine wurde mit dem Programm ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) berechnet. Die Konzentration der Proteine wurde so gewählt, dass die Absorption zwischen 0,1 und 1,0 lag, damit der Messbereich des Photometers linear war. Die Reinheit der Proteinprobe gibt der Koeffizient  $A_{280}/A_{260}$  an. Bei einem Wert von ca. 1,75 kann angenommen werden, dass die Proteinprobe frei von DNA-Verunreinigungen ist.

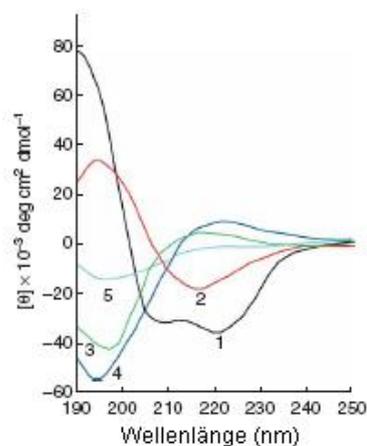
### 2.2.3.2 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus- (CD)-Spektroskopie nutzt die Wechselwirkung optisch aktive Substanzen mit polarisiertem Licht aus. Die CD-Spektroskopie findet Anwendung u.a. in der Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen, weil Sekundärstrukturelemente charakteristische CD-Spektren im fernen UV (180-240 nm) aufweisen (Abb. 7). Mit Hilfe der CD-Spektroskopie ist es auch möglich, die thermische Stabilität eines Proteins zu bestimmen. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich ab einer spezifischen Temperatur (Schmelztemperatur) die Sekundärstrukturelemente entfalten und somit sich das CD-Spektrum signifikant ändert.

Die Messungen wurden mit dem CD-Spektrometer Chirascan der Firma Applied Photophysics durchgeführt. Die Proteine wurden über Nacht gegen CD-Puffer dialysiert. Die Konzentration der Proteine wurde durch UV-Absorption bei 280 nm bestimmt und die Lösung dann auf 2,5  $\mu\text{M}$  verdünnt.

Für die Messungen der CD-Spektren wurden folgende Parameter verwendet: Stickstofffluss: 5 l/min, Temperatur: 20 °C, Wellenlänge: 260-178 nm in 0,5 nm

Schritten, Integrationszeit: 0,5 s, Bandbreite: 0,5 nm, Wiederholungen: 10, Küvettenvolumen: 400 µl, Schichtdicke: 1 mm.



**Abb. 2.1: CD-Spektren von Modellpeptiden.** (1-3) Spektren typischer Sekundärstrukturen: (1)  $\alpha$ -Helix, (2)  $\beta$ -Faltblatt, (3) ungeordnete Konformation. (4-5) Effekt von Proteindenaturierung auf das CD-Spektrum am Beispiel von Kollagen (4) mit gefalteter dreifach Helix, (5) nach Denaturierung.<sup>[125]</sup>

Für die Messungen des Schmelzpunktes wurden folgende Parameter verwendet: Stickstofffluss: 5 l/min, Temperaturbereich: 10 bis 90 °C in 2 °C Schritten, Heizrate: 2 °C/min, Wellenlängen: 222, 218, 208, 195 und 193 nm, Integrationszeit: 4 s, Bandbreite: 0,5 nm, Küvettenvolumen: 400 µl, Schichtdicke: 1 mm.

Die Subtraktion des Puffer-Spektrums und die Kurvenanpassung erfolgten mit dem Analyseprogramm von Chirascan.

$$\theta = \frac{mdeg}{d [mm] \cdot c [M] \cdot N_{AS}} \quad (2)$$

Mit d = Pfadlänge [mm], c = Konzentration [M],  $N_{AS}$  = Anzahl der Aminosäuren

Die erhaltene Elliptizität (*mdeg*) wurde über Gleichung 2 in die gemittelte residuale Elliptizität  $\theta$  umgerechnet. Die Herleitung der verwendeten Formel ist in einer Übersichtsarbeit von Greenfield<sup>[125]</sup> beschrieben. Die Dekonvolution der CD-Spektren wurde auf dem Dichroweb-Server<sup>[126]</sup> mit dem Algorithmus CDSSTR<sup>[127]</sup> und unter Verwendung des Referenzsets 3 durchgeführt.

### 2.2.3.3 Fluoreszenz-basierte Bestimmung der Thermostabilität

Die Fluoreszenz-basierte Bestimmung der Thermostabilität, auch als *Thermo-Fluor*-Experiment bezeichnet, ist eine schnelle und effiziente Methode zur Bestimmung des Schmelzpunktes eines Proteins. Diese Methode kann im 96er Format durchgeführt

werden und ermöglichen so einen hohen Durchsatz an Bedingungen. Durch die Ermittlung geeigneter Pufferbedingungen kann u.a. die Qualität und Quantität der Proteinherstellung erhöht werden. Weiterhin kann sich durch die Erhöhung der Thermostabilität des Proteins oder Komplexes auch die Kristallisierbarkeit verbessern.<sup>[128]</sup>

Das *ThermoFluor*-Experiment wurde mit dem *Real-Time* PCR Gerät (CFX96) von Biorad durchgeführt. Die Ansätze wurden wie in Tabelle 2.12 hergestellt. Anschließend wurden dreimal 20 µl Ansätze luftblasenfrei pipettiert. Die Ansätze wurden von 20 bis 95 °C in 0,5 °C Schritten erhitzt.

**Tabelle 2.12: Pipettierschema für ThermoFluor**

Reagenz	Mengen
Protein	20-100 µM
SYPRO Orange (8x)	10,0 µl
ThermoFluor-Puffer (4x)	20,0 µl
1 M HEPES, pH 7,5	1,6 µl
ddH <sub>2</sub> O	zu 80 µl

#### 2.2.3.4 Statische Lichtstreuung (SLS)

Die statische Lichtstreuung (SLS) ermöglicht die Bestimmung der absoluten mittleren Molekularmasse und des oligomeren Zustandes eines Proteins. Für diese Methode wird eine analytische Gelfiltrationssäule Superdex200<sup>TM</sup> 10/300 (GE-Healthcare) mit einem Detektor für Lichtstreuung bei einem Winkel von 90° (*Right Angle Light Scattering* (RALS)) und einem Refraktometer kombiniert. Zusätzlich wurde der UV-Detektor der FPLC-Anlage verwendet, um die Proteinkonzentrationen zu bestimmen. Auf die mit GF-Puffer 3 äquilibriert Gelfiltrationssäule wurde zwischen 300 und 600 µg Protein gegeben.

#### 2.2.4 Proteinkristallographie

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins kann mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Hierfür müssen die Proteine in reiner und kristalliner Form vorliegen. Proteinkristalle können aus einer übersättigten Lösung entstehen, die durch Konzentrationserhöhung des Präzipitans oder des Proteins hergestellt wird. Dabei wird die Löslichkeitsgrenze des Proteins kontrolliert überschritten, und es kommt im Idealfall zur Entstehung von Kristallisationskeimen und anschließend zur Kristallisation. Die Suche

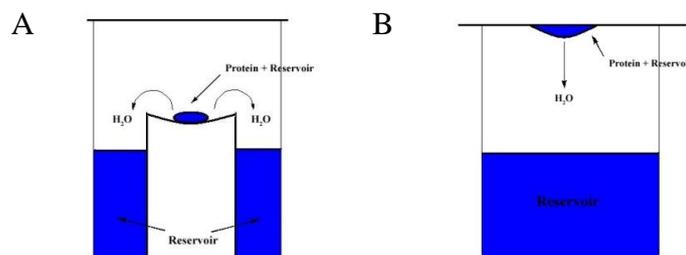
nach geeigneten Bedingungen beruht auf dem Prinzip von Versuch und Irrtum. Nach der erfolgreichen Kristallisation werden Röntgenbeugungsdaten aufgenommen. Hierbei wird ein Röntgenstrahl am Proteinkristall gebeugt. Aus den Intensitäten der Bragg-Reflexe und nach Bestimmung der Phasen kann eine Elektronendichtekarte berechnet werden. Die Interpretation der Elektronendichte führt zu einem atomaren Strukturmodell, das abschließend gegen die experimentellen Daten verfeinert wird.<sup>[123]</sup>

#### 2.2.4.1 Kristallisation mittels Dampfdiffusionsmethode

In dieser Arbeit wurde die Methode der Dampfdiffusion mittels *sitting-drop* und *hanging-drop* verwendet, um die Konzentration von Protein und Präzipitans langsam zu erhöhen. Hierfür wird ein kleines Volumen konzentrierter Proteinlösung mit dem gleichen Volumen Reservoirlösung gemischt und gegen ein größeres Volumen unverdünnter Reservoirlösung inkubiert (Abb. 2.2). Im Tropfen ist die Konzentration des Präzipitans nur halb so groß wie im Reservoir. Deswegen verringert sich durch Dampfdiffusion das Volumen, und die Konzentration an Protein und Präzipitans erhöht sich.

Um geeignete Bedingungen für die Kristallisation zu finden, wurde ein Hochdurchsatzverfahren mit den Kristallisationsscreens *The Anions Suite*, *The Cations Suite*, *The Classics II Suite*, *The Classics Suite*, *The JCSG+ Suite*, *The PACT Suite*, *The pHClear II Suite* und *The pHClear Suite* von QIAGEN durchgeführt. In diesem Verfahren wurden viele verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet. Dabei wurden Parameter wie z.B. die Art und die Konzentration des Präzipitans, der pH-Wert und die Ionenstärke systematisch variiert. Für das Verfahren wurde die *sitting-drop*-Methode verwendet (Abb. 2.2a). Die verschiedenen Bedingungen wurden in einer Kristallisationsplatte mit 96 Kavitäten (Corning 3550) getestet. Für jede Testbedingung wurden 200 nl Proteinlösung mit 200 nl Reservoirlösung vermischt und gegen 75 µl Reservoirlösung bei 20 °C inkubiert.

Diejenigen Kristallisationsbedingungen des Hochdurchsatzverfahrens, bei denen die Proteine Kristallisationskeime oder Kristalle bildeten, wurden im *hanging-drop*-Verfahren (Abb. 2.2b) verfeinert/optimiert. Die *hanging-drop*-Methode beruht wie die *sitting-drop*-Methode auf der langsamen Konzentrationserhöhung des Proteins im Tropfen durch Dampfdiffusion. Hierfür wurde für jede Bedingung 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Reservoirlösung vermischt und gegen 1000 µl Reservoirlösung bei 20 °C inkubiert.



**Abb. 2.2: Proteinkristallisation A) *sitting drop*-Methode B) *hanging drop*-Methode.**

Die Optimierung wurde in Flachbodengewebekulturplatten mit 24 Kavitäten durchgeführt. Ziel der Optimierung war es, vereinzelt wachsende Kristalle zu erhalten.

#### 2.2.4.2 Datensammlung

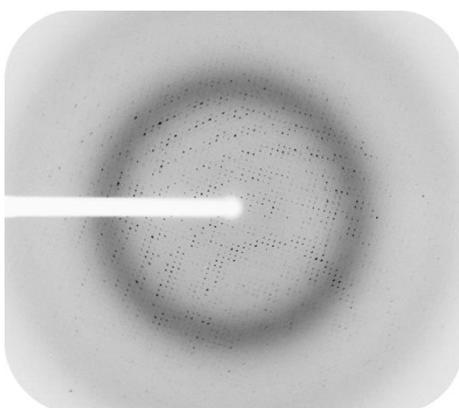
Die optisch besten Einzelkristalle wurden mittels 0,1-0,3 mm Kryoschleifen (Hampton Research) gefischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert. Um Strahlenschäden in den Proteinkristallen, wie beispielsweise das Aufbrechen von Bindungen und die Entstehung beweglicher Radikale durch die Röntgenstrahlen zu minimieren, wurden diese in einem trockenen Stickstoffstrahl bei  $-173\text{ °C}$  vermessen. Diese tiefen Temperaturen dienen der Vermeidung von exzessiven Strahlungsschäden während des Beugungsexperiments. Bei diesen Temperaturen gefriert jedoch das im Puffer enthaltene Wasser. Dadurch entstehen mikrokristalline Eiskristalle, die den Proteinkristall durch mechanischen Stress schädigen können. Zusätzlich erzeugen diese Eiskristalle ein charakteristisches Streumuster („Eisringe“), welches den Informationsgehalt der Diffraktionsbilder in bestimmten Auflösungsbereichen verringern kann. Aus diesen beiden Gründen werden Kristalle vor dem Einfrieren in eine sogenannte Kryo-Lösung überführt, welche einen Kryoprotektanden enthält, der die Eisbildung verhindert. Dabei ist jedoch zu beachten, dass Kristalle sehr sensitiv bezüglich ihrer chemischen Umgebung sein können. Diese wird natürlich auch durch den Kryoprotektanden beeinflusst, wodurch dieser unter Umständen schädlich für den Proteinkristall sein und im schlimmsten Fall zu einer Auflösung des Proteinkristalls führen kann. In dieser Arbeit wurde als Standardkryoschutz Glycerin in einer Konzentration von 20% (v/v) eingesetzt. Im Verlaufe der Arbeit (Kapitel 3.1.3.3.1) wurden auch andere Kryoprotektanden getestet.

Hochauflösende Datensätze von nativen sowie SeMet-Derivatkristallen wurden an den Beamlines 14.1 und 14.2 des Helmholtz-Zentrums Berlin für Materialien und Energie und der Freien Universität Berlin am Synchrotron BESSY II)<sup>[129]</sup> aufgenommen. Die Synchrotronstrahlung hat den Vorteil, dass Wellenlängen im Bereich von 0,75 – 2,25 Å (bei BESSY) für das Diffraktionsexperiment frei gewählt werden können. Somit sind Messungen der anomalen Dispersion bei einer einzelnen Wellenlänge (SAD) als auch bei mehreren Wellenlängen (MAD)<sup>[130]</sup> möglich. Die Indizierung, Integration und Skalierung aller Diffraktionsdaten erfolgte mit dem XDS-Programmpaket.<sup>[131]</sup>

Die im Synchrotron erzeugten Röntgenstrahlen treffen auf den Kristall und interagieren mit den Elektronen der Atome im Kristall, wodurch diese angeregt werden. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird Röntgenstrahlung in jede Richtung abgegeben. Die von den Atomen emittierten Röntgenstrahlen interferieren dabei miteinander. Ob die Strahlen in eine bestimmte Richtung ausgelöscht werden (destruktive Interferenz) oder sie sich gegenseitig verstärken (konstruktive Interferenz) hängt vom Abstand der Atome und vom Winkel ab.<sup>[123]</sup> Die Bedingungen für eine konstruktive Interferenz wird durch das Bragg'sche Gesetz beschrieben (Gleichung 3):

$$2d \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad (3)$$

$d$  = Abstand der Gitterebenen,  $\theta$  = Beugungswinkel,  $n$  = Beugungsordnung,  $\lambda$  = Wellenlänge des Röntgenstrahls



**Abb. 2.3: Röntgenbeugungsaufnahme vom nativen Kristall von Vps18<sub>NTD</sub>, bei 0,913 Å und einer Auflösung von 2,14 Å.**

Zu einer konstruktiven Interferenz kommt es also, wenn der Gangunterschied zwischen den Strahlen, die unter dem Winkel  $\theta$  auf zwei benachbarte Gitterebenen einfallen, einem ganz-zahligen Vielfachen der verwendeten Wellenlänge  $\lambda$  entspricht. Dadurch entstehen Reflexe, die mit dem Detektor aufgezeichnet werden können (Abb. 2.3).

Jeder einzelne Reflex unterscheidet sich in seiner Lage, Amplitude und Phase, abhängig von der Anordnung der Atome im Kristallgitter. Mittels ortsauflösender Röntgendetektoren lässt sich die Lage der Beugungsreflexe und aus der Intensität der

Reflexe ermitteln, die dem Quadrat der Strukturfaktoren proportional sind. Die Phasenbeziehungen zwischen den Reflexen jedoch können nicht experimentell gemessen werden. Es gibt also ein sogenanntes „Phasenproblem“, da sowohl Amplitude als auch Phase der Strukturfaktoren benötigt werden, um eine Elektronendichtekarte zu berechnen.

#### 2.2.4.3 Phasenbestimmung durch *multiple anomalous diffraction* (MAD)

Um das Phasenproblem zu lösen, können verschiedene Methoden verwendet werden: 1. Direkte Methoden, 2. Molekularer Ersatz, 3. Isomorpher Ersatz und 4. Anomale Dispersion.<sup>[132]</sup> Die direkten Methoden sind bei Strukturen mit einer Größe von maximal 10-15 kDa und bei einer Auflösung besser als 1,0 Å anwendbar. Beide Bedingungen treffen nicht auf die in dieser Arbeit relevanten Proteinfragmente zu. Der Molekulare Ersatz kann nur angewendet werden, wenn bereits ein dreidimensionales Strukturmodell mit hoher Sequenz- und Strukturhomologie vorhanden ist. Aus den aus dem Modell abgeleiteten Phasen und den gemessenen Amplituden kann dann eine Elektronendichtekarte der neuen Struktur konstruiert werden. Dies ist im Falle der Proteinfragmente der HOPS und CORVET-Untereinheiten nicht möglich, da keine Strukturen von homologen Proteinen bekannt sind. Bei der Methode des isomorphen Ersatzes wird der Kristall in Lösungen von Schwermetallsalzen oder organischen Schwermetallverbindungen überführt. Die Schwermetalle diffundieren in den Kristall und binden seitenkettenspezifisch an die Proteinoberfläche. Verschiedene Schwermetalle weisen dabei verschiedene Spezifitäten auf. Da die Schwermetalle mehr Elektronen als die Atome des Proteins besitzen, streuen sie die Röntgenstrahlen viel stärker. Durch die Intensitätsunterschiede des nativen Datensatzes im Vergleich zum isomorphen Datensatz bei gleicher Wellenlänge können die Positionen der Schweratome ermittelt werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass der schweratommodifizierte Derivatkristall isomorph zum nativen Kristall ist, d.h. keine Änderung an der Struktur oder Packung des Proteinkristalls ausweist.<sup>[130]</sup> Durch die Bestimmung der Schweratompositionen wird eine grobe Abschätzung der Phasen für die Proteinstruktur erlaubt. Bei Verwendung nur eines Schweratomderivats wird dies als SIR (*single isomorphous replacement*) bezeichnet, die Kombination von verschiedenen Derivatkristallen als MIR (*multiple isomorphous replacement*).

Bei Beugungsexperimenten an Kristallen, die keine schweren Atome enthalten, ist das Friedel'sche Gesetz gültig, dem zufolge die Intensitäten der Reflexe ( $h, k, l$ ) identisch zu den Reflexen ( $-h, -k, -l$ ) sind<sup>[130]</sup>, da diese durch Inversionssymmetrie miteinander verknüpft sind.<sup>[123]</sup> Wenn schwere Atome wie Selen im Kristall vorkommen, unterscheiden sich diese Intensitäten voneinander, wenn die Energie der Röntgenstrahlen größer ist als die Absorptionskante des Elements (bei Selen bei ca. 12,8 keV). Diese anomalen Streuer besitzen die Eigenschaft, Röntgenstrahlung einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und dann als anomale Strahlung wieder abzugeben. Dadurch erfährt die Intensität und die Phase eine Änderung. Die wird als anomale Streuung oder anomale Dispersion bezeichnet.

Das Phasenproblem in dieser Arbeit wurde mit Hilfe der *multiple anomalous diffraction* (MAD) gelöst. Dafür wurde das Proteinfragment Vps18<sub>2-349</sub> mit Seleno-L-Methionin, wie in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben, markiert. Bei der MAD-Methode wurde ein hochredunder Datensatz bei der Wellenlänge der Absorptionskante und beim Wendepunkt von SeMet aufgenommen. Die Bestimmung der Selen-Positionen, die Phasierung und die initiale Dichtemodifikation erfolgte mit dem Programm SHELXC/D/E<sup>[133]</sup>. Das erzeugte Modell aus dem SeMet-Datensatz wurde dann wiederum als Template genutzt, um die Phase des nativen Datensatzes per molekularen Ersatz zu bestimmen.

#### 2.2.4.4 Modellbau, Strukturverfeinerung und Validierung

Zunächst wurde durch das Programm ARP/wARP<sup>[134]</sup> aus der nach Phasierung erhaltenen Elektronendichtekarte ein partielles Modell erzeugt. Zudem wurde das Modell in wiederholten Zyklen aus Verfeinerung mit dem Programm REMAC5<sup>[135]</sup> und manueller Anpassung mit dem Programm COOT<sup>[136]</sup> vervollständigt.

Verschiedene Qualitätskriterien ermöglichen eine Bewertung des Modells und Schützen vor einer Fehl- oder Überinterpretation während der Strukturverfeinerung. Zur Kontrolle der Strukturverfeinerung wird ein kleiner Teil der Daten von der Verfeinerung ausgeschlossen. Aus diesen Daten wird der freie R-Faktor ( $R_{free}$ ) bestimmt. Der R-Faktor ist ein Maß für die Qualität eines Modells, je kleiner der R-Wert ist, desto besser entsprechen die berechneten den gemessenen Strukturfaktoramplituden. Durch den Vergleich beider R-Faktoren ist eine Abschätzung möglich, ob die Struktur verzerrt, d.h. die Elektronendichten fehlinterpretiert wurden.<sup>[123]</sup> Ebenso sollte die Abweichung von der

idealen Stereochemie für die Bindungslängen nicht mehr als 0,02 Å und für die Bindungswinkel nicht mehr als 4° ausmachen.<sup>[130]</sup> Der B-Faktor beschreibt die Beweglichkeit der Atome im Kristallgitter und wird als kristallographischer Temperaturfaktor bezeichnet. Werte bis ca. 20 Å entsprechen sehr starren und wohl definierten Strukturen. Je höher der Wert, desto schlechter sind die Atome durch die Elektronendichte charakterisiert.

Abschließend wurden das Proteinmodell mittels TLSMD Webserver<sup>[137]</sup> in TLS (*Translation/Libration/Screw*) Gruppen eingeteilt. Das TLS Konzept geht davon aus, dass Gruppen einzelner Atome als rigider Körper von den idealen Positionen des Kristallgitters verschoben sind. Somit kann versucht werden, anhand des B-Faktors einzelne Domänen und flexible Bereiche in einer Struktur zu definieren.

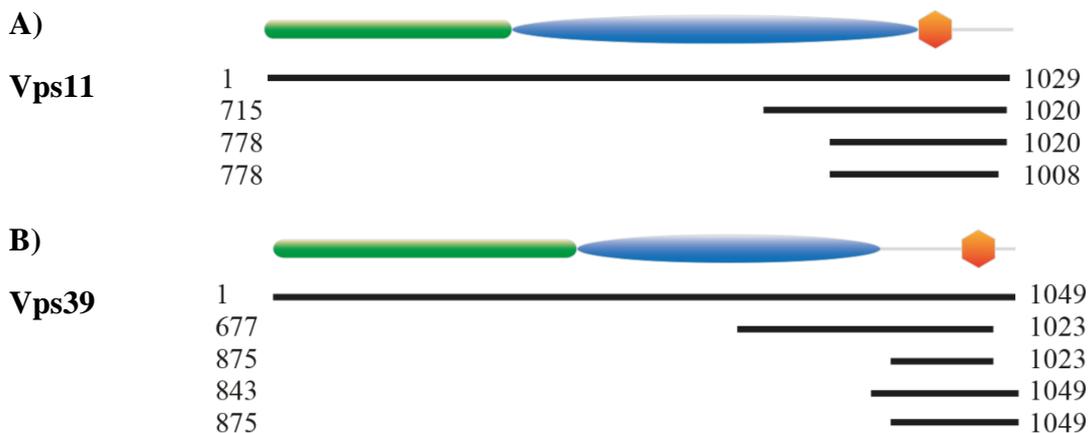
Die Validierung des Modells erfolgte mit Hilfe des Molprobtity-Statistik-Webservers.<sup>[138]</sup> Abbildungen des Modells wurden mit PyMOL generiert (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7, Schrödinger LLC).

### 3 C-terminaler Unterkomplex Vps39-Vps11

#### 3.1 Ergebnisse und Diskussion

##### 3.1.1 Expressions- und Löslichkeitstest der Unterkomplexe

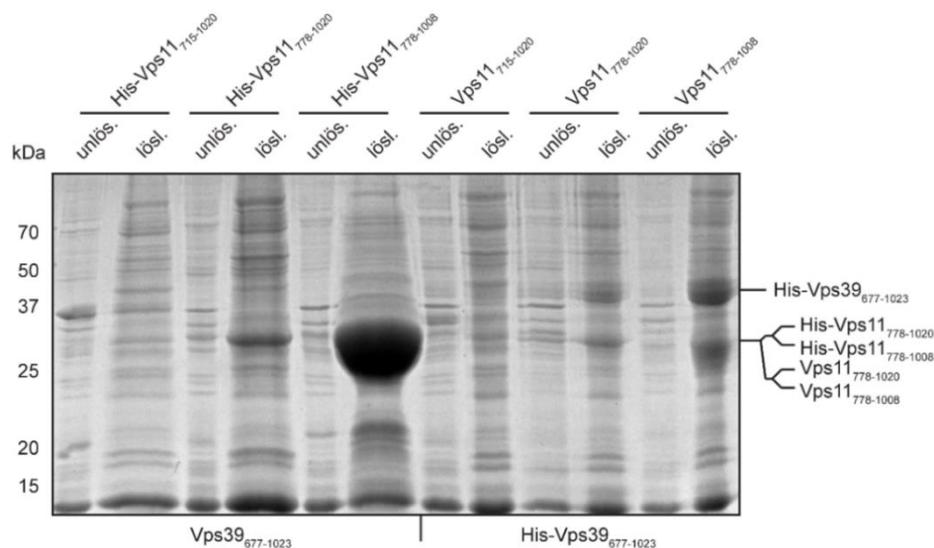
Zur funktionellen und strukturellen Charakterisierung der HOPS- und CORVET-Untereinheiten wurden gezielt Einzelkonstrukte (Tabelle 6.1) entworfen und zur anschließenden bakteriellen Expression in *E. coli* in einen pQlinkH-Plasmid kloniert. Das Augenmerk lag beim Design auf vorhergesagten Domänengrenzen, identifizierten Interaktionsbereichen<sup>[83]</sup> sowie dem Vermeiden von unstrukturierten Bereichen. Die Kernuntereinheit Vps11 der *Tethering*-Komplexe HOPS und CORVET wird von Strukturvorhersagen in drei Domänen aufgeteilt: einen N-terminalen  $\beta$ -Propeller, gefolgt von einer  $\alpha$ -Solenoid-Domäne und abgeschlossen von einem C-terminalen RING-Motiv. Die spezifische Untereinheit Vps39 des Komplexes HOPS weist eine analoge Domänenanordnung auf.<sup>[97]</sup> (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Domänenarchitektur und Expressionskonstrukte von A) Vps11 und B) Vps39. Zahlen bezeichnen die terminalen Aminosäurepositionen der Konstrukte. In grün die  $\beta$ -Propeller-Domäne, in blau die  $\alpha$ -Solenoid-Domäne und in orange die RING-Finger-Domäne.

Nach erfolgreicher Klonierung sowie Verifizierung der Gensequenzen wurden die Einzelkonstrukte in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) transformiert und zunächst im kleinen Maßstab (Kapitel 2.2.2.1) auf Expression und Löslichkeit getestet. Eine Übersicht über den Fortschritt aller im Laufe dieser Arbeit verwendeten Konstrukte ist im Anhang in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Bei den Testexpressionen dieser Einzelkonstrukte konnten

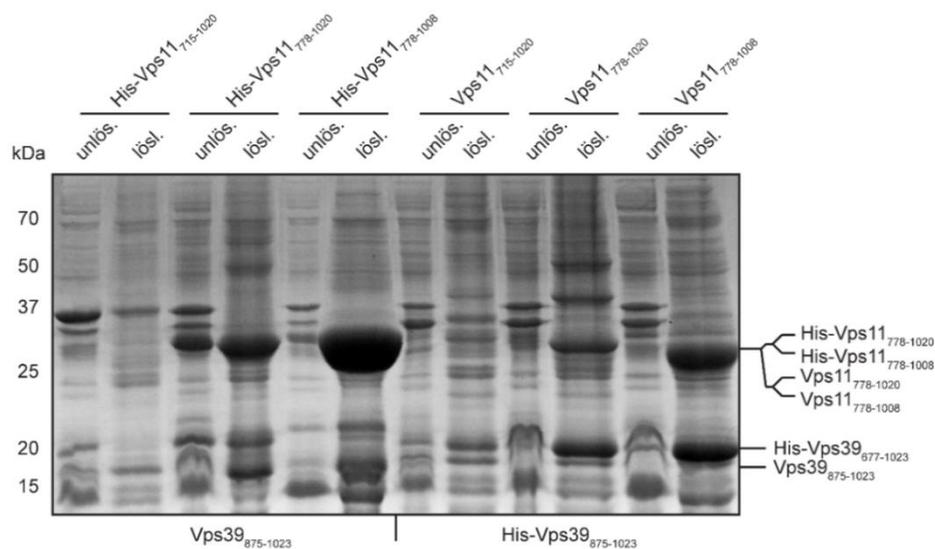
mehrere löslich exprimierte Konstrukte der Kernuntereinheit Vps11 identifiziert werden, lösliche Konstrukte der HOPS-spezifischen Untereinheit Vps39 dagegen nicht. Weiterhin wurde festgestellt, dass Einzelkonstrukte von Vps11 zwar löslich exprimieren und die Proteine gereinigt werden können, diese aber die Tendenz zeigen, nicht stabil genug für Experimente wie z.B. Kristallisationsversuche zu sein. Da beide Untereinheiten über ihren C-Terminus miteinander interagieren,<sup>[83, 98]</sup> wurden zusätzlich Co-Expressionsversuche von Vps39 mit Vps11 durchgeführt, in der Hoffnung, dass durch die Anwesenheit des korrekten Bindungspartners die Tendenz zur Selbstaggregation reduziert werden kann.



**Abb. 3.2: Expressions- und Löslichkeitstest der Co-Expressionskonstrukte von Vps39 mit Vps11.** Die linke Hälfte des Gels zeigt die Ergebnisse von Vps39<sub>677-1023</sub> (40 kDa) mit His-Vps11<sub>715-1020</sub> (38 kDa), His-Vps11<sub>778-1020</sub> (37 kDa) und His-Vps11<sub>778-1008</sub> (30 kDa) und die letzten sechs Spuren His-Vps39<sub>677-1023</sub> (43 kDa) mit Vps11<sub>715-1020</sub> (37 kDa), Vps11<sub>778-1020</sub> (30 kDa) und Vps11<sub>778-1008</sub> (29 kDa).

Für die Co-Expression wurden die Einzelkonstrukte aus dem pQlinkH-Vektor entweder mit dem Histidinanker in den pACE-Vektor oder aber ohne den Affinitätsanker in den pDK-Vektor kloniert und danach mittels Cre-Rekombinase fusioniert (Kapitel 2.2.1.4). So konnten beide Konstrukte mit gleicher Gendosis von einem einzelnen Plasmid in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) exprimiert werden. Diese Herangehensweise wurde gewählt, um möglichst homogene Co-Konstrukte zu erhalten. Die Co-Expressionsplasmide wurden wiederum im kleinen Maßstab getestet, diesmal auf Löslichkeit und zusätzlich auf eine gemeinsame und gleichmäßige Expression der Genprodukte.

Durch die Co-Expression von Vps39 mit Vps11 wurde es möglich, dass Konstrukte von Vps39, welche als Einzelkonstrukte nicht detektierbar exprimiert werden konnten, nun zusammen mit Vps11 in löslichen Form zu gewinnen. Anhand des Beispiels von Vps39<sub>677-1023</sub> mit verschiedenen C-terminalen Konstrukten von Vps11 ist deutlich zu erkennen, dass das Expressionslevel der Konstrukte sehr unterschiedlich ist. Befindet sich der Affinitätsanker am Vps11-Konstrukt, so kann hauptsächlich dieses Konstrukt mittels *Beads* angereicht werden. Das Expressionslevel korreliert hierbei stark negativ mit der Konstruktlänge. Eine gleichmäßige Expression von Vps39- und Vps11-Konstrukt ist nur möglich, wenn sich der Affinitätsanker am Vps39-Konstrukt befindet. Auch hier entscheidet das Expressionslevel des Vps11-Konstrukts über die Expressionsmenge von Vps39. Je kürzer das Vps11-Konstrukt, desto stärker das Expressionslevel der beiden c-terminalen Bereiche zusammen.

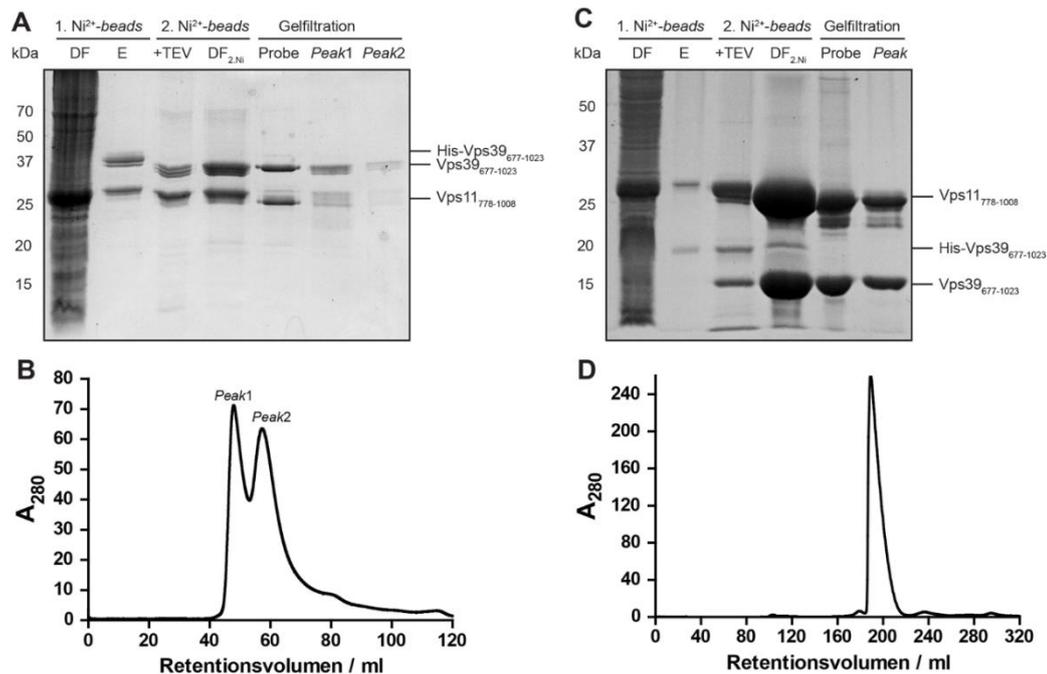


**Abb. 3.3: Expressions- und Löslichkeitstest der Co-Expressionskonstrukte von Vps39 mit Vps11.** Die linken sechs Taschen repräsentieren die Ergebnisse von Vps39<sub>875-1023</sub> (17 kDa) mit His-Vps11<sub>715-1020</sub> (38 kDa), His-Vps11<sub>778-1020</sub> (37 kDa) und His-Vps11<sub>778-1008</sub> (30 kDa) und die letzten sechs Taschen His-Vps39<sub>875-1023</sub> (20 kDa) mit Vps11<sub>715-1020</sub> (37 kDa), Vps11<sub>778-1020</sub> (30 kDa) und Vps11<sub>778-1008</sub> (29 kDa).

Das gesamte Expressionslevel für die Co-Expression konnte durch die Verkürzung des Vps39-Konstrukts um knapp 200 Aminosäurereste weiter gesteigert werden, jedoch auch nur bei Platzierung des Affinitätsankers am Vps39-Konstrukt. Im Gegensatz zu Vps39<sub>677-1023</sub> ist aber eine geringe Anreicherung von Vps39<sub>875-1023</sub> an den *Beads* zu erkennen, selbst wenn sich der Affinitätsanker am Vps11-Konstrukt befindet.

### 3.1.2 Reinigung der Unterkomplexe

Die löslichen und gleichmäßig exprimierten Co-Expressionskonstrukte wurden im großen Maßstab produziert (Kapitel 2.2.2.2) und innerhalb von drei Tagen wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben gereinigt. Der Verlauf der Reinigung von Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> ist in Abb. 3.4A-B und der von Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> in Abb. 3.4C-D exemplarisch dargestellt.



**Abb. 3.4:** Reinigung der Co-Expressionskonstrukte von Vps39 mit Vps11. **A)** 15%iges SDS-PAGE mit verschiedenen Proben, die während der Reinigung der Co-Expressionskonstrukte Vps39<sub>677-1023</sub> (43/40 kDa) mit Vps11<sub>778-1008</sub> (29/27 kDa) genommen wurden. DF: Durchfluss der ersten Ni<sup>2+</sup>-Säule, E: Elution mit Puffer E<sub>1</sub>, +TEV: nach der Inkubation mit der TEV-Protease, DF<sub>2,Ni</sub>: Durchfluss der zweiten Ni<sup>2+</sup>-Säule (enthält geschnittenes Protein), Probe: konzentrierte Probe vor der Gelfiltration, Peak1: vereinigte Fraktionen des ersten Gelfiltrationspeaks, Peak2: vereinigte Fraktionen des zweiten Gelfiltrationspeaks. **B)** Chromatogramm Superdex<sup>TM</sup> 200 (16/60) für Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>. **C)** 15%iges SDS-PAGE mit verschiedenen Proben, die während der Reinigung der Co-Expressionskonstrukte Vps39<sub>875-1023</sub> (20/17 kDa) mit Vps11<sub>778-1008</sub> (29/27 kDa) genommen wurden. DF: Durchfluss der ersten Ni<sup>2+</sup>-Säule, E: Elution mit Puffer E<sub>1</sub>, +TEV: nach der Inkubation mit der TEV-Protease, DF<sub>2,Ni</sub>: Durchfluss der zweiten Ni<sup>2+</sup>-Säule (enthält geschnittenes Protein), Probe: aufkonzentrierte Probe vor der Gelfiltration, Peak: vereinigte Fraktionen des Gelfiltrationspeaks. **D)** Chromatogramm Superdex<sup>TM</sup> 200 (26/60) für Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>.

Für die Reinigung der Unterkomplexe wurden die Zellen mittels Fluidizer aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation konnten die miteinander interagierenden Konstrukte via Ni<sup>2+</sup>-IDA Affinitätschromatographie aus dem Lysat an einer Gravitations säule angereichert werden. Nach der Elution von

His-Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> bzw. His-Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> von der Säule wurden beide Unterkomplexe mit TEV-Protease (1:5) über Nacht inkubiert. Nach dem Verdau mit der Protease konnte durch eine zweite Affinitätschromatographie die verdauten von unverdauten Komplexen, der Protease und den geschnittenen Affinitätsankern abgetrennt werden. Mittels Gelfiltration konnten letzte Verunreinigungen entfernt und die Reinigung abgeschlossen werden.

Alle Unterkomplexe von Vps39 mit Vps11 wurden nach dem gleichen Schema gereinigt. Für den Unterkomplex Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1023</sub> ergab sich eine Ausbeute von ~3,4 mg/l Kultur. Die Retentionszeit des *Peaks* (Abb. 3.4D) entsprach einem ungefähren Molekulargewicht von 59 kDa. Vps39<sub>875-1023</sub> und Vps11<sub>778-1023</sub> haben zusammen ein Molekulargewicht von 44 kDa. Somit entspricht der *Peak* in etwa einem 1:1 Gemisch von Vps39<sub>875-1023</sub> und Vps11<sub>778-1008</sub>.

Für den Unterkomplex Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1023</sub> ergab sich eine Ausbeute von nur ~0,2 mg/l Kultur. Zusätzlich eluierte der Komplex in zwei *Peaks*. In beiden *Peaks* sind sowohl Vps39<sub>677-1023</sub> als auch Vps11<sub>778-1008</sub> vorhanden, kontaminierende Proteine konnten nicht detektiert werden. Die Intensität der jeweiligen Vps39- bez. Vps11-Bande im SDS-Gel ist dagegen sehr unterschiedlich. Vps11<sub>778-1008</sub> ist kaum in der Probe von *Peak2* zu erkennen. Die Retentionszeiten der *Peaks* (Abb. 3.4B) entsprechen einem ungefähren Molekulargewicht von 1000 kDa (*Peak1*) bzw. 450 kDa (*Peak2*). Diese Retentionszeiten deuten darauf hin, dass Vps39<sub>677-1023</sub> und Vps11<sub>778-1008</sub> nicht als homogenes Heterodimer vorliegen, sondern in einem höheren oligomeren Zustand. Zusätzlich zeigt das SDS-Gel, dass Vps39<sub>677-1023</sub> und Vps11<sub>778-1008</sub> nicht im gleichen Verhältnis in Lösung vorliegen. Zusammengenommen deuten beide Observationen darauf hin, dass dieser Komplex nicht homogen ist und dadurch wahrscheinlich schlecht zu kristallisieren sein wird. Diese Vermutung bewahrheitete sich in den anschließenden Kristallisationsstudien, bei denen nur eine positive aus getesteten 348 initialen Kristallisationsbedingung (Kapitel 3.1.3) identifiziert werden konnte. Zwar konnte diese unter Verwendung derselben Komplexcharge optimiert werden, die Reproduktion mit einer neuen Charge gelang dagegen nicht.

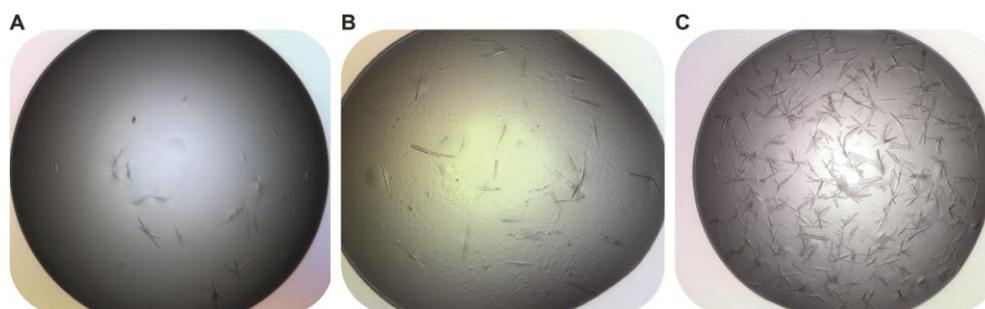
Im Gegensatz zu Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> zeigte das Gelfiltrationsprofil von Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> (Abb. 3.4B) einem gaußförmigen *Peak* bei einer für ein Dimer erwarteten Retentionszeit. Zusätzlich waren beide Proteinbanden im SDS-Gel annähernd

gleich stark, was auf ein homogenes Gemisch schließen lässt. Dieses spiegelt sich auch in der Anzahl der initialen Kristallisationsbedingungen wider. Insgesamt wurden hier 27 positive von 480 getesteten Bedingungen identifiziert.

### 3.1.3 Kristallisationsversuche

#### 3.1.3.1 Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>

Die Kristallisationsversuche vom gereinigten Unterkomplexe Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> wurden bei 20 °C und mit zwei verschiedenen Konzentrationen (7,8 mg/ml und 9,3 mg/ml) angesetzt. Zur Ermittlung geeigneter Kristallisationsbedingungen wurden, wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, initiale *Screens* im 96er Format mit einer Tropfengröße von 200 + 200 nl durchgeführt. Für diesen Komplex wurden die Kristallisations-*Screens The Classics Suite, The Classics II Suite, The pHClear Suite* und *The pHClear II Suite* verwendet.



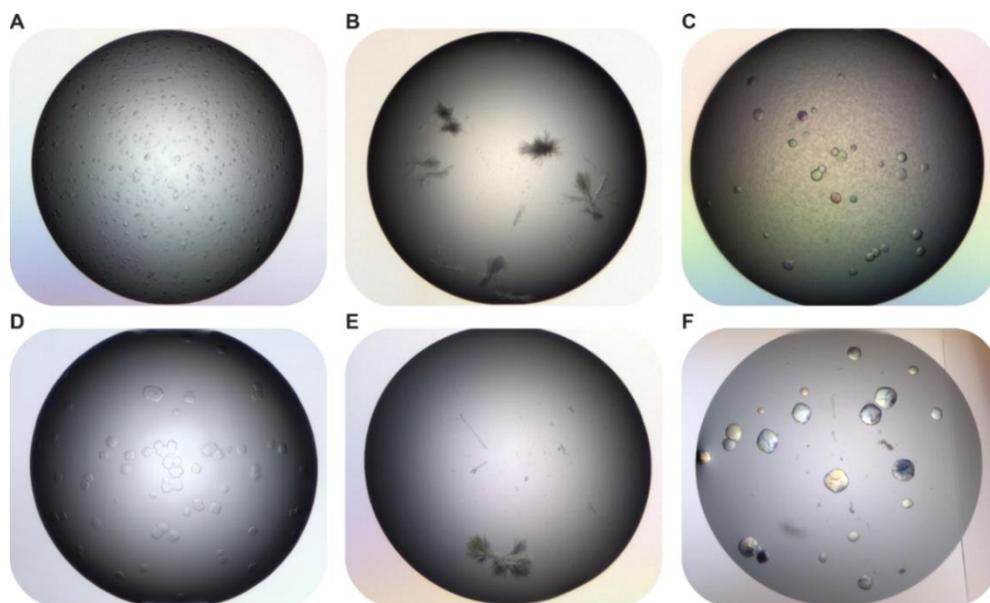
**Abb. 3.5:** Kristallisationsversuche mit Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>. **A)** Initiale Bedingung: kleine verwachsene Nadeln nach drei Tagen bei 20 °C in 200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM HEPES pH 7,5 und 25% (w/v) PEG 3350. **B-C)** optimierte Bedingungen: leicht größere verwachsene Nadeln nach drei Tagen bei 20 °C in B) 200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM HEPES pH 8,0 und 26% (w/v) PEG 3350. C) 200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM HEPES pH 8,0 und 28% (w/v) PEG 3350.

In den vier *Screens* mit der geringeren Proteinkonzentration konnten unter keiner einzigen Bedingung Kristalle gefunden werden. Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> kristallisierte unter einer einzigen Bedingung bei der höheren Proteinkonzentration. Es bildeten sich nach ca. drei Tagen Inkubation kleine verwachsene Nadeln (Abb. 3.5A). Diese Nadeln konnten noch weiter in ihrer Größe optimiert werden (Abb. 3.5B-C). Als Kryoprotektand konnte Glycerin verwendet werden. Hierfür wurden 8 µl der Reservoirlösung mit 2 µl 100% (v/v) Glycerin gemischt. Der gefischte Kristall wurde kurz in diese Kryolösung überführt und dann sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Röntgenbeugungsexperimente bei -173 °C ergaben, dass die Auflösung bei 8,6-8,2 Å limitiert war.

Weitere Optimierungen der Kristallisationsbedingung waren nicht möglich, da sich die Kristalle nicht mit einer neuen Charge Komplex reproduzieren ließen.

### 3.1.3.2 Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>

Die Kristallisationsversuche mit dem gereinigten Unterkomplex Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> wurden bei 20 °C und mit drei verschiedenen Proteinkonzentrationen (3,5 mg/ml, 6,3 mg/ml und 8,5 mg/ml) angesetzt. Wie für Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> wurden auch für Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> die initialen Screens wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben im 96er Format mit einer Tropfengröße von 200 + 200 nl durchgeführt. Für diesen Komplex wurden die Kristallisations-Screens *The Classics Suite*, *The Classics II Suite*, *The pHClear Suite*, *The pHClear II Suite* und *The JCSG+ Suite* verwendet.



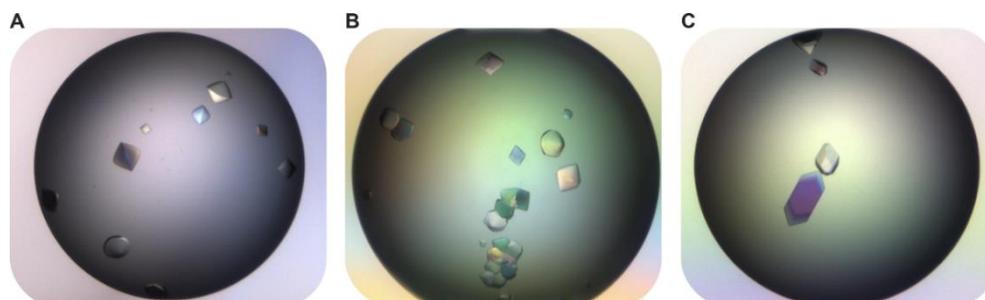
**Abb. 3.6** Kristallisationsversuche mit Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>. A-F) Initiale Bedingung bei 20 °C in A) 1,6 M MgSO<sub>4</sub> und 100 mM MES pH 6,5 bei einer Proteinkonzentration von 3,5 mg/ml. B) 0,49 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 0,91 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> bei einer Proteinkonzentration von 8,5 mg/ml. C) 200 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM HEPES pH 7,5 und 28% (w/v) PEG 400 bei einer Proteinkonzentration von 3,5 mg/ml. D) 3,0 M NaCl und 100 mM bis-Tris pH 6,5 bei einer Proteinkonzentration von 8,5 mg/ml. E) 1,4 M Na/K-Phosphat bei einer Proteinkonzentration von 6,3 mg/ml. F) 1 M Mg<sup>2+</sup>-Acetat und 100 mM MES pH 6,5 bei einer Proteinkonzentration von 8,5 mg/ml.

Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> kristallisierte unter verschiedensten Bedingungen (Abb. 3.6) und in unterschiedlichen Formen. Meist wurden irregulär geformte Kristalle observiert (Abb. 3.6A,C,D,F), es konnten aber auch einige wenige Nadeln (Abb. 3.6B,E)

beobachtet werden. Die meisten Kristalle konnten bei einer Proteinkonzentration von 8,5 mg/ml identifiziert werden und entstanden hauptsächlich aus einem Zweikomponentengemisch (anorganisches Salz und Puffer). Die fünf obengenannten *Screens* ermöglichen keine systematische Suche nach verschiedenen Salz-Puffer-Bedingungen. Deswegen wurden zusätzlich die *The Anions Suite*- und *The Cations Suite*-*Screens* nur mit der höchsten Proteinkonzentration angesetzt. Dabei konnte weitere Kristallisationsbedingungen (Abb. 3.6F) identifiziert werden.

### 3.1.3.3 Optimierung

Es wurden mehrere der initialen Bedingungen optimiert. Dabei wurden chemisch ähnliche initiale Bedingungen zu einem gemeinsamen *Fine-Screen* zusammengefasst. Die Kristallisationsbedingungen, die Nadeln erzeugten (Abb. 3.6B und E) konnten in *Fine-Screens* nicht reproduziert werden. Hingegen ließ sich die Kristallform ohne scharfe Abgrenzungen sowohl reproduzieren als auch optimieren, hier beispielhaft für  $Mg^{2+}$ -Acetat/MES in Abb. 3.7 gezeigt.



**Abb. 3.7:** Kristallisationsversuche mit Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>. A-C) Optimierte Bedingungen bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 8,5 mg/ml in A) 0,8 M  $Mg^{2+}$ -Acetat und 100 mM MES pH 6,5. B) 0,8 M  $Mg^{2+}$ -Acetat und 100 mM MES pH 7,0. C) 0,68 M  $Mg^{2+}$ -Acetat und 100 mM MES pH 6,9.

Die initialen Bedingung mit 1 M  $Mg^{2+}$ -Acetat und 100 mM MES pH 6,5 (Abb. 3.6F) konnte soweit optimiert werden, dass klar abgegrenzte Kristalle entstanden. Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> kristallisierte unter dieser Bedingung in zwei Kristallformen (Abb. 3.7C): einer kompakten und einer länglichen Form.

Zunächst wurde Glycerin als Kryoprotektand verwendet. Wie für den Komplex Vps39<sub>677-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> wurden hierfür 8 µl der Reservoirlösung mit 2 µl 100% (v/v) Glycerin gemischt. Der gefischte Kristall wurde kurz in diese Kryo-Lösung überführt und

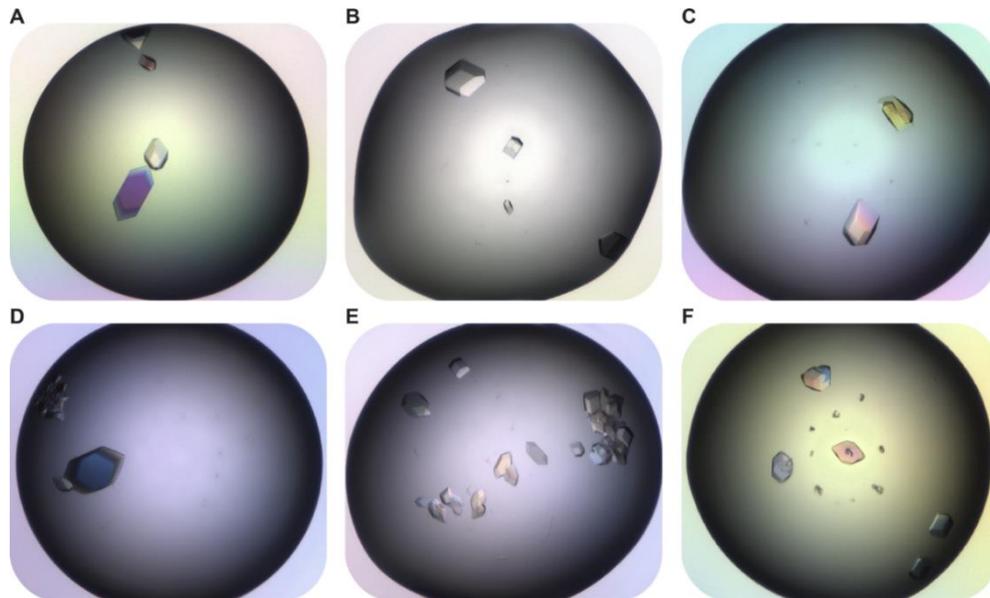
dann sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Röntgenbeugungsexperimente bei  $-173\text{ °C}$  ergaben, dass die Auflösung bei  $10\text{-}8\text{ Å}$  limitiert war.

#### **3.1.3.3.1 Kryoprotektand-Screening**

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde Glycerin als Standard-Kryoprotektand verwendet (Kapitel 2.2.4.1). Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Glycerin für die schlechte Auflösung verantwortlich ist, wurde nach alternativen Kryoprotektanden gesucht. Insbesondere wurde versucht, Substanzen zu finden, welche chemisch möglichst unterschiedlich zu Glycerin sind.<sup>[139]</sup> Unter anderem wurde untersucht, ob,  $\text{Mg}^{2+}$ -Acetat, welches in den initialen *Screens* als geeignetes Präzipitans ermittelt wurde, selbst als Kryoprotektand verwendet werden kann. Die Überlegung dahinter ist, dass chemische Verbindungen, in denen das Protein kristallisiert, nach aller Wahrscheinlichkeit nicht schlecht für den Kristall sein werden. Jedoch zeigten anschließende Diffraktionsexperimente nur eine minimale Verbesserung der Auflösung. Zwei der getesteten Kryo-Bedingungen (20% Ethylenglycol sowie 1,8 M  $\text{Mg}^{2+}$ -Acetat) führten zu Kristallen, die länger in der Kryo-Bedingung gelagert werden konnten ohne sich optisch zu verändern. Daher wurden diese beiden Kryoprotektanden anstelle von 20% Glycerin in anschließenden Versuchen verwendet.

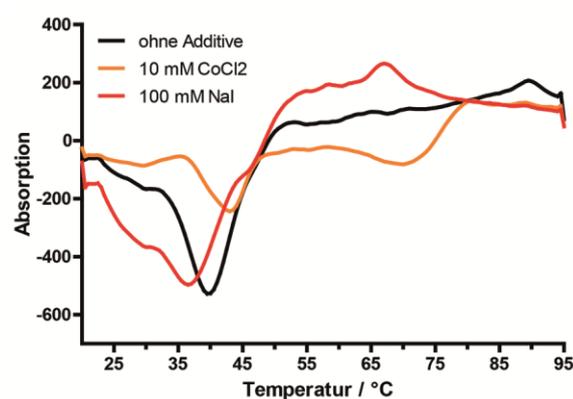
#### **3.1.3.3.2 Additiv-Screen**

Ausgehend von der nach pH, Puffer und Salz optimierten Bedingung (Abb. 3.7C) wurde ein Additiv-Screen durchgeführt, um die Auflösung weiter zu verbessern. Dafür wurde der *Hampton Additive Screen HT* verwendet. Dabei werden im 96er-Format konzentrierte Stammlösungen, welche Salze, Nucleotide und kleine organische Verbindungen enthalten, der optimierten Kristallisationslösung hinzugegeben. Ziel ist es hierbei, potentielle Liganden zu finden, welche entweder den Komplex in einer definierten Konformation stabilisieren und/oder die Ordnung der Einheitszellen erhöhen. Jedoch konnte optisch keine Veränderung der Kristallform zur Bedingung ohne Additive beobachtet werden (Abb. 3.8). Dieses erschwerte eine Vorselektion für anschließende Diffraktionsexperimente erheblich.



**Abb. 3.8:** Kristallisationsversuche mit Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> und Additiven. A-F) Optimierte Bedingungen bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 8,5 mg/ml in A) 0,68 M Mg<sup>2+</sup>-Acetat und 100 mM MES pH 6,9. B) plus 3% DMSO. C) plus 10 mM Harnstoff. D) plus 10 mM SrCl<sub>2</sub>. E) plus 10 mM BaCl<sub>2</sub>. F) plus 100 mM NaI.

Daher wurden zusätzlich *Thermofluor*-Experimente durchgeführt (Kapitel 2.2.3.3). Auch im *Thermofluor*-Experiment konnte für den Großteil der getesteten Bedingungen keine Veränderung der Komplexstabilität beobachtet werden. Nur zwei Bedingungen zeigten eine Veränderung: NaI führte zu einer Reduktion der Thermostabilität um 3 °C, während CoCl<sub>2</sub> die Thermostabilität um 3 °C erhöhte. (Abb. 3.9)



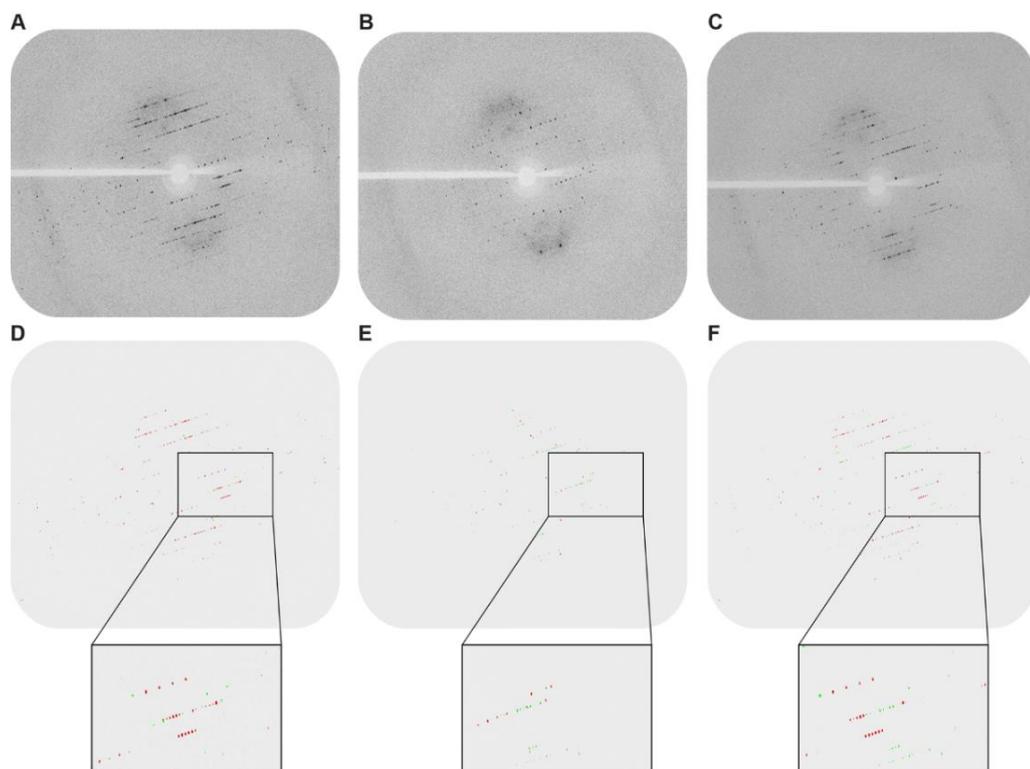
**Abb. 3.9:** Ausgewählte Ergebnisse des *Thermofluor*-Experiments mit Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>. Schwarz: Komplexe ohne Additiv. Orange: Komplexes mit 10 mM CoCl<sub>2</sub> und Rot: mit 100 mM NaI.

Eine systematische Auswertung sowie eine Interpretation der Ergebnisse waren aufgrund der minimalen Anzahl an beobachteten Veränderungen nicht möglich. Daher

wurden in anschließenden Diffraktionsexperimenten die meisten der erhaltenen Additiv-Kristalle experimentell untersucht. Jedoch konnte keine Verbesserung der Auflösung, auch nicht für den durch  $\text{CoCl}_2$  stabilisierten Komplex, festgestellt werden.

### 3.1.3.3.3 Hydratationsexperiment

Die anisotrope Streuung der optimierten Kristalle, sowie die auf 8 Å limitierte Auflösung lassen vermuten, dass die Einheitszelle ein großes Solvens-Volumen aufweist. Physikalische Dehydratation ist eine Methode, mittels welcher der Solvens-Anteil von Proteinkristallen verringert werden kann. Dabei wird anstelle des  $-173\text{ °C}$  kalten, trockenen Stickstoffstroms ein mit definierter Feuchtigkeit gesättigter Stickstoffstrom bei Raumtemperatur über den Kristall geleitet.



**Abb. 3.10: Diffraktionsbilder des Hydratationsexperiments mit Kristallen von Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>.** **A)** Startbedingung 95% Luftfeuchtigkeit (Pre), **B)** Dehydratation bei 75% Luftfeuchtigkeit (Dehy), **C)** Endbedingung 95% Luftfeuchtigkeit (Post). **D)** Vergleich der Reflexe Pre-Dehy, **E)** Vergleich der Reflexe Dehy-Post, **F)** Vergleich der Reflexe Post-Pre. Jeweils in grün dazugewonnene, in rot verlorene Reflexe.

Um sicherzustellen, dass die Kristalle bei Raumtemperatur ausreichend stabil sind, wurden diese zunächst an einer *In-house-Beamline* bei Raumtemperatur vermessen. Das dabei erhaltene Diffraktionsbild war vergleichbar mit denen der vorherigen Kryo-Experimente. Das Hydratationsexperiment wurde anschließend am Synchrotron

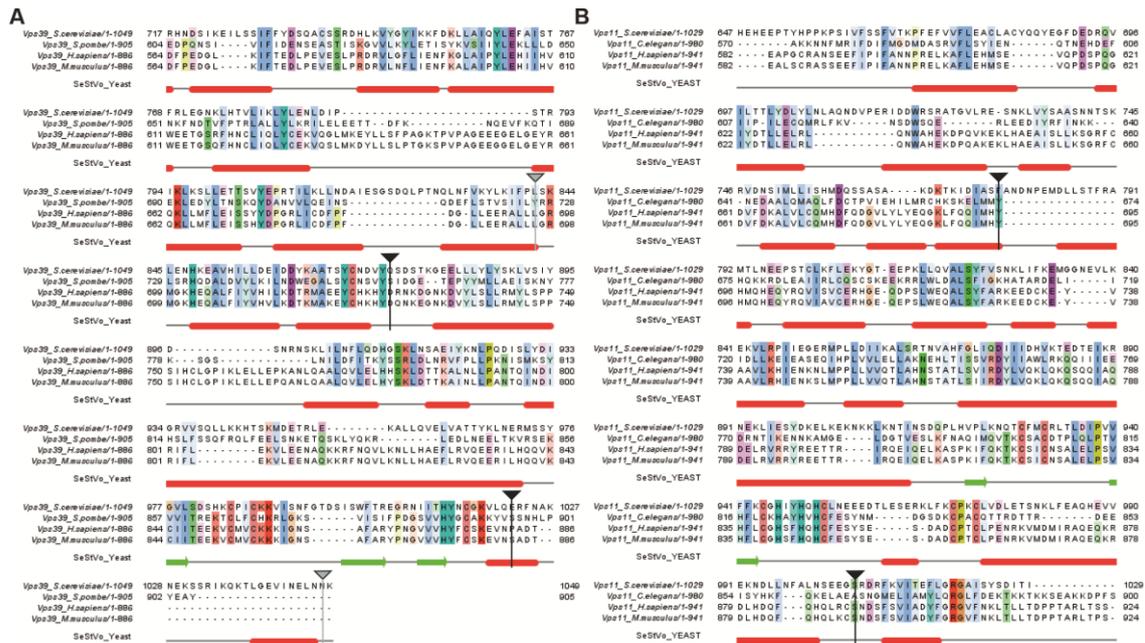
durchgeführt. Auch wenn eine Umordnung des Kristallgitters bei 75% Luftfeuchtigkeit deutlich wurde (Abb. 3.10), so konnten nach Rehydratation keine höher aufgelösten Reflexe mehr detektiert werden. Nur niedrig aufgelöste Reflexe wurden etwas intensiver. Das Reflexionsmuster nach der De-/Rehydratation deuten darauf hin, dass sich die Raumgruppe des Kristalls verändert und sich die lange Achse der Einheitszelle von 402,9 Å auf 136,4 Å mehr als halbiert hatte. Vermutlich im Zusammenhang hierzu steht eine beobachtete Verringerung der Anisotropie der Auflösung.

Zusammenfassend zeigte sich in diesen Experimenten, dass der Solvens-Anteil des Kristalles hoch ist, da eine Umordnung im Inneren des Kristalles nach Dehydratation und Rehydratation offenbar stattfand, wenn sie auch nicht zu einem besser diffraktierenden Kristall führte. Jedoch ist anzumerken, dass aufgrund der relativ geringen Anzahl an Reflexen nach Rehydratation ein gewisser Fehler in der Bestimmung der Zellparameter nicht ausgeschlossen werden kann.

#### **3.1.3.3.4 Konstruktoptimierung**

Nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Vps39-Bindungsstelle von Vps11 im bis zu diesem Punkt verwendeten Konstrukt nur partiell abgesättigt ist. Um zu verhindern, dass sich undefiniert weitere Kopien von Vps11 und/oder Vps39 an dem Komplex beteiligen, wurde im Folgenden versucht, die verwendeten Konstrukte mit dem Ziel weiter zu optimieren, den Komplex möglichst optimal abzubilden.

Im Gegensatz zu dem initialen Konstruktdesign (Abb. 3.11 schwarze Dreiecke), welches versuchte, bekannte oder vermutete Interaktionsbereiche abzudecken, wurde bei dieser spezialisierten Designrunde ein Hauptaugenmerk auf vorhergesagte Sekundärstrukturelemente von Vps39 und Vps11 gelegt (Abb. 3.11A,B). Dabei konnte festgestellt werden, dass Vps39 und Vps11 nicht nur in der Domänenarchitektur große Übereinstimmungen aufweisen, sondern auch bei der Anzahl der vorhergesagten Sekundärstrukturelemente. Nach diesen neuen Gesichtspunkten war das in vorhergehenden Experimenten verwendete Vps39-Konstrukt sowohl N-terminal als auch C-terminal nicht vollständig. Dieses wurde in neuen Konstrukten korrigiert.

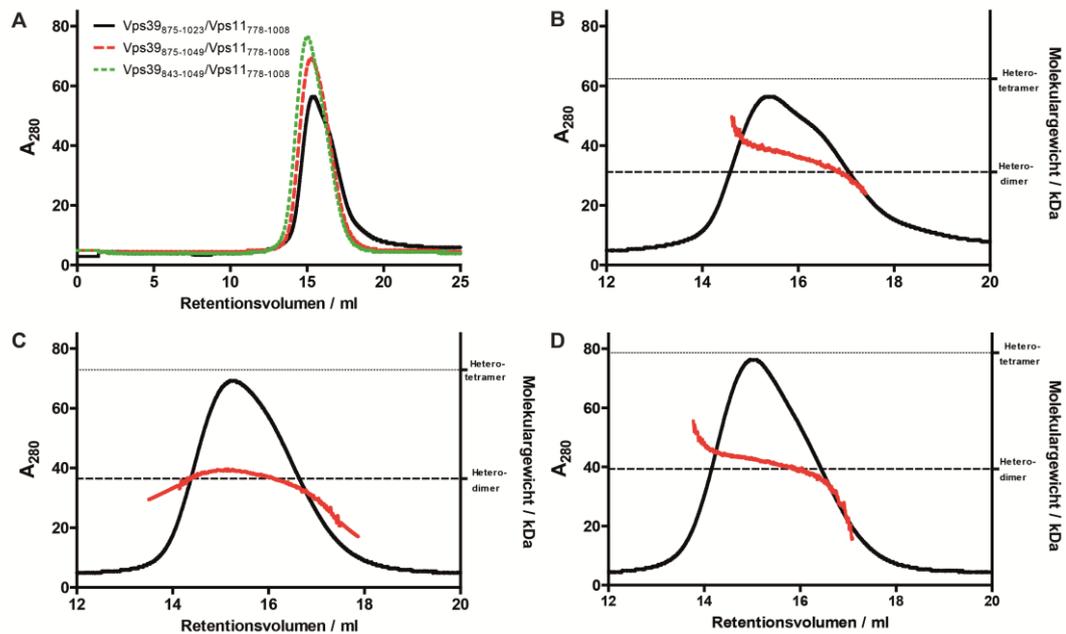


**Abb. 3.11: Sequenzvergleich und Sekundärstrukturvorhersage der C-terminalen Bereiche von A) Vps39 und B) Vps11.** Dargestellt sind mit roten Balken  $\alpha$ -Helices, mit grünen Balken  $\beta$ -Faltblätter, mit schwarzen Dreiecken die bisher verwendeten Konstruktgrenzen und in grauen Dreiecken neue, optimierte Konstruktgrenzen. Aminosäurereste wurden nach dem ClustalX-Schema eingefärbt, d.h. konservierte Reste nach ihren chemischen Eigenschaften: hydrophobe in blau, basische in rot, ungeladene polare in grün, saure in magenta, hydrophile aromatische in cyan, Cys in rosa, Gly in orange und Pro in gelb. Für eine vergrößerte Darstellung siehe Anhang Abb. 6.1.

### 3.1.3.3.5 Statische Lichtstreuung

Um den Effekt der neuen Konstrukte auf die Heterodimer-Bildung genauer zu untersuchen, wurde statische Lichtstreuung in Kombination mit Gelfiltration (Kapitel 2.2.3.4) durchgeführt. Grund hierfür ist, dass die eingangs verwendete Größenbestimmung per Größenausschlusschromatographie trotz einer gewissenhaften Kalibrierung mit Größenstandards mit einem hohen Messfehler verbunden ist.

Im direkten Vergleich zu dem originalen Konstrukt (Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>, Abb. 3.12A) ist sowohl bei Vps39<sub>875-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> als auch bei Vps39<sub>843-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> bereits ein symmetrischeres Elutionsprofil von der Größenausschlusschromatographiesäule zu beobachten (Abb. 3.12), was die Interpretation nahelegt, dass beide nach Domänengrenzen designte Konstrukte in besser definierten Heterodimeren resultieren.



**Abb. 3.12: Chromatogramme der statischen Lichtstreuung.** A) Zusammenfassung der Elutionsprofile mit der Superdex™ 200 10/300 für die Unterkomplexen von Vps39 mit Vps11. B-D) Peaks des Absorptionssignals (schwarze Linie) von den Unterkomplexen und den zugehörigen Molmassen (rote Linie), gestrichelte Linie: theoretisches Molekulargewicht des Heterodimers, gepunktete Linie für Heterotetramer. B) Vps39<sup>875-1023</sup>•Vps11<sup>778-1008</sup>. C) Vps39<sup>875-1049</sup>•Vps11<sup>778-1008</sup>. D) Vps39<sup>843-1049</sup>•Vps11<sup>778-1008</sup>.

Die genaue Größenbestimmung anhand der statischen Lichtstreuung zeigt zusätzlich für Vps39<sup>875-1049</sup>•Vps11<sup>778-1008</sup> als auch für Vps39<sup>843-1049</sup>•Vps11<sup>778-1008</sup> (Abb. 3.12C,D) ein eluierendes Heterodimeres, welche besser mit der theoretischen Größe des Heterodimers übereinstimmt (gestrichelte Linie). Bei Vps39<sup>875-1049</sup>•Vps11<sup>778-1008</sup> (Abb. 3.12C) konnten zusätzlich keine höheren, potentiellen homopolymeren, Komplexanteile detektiert werden.

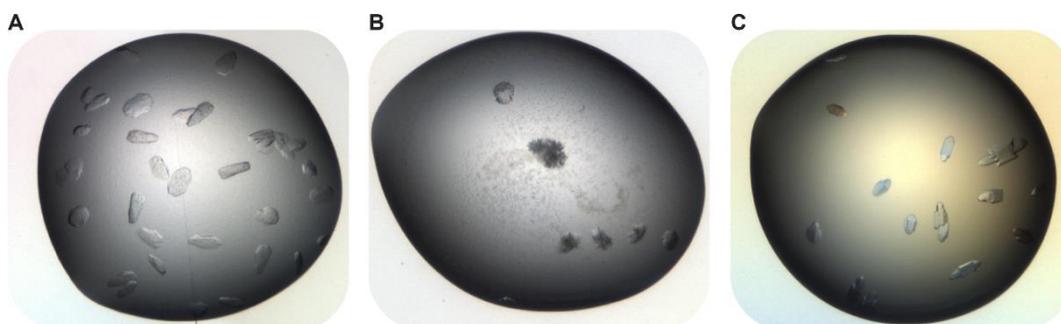
**Tabelle 3.1: Ergebnisse der statischen Lichtstreuung.**

Komplex	RV [ml]	MW <sub>theoretisch</sub> [g·mol <sup>-1</sup> ]	MW <sub>ermittelt</sub> [g·mol <sup>-1</sup> ]	Oligomerisierungszustand
Vps39 <sup>875-1023</sup> •Vps11 <sup>778-1008</sup>	14,9	44181	44000	Heterodimer
Vps39 <sup>875-1049</sup> •Vps11 <sup>778-1008</sup>	14,8	47166	47000	Heterodimer
Vps39 <sup>843-1049</sup> •Vps11 <sup>778-1008</sup> .	14,5	50874	53000	Heterodimer

RV: Retentionsvolumen, MW: Molekulargewicht

### 3.1.4 Kristallisation von Vps39<sub>875-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>

Die Kristallisationsversuche von den gereinigten Unterkomplexen Vps39<sub>875-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> (5,4 mg/ml) und Vps39<sub>843-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> (7,6 mg/ml) wurden bei 20 °C angesetzt. Wie für Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> wurden auch für diese beiden Komplexe die initialen *Screens* wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben im 96er Format mit einer Tropfengröße von 200 + 200 nl durchgeführt. Für Vps39<sub>875-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> wurden die Kristallisations-*Screens* *The Classics Suite*, *The Classics II Suite*, *The pHClear Suite*, *The pHClear II Suite*, *The JCSG+ Suite*, *The Anions Suite* und *The Cations Suite*, für Vps39<sub>843-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> wurde zusätzlich zu den erwähnten noch der *The PACT Suite Screen* verwendet.



**Abb. 3.13:** Kristallisationsversuche mit den Komplexen A) Vps39<sub>843-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> und B-C) Vps39<sub>875-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>. A) 4 M NaCl, 100 mM MES, pH 6,0. B) 28% (v/v) PEG 400, 200 mM CaCl<sub>2</sub>, und 100 mM HEPES, pH 7,5. C) 10% (w/v) PEG 8000, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 7,0.

In anschließenden Kristallisation- und Diffraktionsexperimenten, welche gemäß den vorherigen Versuchen geplant und durchgeführt wurden, zeigten sich keine signifikanten Verbesserungen der Auflösung. Die Kristallisationsexperimente verdeutlichen jedoch den prognostischen Charakter der SLS-Vorversuche, da Vps39<sub>843-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> besser als Vps39<sub>875-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> kristallisierte. Die optimierten Kristallformen von Vps39<sub>875-1049</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub> (Abb. 3.13C) ähnelten denen der Vps39<sub>875-1023</sub>•Vps11<sub>778-1008</sub>-Kristalle.

## 3.2 Fazit

Ungeachtet der intensiven Bemühungen und einer Vielzahl von Kristallisations-, Postkristallisations- und Diffraktionsexperimenten konnten keine Diffraktionsdaten in einer Auflösung gewonnen werden, die zur Bestimmung der Struktur der Interaktions-

region zwischen Vps39 und Vps11 ausreichen würde. Der hohe Durchsatz an Proben wurde getragen durch die heutzutage etablierten Verfahren des Hochdurchsatz-*Screening* sowie moderne Detektoren und automatisiertes Probenhandling an der *Beamline*.

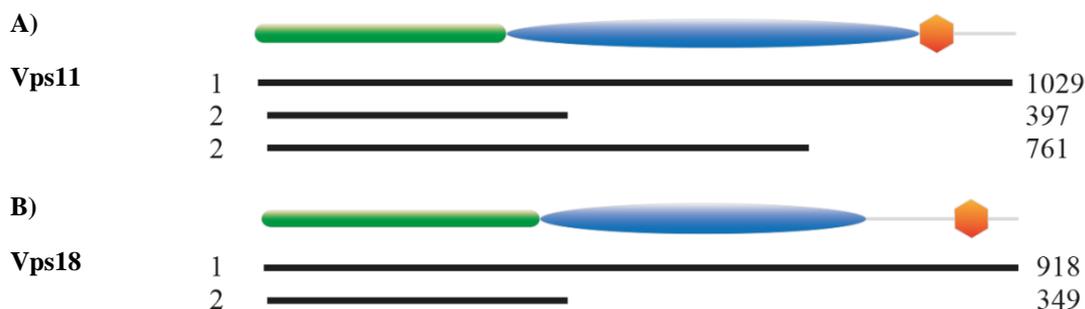
Jedoch bleibt das Problem, dass beide Verfahren nur helfen chemische Bedingungen im hohen Durchsatz zu testen. Im Fall von Vps39 und Vps11 ist jedoch zu vermuten, dass die Konstrukte selber limitierend sind. Somit wird nicht die Suche nach Kristallisationsbedingungen, sondern Konstruktdesign und -Expression limitierend. Bei einem Komplex aus verschiedenen Untereinheiten, insbesondere wenn die genauen Interaktionsbereiche nicht bekannt sind, ist das Konstruktdesign generell erschwert: Während bei Einzelkonstrukten vorhergesagte Schleifenregionen meistens umgangen werden können, um die Kristallpackung zu verbessern, so können diese möglicherweise für den Kontaktbereich essentiell sein, z.B. wenn sich unstrukturierte Bereiche auf strukturierte des Bindungspartners falten. Für ein rationales Konstruktdesign ist also eine genaue Kenntnis oder Vorhersage der Interaktionsbereiche notwendig. Bedauerlicherweise sind hierfür jedoch hochaufgelöste Strukturen, wie in dieser Arbeit angestrebt, erforderlich. Verfügbar waren aber nur ein *Yeast-two-Hybrid-Experiment*<sup>[97]</sup> und Co-Immunopräzipitationsexperimente (Co-IP)<sup>[83, 98]</sup>, welche beide vergleichbar grob aufgelöste Informationen lieferten. Den höchsten Informationsgehalt lieferte eine limitierte Proteolyse von volllänge Komplexen sowie Volllänge-Unterkomplexen (z.B. Vps39•Vps11 oder Vps33•Vps16) im Vergleich mit der limitierten Proteolyse von Einzelkonstrukten.<sup>[140]</sup> Eine weitere Verfeinerung dieser Grenzen ist jedoch weiterhin notwendig, bestenfalls in einem hochdurchsatzfähigen Verfahren. Auch wenn SLS einen guten prognostischen Charakter für die Planung von Konstruktgrenzen zeigte, ist es aufgrund der Dauer des Experimentes nur für geringe Anzahl an Konstrukten anwendbar.

## 4 N-terminale Domänen von Vps11 und Vps18

### 4.1 Ergebnisse und Diskussion

#### 4.1.1 Expressions- und Löslichkeitstest der Einzelkonstrukte

Wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, wird auch die Kernuntereinheit Vps18 der *Tethering*-Komplexe HOPS und CORVET analog zu den Untereinheiten Vps11 und Vps39 von Strukturvorhersagen in drei Domänen aufgeteilt: einen N-terminalen  $\beta$ -Propeller, gefolgt von einer  $\alpha$ -Solenoid-Domäne und abgeschlossen von einem C-terminalen RING-Motiv<sup>[97]</sup> (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** Domänenarchitektur und verwendete Expressionskonstrukte von A) Vps11 und B) Vps18. Zahlen bezeichnen die terminalen Aminosäurepositionen der im Folgenden näher besprochenen Konstrukte. Weitere Konstrukte sind im Anhang in Tabelle 6.1 aufgeführt. In grün,  $\beta$ -Propeller-Domäne; in blau,  $\alpha$ -Solenoid-Domäne; in orange, RING-Finger-Domäne.

Interessanterweise wird bis auf Vps33<sup>[92, 96]</sup> für alle HOPS- und CORVET-Untereinheiten eine als  $\beta$ -Propeller gefaltete N-terminale Domäne vorhergesagt.<sup>[97]</sup> Um deren Funktion im Komplex näher zu ergründen, wurden strukturelle und funktionelle Studien geplant, insbesondere Röntgenkristallographie, um die Ergebnisse der Strukturvorhersage zu überprüfen. Hierfür wurde eine Vielzahl von Konstrukten (Tabelle 6.1) erzeugt, die sowohl den als Propeller vorhergesagten Bereich, als teilweise zusätzliche Bereiche der anschließenden  $\alpha$ -Solenoid-Domäne enthalten. Hintergrund für letztere Konstrukte ist, dass bei einigen der strukturell aufgeklärten  $\beta$ -Propellern gezeigt werden konnte, dass sich das letzte Blatt aus einem N-terminalen und drei C-terminalen  $\beta$ -Faltblattsträngen zusammensetzt. Dieses wird in der Literatur als sogenannter Klettverschluss (*Velcro closure*) bezeichnet.<sup>[112]</sup> Somit war davon auszugehen, dass zu kurze Konstrukte aufgrund eines nicht vollständig gefalteten  $\beta$ -Propellers vermutlich nicht stabil exprimiert werden könnten.

Nach erfolgreicher Klonierung (Kapitel 2.2.1) sowie Verifizierung der Gensequenzen wurden die Einzelkonstrukte in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) transformiert und zunächst im kleinen Maßstab (Kapitel 2.2.2.1) auf Expression und Löslichkeit getestet. Eine Zusammenfassung der Konstrukte für den N-terminalen Bereich von Vps11 und Vps18 ist in Tabelle 4.1 aufgeführt, eine detailliertere Aufzählung ist im Anhang in Tabelle 6.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1: Übersicht der geklonten, löslichen und gereinigten Konstrukte, die die N-terminalen Domänen von Vps11 und Vps18 enthielten.**

Untereinheit	kloniert	löslich*	gereinigt
Vps11	12	5	4
Vps18	7	3	3

\*in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) rekombinant exprimiert.

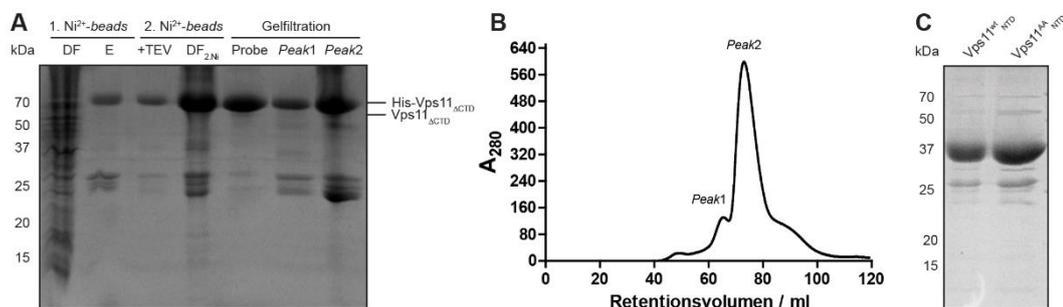
#### 4.1.2 Reinigung N-terminale Domäne von Untereinheit Vps11

Die löslichen exprimierten Einzelkonstrukte wurden im großen Maßstab produziert (Kapitel 2.2.2.2) und innerhalb von drei Tagen wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben gereinigt. Exemplarisch für die anderen Konstrukte wird der Verlauf der Reinigung von Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> (Reste 2-761) im Folgenden beschrieben und in Abb. 4.2A-B dargestellt.

Für die Proteinreinigung wurden die Zellen mittels Fluidizer aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation konnte Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> via Ni<sup>2+</sup>-IDA Affinitätschromatographie aus dem Lysat an einer Gravitationssäule angereichert werden. Nach Elution von der Säule wurden die Fraktionen mit Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> mit TEV-Protease (1:3) über Nacht inkubiert. In initialen Versuchen war jedoch die Präzipitation von Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> während der Dialyse optisch verfolgbar. Eine weitere Reinigung unter den verwendeten initialen Bedingungen war dementsprechend nicht zielführend.

Vor der Durchführung weiterer Reinigungsschritte war es also notwendig, die Proteinstabilität entweder durch andere Konstruktgrenzen oder aber durch andere Pufferbedingungen zu erhöhen. Für Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> war letztere Vorgehensweise erfolgreich: hydrophobe Bereiche auf den gekürzten Proteinen, welche entweder im Volllänge-Protein durch andere Bereiche oder aber im Komplex durch andere Untereinheiten maskiert werden, können die Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen stark reduzieren. Auch wenn der genaue Mechanismus nicht aufgedeckt werden konnte, so konnte praktisch gezeigt werden, dass die geladenen Aminosäuren Arg und Glu stabilisierend auf

solche Proteinkonstrukte wirken<sup>[141]</sup>. Von Golovanov et al.<sup>[141]</sup> wird vermutet, dass diese beiden Aminosäuren mit geladenen Bereichen des Proteins interagieren und gleichzeitig die aliphatisch hydrophoben Teile der beiden Seitenketten mit benachbarten, freiliegenden hydrophoben Bereichen der Proteinoberfläche interagieren. Diese werden somit maskiert, die Hydratation des Proteins verstärkt, und das Protein somit stabiler in wässrigen Lösungen. Zusätzlich wurde postuliert, dass durch die Zugabe von Arg und Glu unspezifische Degradation minimiert wird. Möglicherweise geschieht dies durch Maskierung von Erkennungssequenzen einzelner Proteasen oder aber durch generelle Störung der Interaktion mit Proteasen. Interaktion in „normalen“ Protein-Protein Wechselwirkungen sollen hingegen nicht durch die Zugabe von Arg und Glu gestört werden. Somit wäre die Zugabe von Arg und Glu ohne schädlichen Einfluss auf folgende funktionelle Experimente. Auch für Kristallisationsversuche wird Arg und Glu in den verwendeten Konzentrationen als unproblematisch eingeschätzt, da z.B. die Kristallisation der C-terminale Proteasedomäne des *Venezuelan Equine Encephalitis Virus* nsP2 mit dieser Pufferzusammensetzung gelang.<sup>[142]</sup>



**Abb. 4.2:** **Reinigung von Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub>.** **A)** 15%iges SDS-Polyacrylamidgel mit verschiedenen Proben, die während der Reinigung von Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> (90/87 kDa) genommen wurden. DF: Durchfluss der ersten Ni<sup>2+</sup>-Säule, E: Elution mit Puffer E<sub>1</sub>, +TEV: nach der Inkubation mit der TEV-Protease, DF<sub>2,Ni</sub>: Durchfluss der zweiten Ni<sup>2+</sup>-Säule (enthält geschnittenes Protein), Probe: konzentrierte Probe vor der Gelfiltration, *Peak1*: vereinigte Fraktionen des ersten Gelfiltrationspeaks, *Peak2*: vereinigte Fraktionen des zweiten Gelfiltrationspeaks. **B)** Chromatogramm Superdex<sup>TM</sup> 200 (16/60) für Vps11<sub>ΔCTD</sub>. **C)** SDS-PAGE der gereinigten Proteine Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (Reste 2-397) und ihrer Mutante Vps11<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (RQ7-8AA).

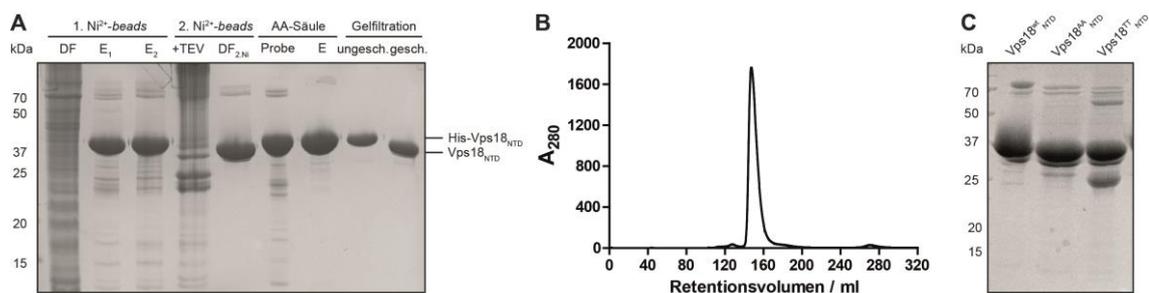
Somit wurden sowohl Dialyse- und Gelfiltrationspuffer je 50 mM Arg und Glu versetzt. Durch die Verwendung von Arg/Glu konnte verhindert werden, dass das Protein während der Dialyse präzipitierte. Weiterhin wurde auch keine Präzipitation in anschließenden Konzentrationsschritten beobachtet. Es konnte auch bestätigt werden, dass Glu/Arg zumindest für den gezielten Verdau mit TEV-Protease keinen negativen

Einfluss hat. So konnte nach dem Verdau mit der Protease durch eine zweite Affinitätschromatographie die verdauten von unverdauten Proteinen, der Protease und den geschnittenen Affinitätsankern abgetrennt werden. Mittels Gelfiltration konnten letzte Verunreinigungen und Aggregate entfernt und die Reinigung abgeschlossen werden.

Alle N-terminalen Einzelkonstrukte von Vps11 und deren Mutanten wurden nach diesem Schema gereinigt (Abb. 4.2C).

#### 4.1.3 Reinigung der N-terminale Domäne von Untereinheit Vps18

Die löslichen exprimierten Einzelkonstrukte wurden im großen Maßstab produziert (Kapitel 2.2.2.2) und innerhalb von drei Tagen wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben gereinigt. Der Verlauf der Reinigung von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (Reste 2-349) in Abb. 4.3A-B dargestellt sowie im Folgenden beschrieben.



**Abb. 4.3:** **Reinigung von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>.** **A)** 15%iges SDS-Polyacrylamidgel mit verschiedenen Proben, die während der Reinigung von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (43/40 kDa) genommen wurden. DF: Durchfluss der ersten Ni<sup>2+</sup>-Säule, E<sub>1</sub>: Elution mit Puffer E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>: Elution mit Puffer E<sub>2</sub> +TEV: nach der Inkubation mit der TEV-Protease, DF<sub>2,Ni</sub>: Durchfluss der zweiten Ni<sup>2+</sup>-Säule (enthält geschnittenes Protein), Probe: konzentrierte Probe vor der Anionenaustauschersäule (AA-Säule), E: vereinigte Fraktionen der AA-Säule (enthält ungeschnittenes Protein) ungesch.: vereinigte Fraktionen des Gelfiltrationspeaks von His-Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>, gesch.: vereinigte Fraktionen des Gelfiltrationspeaks von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>. **B)** Chromatogramm Superdex<sup>TM</sup> 200 (16/60) für Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>. **C)** SDS-PAGE der gereinigten Proteine Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> und der Mutanten Vps18<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (KK97/99AA) und Vps18<sup>TT</sup><sub>NTD</sub> (KK97/99TT).

Für die Reinigung wurden die Zellen mittels Fluidizer aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation konnte Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> via Ni<sup>2+</sup>-IDA Affinitätschromatographie aus dem Lysat an einer Gravitationssäule angereichert werden. Nur für dieses Konstrukt wurde noch ein zusätzlicher Anionenaustauscherschritt durchgeführt. Nach der Elution von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> von der Ni<sup>2+</sup>-IDA-Affinitätssäule wurden zwei Drittel der Fraktionen mit des eluierten Proteins mit TEV-Protease (1:10) über Nacht inkubiert.

Im Gegensatz zu den Vps11-Konstrukten war Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> unter den verwendeten Pufferbedingungen sehr gut löslich und präzipitierte nicht während der Dialyse. Eine Zugabe von Detergenzien oder Aminosäuren zur Stabilisierung war somit nicht notwendig. Nach dem Verdau mit der Protease konnte durch eine zweite Affinitätschromatographie die verdauten von unverdauten Proteinen, der Protease und den geschnittenen Affinitätsankern abgetrennt werden. Mittels Gelfiltration konnten letzte Verunreinigungen und Aggregate entfernt und die Reinigung damit abgeschlossen werden.

Das restliche, unverdaute Drittel wurde gegen Niedrigsalzpuffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8,0) dialysiert zur Vorbereitung auf eine Anionenaustauschersäule (AA-Säule). Anschließend konnte das ungeschnittene Protein von Verunreinigungen getrennt werden. Analog zum verdauten Protein konnten mittels Gelfiltration letzte Verunreinigungen und Aggregate entfernt und die Reinigung damit abgeschlossen werden.

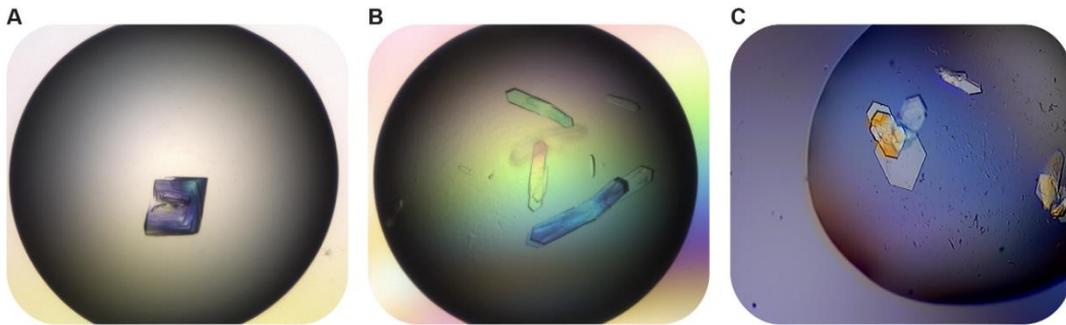
Das Reinigungsprotokoll von SeMet-Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> entsprach dem des nativen Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>. Ein Anionenaustauscherschritt war bei dieser Reinigung nicht notwendig. Die Mutanten von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> wurden unter Zugabe von Arg/Glu analog zu Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> gereinigt, da die Mutationen Einfluss auf die Stabilität der Proteine hatten.

#### 4.1.4 Strukturbestimmung

##### 4.1.4.1 Kristallisationsversuche der N-terminalen Domänen

Die gereinigten N-terminalen Konstrukte von Vps11 und Vps18 wurden für Kristallisationsexperimente eingesetzt. Zur Ermittlung der geeigneten Kristallisationsbedingungen wurden wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben initiale *Screens* bei 20 °C im 96er Format, jedoch mit einer Tropfengröße von 300 + 300 nl, durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug für Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> 11 mg/ml und für Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> 4,1 mg/ml. Zusätzlich wurden für Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> Kristallisationsversuche bei 4°C angesetzt. Für beide Konstrukte wurden die Kristallisations-*Screens The Classics Suite, The Classics II Suite, The pHClear Suite, The pHClear II Suite* und *The JCSG+ Suite* verwendet. Zusätzlich wurde für Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> der *The PACT Suite*-Screen verwendet.

In den Kristallisationsversuchen der Vps11-Konstrukte konnten weder Kristalle noch Kristallisationskeime beobachtet werden.



**Abb. 4.4:** Kristallisationsversuche mit Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> und SeMet-Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>. **A-B)** Initiale Bedingung: A) verwachsener Kristall nach 11-30 Tagen bei 20 °C in 1,4 M Na/K-Phosphat pH 7,5. B) verwachsener Kristall nach 5 Tagen bei 20 °C in 200 mM Ammoniumsulfat, 25% (w/v) PEG 3350, 100 mM BIS-Tris pH 6,5. **C)** SeMet-derivatisierter Kristall bei 20 °C in 200 mM Ammoniumsulfat, 23%(w/v) PEG 3350, 100 mM BIS-Tris pH 5,9.

Im Gegensatz dazu konnte mehrere Bedingungen ermittelt werden, unter denen die N-terminale Domäne der Untereinheit Vps18 kristallisiert (Abb. 4.4A-B). In 200 mM Ammoniumsulfat, 25% (w/v) PEG 3350, 100 mM BIS-Tris pH 6,5 gewachsene Kristalle waren von ausreichender Qualität für direkte Diffraktionsexperimente (Kapitel 4.1.4.2). SeMet-derivatisierte Kristalle konnten unter dieser Bedingung jedoch nicht direkt erhalten werden. Nach Optimierung der PEG-Konzentration sowie des pH-Wertes konnten fächerförmige Kristalle gesammelt werden (Abb. 4.4C).

#### 4.1.4.2 Datensammlung, Strukturbestimmung und -verfeinerung

Diffraktionsdaten wurden an den Messplätzen 14.1 und 14.2 des Helmholtz-Zentrums Berlin für Materialien und Energie und der Freien Universität Berlin<sup>[129]</sup> an der Röntgenquelle BESSY II gesammelt. Zunächst wurde ein Datensatz eines nativen Kristalls bis zu einer Auflösung von 2,1 Å aufgenommen und mit dem Programm XDS<sup>[131]</sup> in der Raumgruppe P2<sub>1</sub> prozessiert.

Ausgehend von der Proteinsequenz von Vps18<sub>NTD</sub> wurde versucht, die Sekundärstruktur mit dem Webserver Phyre<sup>[143]</sup> vorherzusagen. Aufgrund fehlender Sequenzhomologien konnte keine zuverlässige Struktur ermittelt werden. Als Alternative zur somit nicht möglichen Phasenbestimmung mittels Molekularem Ersatz, wurde deshalb eine Phasenbestimmung mittels der MAD-Methode versucht.

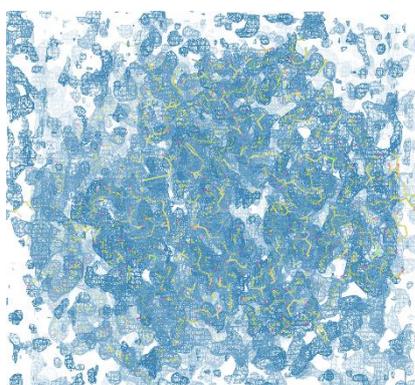
Dafür wurden hochreduzante Datensätze von einem SeMet-derivatisierten Proteinkristall aufgenommen. Dieser Kristall zeigte ein geringfügig schlechteres Streuvermögen als der native. Die maximale Auflösung für den SeMet-Kristall lag bei 2,4 Å. Zunächst wurde mit einem Röntgenfluoreszenzspektrum die genaue Lage der Selen-K-

Absorptionskante festgelegt und die anomalen Streufaktorsterme  $f'$  und  $f''$  mit dem Programm CHOOCH<sup>[144]</sup> ermittelt. Danach konnten Datensätze bei den jeweiligen Wellenlängen, die dem Maximum von  $f''$  (*Peak*) bzw. dem Minimum von  $f'$  (*Inflection Point, IP*) entsprechen, gesammelt werden (Tabelle 4.2). Diese Datensätze wurden mit dem Programm XDS in der Raumgruppe  $P2_12_1$  prozessiert.

**Tabelle 4.2: Anomale Streufaktorsterme bei *Peak*- und *IP*- Wellenlängen.**

	E [eV]	$\lambda$ [Å]	$f'$	$f''$
<i>Peak</i>	12654,5	0,97977	-8,67	8,15
<i>IP</i>	12652,0	0,97997	-11,84	4,11

Anhand des Matthews-Koeffizienten<sup>[145]</sup> kann auf die Anwesenheit von zwei Kopien von Vps18<sub>NTD</sub> in der asymmetrischen Einheit des Kristalls geschlossen werden. Der Lösungsmittelgehalt beträgt damit 52%, entsprechend einem Matthews-Parameter von  $2,6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ . Hiernach wurde mit dem Programm SHELXC/D/E<sup>[133]</sup> anhand der anomalen Differenzen nach den Positionen der Selenatome innerhalb der asymmetrischen Einheit gesucht. Es wurden 12 der erwarteten 14 Selenatome gefunden. Dadurch konnten initiale Phasen bestimmt und eine interpretierbare Elektronendichte erhalten werden.



**Abb. 4.5: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte des Vps18<sub>NTD</sub>.** Die  $2m|F_o|-D|F_c$ -Elektronendichte wurde bei  $1\sigma$  konturiert und zeigt den  $\beta$ -Propeller in der Vorderansicht.

Als nächstes wurde ein partielles Modell mit dem Programm ARP/wARP<sup>[134]</sup> erzeugt (Abb. 4.5) und anschließend manuell in dem Programm COOT<sup>[146]</sup> komplettiert (Abb. 4.5). Die weitere Verfeinerung erfolgte dann in sich wiederholenden Zyklen aus manuellem Modellbau mit dem Programm COOT und Verfeinerung gegen den gesamten Datensatz in dem Programm REFMAC5<sup>[135]</sup>. Mit Hilfe des TLMSD Webservers<sup>[137]</sup>

wurde das Modell in vier TLS-Gruppen eingeteilt. Die finale Verfeinerung ergab einen  $R_{work}$ -Wert von 20,1% und  $R_{free}$ -Wert von 24,4% bei einer Auflösung von 2,14 Å. Die Bewertung der Qualität des Modells erfolgt mithilfe des Webservers Molprobity<sup>[138]</sup>. Das erzeugte Modell enthielt 318 von 350 Resten des kristallisierten Konstrukts. Es wurde unter Identifikationsnummer 4uuy in der Proteindatenbank PDBe hinterlegt. Einen vollständigen Überblick über Datensammlung und Verfeinerungsstatistik gibt Tabelle 4.3 wieder.

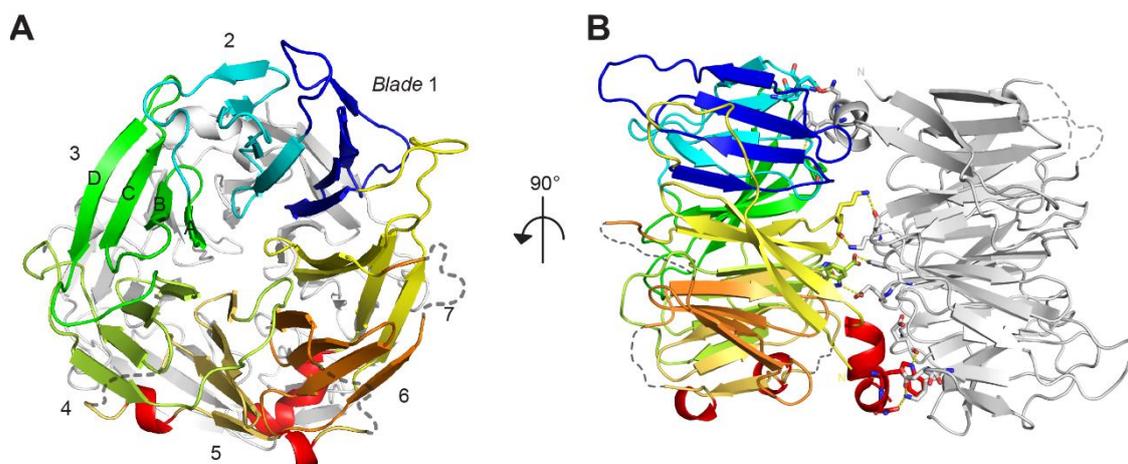
**Tabelle 4.3: Datensammlung von Vps18<sub>2-349</sub> und Vps18<sub>2-349</sub>SeMet**

Derivate	Native	SeMet Peak	SeMet Wendepunkt
<b>Datensammlung und Prozessierung:</b>	BL14.1	BL14.2	BL14.2
<b>Wellenlänge [Å]</b>	0,91300	0,97977	0,97997
<b>Auflösung<sup>a</sup> [Å]</b>	63,11-2,14 (2,26-2,14)	46,45-2,39 (2,45-2,39)	
<b>Raumgruppe</b>	P2 <sub>1</sub>		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Zellparameter</b>			
<b>a, b, c [Å]</b>	56,25; 77,53; 84,51		77,01; 86,49; 110,13
<b>α, β, γ [°]</b>	90,00; 98,91; 90,00		90,00; 90,00; 90,00
<b><math>R_{meas}</math><sup>a</sup> [%]</b>	11,3 (60,9)	7,9 (32,5)	9,2 (43,1)
<b>&lt;I / σ(I)&gt;<sup>a</sup></b>	11,3 (2,6)	13,6 (3,9)	12,4 (3,2)
<b>Vollständigkeit [%]<sup>a</sup></b>	99,8 (93,8)	99,2 (90,2)	99,5 (94,5)
<b>Anomale Redundanz</b>		3,0	1,8
<b>Anzahl an schweren Atomen</b>		14	14
<b>Verfeinerung:</b>			
<b><math>R_{work}</math> [%]</b>	20,1		
<b><math>R_{free}</math> [%]</b>	24,4		
<b>Reste / Wasser / Ionen / Liganden</b>	635 / 207 / 6 / 5		
<b>Alle Atome</b>	5530		
<b>&lt;ADP&gt; [Å<sup>2</sup>]</b>	33		
<b>Mittlere Abweichung</b>			
<b>Bindungslängen [Å]</b>	0,009		
<b>Bindungswinkel [°]</b>	1,344		
<b>Ramachandran Ausreißer [No., %]</b>	0 (0%)		
<b>Molprobity Wertung (Perzentile)</b>	1,7 (94 <sup>th</sup> )		

<sup>a</sup>Äußere Auflösungsschale in Klammern.

#### 4.1.4.3 Struktur der N-terminalen Domäne von Vps18

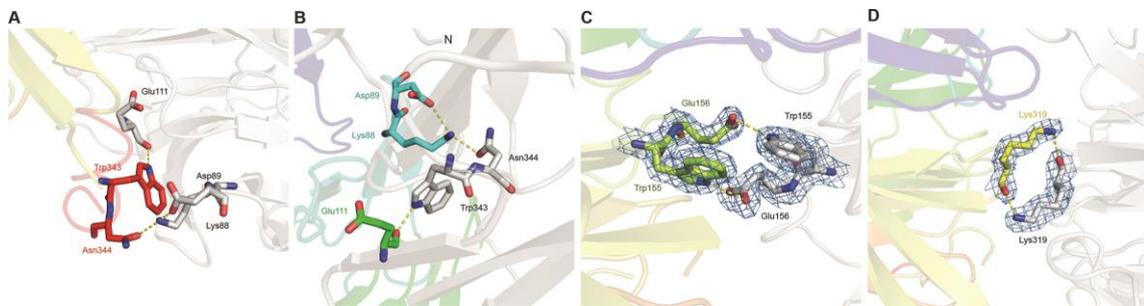
Die asymmetrische Einheit enthält zwei hochgradig ähnliche Moleküle Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> mit einer Quadratwurzel der mittleren quadrierten Abweichung (*root-mean-square deviation*; RMSD) von 0,105 Å zwischen äquivalenten  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen. Beide Moleküle lassen sich durch Rotation um eine nicht-kristallographische Achse, die zwischen beiden Molekülen verläuft, ineinander überführen. Die Rückseite des einen  $\beta$ -Propellers zeigt somit auf die Rückseite des anderen. Pro Molekül sind dabei 8% (1230 Å<sup>2</sup>) der Gesamtoberfläche Teil der Interaktionsfläche. Dieser Wert deutet nach dem PISA Webserver<sup>[147]</sup> auf ein artifizielles, nur durch den Kristall stabilisiertes Dimer hin.



**Abb. 4.6:** Kristallstruktur des siebenblättrigen  $\beta$ -Propellers von Vps18 (Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>). Cartoon-Darstellung **A**) der Vorderansicht sowie **B**) der Seitenansicht des kristallographischen Dimers. Jedes *Blade* der Kette B ist in einer individuellen Farbe eingefärbt. Die Kette A ist in grau dargestellt. Die Aminosäureseitenketten, die an der Interaktion der beiden Proteinketten beteiligt sind, sind als Stabmodell hervorgehoben. Der wahrscheinliche Verlauf der Polypeptidkette in Regionen fehlender Elektronendichte wurde durch gestrichelte Linien dargestellt.

Jedes der beiden Moleküle im Modell bildet einen siebenblättrigen  $\beta$ -Propeller mit einem Innendurchmesser von 17 Å und einem Außendurchmesser von 50 Å. Die Strukturvorhersage konnte somit bestätigt werden<sup>[97]</sup>. Zusätzlich wird aus dem Modell ersichtlich, dass es sich um einen Reißverschluss- (*velcro closure*-)  $\beta$ -Propeller handelt, bei welchem das siebte Blatt durch den ersten, N-terminalen Faltblattstrang (Reste 3-9) sowie die letzten drei, C-terminalen Faltblattstränge (Reste 310-336) gebildet wird. Wie auch die restlichen 6 Blätter sind je vier Faltblattstränge antiparallel angeordnet. Bis auf eine längere Schleife zwischen den Strängen C und D des Blattes 5 (Reste 220-236) sind alle Stränge durch kurze Linker verbunden. Diese längere Schleifenstruktur, sowie auch die restlichen langen Schleifen (zwischen Blatt 5 und 6, Reste 249-259, sowie zwischen

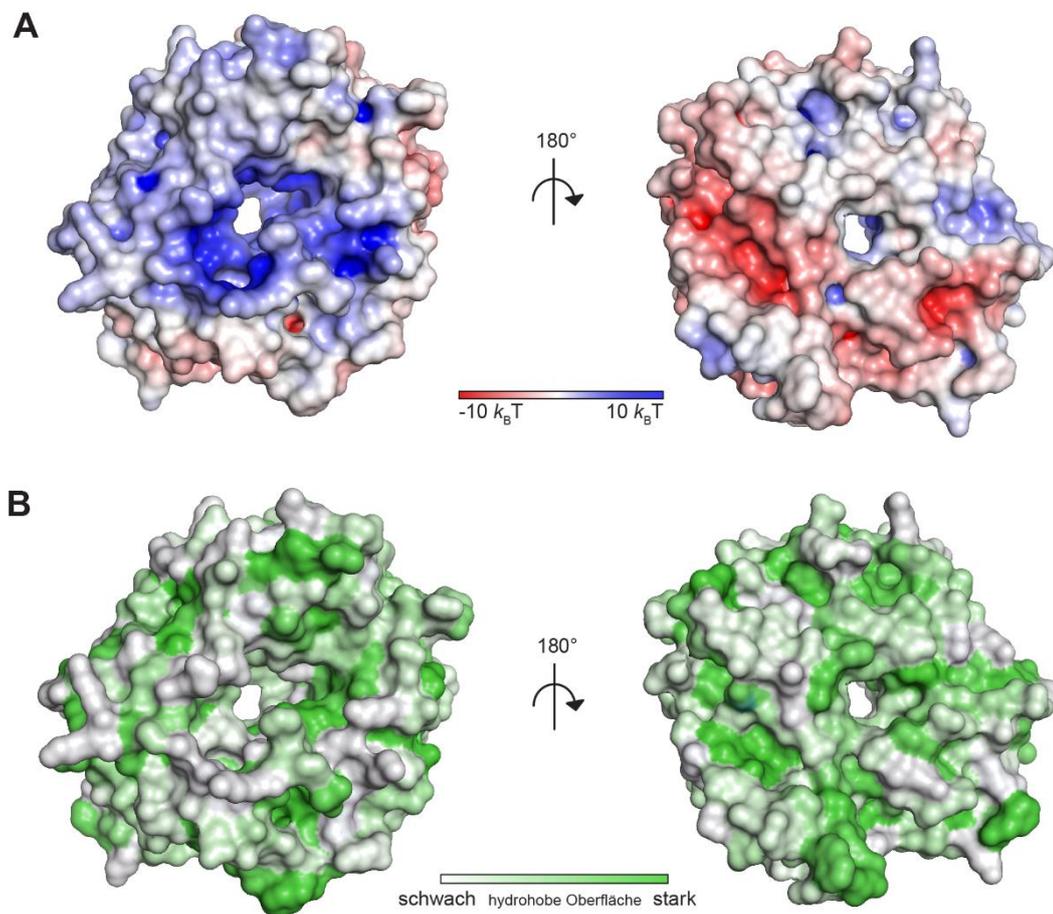
Blatt 6 und 7, Reste 294-309), sind in der Kristallstruktur ungeordnet und konnte somit nicht modelliert werden.



**Abb. 4.7:** **Interaktion zwischen Untereinheiten des kristallographischen Dimers.** **A-B)** Hervorgehobene Wasserstoffbrückenbindungen der stabilisierend wirkenden Helix. **C-D)** Wasserstoffbrücken durch nicht-kristallographische Symmetrie der Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Kette B der asymmetrischen Einheit ist farbig, Kette A ist vollständig grau dargestellt. Mit einem blauen Gitternetz ist die  $2m|F_o|-D$  Elektronendichte, bei  $1\sigma$  konturiert, dargestellt.

Das Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> Konstrukt wird an seinem C-Terminus durch eine  $\alpha$ -Helix abgeschlossen (Reste 338-348; rot dargestellt in Abb. 4.6). Diese deutet den Übergang zur benachbarten  $\alpha$ -Solenoid-Domäne an. Interessanterweise waren Konstrukte ohne diese Helix, zum Beispiel Vps18<sup>wt</sup><sub>2-338</sub>, stark instabil und konnten nicht in nennenswerten Mengen gereinigt werden. Diese Observation kann nun durch die vorliegende Kristallstruktur erklärt werden. Die Helix liegt auf Blatt 7 und stabilisiert den Propeller durch Interaktionen von E338 mit T266 sowie N337 mit dem Rückgrat eines Serins, das nach Proteolyse der TEV-Schnittstelle am Konstrukt verblieben ist. Darüber hinaus scheint die C-terminale Helix entscheidend für den Kristallisationsdimer, und somit vermutlich auch für die Kristallisation des Konstruktes an sich zu sein. Diese Helix nimmt an zwei der insgesamt vier intermolekularen Wechselwirkungen teil (Abb. 4.7). Hierbei ist sie zwischen Blatt 2 und Blatt 3 des gegenüberliegenden, um  $180^\circ$  rotierten, Moleküls eingelagert. Beide Interaktionsstellen sind somit symmetrisch. Jeweils interagiert der Stickstoff des Indols von W343 mit dem Rückgrat von E111 über dessen Carbonylsauerstoff. Zusätzlich interagiert die Amidgruppe von N343 über Wasserstoffbrückenbindungen mit K88 sowie D89 (Abb. 4.7A,B). Auch die verbleibenden zwei intermolekularen Wechselwirkungen sind symmetrische Wasserstoffbrücken. Zum einen interagiert der Stickstoff des Indols von W155 mit der Carboxylat-Gruppe von E156 (Abb. 4.7C). Zum anderen interagiert die Aminogruppe von K319 mit dem Rückgrat,

genauer dem Carbonylsauerstoff, von K319 des gegenüberliegenden Moleküls (Abb. 4.7D).



**Abb. 4.8:** Oberflächendarstellung des  $\beta$ -Propellers. **A)** Elektrostatisches Potenzial, links die Vorderseite und rechts die Rückseite des Monomers. **B)** Hydrophobizität des Monomers in derselben Orientierung.

Global weist die Kontaktfläche zwischen den beiden Molekülen sowohl positiv als auch negativ geladene Bereiche auf, welche sich durch die Rotation um  $180^\circ$  annähernd überlagern (Abb. 4.8A). Die Rückseiten der Moleküle, welche die Kontaktfläche ausbilden, weisen aber auch signifikante hydrophobe Bereiche auf, die auch durch die Rotation annähernd überlagern (Abb. 4.8B). Die Vorderseite des Moleküls ist hingegen von positiven Ladungen dominiert, insbesondere die schmaler werdende Öffnung des trichterförmigen Kanals des  $\beta$ -Propellers.

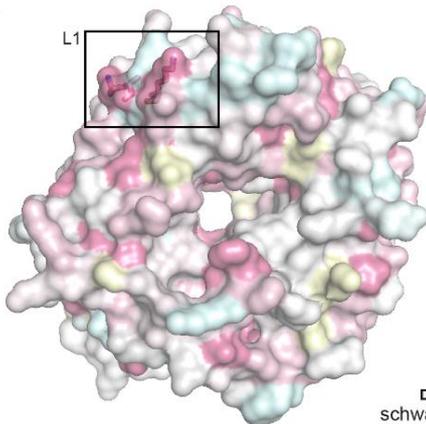
### 4.1.5 Interaktion der N-terminalen Domänen von Vps18 und Vps11

Auch wenn die im Kristall gefundene dimere Anordnung der Proteinketten vom PISA Webserver als nicht stabil in Lösung eingestuft wird, so ist dennoch auffällig, dass bis auf Vps33 alle Untereinheiten von HOPS und CORVET einen N-terminalen  $\beta$ -Propeller aufweisen.

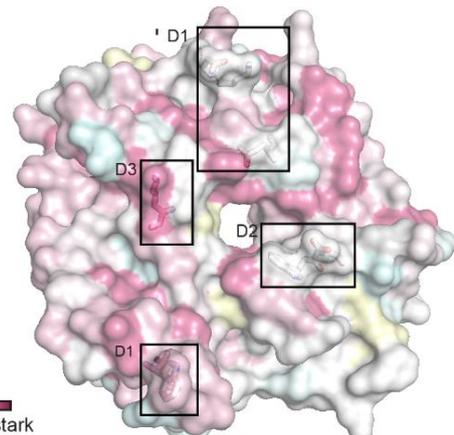
#### A

Vps18_YEAST/1-361	1	-----PNSSEDSDDIQEDAELEYTADNP-----EKEQRGVSELEKVOLOFPVSV-----IRCLAVENNILVMALT-----SDKLMIYDLRPERDIDIELPKKVLALG-LTVKIFLDPSSQHY	74
Vps18_SCHOP/1-397	1	-----MSLAEADWDID-----PNSSEDSDDIQEDAELEYTADNP-----EKEQRGVSELEKVOLOFPVSV-----IRCLAVENNILVMALT-----SDKLMIYDLRPERDIDIELPKKVLALG-LTVKIFLDPSSQHY	108
Vps18_DROME/1-446	1	MDSMPNOKPFL-----PRIEHNSSGATANSYVATASGNPFDEDEIEFSRHMVLEVPVSNCTGDMLHVASRNLVCLLGPTEITLRFPPRAPPGEAVLEKYLSSGSKYITRFMLDPTQHH	122
Vps18_DANRE/1-417	1	MASILDQYEDSQNIHQHSRMSSTANIGITASGFVY-----VRLFEKPIFTKQIDSPPEK-----INQFSKNOLCMLSG-----KDTLLRIDGKPDQPNQJELG-----RKDQKWHRLFDPTESH	111
Vps18_HUMAN/1-417	1	MASILDQYEDSNLSRAVLQGPCPSVGIHSGYVY-----AQLKEKVPFTKQIDFTPSER-----ITSLVSSNOLCMLSG-----KDTLLRIDGKANEPNHVELG-----BKDDAKVHKMFLDHTESH	111
Vps18_MOUSE/1-417	1	MASILDQYEDSLRSRAVLQGTGCPVSGIHPHSGYVS-----AHLEKEVPIFTKQVDFTPSER-----ITSLVSSNOLCMLSG-----KDTLLRIDGKASEPNRVELG-----BKDDAKVHKMFLDHTESH	111
Vps18_YEAST/1-361	75	LLTITNFR-----YMLL-----KDGFTTNRINLQDLSLHWINET-----TFEMIKKTKLYRVELGKIDIT-----TKLWYEN-----KKESGGIDGIAWEGS	158
Vps18_SCHOP/1-397	109	IFVITTAGD-----NCLFTPSH-----DGRVITLNGHTVEAVONLNGNLI-----ELLASKS-GVLLLEVLQDSANLKR-----EKSINTLYSFPFESP-----MGLKLNQDSDM-----	205
Vps18_DROME/1-446	123	IIIALVPSATAGVSPDFLYIHCLESQAQKLVRRIEKFDHEITAVAPNPHYHNSSTGPIILGTSR-GLIFETEINPAADGHVQR-----KQDLVGLGRPKYPIITGLKLRVPSNRSRI-----	239
Vps18_DANRE/1-417	112	LVVCLTME-----CVYL-----NNTQKVRGLSRWGHLESIGWNLIGSETNTGPIIVGTSQ-GIIFEAIEASEGLSNTNPQYFRVWYHLEEDGKPAFVCLLEVERGLTKYFI-----	220
Vps18_HUMAN/1-417	112	LLALSSTE-----VLYV-----NNGQVRFPLAWKQGLVESVGNKALGTSSTGPIIVGTAQ-GHIFEAIEASEGELFGAPDLYFRPLVNEEGGPAFVCSLEAERPGDGRSIV-----	220
Vps18_MOUSE/1-417	112	LLVALSSTE-----VLYM-----NNGQKARPLAWKQGLVESVGNKAMGNSSTGPIIVGTAQ-GQIFEAIEASEGELFGAPDLYFRPLVNEEGGPAFVCSLEAERPGDGRSIV-----	220
Vps18_YEAST/1-361	159	LLLTIKDNLVWRDVT-----NMKFP-----LVLDPDESQFERLKH-----HAIKFDSYNGLFAWVTSNGIVFGDLEKQMEKDPASNNGFKLSSSKVLNLFELPD-----YQNDKHLIKD	262
Vps18_SCHOP/1-397	206	TVYMKRILPEPATSRSKQQLYSPAFQSSMKELISFSEETACQSPSSD-----PKMLAEPTLAKKSKRIIF-----LDIMNRYN-----PD-----IQDQFESPELSVP-----TVEMN	307
Vps18_DROME/1-446	240	IVVSPCEIYTFQEL-----KAEERLQAFAGYVSGVQHPCEIRKTDLTLSQLRFFAPNPKYKQAWALCCEGRVGELEISANSA-----TLIGNT-----LNLDFKTMHLSYGERLNTPKA	355
Vps18_DANRE/1-417	221	I-ATTRKRLFOFVGLKLAEGSEQGSSIFAQND-----LLPSFOFPYVMGYSEITFTYTSKLSRKRKTFAWMMNGVLYGQDYVRPDS-----LLSDV--Q-VWEYTDQI-----DLNFKVPI	327
Vps18_HUMAN/1-417	221	I-ATTRORLFOFVGRAAEAGEAQQSGLFAAYT-----HPPPFREFPNSNLGSELAFTYPKLRSAPRAFAMMMGGVLYGALDCGRPDS-----LLSEE--R-VWEYPEGV-----GPGASPLA	327
Vps18_MOUSE/1-417	221	I-ATTRORLFOFVGRAAEAGEAQQSGLFAAYT-----HPPPFREFPNSNLGSELAFTYPKLRSAPRAFAMMMGGVLYGALDCGRPDS-----LLSEE--R-VWEYFAGV-----GPGANPLA	327
Vps18_YEAST/1-361	263	IVLQFHLFLLLRKNTVTMSQLNDVVFHETIPRHQLTGSNTDSNEKFLGLVRSVKETWCFCSNINVFEEIIEENPNSVWNLVDRDKTFDKLSLKLGL	361
Vps18_SCHOP/1-397	308	MILSFLHAFALDIDLYIYNRWKESYQQRVNL-----PHEELICCEHEKNTVYTTDSLHELWVNNETRESLVFLEKGFKALECAN-----	397
Vps18_DROME/1-446	356	FVLEKTRAVELVADHVAICLLDQVYQAFDEA-----RVKPLSERBELTGSIIYFYKTVFNRVTRERVWRIYLDKGOELATAHAKAE	446
Vps18_DANRE/1-417	328	IVLQFHLFLLLRDVRGICTLQGVVHEDVFE-----KFGTLQMKIKPIITGLWVWYTEKAVERYHQKARDVWQWYMNMKFDLAKEYCKD	417
Vps18_HUMAN/1-417	328	IVLQFHLFLLLRDVEAVCTLTGVVLRDHFLE-----KFGPLKHMVKSSDGLQWYTERAVFRYHVQKARDVWRTYLDMNRFDLAKEYCRE	417
Vps18_MOUSE/1-417	328	IVLQFHLFLLLRDVEAVCTLTGVVLRDHFLE-----KFGPLRHMVKSSDGLQWYTERAVFRYHVQKARDVWRTYLDMNRFDLAKEYCRE	417

#### B



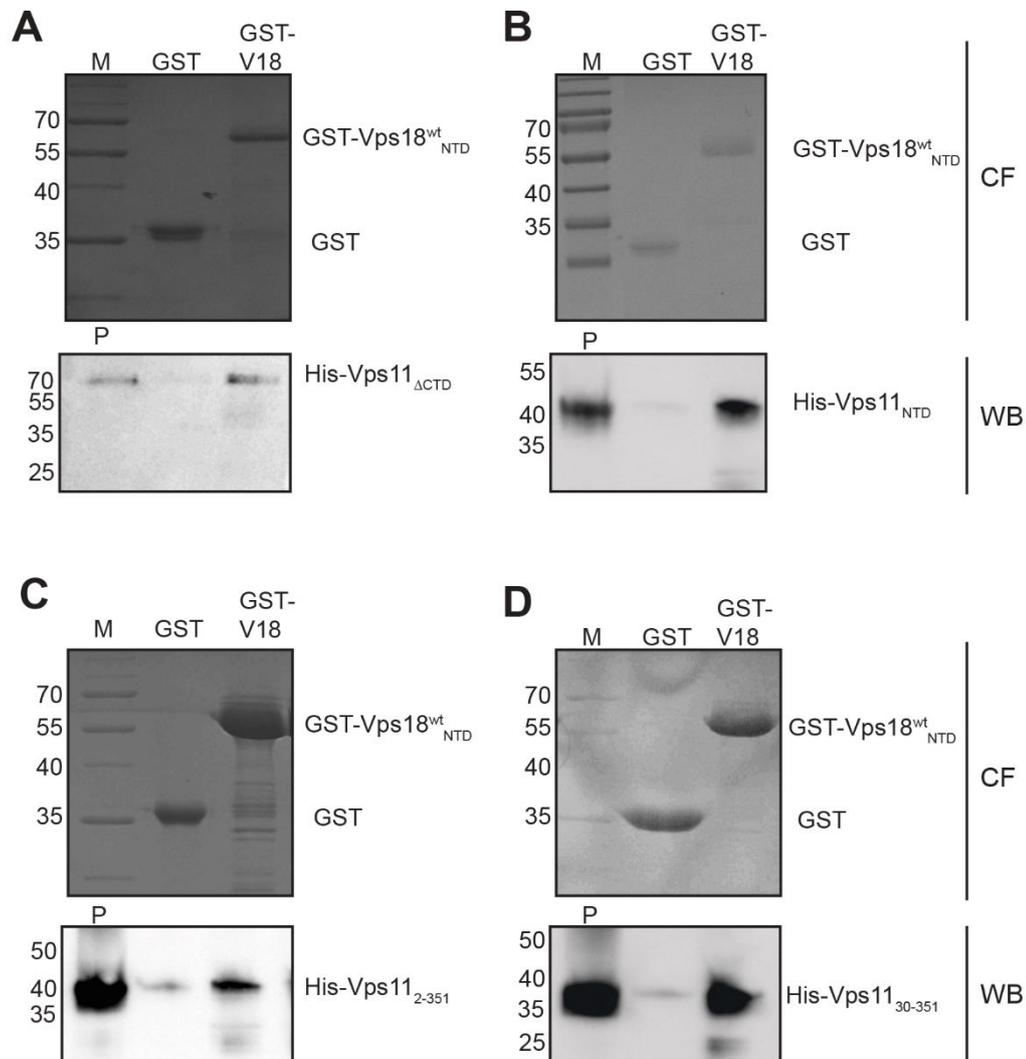
#### C



**Abb. 4.9: Konservierung des  $\beta$ -Propellers von Vps18.** A) Sequenzvergleich der N-terminalen Domäne von Vps18 in Eukaryoten. Aminosäurereste wurden nach dem ClustalX-Schema eingefärbt, d.h. konservierte Reste nach ihren chemischen Eigenschaften: hydrophobe in blau, basische in rot, ungeladene polare in grün, saure in magenta, hydrophile aromatische in cyan, Cys in rosa, Gly in orange und Pro in gelb. B-C) Oberflächendarstellung der Sequenzkonservierung. B) Vorderseite eines Monomers, hervorgehoben wurden die Reste der Lipidbindung (L1, beschrieben in Kapitel 4.1.6.3). C) Rückseite eines Monomers, hervorgehoben wurden die Reste der Dimerinteraktion, Details wurden in Abb. 4.7 gezeigt, wobei Abb. 4.7A,B D1 und D1' entspricht sowie C der Box D2 und D der Box D3. Für eine vergrößerte Darstellung von Abb. 4.9A siehe Anhang Abb. 6.2.

Diese Domäne ist aus der Literatur dafür bekannt, häufig Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln („*Scaffold-Funktion*“)<sup>[112]</sup> und könnte somit einen Beitrag zur Ausbildung der *Tethering*-Komplexe leisten. Funktionell wichtige Aminosäuren sind häufig zwischen Spezies konserviert. Somit kann eine Konservierungsanalyse Hinweise

auf die funktionelle Relevanz der Dimerstruktur geben. Insgesamt sind sechs Aminosäuren an den vier Interaktionsbereichen direkt beteiligt. Von diesen werden K319 und W343 durch den ConSurf Webserver<sup>[148]</sup> als hoch konserviert eingestuft. Dieses liefert natürlich nur Hinweise, welche experimentell überprüft werden müssen.

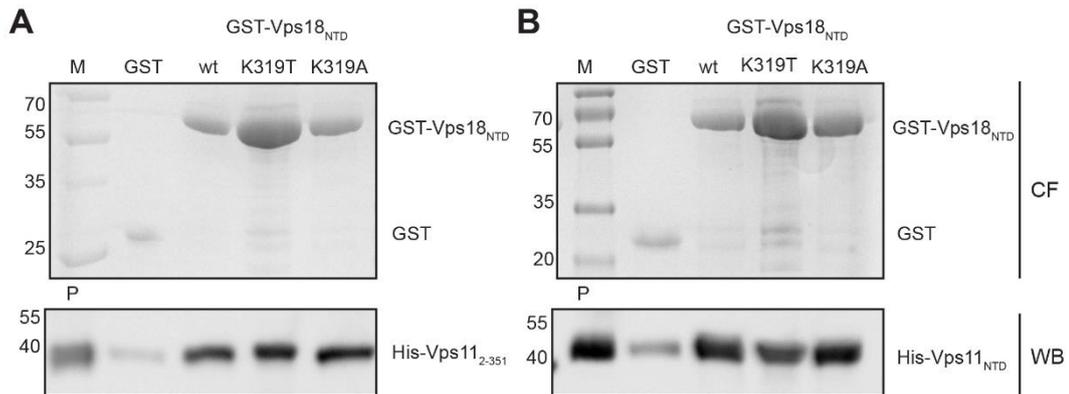


**Abb. 4.10:** *Pull-down* Experimente mit Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> gegen verschiedene Vps11-Konstrukte. Inkubation mit **A**) Vps11<sub>ΔCTD</sub> (Reste 2-761), **B**) Vps11<sub>NTD</sub> (Reste 2-397), **C**) Vps11<sub>2-351</sub> und **D**) Vps11<sub>30-351</sub>. Analyse erfolgte mittels SDS-Gel in Coomassie-Färbung (CF) sowie Western-Blot (WB) gegen den Histidin-Anker der Vps11-Konstrukte.

Der wahrscheinlichste Interaktionspartner von Vps18 ist aufgrund der elektronenmikroskopischen Struktur des Gesamtkomplexes Vps11 oder Vps16.<sup>[99]</sup> Aufgrund von *Pull-down* Experimenten (Abb. 4.12) konnte Vps16 als Interaktionspartner des Vps18-Propellers ausgeschlossen werden. Daher wurde im Folgenden die Interaktion

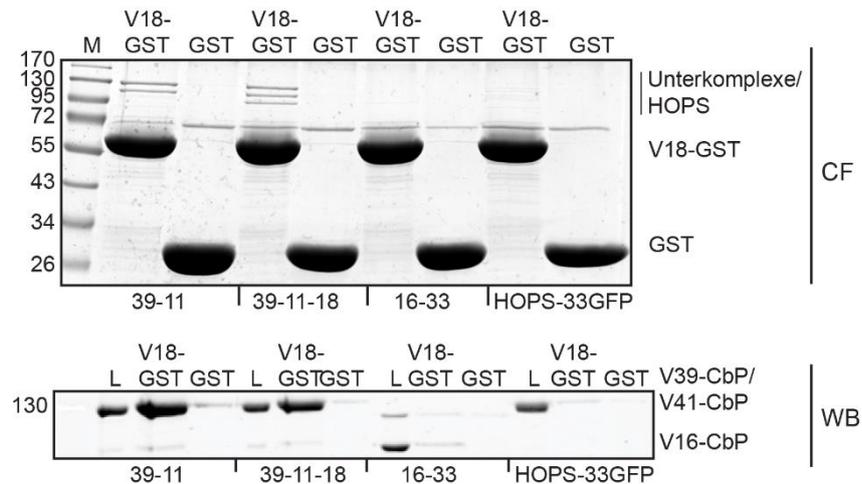
durch *Pulldown* Experimente (Kapitel 2.2.2.7) gegen Vps11-Konstrukte verschiedener Längen getestet (Abb. 4.10).

Es konnte eine eindeutige Interaktion zwischen dem  $\beta$ -Propeller von Vps18 und Vps11 festgestellt werden. Dabei war die Interaktion am stärksten für das Konstrukt von Vps11, welches nur noch den N-terminalen  $\beta$ -Propeller enthielt. Eine Mutation von K319 zu T oder A schwächte diese Interaktion geringfügig (Abb. 4.11, Abb. 6.1).



**Abb. 4.11:** *Pulldown* Experimente mit Vps18<sub>NTD</sub> gegen verschiedene Vps11-Konstrukte. Inkubation des  $\beta$ -Propellers von Vps18 und seiner Mutanten K319T und K319A mit **A**) Vps11<sub>2-351</sub> und **B**) Vps11<sub>NTD</sub> (Reste 2-397). Analyse erfolgte mittels SDS-Gel in Coomassie-Färbung (CF) sowie Western-Blot (WB) gegen den Histidin-Anker der Vps11-Konstrukte.

Interessanterweise wurde die Interaktion auch schwächer für Konstrukte, welche größere Teile der anschließenden  $\alpha$ -Solenoid-Domäne enthielten (Abb. 4.10A). Dieses kann auf zwei unterschiedliche Arten interpretiert werden. Zum einen kann dieses Ergebnis darauf hindeuten, dass die beobachtete Interaktion ein Artefakt, bedingt durch die verkürzten Konstrukte ist. Zum anderen könnte der  $\alpha$ -Solenoid-Bereich aber im Volllänge-Protein an anderen Interaktionen beteiligt sein, womit der inhibierende Einfluss im *in vitro*-Experiment als Artefakt zu betrachten wäre. Um zu klären, ob es sich bei der Interaktion um ein Artefakt handelt, wurden vom Labor Ungermann (Universität Osnabrück) *Pulldown* Experimente in Hefe mit dem N-terminalen  $\beta$ -Propeller von Vps18 entweder gegen den Gesamtkomplex oder gegen verschiedene Volllänge-Unterkomplexe durchgeführt (Abb. 4.12). Auch hierbei konnte eine Interaktion zwischen dem  $\beta$ -Propeller von Vps18 mit Unterkomplexen, welche Vps11 enthalten, beobachtet werden. Der HOPS-Gesamtkomplex ist jedoch so stabil, dass es zu keinem Austausch des Vps18  $\beta$ -Propellers gegen Volllänge-Vps18 kommt.



**Abb. 4.12:** Interaktionsexperimente mit Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>-GST. Inkubation des  $\beta$ -Propellers mit Vps39-Vps11-Dimer, Vps39-Vps11-Vps18-Trimer, Vps16-Vps33-Dimer und dem gesamten HOPS-Komplex mit einem GFP-Anker am Vps33. Analyse mittels SDS-Gel (oben, CF) und Western-Blot (unten, WB) gegen das Calmodulin-bindende Protein (CbP). Diese Daten wurden von Christian Ungermann (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt.

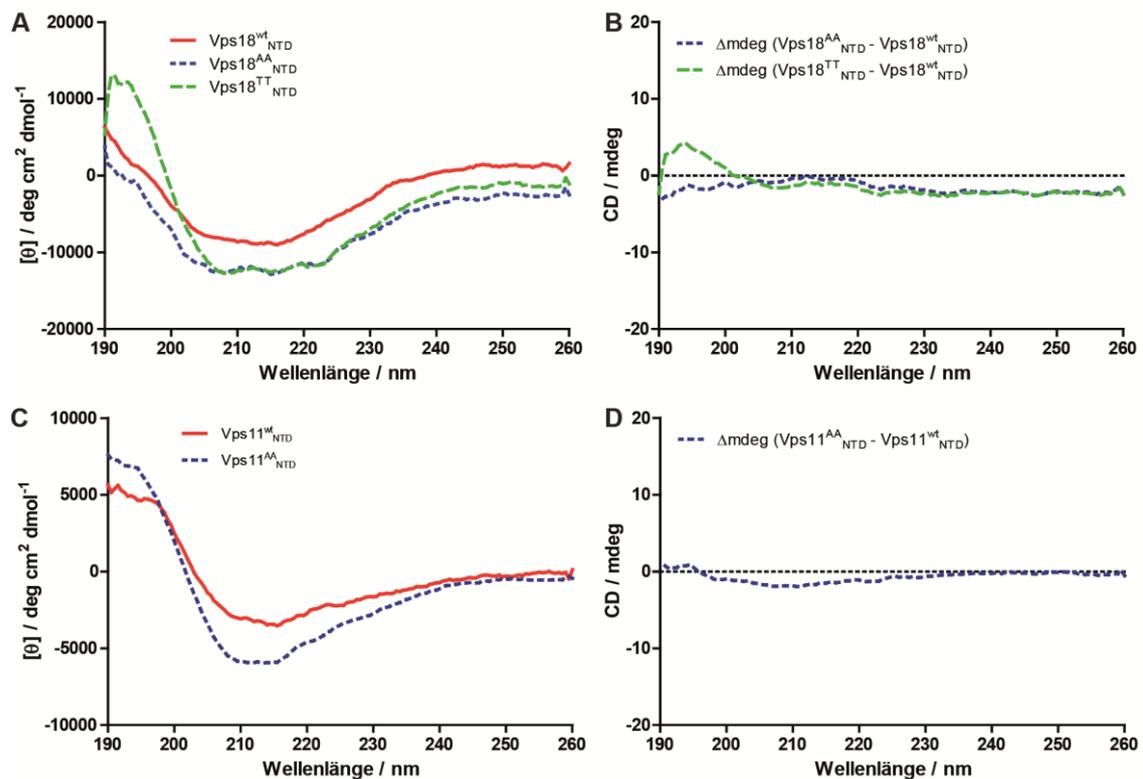
#### 4.1.6 Lipidinteraktionen der N-terminalen Domänen

Sowohl bei HOPS als auch bei CORVET handelt es sich um Komplexe, die ihre Aktivität membranassoziiert ausüben. Für HOPS wurden sowohl direkte, über PtdIns, als auch indirekte, durch SNARE vermittelte, Assoziationsmechanismen publiziert<sup>[76]</sup>. Von isoliertem Vps41 ist zusätzlich bekannt, dass es ein ALPS-Motiv zur Membranbindung enthält<sup>[87]</sup>. Für andere Untereinheiten wurden bis dato noch keine expliziten Membranbindungsmotive entdeckt. Jüngst wurde jedoch eine Klasse von  $\beta$ -Propellern mit Membranbindungsaktivität identifiziert. Diese werden als PROPPINs bezeichnet und weisen eine Spezifität für PtdIns3P sowie PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> auf, welches sie über ein FRRG-Sequenzmotiv binden<sup>[114, 115]</sup>. Die Kristallstruktur des N-terminalen Propellers von Vps18 weist eine konservierte Lx[KR][WFLI]K (in Hefe LNKIK) Sequenz auf, deren Lysine sich oberflächenexponiert auf einer kurzen Schleife zwischen Blatt 2 und Blatt 3 befinden (Abb. 4.9A,B). Um zu testen, ob diese Sequenz, ähnlich zu dem FRRG-Motiv der PROPPINs, eine direkte Membranbindung von Vps18 ermöglicht, wurden Co-Sedimentationsassays geplant. Auch wurden LNTIT- sowie LNAIA-Mutanten geplant, um einen kausalen Rückschluss auf die LNKIK Sequenz, insbesondere die beiden Lysine, zu ermöglichen. Zusätzlich wurde auch der N-terminale Propeller von Vps11 untersucht.

Dieser enthält keine Lx[KR][WFLI]K-Sequenz in dem als  $\beta$ -Propeller vorhergesagtem Bereich, aber ein mögliches, abgewandeltes FRRG Motiv.

#### 4.1.6.1 CD-Spektroskopie

Zur Überprüfung, ob die eingeführten Mutationen einen Einfluss auf die Sekundärstruktur oder die thermische Stabilität der Vps18-Proteine haben, wurden CD-Messungen durchgeführt. Hierfür wurden die CD-Spektren von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> und seiner Mutanten Vps18<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> und Vps18<sup>TT</sup><sub>NTD</sub> von 190-260 nm bei Raumtemperatur wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben aufgenommen. Um zu ermitteln, ob sich eine Änderung der Sekundärstruktur der Mutanten im Vergleich zu Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> ergibt, wurden deren CD-Spektren (Abb. 4.13A) miteinander verglichen.



**Abb. 4.13: CD-Spektren sowie Differenzspektren der N-terminalen Domänen von A,B) Vps18 und C,D) Vps11 und ihrer Mutanten.** A) CD-Spektrum und B) Differenzspektrum von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (rot) und seinen Mutanten Vps18<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (blau) und Vps18<sup>TT</sup><sub>NTD</sub> (grün). C) CD-Spektrum und B) Differenzspektrum von Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (rot) und seiner Mutante Vps11<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (blau).

Gleiches wurde auch für den N-terminalen  $\beta$ -Propeller von Vps11 und seine Mutante durchgeführt (Abb. 4.13C). Vorher wurde die gemessene Elliptizität in die

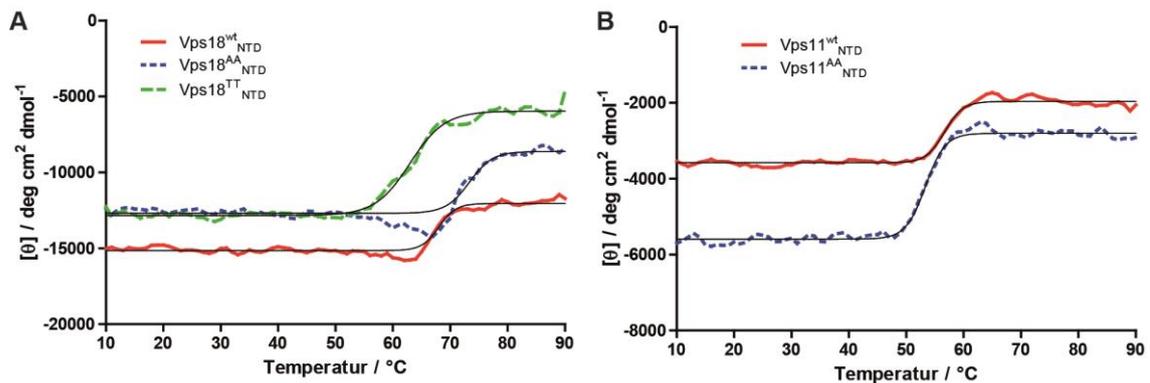
gemittelte residuale Elliptizität  $\theta$  umgerechnet und so auf die Konzentration des Proteins und die Anzahl der Aminosäuren normiert. Zusätzlich wurde die Differenz der Spektren zwischen Wildtyp-Protein und Mutante errechnet, um einen direkten Vergleich der Sekundärstruktur zu ermöglichen (Abb. 4.13B,D).

**Tabelle 4.4: Sekundärstrukturgehalt der  $\beta$ -Propeller von Vps18 und Vps11.**

Protein	$\alpha$ -Helix	anti-paralleles $\beta$ -Faltblatt	paralleles $\beta$ -Faltblatt	Schleifen	ungeordnet
Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub> *	5,4%	45,4%	-	49,1%	-
Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub>	10,5%	26,0%	13,0%	23,0%	34,0%
Vps18 <sup>AA</sup> <sub>NTD</sub>	12,6%	14,7%	10,0%	30,0%	32,7%
Vps18 <sup>TT</sup> <sub>NTD</sub>	21,2%	17,1%	11,5%	22,1%	28,1%
Vps11 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub>	6,6%	28,0%	13,2%	21,1%	30,6%
Vps11 <sup>AA</sup> <sub>NTD</sub>	11,5%	24,8%	12,2%	22,3%	29,2%

\*Sekundäranteile ermittelt aus der Röntgenkristallstruktur. Alle anderen ermittelt mit DICHROWEB<sup>[126]</sup>

Aus den CD-Spektren der  $\beta$ -Propeller von Vps18 sowie seiner Mutanten sagt der Webserver DICHROWEB<sup>[126]</sup> eine Mischung aus rechtsgängigen  $\alpha$ -helikalen Elementen und  $\beta$ -Faltblatt-Elementen sowie einem signifikanten Anteil an unstrukturierten Bereichen vorher (Tabelle 4.4). Die Kristallstruktur bestätigte die Vorhersage für Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> jedoch nur zum Teil, insbesondere ist der Anteil der  $\alpha$ -helikalen Bereiche überschätzt. Daher wird davon ausgegangen, dass die beiden Mutanten analog weniger  $\alpha$ -helikale Anteile haben. Dies gilt insbesondere, da die Differenzspektren eine ähnliche Struktur zum Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> implizieren. Im Bereich von 190-200 nm zeigen die CD-Spektren eine positive Elliptizität, aber kein eindeutiges Maximum. Ein Maximum bei 195 nm würde für ein  $\beta$ -Faltblatt-Protein, ein Maximum bei 193 nm für ein  $\alpha$ -helikales Protein sprechen. Weiterhin konnten weder eindeutige Minima bei 222 nm und 208 nm (für  $\alpha$ -helikale Proteinen) noch ein Minimum bei 218 nm (Faltblatt) identifiziert werden. Es wurde hingegen ein Minimum bei 216 nm identifiziert. Aufgrund eines negativen Cotton-Effekts durch  $\alpha$ -helikale Anteile könnte dieses daher für einen  $\beta$ -Faltblatt-Anteil sprechen. Die gleichen Rückschlüsse konnten auch für Vps11 getroffen werden, welches ein sehr ähnliches CD-Spektrum zu Vps18 zeigte.



**Abb. 4.14: Schmelzkurven der N-terminalen Domänen von A) Vps18 und B) Vps11 und ihrer Mutanten.** A) CD-Messung bei 218 nm von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (rot) und seiner Mutanten Vps18<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (blau) und Vps18<sup>TT</sup><sub>NTD</sub> (grün) zur Bestimmung der Schmelztemperatur. B) CD Messung bei 218 nm von Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (rot) und seiner Mutante Vps11<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (blau) zur Bestimmung der Schmelztemperatur.

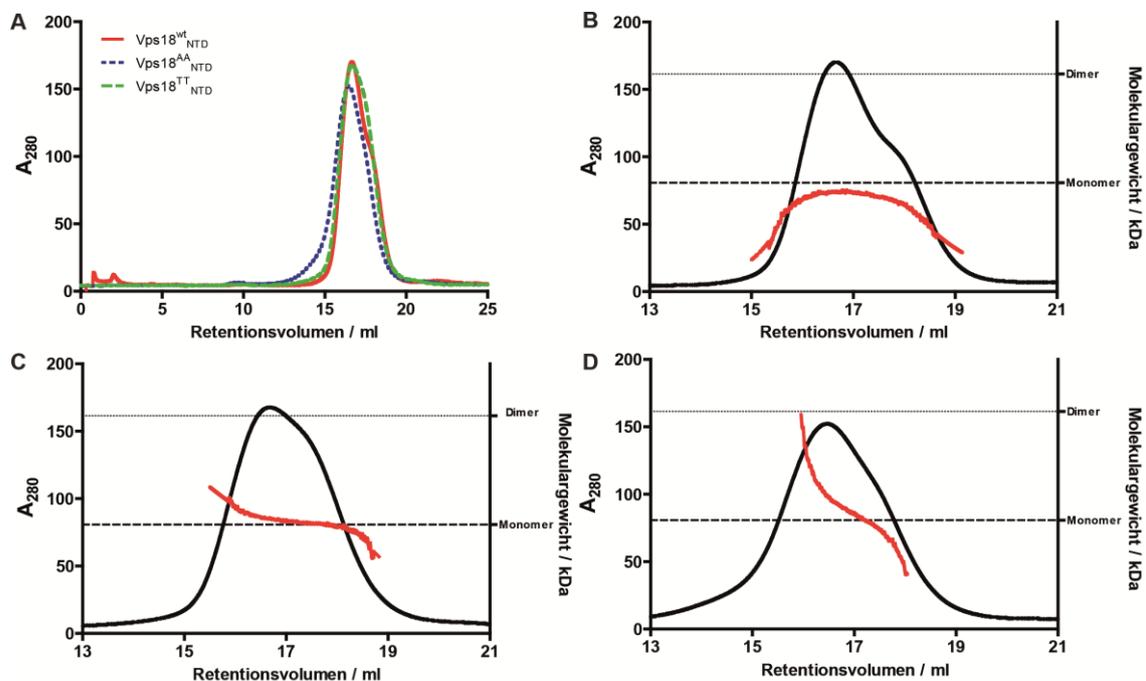
Da CD-Spektren eine, zumindest vergleichende, Auskunft über die in einem Konstrukt vorkommenden Strukturelemente geben, können diese auch zur Ermittlung der thermischen Stabilität eines Proteins verwendet werden. Bei 218 nm befindet sich ein Minimum für  $\beta$ -Faltblätter, welche nach der Kristallstruktur das bestimmende Strukturelement für den N-terminalen Propeller sind. Änderungen in diesem Bereich sind nur bei einer Entfaltung des Konstruktes zu erwarten. Sowohl für Vps18 als auch für Vps11 zeigen die Mutanten vergleichbare Schmelzkurven zum Wildtyp. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine der Mutationen die Konstrukte entscheidend destabilisiert. Es fällt jedoch auf, dass die Vps11-Konstrukte generell instabiler als das erfolgreich kristallisierte Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>-Konstrukt sind (Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5: Ermittelten Schmelztemperaturen.**

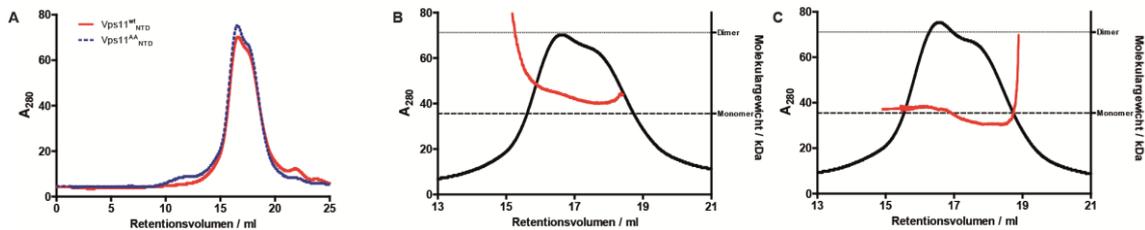
Protein	Schmelztemperatur
Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub>	68,0 °C
Vps18 <sup>AA</sup> <sub>NTD</sub>	73,3 °C
Vps18 <sup>TT</sup> <sub>NTD</sub>	63,0 °C
Vps11 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub>	56,7 °C
Vps11 <sup>AA</sup> <sub>NTD</sub>	53,3 °C

#### 4.1.6.2 Statische Lichtstreuung

Sowohl die Vps18-Mutanten (Abb. 4.15) als auch die Vps11-Mutanten (Abb. 4.16) zeigen ähnliche Elutionsprofile in der Größenausschlusschromatographie. Da die Größenausschlusschromatographie jedoch nur eine grobe Einordnung der absoluten Größe eines Proteinkonstruktes erlaubt, wurde diese zusätzlich mit statischer Lichtstreuung gekoppelt. Durch diese konnten geringfügige Unterschiede zwischen Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> und Vps18<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> sowie Vps18<sup>TT</sup><sub>NTD</sub> identifiziert werden. Beide Mutanten liegen jedoch, wie auch der Wildtyp, in Lösung als Monomer vor. Auch bei Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> und seiner Mutante Vps11<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> sind leichte Unterschiede zu erkennen.



**Abb. 4.15: Chromatogramme der statischen Lichtstreuung.** A) Zusammenfassung der Elutionsprofile mit der Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 für den  $\beta$ -Propeller von Vps18 und seine Mutanten. B-D) Peaks des Absorptionssignal (schwarze Linie) von den  $\beta$ -Propellern und den zugehörigen Molmassen (rote Linie), gestrichelte Linie: theoretisches Molekulargewicht des Monomers, gepunktete Linie fürs Dimer. B) Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>. C) Vps18<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (KK97/99AA) und D) Vps18<sup>TT</sup><sub>NTD</sub> (KK97/99TT).



**Abb. 4.16: Chromatogramme der statischen Lichtstreuung.** A) Zusammenfassung der Elutionsprofile mit der Superdex™ 200 10/300 für den  $\beta$ -Propeller von Vps11 und seine Mutante. B-C) Peaks des Absorptionssignal (schwarze Linie) von den  $\beta$ -Propellern und den zugehörigen Molmassen (rote Linie), gestrichelte Linie: theoretisches Molekulargewicht des Monomers, gepunktete Linie fürs Dimer. B) Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> und C) Vps11<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (RQ7-8AA).

Insgesamt werden die leichten Unterschiede als nicht relevant für die im Folgenden geplanten Co-Sedimentationsexperimente angesehen. Insbesondere, da keines der Konstrukte eine starke Neigung zur Oligomerisierung/Aggregation gezeigt hatte (Tabelle 4.6), welche zu einer Sedimentation auch in der Abwesenheit von Vesikeln führen könnte.

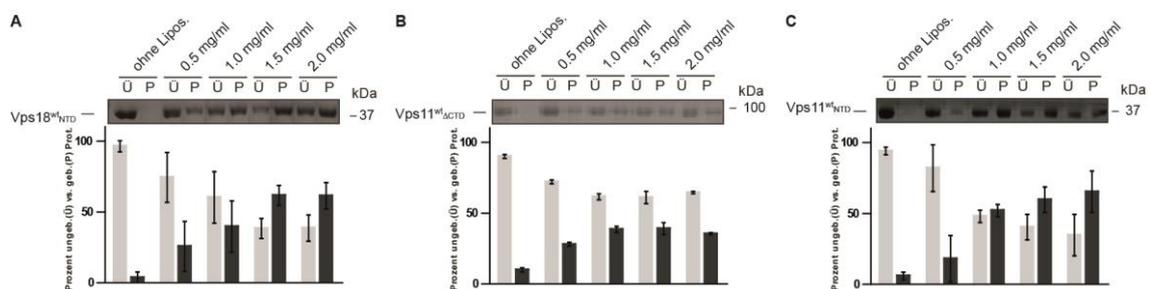
**Tabelle 4.6: Ergebnisse der statischen Lichtstreuung.**

Protein	RV [ml]	MW <sub>theoretisch</sub> [g·mol <sup>-1</sup> ]	MW <sub>ermittelt</sub> [g·mol <sup>-1</sup> ]	Oligomerisierungszustand
Vps18 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub>	16,4	40355	40000	Monomer
Vps18 <sup>AA</sup> <sub>NTD</sub>	16,2	40241	41000	Monomer
Vps18 <sup>TT</sup> <sub>NTD</sub>	16,0	40301	43000	Monomer
Vps11 <sup>wt</sup> <sub>NTD</sub>	16,7	44537	56000	Monomer
Vps11 <sup>AA</sup> <sub>NTD</sub>	16,9	44395	43000	Monomer

#### 4.1.6.3 Co-Sedimentationsexperiment

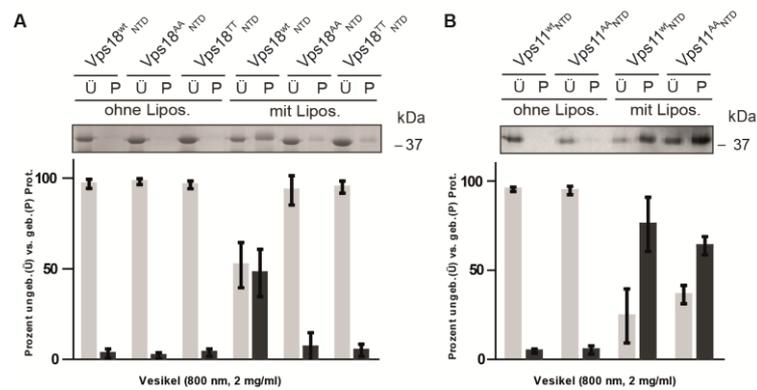
Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Interaktion von Proteinen mit Lipiden nachzuweisen. Ein direkter struktureller Nachweis konnte bisher jedoch nur für sehr wenige Proteine erbracht werden, zum Beispiel Aquaporine.<sup>[149]</sup> Häufiger sind funktionelle Assays die eine Co-Lokalisation von Protein, visualisiert z.B. durch Fusion mit GFP (*green fluorescent protein*), mit Lipidschichten, visualisiert durch Farbstoffe, ermöglichen. Alternativ kann auch versucht werden eine stabile Assoziation nachzuweisen. Dieses kann analog zu einem Western-Blot geschehen, wenn Lipide auf eine Membran aufgetragen werden und das Protein dann analog zu einem Dot Blot nachgewiesen wird<sup>[76]</sup>, oder aber analog zu einer Co-IP. Bei dem Co-IP analogem

Verfahren wird ausgenutzt, dass Vesikel leichter sedimentieren als lösliche Proteine (Kapitel 2.2.2.6). Da HOPS- bzw. CORVET-Komplexe *in vivo* das *Tethering* von Vesikeln vermitteln wurde ein Co-IP analoges Verfahren als experimenteller Aufbau gewählt, da bei diesem die Geometrie der Lipidmembran am ehesten mit dem natürlichen System übereinstimmt. Als Lipidsystem wurde ein Folch-Extrakt I<sup>[124]</sup> gewählt, welcher eine breite Auswahl an Lipidklassen enthält, insbesondere PtdIns, welche für die Membranerkennung durch PROPPINs wichtig sind<sup>[116]</sup>. Um zu überprüfen, ob Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> spezifisch an Vesikel bindet, wurde das Konstrukt mit verschiedenen Konzentrationen an Lipiden co-sedimentiert.



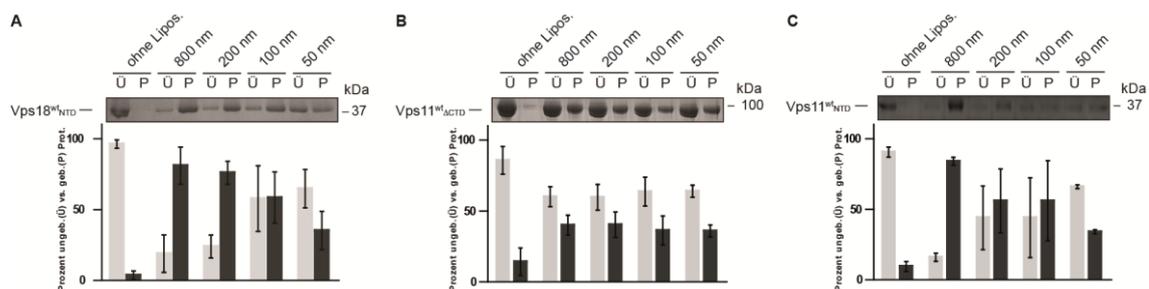
**Abb. 4.17:** Co-Sedimentationsexperimente mit 800 nm Vesikeln verschiedener Konzentration bei konstanter Proteinkonzentration. **A)** Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (5 μM). **B)** Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> (10 μM). **C)** Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (5 μM). Oben, repräsentatives SDS-Gel; unten, Quantifizierung von mindestens drei SDS-Gelen. Ü: Überstand nach Zentrifugation, graue Balken; P: Pelletfraktion nach Zentrifugation, schwarze Balken.

Mit steigender Lipidkonzentration zeigte sich eine lineare Zunahme des Proteins in der Pelletfraktion, welche sich erst bei 1,5 mg/ml Lipid abgesättigt. Auch Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Lipidkonzentration, die aber bereits bei 1,0 mg/ml abgesättigt wird. Für Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> konnte unter diesen Bedingungen keine Sättigung erreicht werden (Abb. 4.13). Im Folgenden wurden Experimente bei 2,0 mg/ml Lipid durchgeführt, um maximale Effekte zu erkennen. Die Abhängigkeit der Co-Sedimentation von der Lipidkonzentration weist auf einen spezifischen Mechanismus hin, lässt jedoch noch keinen Rückschluss darauf zu, ob wirklich die Lx[KR][WFLI]K Sequenz, bzw. die beiden exponierten Lysine, verantwortlich für die Membranbindung sind.



**Abb. 4.18:** Co-Sedimentationsexperimente zur Analyse der N-terminalen Mutanten von Vps18 und Vps11. **A)** Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> sowie die Mutanten Vps18<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (KK97/99AA) und Vps18<sup>TT</sup><sub>NTD</sub> (KK97/99TT). **B)** Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> sowie die Mutanten Vps11<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> (RQ7-8AA). Durchgeführt mit einer Proteinkonzentration von je 5  $\mu$ M und einer Vesikelkonzentration von 2 mg/ml und einem Durchmesser von 800 nm.

Um dieses zu überprüfen wurden die beiden eingangs charakterisierten LNTIT- sowie LNAIA-Mutanten verwendet. Sowohl Vps18<sup>AA</sup><sub>NTD</sub> als auch Vps18<sup>TT</sup><sub>NTD</sub> zeigen eine fast vollständige Reduktion der Membranbindung (Abb. 4.14A). Hingegen war eine Mutation des potentiellen FRRG-Motivs in Vps11 ohne Auswirkung auf dessen Membranbindung (Abb. 4.14A). Dieses verdeutlicht anschaulich die Vorzüge von struktur-basierten Mutationsstudien. Nur wenn die exakte Topologie eines Proteins oder einer Domäne bekannt ist, können gezielt oberflächenexponierte Bereiche identifiziert und mutiert werden. Ohne diese Information beschränken sich Mutationsexperimente entweder auf „Schüsse in Blaue“ oder aber Total-Alanin-Scans<sup>[115]</sup>.



**Abb. 4.19:** Co-Sedimentationsexperimente mit Vesikeln (2 mg/ml) verschiedener Durchmesser bei konstanter Proteinkonzentration. **A)** Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (5  $\mu$ M), **B)** Vps11<sup>ΔCTD</sup> (10  $\mu$ M) und **C)** Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> (5  $\mu$ M). Oben, SDS-Gel; unten, Quantifizierung mit mindestens drei SDS-Gelen.

Um die Membranbindungseigenschaften von Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> näher zu charakterisieren wurden weitere Experimente durchgeführt. Zunächst wurde getestet, ob die Membrankrümmung einen Einfluss auf die Stärke der Interaktion zwischen  $\beta$ -Propeller und der Vesikelmembran hat. Hintergrund war hierbei, dass HOPS und

CORVET als wichtiger Bestandteil des zellulären vesikulären Transportsystems mit Membranen unterschiedlichster Krümmungen in Kontakt kommen (Vesikel, Endosomen, Vakuole/Lysosomen). Vps18<sup>wt</sup><sub>NTD</sub> zeigt eine leichte Präferenz für weniger gekrümmte Vesikel, bindet aber auch an 50 nm Vesikel (Abb. 4.19A). Vps11<sup>wt</sup><sub>ΔCTD</sub> zeigt hingegen keine Präferenzen, im Gegensatz zum kürzeren, nur noch aus dem  $\beta$ -Propeller bestehenden Vps11<sup>wt</sup><sub>NTD</sub>-Konstrukt (Abb. 4.19B,C). Dessen Verhalten ähnelt eher dem des  $\beta$ -Propeller Konstruktes von Vps18.

## 4.2 Fazit

Bei *in vitro* Analysen, insbesondere solchen, die mit Domänen-Konstrukten durchgeführt werden, sollte immer die Frage nach der Relevanz der Beobachtung gestellt werden. Beispielsweise können verkürzte Konstrukte im Vergleich zum Volllängeprotein unterschiedliche Ladungssituationen aufweisen. Dies kann u.U. durch nicht ladungsausgeglichene Interaktionsflächen durch fehlende interagierende Domänen oder Sekundärstrukturelemente bedingt sein. Weiterhin können verschobene N- bez. C-Termini unbeabsichtigt stark geladene Bereiche erzeugen. Rein elektrostatische Bindungsmechanismen an Lipidschichten sollten somit bei verkürzten Konstrukten kritisch hinterfragt werden. Die durchgeführten Mutationsstudien zeigen jedoch deutlich, dass zumindest für Vps18 die beiden in der Kristallstruktur als exponiert identifizierten Lysine entscheidend für die Membranbindung sind. Auch die hohe Konservierung beider Aminosäuren ist ein deutlicher Hinweis auf deren Relevanz für die biochemische Funktion von Vps18, da ansonsten ein evolutionärer Druck auf die Konservierung schwierig zu erklären wäre, insbesondere da CD-Spektroskopie, SLS als auch Schmelzkurven gezeigt haben, dass diese keinen strukturellen Einfluss haben.

Die aus den Co-Sedimentationsexperimenten mit Vesikeln unterschiedlicher Größe ersichtliche Präferenz für Vesikel mit geringer Krümmung ist schwieriger zu interpretieren, da keine (annähernd) komplett flachen Vesikeln, z.B. *giant unilamellar vesicles* (GUVs), getestet worden waren. Eindeutig ist jedoch, dass selbst eine sehr hohe Krümmung, wie bei den 50 nm Vesikeln, die Bindung nicht vollständig inhibiert. Zu beachten ist, dass die Spezifität des HOPS-Komplexes zu seinen Zielmembranen durch Interaktion von Vps39 und Vps41 mit der GTPase Ypt7 gegeben ist.<sup>[83, 97]</sup> Dieses schließt

jedoch zusätzliche Membraninteraktionen nicht aus. Insbesondere könnten multiple, wenn auch unspezifische Interaktion mit Membranen als zusätzlicher dynamischer „Klettverschluss“ dienen, welche durch die N-terminalen  $\beta$ -Propeller vermittelt werden würden.

Generell wird in den Studien zur Funktion der N-terminalen Domäne von Vps18 deutlich, wie wichtig Strukturdaten zur Planung von gezielten Experimenten sind. Ohne die Struktur des  $\beta$ -Propellers wäre es sehr aufwendig gewesen, die beiden oberflächenexponierten Lysine zu identifizieren und durch gezielte Mutationen ihre Rolle in der Membranbindung nachzuweisen. Nur eventuell mittels eines Alanin-Scan Experimentes hätte ähnlich deren Bedeutung ermittelt werden können, jedoch mit einem wesentlich höheren Aufwand.

## 5 Zusammenfassung / Summary

### 5.1 Zusammenfassung

In eukaryotischen Zellen werden einzelne Kompartimente mittels vesikulären Transportes verknüpft. *Tethering* dient dabei als Bindeglied zwischen Transport/Adressierung und Fusion mit der Zielmembran. Die *Class C Vps Tethering*-Komplexe HOPS und CORVET erfüllen diese Aufgabe im endolysosomalen Transportweg. Auch wenn die Funktion der Komplexe gut untersucht ist, so ist unser Wissen um die molekularen Grundlagen der Funktionsweise dieser Komplexe noch lückenhaft. Struktur-Funktions-Analysen können einen Einblick in diese Grundlagen gewähren.

Für fünf der sechs Untereinheiten von HOPS wurden zueinander stark ähnliche Domänenarchitekturen vorhergesagt, was jüngst für den C-terminalen Bereich belegt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmalig durch Kristallisation des N-terminus von Vps18 bestätigt werden, dass die Vorhersage der N-terminalen Domäne als  $\beta$ -Propeller korrekt ist. Das im Kristall als Dimer vorliegende Protein zeigt einen typischen siebenblättrigen  $\beta$ -Propeller mit einem *Velcro*-Verschluss. Die einzelnen Moleküle sind dabei zueinander um  $180^\circ$  gedreht und durch eine C2-Symmetrie verknüpft. Die Kontaktfläche des Dimers ist durch elektrostatische Interaktionen geprägt, jedoch ist die physiologische Relevanz der Interaktionsfläche und der beteiligten Aminosäuren trotz zum Teil hoher Konservierung fragwürdig. Vorhersagen und experimentellen Daten nach handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Kristallkontakte. Am Rand des Propellers, genauer zwischen Blatt 2 und Blatt 3, konnte eine auffällige Schleifenstruktur identifiziert werden, welche eine zwischen Spezies konservierte Sequenz Lx[KR][WFL]K (in Hefe LNKIK) aufweist. Durch Lipid-Co-Sedimentationsexperimente sowie gezielte Mutagenese konnte gezeigt werden, dass die beiden Lysine dieser Sequenz entscheidend für die Membranbindung sind. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig dem N-terminalen Bereich eine Funktion außerhalb des Komplexaufbaus zugewiesen werden, sowie eine neue Klasse von Membran-bindenden  $\beta$ -Propellern, neben den bekannten PROPPINs, identifiziert werden.

Die bekannte Beteiligung an der Stabilisierung des HOPS-Komplexes konnte im Rahmen von *in vitro*-Experimenten genauer eingegrenzt werden. Diese zeigten eine direkte Interaktion des N-terminalen Propellers von Vps18 mit der N-terminalen Domäne

von Vps11. Die N-terminale Domäne von Vps11 weist zwar weder eine Lx[KR][WFLI]K-Sequenz noch ein PROPPIN-Motiv auf, dennoch konnte eine Membranaffinität festgestellt werden. Aufgrund des Fehlens einer Kristallstruktur konnte der interagierende Bereich jedoch nicht durch gezielte Mutagenese-Studien ermittelt werden. Der genaue Bindungsmechanismus bleibt somit für Vps11, im Gegensatz zu Vps18, im Unklaren.

## 5.2 Summary

In eukaryotic cells, individual compartments are connected via the vesicular transport pathway. Tethering acts as the bridging step between transport/addressing of vesicles and their fusion with target membranes. The class C Vps tethering complexes HOPS and CORVET are acting on the endolysosomal transport pathway. Although their cellular function is well understood, little is known about the molecular mechanisms. Structure-function analysis can be of great help to further our molecular understanding of these tethering mechanisms.

Five of the six known subunits of HOPS share similar predicted domain architectures. At least for the C-terminal domain, this prediction was recently confirmed by protein crystallography. In the present study, the N-terminal domain of the HOPS subunit Vps18 was crystallized. The resulting structure is that of a typical seven-bladed  $\beta$ -propeller, with a velcro closure, thus confirming the initial structure prediction. In the asymmetric unit of the crystal, a dimer of two molecules is observed, related to each other by a 180° rotation and C2 symmetry. The interface is defined by electrostatic interactions. Although several of the interacting residues show high levels of conservation, experimental data and predictions indicate that the interaction is not likely to be of relevance for the biological function of Vps18. At the rim of the propeller, more specifically between blade 2 and blade 3, an extended loop containing a conserved Lx[KR][WFLI]K (in yeast LNKIK) sequence can be found. Relying on lipid co-sedimentation assays and mutagenesis, it could be shown that this sequence is responsible for interactions of the propeller with lipid membranes. Thus for the first time, a functional role of the N-terminal domain could be determined, apart from its known function in

stabilizing the complex. Moreover, the Vps18  $\beta$ -propeller constitutes a novel class of membrane-binding propellers, complementing the known PROPPINs.

Besides this, the known function of stabilizing the HOPS complex could be further specified by showing that the Vps18 propeller can interact directly with the N-terminal domain of Vps11. Although Vps11 shows neither a Lx[KR][WFLI]K sequence nor a PROPPIN motif, membrane-binding properties were also found for this N-terminal domain. Due to the lack of a known structure, no further analysis of this property was possible. Therefore, and different from the Vps18 propeller, the lipid-binding mechanism of Vps11 remains unknown.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Wachtershauser, G., *From pre-cells to Eukarya--a tale of two lipids*. Mol Microbiol, 2003. **47**(1): p. 13-22.
2. Lombard, J., P. Lopez-Garcia, and D. Moreira, *The early evolution of lipid membranes and the three domains of life*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(7): p. 507-15.
3. Cavalier-Smith, T., *The origin of eukaryotic and archaeobacterial cells*. Ann N Y Acad Sci, 1987. **503**: p. 17-54.
4. Alberts, B., et al., *Molekularbiologie der Zelle*. 2004: Wiley.
5. Kutateladze, T.G., *Translation of the phosphoinositide code by PI effectors*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(7): p. 507-13.
6. Behnia, R. and S. Munro, *Organelle identity and the signposts for membrane traffic*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 597-604.
7. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 112-24.
8. Hofmann, K.P., et al., *Building functional modules from molecular interactions*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(9): p. 497-508.
9. Crowther, R.A. and B.M. Pearse, *Assembly and packing of clathrin into coats*. J Cell Biol, 1981. **91**(3 Pt 1): p. 790-7.
10. Kirchhausen, T. and S.C. Harrison, *Protein organization in clathrin trimers*. Cell, 1981. **23**(3): p. 755-61.
11. Vigers, G.P., R.A. Crowther, and B.M. Pearse, *Three-dimensional structure of clathrin cages in ice*. EMBO J, 1986. **5**(3): p. 529-34.
12. Le Borgne, R., G. Griffiths, and B. Hoflack, *Mannose 6-phosphate receptors and ADP-ribosylation factors cooperate for high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 2162-70.
13. Dell'Angelica, E.C., et al., *Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin*. Science, 1998. **280**(5362): p. 431-4.
14. Dell'Angelica, E.C., C. Mullins, and J.S. Bonifacino, *AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7278-85.
15. Vowels, J.J. and G.S. Payne, *A dileucine-like sorting signal directs transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the yeast vacuole*. EMBO J, 1998. **17**(9): p. 2482-93.
16. Schekman, R. and L. Orci, *Coat proteins and vesicle budding*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1526-33.
17. Orci, L., B.S. Glick, and J.E. Rothman, *A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack*. Cell, 1986. **46**(2): p. 171-84.
18. Sohn, K., et al., *A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding*. J Cell Biol, 1996. **135**(5): p. 1239-48.
19. Cai, H., K. Reinisch, and S. Ferro-Novick, *Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle*. Dev Cell, 2007. **12**(5): p. 671-82.
20. Moran, U., R. Phillips, and R. Milo, *SnapShot: key numbers in biology*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1262-1262 e1.

21. Kummel, D. and U. Heinemann, *Diversity in structure and function of tethering complexes: evidence for different mechanisms in vesicular transport regulation*. *Curr Protein Pept Sci*, 2008. **9**(2): p. 197-209.
22. Brocker, C., S. Engelbrecht-Vandre, and C. Ungermann, *Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion*. *Curr Biol*, 2010. **20**(21): p. R943-52.
23. Hong, W. and S. Lev, *Tethering the assembly of SNARE complexes*. *Trends in Cell Biology*, 2014. **24**(1): p. 35-43.
24. Jahn, R. and R.H. Scheller, *SNAREs--engines for membrane fusion*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(9): p. 631-43.
25. Sutton, R.B., et al., *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution*. *Nature*, 1998. **395**(6700): p. 347-53.
26. Fasshauer, D., et al., *Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(44): p. 28036-41.
27. Fasshauer, D., et al., *A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(7): p. 4582-90.
28. Rice, L.M., P. Brennwald, and A.T. Brunger, *Formation of a yeast SNARE complex is accompanied by significant structural changes*. *FEBS Lett*, 1997. **415**(1): p. 49-55.
29. Fasshauer, D., et al., *Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15781-6.
30. Bock, J.B., et al., *A genomic perspective on membrane compartment organization*. *Nature*, 2001. **409**(6822): p. 839-41.
31. Colicelli, J., *Human RAS superfamily proteins and related GTPases*. *Sci STKE*, 2004. **2004**(250): p. RE13.
32. Lazar, T., M. Gotte, and D. Gallwitz, *Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?* *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(12): p. 468-72.
33. Zerial, M. and H. McBride, *Rab proteins as membrane organizers*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 107-17.
34. Constantinescu, A.T., et al., *Rab-subfamily-specific regions of Ypt7p are structurally different from other RabGTPases*. *Structure*, 2002. **10**(4): p. 569-79.
35. Gorvel, J.P., et al., *rab5 controls early endosome fusion in vitro*. *Cell*, 1991. **64**(5): p. 915-25.
36. Bucci, C., et al., *Rab7: a key to lysosome biogenesis*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(2): p. 467-80.
37. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. *EMBO J*, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
38. Nordmann, M., et al., *The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7*. *Curr Biol*, 2010. **20**(18): p. 1654-9.
39. Carney, D.S., B.A. Davies, and B.F. Horazdovsky, *Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons*. *Trends Cell Biol*, 2006. **16**(1): p. 27-35.
40. Bernardis, A., *GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1603**(2): p. 47-82.

41. Burstein, E.S. and I.G. Macara, *Characterization of a guanine nucleotide-releasing factor and a GTPase-activating protein that are specific for the ras-related protein p25rab3A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(4): p. 1154-8.
42. Strom, M., et al., *A yeast GTPase-activating protein that interacts specifically with a member of the Ypt/Rab family*. Nature, 1993. **361**(6414): p. 736-9.
43. Lachmann, J., F.A. Barr, and C. Ungermann, *The Msb3/Gyp3 GAP controls the activity of the Rab GTPases Vps21 and Ypt7 at endosomes and vacuoles*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(13): p. 2516-26.
44. Ullrich, O., et al., *Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange*. Nature, 1994. **368**(6467): p. 157-60.
45. Yu, I.M. and F.M. Hughson, *Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2010. **26**: p. 137-56.
46. Sacher, M., et al., *TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 433-42.
47. Kim, Y.G., et al., *The architecture of the multisubunit TRAPP I complex suggests a model for vesicle tethering*. Cell, 2006. **127**(4): p. 817-30.
48. Cai, H., et al., *TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 941-4.
49. Cai, Y., et al., *The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes*. Cell, 2008. **133**(7): p. 1202-13.
50. Wang, W., M. Sacher, and S. Ferro-Novick, *TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 289-96.
51. Ungar, D., et al., *Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function*. J Cell Biol, 2002. **157**(3): p. 405-15.
52. Suvorova, E.S., R. Duden, and V.V. Lupashin, *The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins*. J Cell Biol, 2002. **157**(4): p. 631-43.
53. Cavanaugh, L.F., et al., *Structural analysis of conserved oligomeric Golgi complex subunit 2*. J Biol Chem, 2007. **282**(32): p. 23418-26.
54. Richardson, B.C., et al., *Structural basis for a human glycosylation disorder caused by mutation of the COG4 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13329-34.
55. Fotso, P., et al., *Cog1p plays a central role in the organization of the yeast conserved oligomeric Golgi complex*. J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27613-23.
56. Ungar, D., et al., *Subunit architecture of the conserved oligomeric Golgi complex*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 32729-35.
57. Conibear, E. and T.H. Stevens, *Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 305-23.
58. Conibear, E., J.N. Cleck, and T.H. Stevens, *Vps51p mediates the association of the GARP (Vps52/53/54) complex with the late Golgi t-SNARE Tlg1p*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(4): p. 1610-23.
59. Liewen, H., et al., *Characterization of the human GARP (Golgi associated retrograde protein) complex*. Exp Cell Res, 2005. **306**(1): p. 24-34.

60. Takagi, K., et al., *Involvement of Golgi-associated retrograde protein complex in the recycling of the putative Dnf aminophospholipid flippases in yeast*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012. **417**(1): p. 490-494.
61. TerBush, D.R., et al., *The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6483-94.
62. Guo, W., et al., *The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis*. EMBO J, 1999. **18**(4): p. 1071-80.
63. Yamashita, M., et al., *Structural basis for the Rho- and phosphoinositide-dependent localization of the exocyst subunit Sec3*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(2): p. 180-6.
64. Munson, M. and P. Novick, *The exocyst defrocked, a framework of rods revealed*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(7): p. 577-81.
65. Boyd, C., et al., *Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p*. J Cell Biol, 2004. **167**(5): p. 889-901.
66. Tripathi, A., et al., *Structural characterization of Tip20p and Dsl1p, subunits of the Dsl1p vesicle tethering complex*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(2): p. 114-23.
67. Ren, Y., et al., *A structure-based mechanism for vesicle capture by the multisubunit tethering complex Dsl1*. Cell, 2009. **139**(6): p. 1119-29.
68. Kraynack, B.A., et al., *Dsl1p, Tip20p, and the novel Dsl3(Sec39) protein are required for the stability of the Q/t-SNARE complex at the endoplasmic reticulum in yeast*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 3963-77.
69. Andag, U., T. Neumann, and H.D. Schmitt, *The coatomer-interacting protein Dsl1p is required for Golgi-to-endoplasmic reticulum retrieval in yeast*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 39150-60.
70. Banta, L.M., et al., *Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1369-83.
71. Horazdovsky, B.F. and S.D. Emr, *The VPS16 gene product associates with a sedimentable protein complex and is essential for vacuolar protein sorting in yeast*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): p. 4953-62.
72. Raymond, C.K., et al., *Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(12): p. 1389-402.
73. Sato, T.K., et al., *Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/fusion*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 661-71.
74. Balderhaar, H.J. and C. Ungermann, *CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 6): p. 1307-16.
75. Laage, R. and C. Ungermann, *The N-terminal domain of the t-SNARE Vam3p coordinates priming and docking in yeast vacuole fusion*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(11): p. 3375-85.
76. Stroupe, C., et al., *Purification of active HOPS complex reveals its affinities for phosphoinositides and the SNARE Vam7p*. EMBO J, 2006. **25**(8): p. 1579-89.
77. Sevrioukov, E.A., et al., *A role for the deep orange and carnation eye color genes in lysosomal delivery in Drosophila*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 479-86.

78. Markgraf, D.F., et al., *The CORVET subunit Vps8 cooperates with the Rab5 homolog Vps21 to induce clustering of late endosomal compartments*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(24): p. 5276-89.
79. Horazdovsky, B.F., et al., *A novel RING finger protein, Vps8p, functionally interacts with the small GTPase, Vps21p, to facilitate soluble vacuolar protein localization*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33607-15.
80. Epp, N. and C. Ungermann, *The N-terminal domains of Vps3 and Vps8 are critical for localization and function of the CORVET tethering complex on endosomes*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67307.
81. Peplowska, K., et al., *The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis*. Dev Cell, 2007. **12**(5): p. 739-50.
82. Wurmser, A.E., T.K. Sato, and S.D. Emr, *New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion*. J Cell Biol, 2000. **151**(3): p. 551-62.
83. Ostrowicz, C.W., et al., *Defined subunit arrangement and rab interactions are required for functionality of the HOPS tethering complex*. Traffic, 2010. **11**(10): p. 1334-46.
84. Cabrera, M., et al., *The Mon1-Ccz1 GEF activates the Rab7 GTPase Ypt7 via a longin-fold-Rab interface and association with PI3P-positive membranes*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 5): p. 1043-51.
85. Darsow, T., et al., *Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(1): p. 37-51.
86. Rehling, P., et al., *Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. 346-53.
87. Cabrera, M., et al., *Phosphorylation of a membrane curvature-sensing motif switches function of the HOPS subunit Vps41 in membrane tethering*. J Cell Biol, 2010. **191**(4): p. 845-59.
88. Zick, M. and W. Wickner, *Phosphorylation of the effector complex HOPS by the vacuolar kinase Yck3p confers Rab nucleotide specificity for vacuole docking and fusion*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(17): p. 3429-37.
89. Cabrera, M., et al., *Vps41 phosphorylation and the Rab Ypt7 control the targeting of the HOPS complex to endosome-vacuole fusion sites*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(7): p. 1937-48.
90. Epp, N., et al., *Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(9): p. 779-85.
91. Lachmann, J., C. Ungermann, and S. Engelbrecht-Vandre, *Rab GTPases and tethering in the yeast endocytic pathway*. Small GTPases, 2011. **2**(3): p. 182-186.
92. Graham, S.C., et al., *Structural basis of Vps33A recruitment to the human HOPS complex by Vps16*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(33): p. 13345-50.
93. Seals, D.F., et al., *A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9402-7.
94. Burkhardt, P., et al., *Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide*. EMBO J, 2008. **27**(7): p. 923-33.

95. Misura, K.M., R.H. Scheller, and W.I. Weis, *Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex*. *Nature*, 2000. **404**(6776): p. 355-62.
96. Baker, R.W., P.D. Jeffrey, and F.M. Hughson, *Crystal Structures of the Sec1/Munc18 (SM) Protein Vps33, Alone and Bound to the Homotypic Fusion and Vacuolar Protein Sorting (HOPS) Subunit Vps16\**. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e67409.
97. Plemel, R.L., et al., *Subunit organization and Rab interactions of Vps-C protein complexes that control endolysosomal membrane traffic*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(8): p. 1353-63.
98. Guo, Z., et al., *Subunit organisation of in vitro reconstituted HOPS and CORVET multisubunit membrane tethering complexes*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e81534.
99. Brocker, C., et al., *Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(6): p. 1991-6.
100. Nickerson, D.P., C.L. Brett, and A.J. Merz, *Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(4): p. 543-51.
101. Holm, L. and P. Rosenstrom, *Dali server: conservation mapping in 3D*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(Web Server issue): p. W545-9.
102. Devos, D., et al., *Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture*. *PLoS Biol*, 2004. **2**(12): p. e380.
103. Kuhlman, B., et al., *Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy*. *Science*, 2003. **302**(5649): p. 1364-8.
104. Rieder, S.E. and S.D. Emr, *A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole*. *Mol Biol Cell*, 1997. **8**(11): p. 2307-27.
105. Yogosawa, S., et al., *Monoubiquitylation of GGA3 by hVPS18 regulates its ubiquitin-binding ability*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **350**(1): p. 82-90.
106. Yogosawa, S., et al., *Ubiquitylation and degradation of serum-inducible kinase by hVPS18, a RING-H2 type ubiquitin ligase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(50): p. 41619-27.
107. Andrade, M.A., C. Perez-Iratxeta, and C.P. Ponting, *Protein repeats: structures, functions, and evolution*. *J Struct Biol*, 2001. **134**(2-3): p. 117-31.
108. Kappel, C., et al., *An unusual hydrophobic core confers extreme flexibility to HEAT repeat proteins*. *Biophys J*, 2010. **99**(5): p. 1596-603.
109. Fournier, D., et al., *Functional and genomic analyses of alpha-solenoid proteins*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e79894.
110. Kim, M., et al., *Fast and forceful refolding of stretched alpha-helical solenoid proteins*. *Biophys J*, 2010. **98**(12): p. 3086-92.
111. Kobe, B. and A.V. Kajava, *When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(10): p. 509-15.
112. Chen, C.K., N.L. Chan, and A.H. Wang, *The many blades of the beta-propeller proteins: conserved but versatile*. *Trends Biochem Sci*, 2011. **36**(10): p. 553-61.
113. Stirnimann, C.U., et al., *WD40 proteins propel cellular networks*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(10): p. 565-74.
114. Krick, R., et al., *Structural and functional characterization of the two phosphoinositide binding sites of PROPPINs, a beta-propeller protein family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(30): p. E2042-9.

115. Rieter, E., et al., *Atg18 function in autophagy is regulated by specific sites within its beta-propeller*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 2): p. 593-604.
116. Thumm, M., et al., *It takes two to tango: PROPPINs use two phosphoinositide-binding sites*. Autophagy, 2013. **9**(1): p. 106-7.
117. Klinger, C.M., M.J. Klute, and J.B. Dacks, *Comparative genomic analysis of multi-subunit tethering complexes demonstrates an ancient pan-eukaryotic complement and sculpting in Apicomplexa*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e76278.
118. Scheich, C., et al., *Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(6): p. e43.
119. Greenfield, N., *[Diagnosis of poliomyelitis]*. Rev Chil Pediatr, 1950. **21**(1): p. 41-4.
120. Bieniossek, C., et al., *Automated unrestricted multigene recombineering for multiprotein complex production*. Nature Methods, 2009. **6**(6): p. 447-U68.
121. Korbie, D.J. and J.S. Mattick, *Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification*. Nat Protoc, 2008. **3**(9): p. 1452-6.
122. Zheng, L., U. Baumann, and J.L. Reymond, *An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(14): p. e115.
123. Lottspeich, F., ed. *Bioanalytik*. 2. Aufl., aktualisierte u. erw. Neuaufl. ed. SAV Biowissenschaften. 2006, Spektrum: München ; Heidelberg. XXIV, 1119 S.
124. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
125. Greenfield, N.J., *Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2527-35.
126. Lobley, A., L. Whitmore, and B.A. Wallace, *DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra*. Bioinformatics, 2002. **18**(1): p. 211-2.
127. Sreerama, N. and R.W. Woody, *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set*. Anal Biochem, 2000. **287**(2): p. 252-60.
128. Reinhard, L., et al., *Optimization of protein buffer cocktails using Thermofluor*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2013. **69**(Pt 2): p. 209-14.
129. Mueller, U., et al., *Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin*. J Synchrotron Radiat, 2012. **19**(Pt 3): p. 442-9.
130. Rhodes, G., *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. 2006: Elsevier Science.
131. Kabsch, W., *Xds*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 2): p. 125-32.
132. Taylor, G., *The phase problem*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 11): p. 1881-90.
133. Sheldrick, G.M., *Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 4): p. 479-85.
134. Langer, G., et al., *Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7*. Nat Protoc, 2008. **3**(7): p. 1171-9.
135. Murshudov, G.N., et al., *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2011. **67**(Pt 4): p. 355-67.

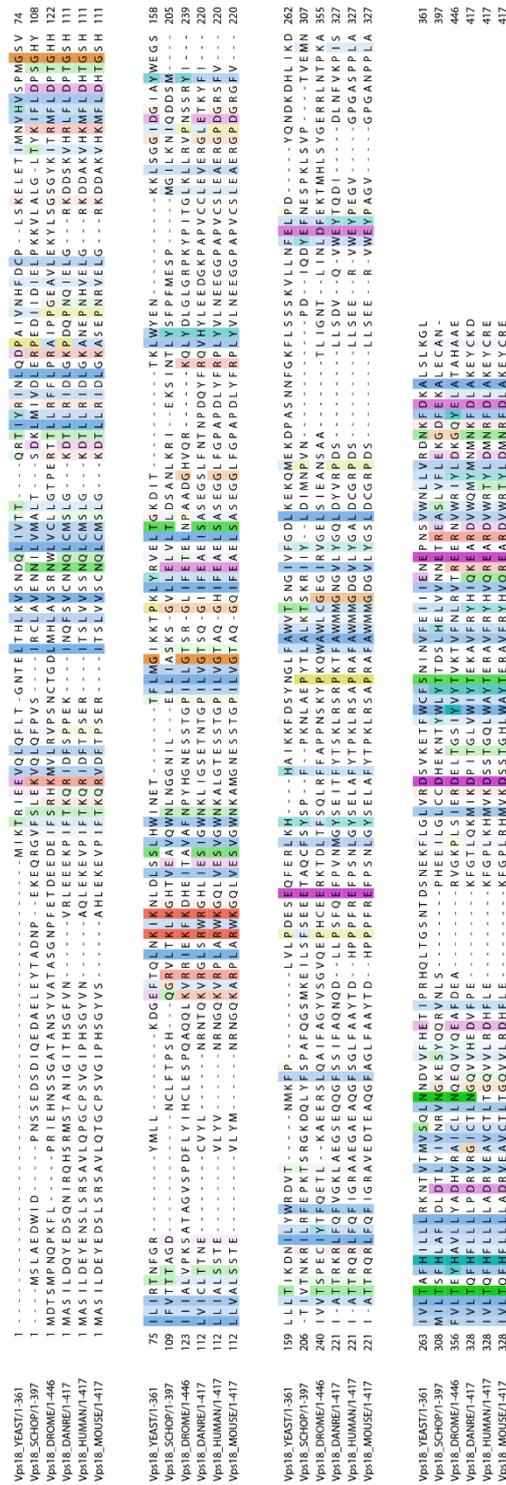
136. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
137. Painter, J. and E.A. Merritt, *TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models*. Journal of Applied Crystallography, 2006. **39**(1): p. 109-111.
138. Chen, V.B., et al., *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography*. Acta Crystallographica Section D, 2010. **66**(1): p. 12-21.
139. Bujacz, G., B. Wrzesniewska, and A. Bujacz, *Cryoprotection properties of salts of organic acids: a case study for a tetragonal crystal of HEW lysozyme*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 7): p. 789-96.
140. Erdal Yavavli. Diplomarbeit. Universität Osnabrück. 2013.
141. Golovanov, A.P., et al., *A simple method for improving protein solubility and long-term stability*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(29): p. 8933-9.
142. Russo, A.T. and S.J. Watowich, *Purification, crystallization and X-ray diffraction analysis of the C-terminal protease domain of Venezuelan equine encephalitis virus nsP2*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2006. **62**(Pt 6): p. 514-7.
143. Kelley, L.A. and M.J. Sternberg, *Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server*. Nat Protoc, 2009. **4**(3): p. 363-71.
144. Evans, G. and R.F. Pettifer, *CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra*. Journal of Applied Crystallography, 2001. **34**(1): p. 82-86.
145. Matthews, B.W., *Solvent content of protein crystals*. Journal of Molecular Biology, 1968. **33**(2): p. 491-497.
146. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 4): p. 486-501.
147. Krissinel, E. and K. Henrick, *Inference of macromolecular assemblies from crystalline state*. J Mol Biol, 2007. **372**(3): p. 774-97.
148. Landau, M., et al., *ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(suppl 2): p. W299-W302.
149. Gonen, T., et al., *Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 633-8.

# 7 Anhang

**Tabelle 7.1: Fortschrittsübersicht der designten Konstrukte für Vps11, Vps18, Vps16, Vps33, der spezifischen HOPS-Untereinheiten Vps39, Vps41 und die spezifischen CORVET-Untereinheiten Vps3 und Vps8.**

	N-His Konstrukte	Klonierung/ vollständige Sequenzierung	MW in kDa	Expression/ Löslichkeit in Rosetta2 (DE3)	gereinigtes Protein	Kristallisationsversuche	Kristalle	
<b>Vps11</b>	Vps11_2-1029	x	120	x	x	x	Nein	
	Vps11_2-575	x	114	x	x	x		
	Vps11_2-351	xx	42	x++ (Abbau)	x	x		
	Vps11_30-351	xx	38	x++	x-Präzipitation	x		
	Vps11_351-1029	xx	81	x	x	x		
	Vps11_381-975	xx	75	x	x-Präzipitation	x		
	Vps11_660-975	xx	39	---	---	---	---	
	Vps11_660-926	xx	34	---	---	---	---	
	Vps11_737-975	xx	30	x++	x geringe Ausbeute und Chaperone	x		
	Vps11_737-926	xx	25	x++	x geringe Ausbeute und Chaperone	x		
	Vps11_824-975	xx	9	---	---	---	---	
	Vps11_824-1029	xx	15	x++	x	x		
	Vps11_107-1008	xx	95	---	---	---	---	
	Vps11_197-761	x	65	x++ (Abbau)	x	x		
	Vps11_206-1008	xx	95	---	---	---	---	
	Vps11_206-761	x	67	---	---	---	---	
	Vps11_206-742	x	65	---	---	---	---	
	Vps11_715-1008	x	37	x++	x-Präzipitation	x		
	Vps11_731-1008	x	35	x++	x	x		
	Vps11_764-1008	x	31	x++	x	x		
	Vps11_778-1008	x	30	x/yes	x	x		
	Vps11_197-1020	xx	86	---	---	---	---	
	Vps11_206-1020	xx	97	---	---	---	---	
	Vps11_715-1020	x	38	x	x	x		
	Vps11_731-1020	x	35	x++	x	x		
	Vps11_764-1020	x	33	---	---	---	---	
	Vps11_778-1020	x	31	x++	x-Präzipitation	x		
	Vps11_737-1020	xx	37	---	---	---	---	
	Vps11_2-1020	xx	119	---	---	---	---	
	Vps11_2-1008	xx	118	---	---	---	---	
	Vps11_17-377	xx	43	---	---	---	---	
	Vps11_2-397	xx	48	x++	x	x		
	Vps11_17-342	x	86	---	---	---	---	
	Vps11_2-742	x	87	---	---	---	---	
	Vps11_151-761	xx	51	---	---	---	---	
	Vps11_2-761	xx	90	x++	x	x	Nein	
	Vps11_778-1008	x/3778, D785, C9316	30	x++	x	x		
	Vps11_778-1008	x/S863P, D956G, L566P	30	x++	x	x		
	Vps11_778-975	xx	26	x++	x geringe Ausbeute und Chaperone	x		
	Vps11_351-926	xx	70	x++	x	x		
	Vps11_2-926	xx	108	---	---	---	---	
	Vps11_660-1020	xx	45	---	---	---	---	
	Vps11_351-1020	xx	80	---	---	---	---	
	Vps11_778-926	xx	20	x++	x geringe Ausbeute und Chaperone	x		
	Vps11_17-397	x	45	---	---	---	---	
Vps11_30-397	x	47	---	---	---	---		
Vps11_2-761	x/KK197/98AA	90	x++	x	x			
Vps11_2-761	x/KK197/98TT	90	x++	x	x			
Vps11_2-761	x/RQ7/AAA	90	x++	x	x			
Vps11_2-397	x/RQ7/TTT	48	x++	x	x			
Vps11_2-397	x/RQ7/AAA	48	x++	x	x			
Vps11_2-351	x/RQ7/TTT	42	x++	x	x			
Vps11_2-351	x/RQ7/AAA	42	x++	x-Präzipitation	x			
<b>Vps18</b>	Vps18_2-918	x	110	---	---	---	---	
	Vps18_2-715	xx	91	---	---	---	---	
	Vps18_2-349	xx	43	x++	x	x		
	Vps18_2-538	x	42	x++	x-Präzipitation	x		
	Vps18_338-918	x	71	x++	x	x		
	Vps18_338-751	xx	46	x++	x	x		
	Vps18_715-918	x	23	---	---	---	---	
	Vps18_751-896	x	20	---	---	---	---	
	Vps18_821-918	xx	14	x	x-Präzipitation	x		
	Vps18_821-896	xx	11	---	---	---	---	
	Vps18_2-455	x	52	---	---	---	---	
	Vps18_2-459	x	56	x	x	x	Nein	
	Vps18_2-494	x	60	x	x	x		
	Vps18_2-349	x/KK197/98AA	43	x++	x	x		
	Vps18_2-349	x/KK197/98TT	43	x++	x	x		
	Vps18_2-349	x/K197	43	x++	x	x		
	Vps18_2-349	x/K197A	43	x++	x	x		
	Vps18_2-349	x/NW340/341RS	43	x++	x	x		
	Vps18_2-349	x/NW340/341AA	43	x++	x	x		
	Vps18_2-349	x/KK197/98AA/xK197A	43	x++	x	x		
Vps18_2-349	x/KK197/98TT/xK197A	43	x++	x	x			
Vps18_2-349	K197/NW340/341RS	43	x++	x	x			
Vps18_2-349	K197A/NW340/341AA	43	x++	x	x			
<b>Vps3</b>	Vps3_2-500	x	119	---	---	---	---	
	Vps3_2-485	x	58	---	---	---	---	
	Vps3_2-425	xx	50	---	---	---	---	
	Vps3_2-343	xx	41	---	---	---	---	
	Vps3_221-1002	xx	94	---	---	---	---	
	Vps3_425-1002	xx	72	---	---	---	---	
	Vps3_901-1002	xx	15	---	---	---	---	
	Vps3_113-439	x	40	---	---	---	---	
	Vps3_294-961	x	70	---	---	---	---	
	Vps3_113-1002	x	106	---	---	---	---	
	<b>Vps8</b>	Vps8_2-1274	x	148	---	---	---	---
		Vps8_2-1190	x	138	---	---	---	---
		Vps8_2-425	x	50	---	---	---	---
		Vps8_55-1274	x	142	---	---	---	---
		Vps8_55-1190	x	132	---	---	---	---
Vps8_55-425		x	44	---	---	---	---	
Vps8_425-1274		x	101	---	---	---	---	
Vps8_425-1190		x	91	---	---	---	---	
Vps8_425-1002		x	106	---	---	---	---	
Vps8_1192-1274		x	172	---	---	---	---	
<b>Vps39</b>	Vps39_2-1023	x	53	---	---	---	---	
	Vps39_2-434	x	53	---	---	---	---	
	Vps39_196-1023	x	100	---	---	---	---	
	Vps39_428-1023	x	73	---	---	---	---	
	Vps39_428-974	xx	67	---	---	---	---	
	Vps39_428-893	xx	58	---	---	---	---	
	Vps39_875-1023	x	26	---	---	---	---	
	Vps39_332-1023	x	84	---	---	---	---	
	Vps39_341-1023	x	83	---	---	---	---	
	Vps39_877-1023	x	84	---	---	---	---	
	Vps39_332-1018	x	83	---	---	---	---	
	Vps39_341-1018	x	83	---	---	---	---	
	Vps39_517-1018	x	62	---	---	---	---	
	Vps39_877-1018	x	43	---	---	---	---	
	Vps39_517-1023	x	63	---	---	---	---	
Vps39_2-893	xx	108	---	---	---	---		
Vps39_874	x	117	---	---	---	---		
Vps39_875-974	xx	15	---	---	---	---		
Vps39_517-893	xx	48	---	---	---	---		
Vps39_877-893	xx	28	---	---	---	---		
Vps39_517-974	xx	58	---	---	---	---		
Vps39_877-974	xx	38	---	---	---	---		
Vps39_875-974	x/L97F	15	---	---	---	---		
Vps39_875-1040	xx	23	---	---	---	---		
Vps39_843-1040	xx	27	---	---	---	---		
Vps39_788-1049	xx	30	---	---	---	---		
Vps39_739-1049	xx	30	---	---	---	---		
<b>Vps41</b>	Vps41_2-992	x	116	---	---	---	---	
	Vps41_2-491	x	58	---	---	---	---	
	Vps41_117-992	x	103	---	---	---	---	
	Vps41_117-491	x	45	---	---	---	---	
	Vps41_117-430	x	28	---	---	---	---	
	Vps41_385-992	xx	72	x++	x	x	Nein	
	Vps41_385-921	xx	64	x++	x	x	Nein	
	Vps41_420-992	x	68	---	---	---	---	
	Vps41_491-992	xx	62	x++	x	x	Nein	
	Vps41_728-992	xx	34	---	---	---	---	
Vps41_728-921	xx	26	---	---	---	---		
Vps41_747-992	x	31	---	---	---	---		
Vps41_747-921	xx	24	---	---	---	---		
Vps41_214-992	x	89	---	---	---	---		
Vps41_420-920	x	66	---	---	---	---		
Vps41_117-398	x	34	---	---	---	---		
<b>Vps33</b>	Vps33_2-491	x	82	x	x	x		
	Vps33_2-176	xx	23	x++	x	x		
	Vps33_26-491	x	79	---	---	---	---	
	Vps33_26-176	xx	20	---	---	---	---	
	Vps33_175-491	xx	62	---	---	---	---	
	Vps33_199-491	x	19	---	---	---	---	
	Vps33_2-621	xx	75	---	---	---	---	
	Vps33_2-369	x	45	x	x	x		
	Vps33_2-444	x	77	---	---	---	---	
	Vps33_267-621	x	44	---	---	---	---	
Vps33_328-691	x	45	---	---	---	---		
Vps33_267-691	xx	52	---	---	---	---		
<b>Vps16</b>	Vps16_2-377	xx	96	x++	x	x		
	Vps16_2-315	x	39	x++	x geringe Ausbeute und Chaperone	x		
	Vps16_476-798	x	41	x++	x	x		
	Vps16_2-394	x	48	---	---	---	---	
	Vps16_348-798	x	56	---	---	---	---	
Vps16_502-798	x	38	---	---	---	---		





**Abb. 7.2: Konservierung des  $\beta$ -Propellers von Vps18.** Sequenzvergleich der N-terminalen Domäne von Vps18 in Eukaryoten. Aminosäurereste wurden nach dem ClustalX-Schema eingefärbt, d.h. konservierte Reste nach ihren chemischen Eigenschaften: hydrophobe in blau, basische in rot, ungeladene polare in grün, saure in magenta, hydrophile aromatische in cyan, Cys in rosa, Gly in orange und Pro in gelb. Vergrößerung der Abb. 4.9A.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångstrom (0,1 nm)
A	Adenin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CORVET	<i>class C core Vacuole/Endosome tethering</i>
C-terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DF	Durchfluss
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DP	Dialysepuffer
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (enhanced chemoluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HOPS	<i>homotypic fusion and vacuole protein sorting</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LMW	<i>Low molecular weight</i>
m	Masse
MAD	multiple anomale Dispersion
min	Minute(n)
MS	Massenspektroskopie

---

MW	Molekulargewicht
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
OD	optische Dichte
P	Pelletfraktion
PAGE	Polyarylamid- Gelelektrophorese
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethelenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pH	potential hydrogenii
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROI	<i>region of interest</i>
SAD	<i>single anomalous diffraction</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Se	Selen
SeMet	Seleno-L-Methionin
T	Thymin
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus Nla</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ü	Überstand
UV	Ultra-Violett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
$\lambda$	Wellenlänge des Lichts
z.B.	zum Beispiel

Ein- und Dreibuchstabencodes wurden gemäß den Empfehlungen der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) und der *International Union of Biochemistry* (IUB)1 als Abkürzungen für Aminosäuren verwendet.

## 9 Danksagung

Vielen Menschen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Diesen möchte ich meinen Dank aussprechen:

Udo Heinemann, Micheal Veit, Christian Ungermann, Ulrich Gohlke, Yvette Roske und Anja Schütz.

Sofia Banchenko, David Carter, Silke Kurths, Christina Iwert, Johanna Kuchta, Anna Luerick, Birgit Cloos, Harald Striegl, Florian Mayr, Jürgen Müller, Manfred Weiss, Janett Tischer, Tracy Dornblut, Daniela Tiburtius, Kathrin Schulte, Eva Rosenbaum, Claudia Haas, Andreas Knespel, Maria Schneider, Anup Arumughan und Qianqian Ming.

Meiner gesamten Familie, auch der angeheirateten.

Ein besonderer Dank geht dabei an meinen Ehemann Elmar.

## **10 Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere, die hier vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben.

Heide Behrmann

November 2014