

*Kristallographische und biochemische  
Charakterisierung des Golgi-assoziierten Proteins  
GRASP65 und seines Hefehomologen Grh1*

**Dissertation**

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

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

vorgelegt von Diplom-Biochemikerin  
Claudia Maria Haas  
aus Sindelfingen

Berlin, 2012

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2008 bis März 2012 in der Forschungsgruppe Makromolekulare Strukturen und Interaktionen (Leiter: Prof. Dr. Udo Heinemann) am Max-Delbrück-Centrum (MDC) für Molekulare Medizin, Berlin-Buch, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Veit

Disputation am: 14.06.2012

## **Selbstständigkeitserklärung**

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b> .....	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 INTRAZELLULÄRER VESIKELTRANSPORT .....	1
1.1.1 <i>Clathrin</i> .....	3
1.1.2 <i>COP-Vesikelhüllen</i> .....	3
1.1.3 <i>COPII</i> .....	3
1.1.4 <i>COPI</i> .....	4
1.1.5 <i>Anheftungsfaktoren (tethering factors)</i> .....	4
1.1.6 <i>Coiled-coil Anheftungsfaktoren</i> .....	5
1.1.7 <i>Anheftungskomplexe (multi-subunit tethering complexes)</i> .....	5
1.1.8 <i>Membranfusion vermittelt durch SNAREs</i> .....	7
1.2 GOLGI-APPARAT .....	8
1.2.1 <i>Golgine – Coiled-coil Proteine am Golgi-Apparat</i> .....	10
1.2.1.1 GM130 – Ein Golgin am <i>cis</i> -Golgi-Apparat .....	11
1.2.1.2 Bug1 – Das Hefehomolog zu GM130 .....	12
1.2.2 <i>GRASP-Proteine</i> .....	12
1.2.2.1 Domänenarchitektur der GRASP-Proteine .....	13
1.2.2.2 Rolle der GRASP-Proteine im Aufbau des Golgi-Apparates .....	14
1.2.2.3 GRASP65 .....	15
1.2.2.4 GRASP55 .....	16
1.2.2.5 Grh1 .....	17
1.3 PDZ-DOMÄNEN .....	18
1.3.1 <i>Vorkommen</i> .....	18
1.3.2 <i>Proteine mit PDZ-Domänen</i> .....	19
1.3.3 <i>Ligandenbindung</i> .....	21

1.3.4	<i>Krankheitsrelevante Mutanten</i> .....	21
1.4	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT .....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>23</b>
2.1	GERÄTE .....	23
2.2	CHEMIKALIEN UND KITS .....	24
2.2.1	<i>Chemikalien</i> .....	24
2.2.2	<i>Kits</i> .....	25
2.3	BAKTERIENSTÄMME UND CDNS .....	25
2.3.1	<i>Stämme</i> .....	25
2.3.2	<i>cDNS</i> .....	25
2.4	PRIMER .....	26
2.4.1	<i>Primer für Klonierung GRASP65</i> .....	26
2.4.2	<i>Primer für Mutagenese GRASP65</i> .....	26
2.4.3	<i>Primer für Klonierung Grh1</i> .....	27
2.5	PEPTIDE .....	27
2.6	NÄHRMEDIEN UND LÖSUNGEN .....	28
2.6.1	<i>Nährmedien</i> .....	28
2.6.2	<i>Lösungen</i> .....	29
2.6.2.1	Molekularbiologie .....	29
2.6.2.2	Proteinreinigung.....	29
2.6.2.3	Interaktionsstudien – ITC .....	30
2.6.2.4	SDS-PAGE .....	30
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>32</b>
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	32
3.1.1	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i> .....	32
3.1.2	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	33
3.1.3	<i>Reinigung von PCR-Produkten</i> .....	33
3.1.4	<i>Bestimmung der DNS-Konzentration</i> .....	34
3.1.5	<i>Ligationsunabhängige Klonierung</i> .....	34
3.1.6	<i>Transformation chemokompetenter E. coli-Zellen</i> .....	34
3.1.7	<i>Plasmid-Präparation</i> .....	34
3.1.8	<i>Mutagenese</i> .....	35
3.1.9	<i>DNS-Sequenzierung</i> .....	36
3.1.10	<i>Konstrukte</i> .....	36
3.2	PROTEINREINIGUNG .....	38

3.2.1	<i>Expression in Escherichia coli</i> .....	38
3.2.2	<i>Zellaufschluss</i> .....	38
3.2.3	<i>Proteinreinigung durch Nickel-Nitrilotriacetat Agarose (Ni-NTA)</i> .....	38
3.2.4	<i>Größenausschlusschromatographie</i> .....	39
3.3	PROTEINCHARAKTERISIERUNG.....	40
3.3.1	<i>SDS-PAGE</i> .....	40
3.3.2	<i>Proteinkonzentration</i> .....	40
3.3.3	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i> .....	41
3.3.4	<i>Massenspektrometrie</i> .....	41
3.3.5	<i>Statische Lichtstreuung</i> .....	42
3.3.6	<i>Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)</i> .....	43
3.3.7	<i>Circulardichroismus</i> .....	45
3.4	KRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN .....	46
3.4.1	<i>Methode der Proteinkristallisation</i> .....	46
3.4.2	<i>Durchführung Kristallisation</i> .....	48
3.4.3	<i>Röntgenbeugungsexperiment</i> .....	48
3.4.4	<i>Phasenbestimmung und Berechnung der Elektronendichte</i> .....	51
3.4.5	<i>Anomale Diffraktion</i> .....	52
3.4.6	<i>Molekularer Ersatz (MR)</i> .....	54
3.4.7	<i>Modellbau und Strukturverfeinerung</i> .....	55
3.5	ERSTELLUNG DES BINDUNGSMODELLS VON GRASP65 UND GM130 .....	56
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>57</b>
4.1	STRUKTUREN DER PDZ-DOMÄNEN GRASP65 <sup>PDZ1</sup> UND GRASP65 <sup>PDZ2</sup> DES GOLGI-ASSOZIERTEN PROTEINS GRASP65 .....	57
4.1.1	<i>Rekombinante Expression und Reinigung</i> .....	57
4.1.2	<i>Kristallisation von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup></i> .....	61
4.1.3	<i>Datensammlung, Strukturbestimmung und Strukturverfeinerung</i> .....	62
4.1.4	<i>Kristallstruktur von GRASP65<sup>PDZ1</sup></i> .....	65
4.1.5	<i>Kristallstruktur von GRASP65<sup>PDZ2</sup></i> .....	66
4.1.6	<i>Vergleich von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup></i> .....	68
4.1.7	<i>Dimerisierung von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup></i> .....	69
4.1.8	<i>Die GRASP-Domäne</i> .....	71
4.2	GRH1 – GRASP65 HOMOLOGES PROTEIN 1 AUS <i>S. CEREVISIAE</i> .....	74
4.2.1	<i>Rekombinante Expression und Reinigung</i> .....	74
4.2.2	<i>Kristallisation von Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup></i> .....	76

4.2.3	<i>Datensammlung und Strukturbestimmung</i> .....	77
4.2.4	<i>Kristallstruktur der ersten PDZ-Domäne von Grh1</i> .....	80
4.2.5	<i>Dimerisierung von Grh1<sup>PDZ1ΔBB</sup></i> .....	83
4.3	INTERAKTIONSSUDIEN .....	84
4.3.1	<i>Interaktion von GRASP65-Konstrukten mit GM130-Peptiden</i> .....	84
4.3.1	<i>Interaktion von Grh1 mit Bug1- bzw. Uso1-Peptiden</i> .....	89
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>91</b>
5.1	STRUKTURANALYSE .....	91
5.1.1	<i>Strukturen von GRASP65</i> .....	91
5.1.2	<i>Struktur von Grh1<sup>PDZ1ΔBB</sup></i> .....	91
5.1.3	<i>PDZ-Domänen im Vergleich</i> .....	92
5.2	MODELL DER BINDUNG VON GRASP65 AN DAS GOLGIN GM130 .....	95
5.3	BIOCHEMISCHE ANALYSE VON GRH1 .....	100
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b> .....	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>102</b>
<b>ANHANG</b>	.....	<b>A</b>
A.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	A
B.	DANKSAGUNG.....	D
C.	LEBENS LAUF.....	E

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über den intrazellulären Vesikeltransport..	1
Abbildung 2: Abknospung und Fusion von Transportvesikeln in einer eukaryotischen Zelle...	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Golgi-Apparates .....	8
Abbildung 4: Der Golgi-Apparat in den Knosphefen. ....	9
Abbildung 5: Domänenarchitektur und Übersicht der Funktionen von GRASP65. ....	15
Abbildung 6: Domänenstruktur von Grh1.....	17
Abbildung 7: Struktur der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 und ihrer Ligandenbindungstasche .....	19
Abbildung 8: Beispiele von Proteinen, die mehrere PDZ-Domänen oder PDZ-Domänen in Kombination mit anderen Domänen enthalten.....	20
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Zielstellung dieser Arbeit.....	22
Abbildung 10: Schematische Abbildung eines isothermen Titrationskalorimeters.....	44
Abbildung 11: Phasendiagramm der Kristallisation.....	46
Abbildung 12: Darstellung des Braggschen Gesetzes. ....	50
Abbildung 13: Ewald-Konstruktion.....	50
Abbildung 14: (A) Harker-Konstruktion für die Phasenbestimmung mit einem Schweratom- Derivat. (B) Argand-Diagramm für anomale Diffraktion.....	53
Abbildung 15: Übersicht der Domänenarchitektur von GRASP65.....	58
Abbildung 16: Reinigungsprofil von GRASP65 <sup>PDZ1</sup> .....	59
Abbildung 17: Reinigungsprofil von GRASP65 <sup>PDZ2</sup> .....	59
Abbildung 18: GRASP65-Kristalle, von denen Diffraktionsdaten aufgenommen wurden .....	61
Abbildung 19: Kristallstruktur von GRASP65 <sup>PDZ1</sup> .....	65
Abbildung 20: Elektrostatisches Oberflächenpotential von GRASP65 <sup>PDZ1</sup> .....	66
Abbildung 21: Kristallstruktur von GRASP65 <sup>PDZ2</sup> .....	67
Abbildung 22: Elektrostatisches Oberflächenpotential von GRASP65 <sup>PDZ2</sup> .....	67
Abbildung 23: Vergleich der PDZ-Domänen GRASP65 <sup>PDZ1</sup> und GRASP65 <sup>PDZ2</sup> .....	68
Abbildung 24: Dimerisierung von GRASP65 <sup>PDZ1</sup> und GRASP65 <sup>PDZ2</sup> .....	70
Abbildung 25: Sequenzanpassung der GRASP-Domänen von GRASP65 und GRASP55 ...	72
Abbildung 26: Vergleich der GRASP65-Domänen von GRASP65 und GRASP55.....	73
Abbildung 27: Domänenübersicht von Grh1 .....	74
Abbildung 28: Reinigungsprofil von Grh1 <sup>PDZ1ΔBB</sup> .....	75
Abbildung 29: Kristalle von Grh1 <sup>PDZ1ΔBB</sup> .....	77

Abbildung 30: Anomale Elektronendichtekarte der intrinsischen Schwefel von Grh <sup>1PDZ1ΔβB</sup> und der gebundenen Chlorid-Ionen.....	78
Abbildung 31: Kristallstruktur von Grh <sup>1PDZ1ΔβB</sup> .....	80
Abbildung 32: Strukturelle und sequenzielle Überlagerung von GRASP65 <sup>PDZ1</sup> und Grh <sup>1PDZ1ΔβB</sup> .....	81
Abbildung 33: Elektrostatisches Oberflächenpotential von Grh <sup>1PDZ1ΔβB</sup> .....	82
Abbildung 34: Dimer von Grh <sup>1PDZ1ΔβB</sup> .....	83
Abbildung 35: Titrations von GRASP65-Konstrukten mit dem GM130-Peptid <sup>N</sup> VKITVI <sup>C</sup> .....	86
Abbildung 36: ITC-Interaktionsstudie von Grh1 mit dem C-terminalen Peptid von Bug1.....	90
Abbildung 37: PDZ-Domänen im Vergleich .....	93
Abbildung 38: Vergleich der Sekundärstrukturelementeorganisation humaner und bakterieller PDZ-Domänen.....	94
Abbildung 39: Modell der GRASP-Domäne von GRASP65 mit gebundenem GM130- Peptid.....	97
Abbildung 40: Konformation der GRASP-Domäne von GRASP65 .....	98
Abbildung 41: Detailansichten der Bindungstasche von GRASP65 .....	99
Abbildung 42: Detailansicht der Interaktion des GM130-Peptids und des β-Strangs βB .....	99
Abbildung 43: Graphische Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit.....	101

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Anheftungskomplexe ( <i>multi-subunit tethering complexes</i> ) .....	6
Tabelle 2: Klassifizierung der Golgine. ....	11
Tabelle 3: Peptidübersicht, der C-terminalen Peptide von Bug1, Uso1 und GRASP65.....	28
Tabelle 4: PCR mit <i>Pfu</i> Polymerase .....	32
Tabelle 5: Kolonie-PCR mit <i>Taq</i> Polymerase.....	32
Tabelle 6: Reaktionsprofil Standard-PCR .....	33
Tabelle 7: Zusammensetzung der Mutageneseansätze.....	35
Tabelle 8: PCR-Protokoll für die Mutagenese.....	36
Tabelle 9: Verwendete GRASP65-Konstrukte. ....	37
Tabelle 10: Verwendete Grh1-Konstrukte.....	37
Tabelle 11: Ausbeuten an gereinigtem Protein der unterschiedlichen GRASP65-Konstrukte.....	60
Tabelle 12: Auflistung der Matthews-Koeffizienten, des Lösungsmittelgehalts und der initialen $R_{work}$ -Werte von GRASP65 <sup>PDZ1</sup> und GRASP65 <sup>PDZ2</sup> . ....	62
Tabelle 13: Daten- und Verfeinerungstatistiken von GRASP65 <sup>PDZ1</sup> und GRASP65 <sup>PDZ2</sup> .....	64
Tabelle 14: Sequenzidentitätsvergleich zwischen GRASP55 und GRASP65. ....	72
Tabelle 15: Übersicht der gereinigten Konstrukte von Grh1.....	76
Tabelle 16: Daten- und Verfeinerungsstatistik von Grh1 <sup>PDZ1ΔBB</sup> .....	79
Tabelle 17: Übersicht der ITC-Messungen. ....	85
Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der ITC-Messungen der GRASP65-Konstrukte und GM130-Peptide. ....	88
Tabelle 19: Übersicht der Grh1-Konstrukte für die ITC-Interaktionsstudien. ....	89
Tabelle 20: Sequenzieller und struktureller Vergleich verschiedener PDZ-Domänen. ....	92

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung der homologen Proteine GRASP65 (*Homo sapiens*) und Grh1 (*Saccharomyces cerevisiae*) mittels Röntgenkristallographie, sowie die Untersuchung des Bindemechanismus von GRASP65•GM130 und Grh1•Bug1 bzw. Grh1•Uso1.

GRASP65 ist in der Stapelung von Golgi-Zisternen involviert und befindet sich an der *cis*-Seite des Golgi-Apparates. Durch Interaktion mit dem Golgin GM130 vermittelt GRASP65 das Andocken von Transportvesikeln an die Golgi-Membran. Grh1 ist das GRASP65-Homolog in der Knosphefe *Saccharomyces cerevisiae*. Wie sein humanes Pendant ist auch Grh1 am Golgi-Apparat lokalisiert. Beide Proteine können in zwei Regionen unterteilt werden: eine N-terminale GRASP- und eine C-terminale SPR-Domäne, wobei die GRASP-Domäne wiederum in zwei PDZ-Domäne unterteilt wird.

Die Strukturanalyse der beiden einzelnen PDZ-Domänen von GRASP65, GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup> zeigt für beide Strukturen eindeutig eine  $\beta$ -sandwich Faltung, wie sie auch für andere PDZ-Domänen beschrieben wurde.

Es wurden Bindungsstudien von GRASP65 mit dem bekannten Interaktionspartner GM130 durchgeführt. Im Gegensatz zu bereits publizierten Daten konnte keine Bindung von GM130-Peptiden an die zweite PDZ-Domäne von GRASP65 nachgewiesen werden. Für eine Interaktion mit GM130 ist die vollständige GRASP-Domäne notwendig. Die Bindungskonstante dieser Interaktion liegt mit  $K_D=10,0 \pm 2,9 \mu\text{M}$  innerhalb des Bereiches, der auch für andere PDZ-Peptid-Interaktionen ermittelt wurde.

Da eine Co-Kristallisation der GRASP-Domäne von GRASP65 und GM130 nicht möglich war, wurden in einem Modell die beiden kristallographisch bestimmten PDZ-Domänen von GRASP65 zu einer GRASP-Domäne kombiniert und das GM130-Peptid eingepasst. Es zeigte sich das typische Bindungsmuster eines Klasse I-Peptids in die Peptid-Bindungstasche einer PDZ-Domäne, das mit Funktionsstudien anderer PDZ-Domänen gut in Einklang zu bringen ist.

Der strukturelle Vergleich von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und der ersten PDZ-Domäne von Grh1, Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$ BB</sup>, zeigt große Übereinstimmungen. Bisher konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, welche Funktion Grh1 in Hefe hat, denn die Knosphefe verfügt, im Gegensatz zu Säugerzellen, über keine zu Golgi-Stapeln organisierten Zisternen. Daher wirft das Vorkommen eines Proteins, das in die Stapelung von Golgi-Zisternen involviert

ist, Fragen zu seiner Funktion auf. Bindungsstudien, analog zu GRASP65, mit potentiellen Interaktionspartnern von Grh1 wie Bug1 und Uso1, sollten Hinweise auf eine mögliche Funktion geben. Obwohl eine Vielzahl unterschiedlicher Grh1-Konstrukte hergestellt und getestet wurde, konnte keine der Interaktionen bestätigt werden. Die Frage der genauen Funktion von Grh1 bleibt offen.

## Abstract

The aim of this study was to structurally characterize the homologous proteins GRASP65 (*Homo sapiens*) and Grh1 (*Saccharomyces cerevisiae*) by X-ray crystallography as well as to analyze the binding mechanism of GRASP65•GM130 and Grh1•Bug1 or Grh1•Uso1.

GRASP65 localizes to the *cis* side of the Golgi apparatus and part of the Golgi cisternae stacking machinery. Due to its interaction with GM130, GRASP65 is involved in the docking of transport vesicles to the Golgi membrane. Like its human homologue, Grh1 also localizes to the Golgi apparatus. Both proteins, GRASP65 and Grh1, can be divided into two different regions: an N-terminal GRASP domain and a C-terminal SPR domain. The GRASP domain can be further separated into two PDZ domains.

Crystal structures of both single PDZ domains of GRASP65 were determined. GRASP65<sup>PDZ1</sup> as well as GRASP65<sup>PDZ2</sup> reveal a  $\beta$ -sandwich fold typical for PDZ domains. We analyzed the interaction between GRASP65 and GM130 by ITC measurements to obtain binding constants. Earlier experiments demonstrated that GM130 interacts with the second PDZ domain of GRASP65. In our study the complete GRASP domain of GRASP65 was necessary for interaction with GM130. The binding constant of  $K_D=10.0 \pm 2.9 \mu\text{M}$  is of the same magnitude as seen for other PDZ-peptide interactions.

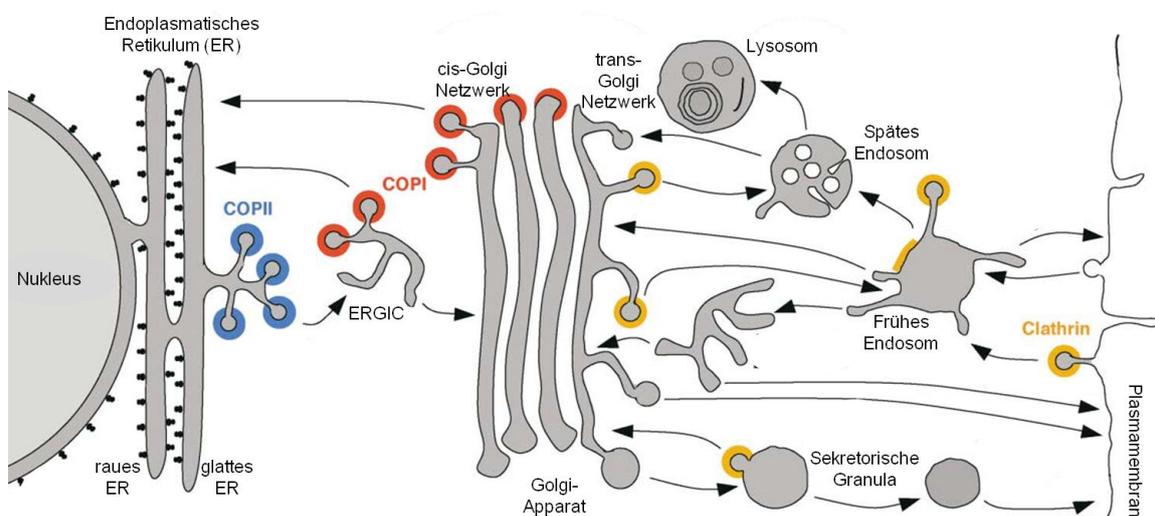
Co-crystallization of the GRASP domain of GRASP65 and GM130 was not possible. Therefore, we combined *in silico* the single PDZ domains of GRASP65 to obtain a complete GRASP domain model where upon the GM130 peptide was docked. Our model demonstrates typical binding between a class I peptide and a ligand-binding pocket.

During this work the structure of Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta\beta$</sup>  was also determined. Superposition shows high structural similarity between GRASP65<sup>PDZ1</sup> and Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta\beta$</sup> . So far, the function of Grh1 is not known in detail. Golgi stacks are not observed in budding yeast – in contrast to mammalian cells – but the Golgi stacking protein Grh1 is present in budding yeast. In analogy to GRASP65, binding studies with peptides from potential interaction partners Bug1 and Uso1 would have provided insight into the function of Grh1. However, we could not confirm binding with our designed constructs. Thus, the question about the biological function of Grh1 remains open.

# 1 Einleitung

## 1.1 Intrazellulärer Vesikeltransport

Im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen, deren Austausch von Molekülen und Signalen mit ihrer Umgebung ausschließlich über die Plasmamembran geschieht, besitzen Eukaryoten ein komplexes Membransystem. Dieses ist über Endozytose fähig, Moleküle aus seiner Umgebung aufzunehmen und, über den sekretorischen Weg modifiziert, über Exozytose wieder an die Umgebung abzugeben. Der Molekülaustausch zwischen den einzelnen Organellen findet durch den Vesikeltransport statt. Die dadurch verbundenen Zellkompartimente werden in eukaryotischen Zellen unter dem Begriff des Endomembransystems zusammengefasst. Dazu zählen das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Plasmamembran, die Kernhülle, die Endosomen, Vakuolen, Lysosomen und die Transportvesikel selbst. Nicht zum Endomembransystem gehören die Mitochondrien, Plastiden, Peroxysomen und Chloroplasten.

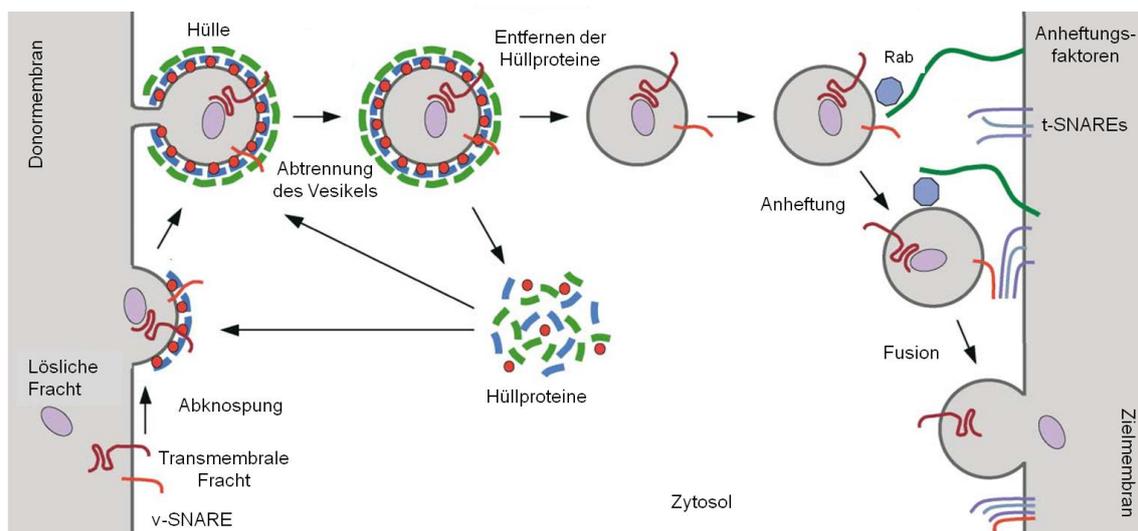


**Abbildung 1: Übersicht über den intrazellulären Vesikeltransport. Die Richtungen der Transportwege (sekretorisch, lysosomal und endozytotisch) zwischen den Kompartimenten sind mit Pfeilen dargestellt. Die Hüllproteine der Vesikel sind in blau (COPII), rot (COPI) und gelb (Clathrin) dargestellt (1).**

Für den gerichteten Transport von Membranbestandteilen, Proteinen und anderen löslichen Molekülen, der sogenannten Fracht, werden drei streng regulierte

Transportwege unterschieden (Abbildung 1); die Endozytose, die der Aufnahme von Molekülen an der Plasmamembran dient, ebenso wie der Translokation und Internalisierung von Rezeptoren; der lysosomale Transport, der den Abbau endogener und exogener Moleküle bewerkstelligt; und der sekretorische Transport, der neu synthetisierte Proteine über verschiedene Organellen an die Zelloberfläche transportiert.

Beim sekretorischen Transport werden die Vesikel an der Donormembran von Hüllproteinen umgeben, die sich aus zytosolischen Proteinen zusammensetzen und über supramolekulare Strukturen für die Selektion und den gerichteten Transport der Fracht sorgen (Abknospen). In Säugern und in *Saccharomyces cerevisiae* werden zwei Klassen von Hüllproteinen unterschieden: Clathrin- und COP-(*coat protein*) Hüllen. An der Zielfmembran angekommen erfolgt die Anheftung der Vesikel an die Membran durch sogenannte Anheftungsfaktoren (*tethering factors*). Auch hier gibt es zwei verschiedene Klassen: die langen *coiled-coil* Anheftungsfaktoren und die multimeren Anheftungskomplexe. Die letztendliche Fusion der Vesikel mit der Zielfmembran erfolgt dann über SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), die durch einen reißverschlussartigen Mechanismus die Vesikel- und Zielfmembran so in räumliche Nähe bringen, dass eine Fusion der beiden Membranen erfolgen kann. Eine schematische Übersicht des Vesikeltransportes ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Abknospung und Fusion von Transportvesikeln in einer eukaryotischen Zelle (1).**

### 1.1.1 Clathrin

Die als erste und am besten charakterisierten Hüllproteine von Vesikeln sind die Clathrine (2). Clathrin beschichtete Vesikel (**clathrin coated vesicles (CCVs)**) finden sich im Proteintransport des *trans*-Golgi Netzwerkes (TGN) in Richtung der späten Endosomen und den Lysosomen. Außerdem werden CCVs an der Plasmamembran gebildet und sind im Proteintransport zwischen der Plasmamembran und den frühen Endosomen involviert. Hauptkomponente der CCVs ist Clathrin selbst. Aus je drei schweren (190 kDa) und drei leichten (25 kDa) Polypeptidketten entsteht das sogenannte *Triskelion* (Dreibein), eine Untereinheit, die sich zu einem polyedrischen Gitter zusammenlagern und so eine Art Käfig um die Vesikel ausbildet (3-5). Die Verbindung zwischen Membran und Vesikeln wird über Adapterproteinkomplexe hergestellt, die an die schweren Ketten des Clathrins und an Membranlipide und Membranproteine binden. Die Art des Adapterproteinkomplexes, d.h. seine Spezifität, hängt dabei von der Zusammensetzung der Membran ab, von der sich die CCVs abschnüren. Dabei binden die Adapterproteinkomplexe an die schweren Ketten des Clathrins. Aktuell sind vier verschiedenen Komplexe bekannt: AP-1 (6), AP-2 (7), AP-3 (8) und AP-4 (9). Durch Interaktion mit Transmembranrezeptoren wird durch die Adapterproteinkomplexe die Aufnahme von Frachtmolekülen vermittelt (10).

### 1.1.2 COP-Vesikelhüllen

COP-umhüllte (**coat protein complex**) Vesikel finden sich, anders als die Clathrin umhüllten Vesikel, im sekretorischen Transport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat. In Säugetieren unterscheidet man zwischen den COPI- und den COPII-Vesikeln. Die COPI-Vesikel sind am retrograden Transport von Proteinen beteiligt, welcher unter anderem für die Rückgewinnung von Proteinen vom *cis*-Golgi in Richtung ER verantwortlich ist. Auch sind COPI-Vesikel am Rücktransport von Proteinen, die im Golgi-Apparat modifiziert wurden und nun an das ER zurücktransportiert werden, beteiligt. COPII-Vesikel übernehmen den anterograden Transport vom ER zum *cis*-Golgi (11-13).

### 1.1.3 COPII

COPII Proteinkomplexe sind Hüllproteine, die am anterograden Transport beteiligt sind, d.h. am Transport von den *exit sites* des ER zum ERGIC (**ER-Golgi intermediate**

*compartment*) oder dem Golgi-Apparat. Aufgebaut sind die COPII-Hüllen aus dem Heterodimer Sec23p•Sec24p und dem Heterodimer Sec13•Sec31p (12). Die Bezeichnung der Untereinheiten leitet sich dabei aus der Terminologie der Hefeproteine ab, da die COPII-Hüllproteine im Modellorganismus *S. cerevisiae* durch den sogenannten Sec-Mutanten-Screen (**secretion defective**) charakterisiert wurden. Homologe zu den genannten Proteinen finden sich, einschließlich denen von Säugern, in höheren Eukaryoten (14). Am Aufbau der Vesikelhüllen aus COPII-Proteinen ist eine GTPase, Sar1p, involviert (15,16). Zusätzlich sind noch Sec16p (17), ein mutmaßliches Gerüstprotein, und Sec12p, ein GEF (**guanine nucleotide exchange factor**) für Sar1p, am Aufbau der COPII Vesikelhülle beteiligt (18). Die Zusammensetzung der Vesikel aus Sar1p•GTP, Sec23p•Sec24p und Sec13p•Sec31p erfolgt direkt an den ER *exit sites*, wo die neusynthetisierten Proteine das ER verlassen. Transmembranale Fracht bindet dann meist direkt an COPII, während lösliche Frachtproteine indirekt über Exportrezeptoren mit COPII interagieren (19,20). Nach dem Beladen werden die Vesikel von der Donormembran abgeschnürt, wobei bis dato noch nicht geklärt ist wie dieser Prozess genau vonstatten geht.

#### 1.1.4 COPI

COPI-Proteinkomplexe (**coat protein complex I**) stellen die Hüllproteine für Vesikel im retrograden Vesikeltransport dar, d.h. COPI umhüllte Vesikel transportieren Fracht von der *cis*-Seite des Golgi-Apparats zurück zum ER und sorgen auch für den Transport innerhalb der Golgi-Zisternen. Die COPI-Vesikelhülle (*Coatamer*) besteht aus sieben verschiedenen Untereinheiten:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\gamma$ - und  $\zeta$ -COP. Dieses Heptamer komplexiert mit der GTPase Arf1 (**ADP ribosylation factor 1**), GTP und der zytoplasmatischen Domäne von p23 (21). Wie COPII erkennt auch COPI Signalsequenzen der Frachtproteine und kann so den gerichteten Transport vom ERGIC oder Golgi-Apparat Richtung ER ausführen.

#### 1.1.5 Anheftungsfaktoren (**tethering factors**)

Wie bereits zuvor erwähnt (Kapitel 1.1) gibt es zwei Gruppen von Anheftungsfaktoren: die langen homodimeren, *coiled-coil* Proteine und die Anheftungskomplexe bestehend aus mehreren Untereinheiten (*multi-subunit tethering complexes*) (22,23). Nach dem Transport der Vesikel entlang von Aktinfilamenten oder Mikrotubuli, angetrieben durch

Motorproteine wie z.B. Myosin, Dynein oder Kinesin, sorgen die Anheftungsfaktoren für den initialen Kontakt zwischen Transportvesikel und Zielmembran.

### 1.1.6 *Coiled-coil* Anheftungsfaktoren

Prominentestes Beispiel für einen *coiled-coil* Anheftungsfaktor ist Uso1 aus *S. cerevisiae* bzw. sein Säugerhomolog p115. Beide Proteine bestehen aus einer großen N-terminalen Domäne (*globular head region*), einem langen *coiled-coil* Teil und einer aziden Region am C-Terminus. Über Rab1 als Membranrezeptor wird die Interaktion des N-Terminus von p115 mit COPII initiiert (24,25). Über eine Interaktion mit GM130, das an den Membrananker GRASP65 gebunden ist, und Giantin, zwei weiteren *coiled-coil* Anheftungsfaktoren, kommt es zur Interaktion mit der Zielmembran, dem *cis*-Golgi (26).

Auf Seiten der frühen Endosomen sind zwei Anheftungsfaktoren bekannt: EEA1 (*early endosome antigen 1*) ist mit den frühen Endosomen assoziiert und in die Fusion mit anderen Endosomen oder endozytotischen Vesikeln involviert (27); Radaptin5 kommt ebenfalls an den frühen Endosomen vor und interagiert, ebenso wie p115, mit einer GTPase, in diesem Fall Rab5 (28).

### 1.1.7 Anheftungskomplexe (*multi-subunit tethering complexes*)

Derzeit sind acht Anheftungskomplexe bekannt, die alle erstmalig in Hefen identifiziert wurden: der Exozyst, zwei Klasse C Vps- (*vesicular protein sorting*) Komplexe, HOPS (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*) und CORVET (*class C core vacuole/endosome tethering*), der GARP-Komplex (*Golgi-associated retrograde protein*, oder VFT- (*Vps fifty three*)), der COG-Komplex (*conserved oligomeric Golgi*), TRAPPI und TRAPP II (*transport protein particle*), sowie der DSL-Komplex (*Dependence on SLY1-20*). Mittlerweile wurden auch homologe Komplexe in allen anderen eukaryotischen Organismen gefunden. In Tabelle 1 werden sie einschließlich ihrer Untereinheiten, der Namen ihrer Homologen in Säugerzellen, ihrer Funktion und interagierenden GTPasen, soweit bekannt, aufgelistet.

Tabelle 1: Übersicht über die Anheftungskomplexe (*multi-subunit tethering complexes*).

Anheftungs-komplex	Untereinheiten in <i>S. cerevisiae</i>	Homologe in <i>H. sapiens</i>	Funktion	GTPasen in <i>S. cerevisiae</i>
<b>Exozyst</b>	Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p, Exo70p, Exo84p	Wie in <i>S. cerevisiae</i>	Verbindet post-Golgi-Vesikel mit der Plasmamembran (29-32)	Sec4p (33)
<b>HOPS</b>	Vps11p, Vps16p, Vps18p, Vps33p, Vps41p, Vam6p	Wie in <i>S. cerevisiae</i>	Anheftungsfaktor bei der Fusion von Vakuolen, tritt als Effektor und als GEF auf (34,35)	Ypt7p
<b>CORVET</b>	Vps11p, Vps16p, Vps18p, Vps33p, Vps8p, Vps3p	Wie in <i>S. cerevisiae</i> , kein Vps3p Homolog bekannt	Lokalisiert an den endosomalen Membranen, Funktion ähnlich der des HOPS-Komplexes (36)	Vps21p
<b>GARP</b>	Vps54p, Vps53p, Vps52p, Vps51p (nicht in trimeren Komplex involviert, peripher an Membran assoziiert)	Kein Vps51p Homolog bekannt	Retrograder Transport von den späten Endosomen zum Golgi-Apparat, rekrutiert durch GTPase Ypt6p (37,38)	
<b>COG</b>	COG1-COG8 (39)	Wie in <i>S. cerevisiae</i>	Anheftung von Vesikeln an Golgi-Membranen, involviert in Glykosylierungen, Bindeglied zwischen <i>coiled-coil</i> Anheftungsfaktoren und Anheftungskomplexen (40,41)	
<b>TRAPPI</b>	Bet3p, Bet5p, Trs20p, Trs23p, Trs31p, Trs33p, Trs85p	Nur ein TRAPP-Komplex bekannt (Bet3, Bet5, Trs20, Trs23, Trs31, Trs33, Trs85, NIBP, Ehoc-1 (42,43))	<i>Cis</i> -Golgi, vermittelt Anheftung von COPII-Vesikeln an Golgi, fungiert als GEF in <i>S. cerevisiae</i> (44-46); Fusion von COPII-Vesikeln, Aufbau ERGIC in <i>H. sapiens</i> (47)	Ypt1p, Ypt31/32p
<b>TRAPPII</b>	Bet3p, Bet5p, Trs20p, Trs23p, Trs31p, Trs33p, Trs85p, Trs65p, Trs120p, Trs130p (48)		Medialer und <i>trans</i> -Golgi, spielt evtl. Rolle im endosomalen Transport (49)	
<b>DSL</b>	Dsl1p, Dsl3p/Sec39, Tip20p, Sec20p (Q-SNARE)	NAG, ZW10, RINT1 (50,51)	Anheftungsfaktor am ER, Sec20p agiert als Q-SNARE während der Fusion (52)	

### 1.1.8 Membranfusion vermittelt durch SNAREs

SNARE-Proteine spielen eine Schlüsselrolle in der Fusion von Vesikeln mit der Zielmembran während des Vesikeltransportes. SNARE-Proteine bilden eine Superfamilie mit über 60 Mitgliedern in *Homo sapiens* und in *Saccharomyces cerevisiae* (53). Die relativ einfache Domänenstruktur besitzt als Kernelement das SNARE-Motiv bestehend aus 60-70 Aminosäuren, die in sogenannten *heptad repeats* angeordnet sind, wobei das Sequenzmotiv der *heptad repeats* folgendermaßen aufgebaut ist: HPPHCPC (H: hydrophob, P: polar, C: geladen). Ein Großteil der SNARE-Proteine besitzt am C-Terminus eine Transmembrandomäne, die das Protein in der Membran verankert. Auch können, je nach Untergruppe, weitere Domänen N-terminal des SNARE-Motivs vorliegen (54,55).

An der Fusion des Vesikels mit der Zielmembran sind mehrere SNARE-Proteine beteiligt. Auf Seiten der Vesikelmembran v-SNAREs (*vesicle-membrane* SNAREs) und auf der Seite der Zielmembran t-SNAREs (*target-membrane* SNAREs). Diese grobe Unterteilung der SNARE-Proteine wurde in den letzten Jahren von einer verfeinerten Version abgelöst. Liegen die SNARE-Proteine als Monomere vor, so sind die SNARE-Motive meist unstrukturiert. Durch die Interaktion mit anderen SNARE-Motiven erfolgt eine Strukturierung und die Ausbildung eines Kernkomplexes (*core complex*) (56). Dieser Kernkomplex ist äußerst stabil und kann nur unter ATP-Verbrauch und mit Hilfe des Proteins NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) dissoziieren.

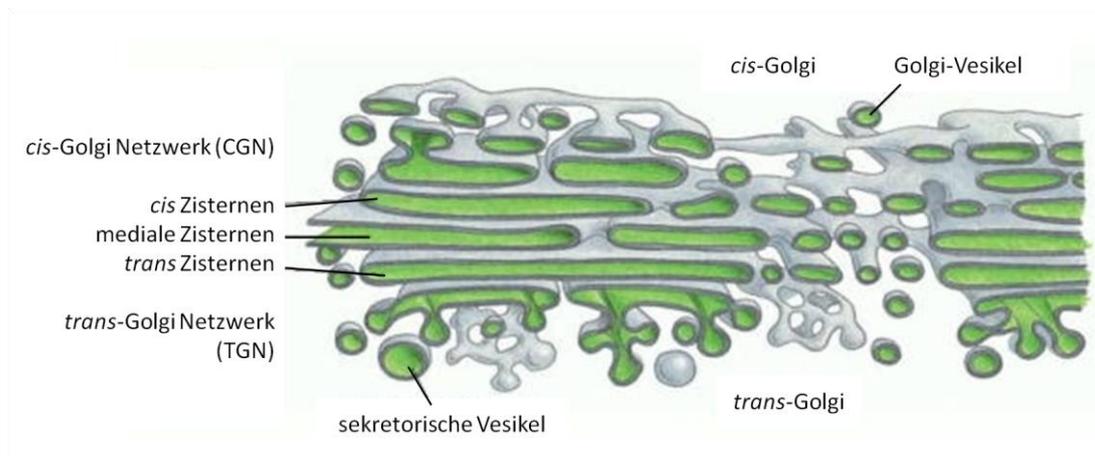
Der Kernkomplex besteht aus einem Vier-Helix-Bündel, wobei jede Helix in diesem Bündel von einem anderen SNARE-Motiv stammt. Im Zentrum des Bündels befinden sich 16 Schichten übereinander liegender meist hydrophober Seitenketten, wobei die zentrale „0“-*layer* drei konservierte Glutamine (Q) und ein konserviertes Arginin (R) enthält. Über die Position dieser konservierten Reste können nun die SNARE-Proteine in die vier Klassen Q<sub>a</sub>-, Q<sub>b</sub>-, Q<sub>c</sub>- und R-SNAREs eingeteilt werden (14,57). Die Ausbildung des Kernkomplexes, ausgehend von den N-Termini der Proteine, setzt sich reißverschlussartig bis zu den C-Termini fort, wodurch die Vesikelmembran in räumliche Nähe zur Zielmembran gebracht wird, was letztendlich in der Fusion beider Membranen resultiert. Durch NSF und den Kofaktor SNAP (*soluble NSF-attachment protein*) werden die SNARE-Motive freigesetzt, sobald das Vesikel mit der Membran verbunden ist und der Prozess der Vesikelfusion ist abgeschlossen.

## 1.2 Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat ist ein membranumschlossenes Organell innerhalb von eukaryotischen Zellen, das 1898 von dem Pathologen Camillo Golgi entdeckt und als eines der ersten Organellen lichtmikroskopisch beschrieben wurde (58).

Aufgebaut ist der Golgi-Apparat aus den Golgi-Stapeln, die aus je vier bis sechs, bei einzelligen Flagellaten bis zu 100, flachen, membranumhüllten Hohlräumen, den Zisternen, bestehen (Abbildung 3). Mehrere dieser Stapel sind durch röhrenförmige Verbindungen lose miteinander verknüpft (Golgi *ribbon*) (59,60) und meist in der Nähe des Zellkerns und des Zentrosoms zu finden (61,62).

Jeder Golgi-Apparat unterliegt einem strengen polaren Aufbau. Die Eintrittsseite, auch *cis*-Seite genannt, ist dem ER und ERGIC zugewandt und über den Vesikeltransport dem *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN) angeschlossen (63). Der Mitte des Golgi-Apparates, dem medialen Golgi, folgt das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), das die Austrittsseite des Golgi-Apparates darstellt (64). Diese Seite des Golgi-Apparates ist der Plasmamembran zugewandt und sorgt für den Austausch zwischen der selbigen und den endozytotischen Kompartimenten (64,65).



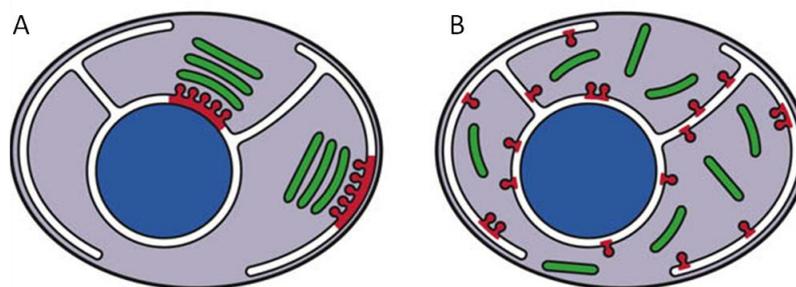
**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Golgi-Apparates (61).**

Wie der Transport von beladenen Vesikeln vom *cis*- zum *trans*-Golgi genau vonstattengeht, ist noch nicht vollständig geklärt. Unter Diskussion stehen derzeit zwei Modelle: das Modell der Zisternenreifung und das Vesikeltransport-Modell (66-68). Das Modell der Zisternenreifung ist hierbei das ältere Modell und basiert auf der Annahme, dass die Transportvesikel, am ER mit neu synthetisierten Proteinen beladen, am *cis*-Golgi

in eine Zisterne maturieren, welche dann den Golgi-Apparat in ihrer Gesamtheit von *cis* nach *trans* durchläuft. Für die Reifung der Proteine benötigte Enzyme werden über einen entgegengesetzten vesikulären Transport für die nachrückende Zisterne zurückbehalten. Beim neueren Vesikeltransport-Modell geht man davon aus, dass die vom ER kommende sekretorische Fracht in Vesikel verpackt durch den Golgi-Apparat geschleust wird. Neue Vesikel werden dabei von den *cis*-Golgi-Zisternen abgeschnürt und von Zisterne zu Zisterne in Richtung TGN transportiert (69). Über einen retrograden Vesikeltransport werden Enzyme des ER und des Golgi-Apparates wieder zurückgewonnen.

Der Golgi-Apparat besitzt sehr vielfältige und komplexe Funktionen. Seine Hauptaufgabe besteht in der Sortierung von Proteinen nach ihrem Bestimmungsort und deren Maturierung. Neu synthetisierte Proteine werden hier schrittweise durch Glykosyl-Transferasen und Glykosidasen modifiziert, bevor sie durch das TGN verteilt und entsprechend ihrer Erkennungssequenz an ihren finalen Bestimmungsort gebracht werden (70,71). Bei der Zellteilung zerfällt der Golgi-Apparat in die einzelnen Zisternen und wird auf beide Tochterzellen verteilt und dort wieder komplettiert (72).

Im Gegensatz zu Säugerzellen sind die Golgi-Stapel in einigen Pilzen, Pflanzen und „niederen“ Eukaryoten im gesamten Zytoplasma verteilt und nicht in einem Golgi-Komplex (Golgi *ribbon*) vernetzt. In *Pichia pastoris* und *Drosophila melanogaster* finden sich zum Beispiel Golgi-Stapel, die keine Golgi *ribbons* ausbilden. In *Saccharomyces cerevisiae* sind nur etwa 40% der Zisternen in Golgi-Stapel zusammengefasst. Die einzelnen Golgi-Stapel befinden sich in diesen Organismen in der Nähe des tERs (Übergangs- (*transitional*) ER), äquivalent zu ERES (**ER exit sites**), und bilden sogenannte tER-Golgi-Einheiten aus (73-75).



**Abbildung 4:** Der Golgi-Apparat in den Knosphefen. (A) *Pichia pastoris* und (B) *Saccharomyces cerevisiae* (76). In rot sind die tERs dargestellt und in grün der Golgi-Apparat.

### 1.2.1 Golgine – *Coiled-coil* Proteine am Golgi-Apparat

Ursprünglich wurden die Golgine als eine Familie von Golgi-lokalisierten Autoantigenen identifiziert, als man Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen untersuchte (77). Alle Golgine haben einen sehr hohen  $\alpha$ -helikalen *coiled-coil* Anteil und sind entweder peripher membranassoziiert oder über zytoplasmatisch exponierte Membranproteine verankert.

Das *coiled-coil* Motiv in Proteinen ist relative weit verbreitet und nicht zu verwechseln mit ungeordneten Bereichen in Proteinen, die oftmals auch als *coil* bezeichnet werden. Bei dem *coiled-coil* Motiv handelt es sich um zwei oder mehr  $\alpha$ -Helices, die umeinander gewunden eine längliche, stabförmige Struktur aufweisen.

Häufig vertreten sind Golgine in der Zentrosomenorganisation (78), im Chromatin, an den Synapsen, man findet sie während der Zellmigration und sie fungieren als molekulare Motoren unter Verbrauch von ATP/GTP. Während der Mitose sind Golgine oft Ziel von Modifikationen, meist Phosphorylierung (60). Bei der Apoptose werden Golgine von Caspasen gespalten (79).

Am Golgi-Apparat findet sich eine Vielzahl an Golginen. Über ihren C-Terminus sind diese Proteine an den Golgi-Apparat gebunden, entweder indem sie an Transmembrandomänen binden oder mit einer GTPase interagieren (22,23,80,81). Der Rest des Proteins ragt ins Zytoplasma, wobei eine Länge von 100-400 nm erreicht werden kann, wobei ein 150 Aminosäuren langes Polypeptid, das eine *coiled-coil* Struktur ausbildet, eine Länge von 15 nm erreicht.

Die verschiedenen Golgine sind dabei an den unterschiedlichsten Stellen am Golgi-Apparat vertreten. Sowohl am *cis*-, wie auch am *trans*-Golgi, zentral oder in der Randzone des Golgi-Apparates. Über die Art, wie die Golgine mit der Golgi-Membran interagieren, wurde eine Einteilung in fünf verschiedene Klassen vorgenommen (22), dargestellt in Tabelle 2.

**Tabelle 2: Klassifizierung der Golgine.**

Klasse	Bezeichnung	Repräsentative Proteine	Art der Membranverankerung
1	Transmembran	Giantin, Golgin-84, CASP	Transmembrandomäne
2	Adapter-assoziiert	GM130 (GRASP65), Golgin-45 (GRASP55)	Periphere Verankerung über ein Adapter-Protein aus der GRASP-Familie
3	Rab-rekrutiert	TMF (Rab6), BicaudalD1/D2 (Rab1)	Rekrutierung durch kleine GTPasen
4	ARL-rekrutiert	Golgin-245 (ARL1), Golgin-97 (ARL1)	Rekrutierung durch kleine GTPasen
5	ARF-rekrutiert	GMAP-210 (ARF1), Rud3p (Arf1p)	Rekrutierung durch kleine GTPasen

### 1.2.1.1 GM130 – Ein Golgin am *cis*-Golgi-Apparat

Als Golgi-Antigen erstmals identifiziert, ist das am *cis*-Golgi lokalisierte Golgin GM130 (alternativ Golgi-95), eines der am besten charakterisierten Golgine (82,83). Wie bereits zuvor erwähnt, interagiert auch der C-Terminus von GM130 mit einem Adapterprotein, das mit dem Golgi-Apparat assoziiert ist. In diesem Fall handelt es sich um die PDZ-Domäne von GRASP65, die über einen Lipidanker mit der Golgi-Membran verbunden ist (84,85). Innerhalb der Metazoen und Pilze ist GM130 konserviert, und es gibt außer dem Hefehomologen aus *Saccharomyces cerevisiae*, Bug1, welches das Hefehomolog von GRASP65, Grh1 (86), bindet, keine weiteren bekannten GM130-Homologe.

Der Aminoterminus des 1002 Aminosäure langen humanen GM130 interagiert mit dem aziden C-Terminus des zytosolischen Proteins p115. Über seine N-terminal gelegene globuläre Kopfregeion bindet p115 an COPII-Vesikel und ist an einer Reihe von weiteren Schritten innerhalb des Vesikeltransports in Säugerzellen und in der Hefe (Uso1) beteiligt (87-90). Wie einige andere Golgine, ist auch GM130 ein Effektor für GTPasen (Rab1, Rab30 und Rab33b (91-93)).

Obwohl GM130 nicht essentiell für den Vesikeltransport und die Anheftung an die Membranen zu sein scheint (94), führt das Fehlen von GM130 zu einem schwer detektierbaren Phänotyp, nämlich dem Auseinanderfallen des Golgi *ribbon*. Die genaue Funktion von GM130 und weiteren Golginen ist demnach noch nicht genau geklärt. Im Moment wird davon ausgegangen, dass die Golgine den Golgi-Apparat wie Tentakeln umgeben und eine Anlaufstelle für Proteine bilden, die mit dem Golgi-Apparat assoziieren wollen (95).

### 1.2.1.2 Bug1 – Das Hefehomolog zu GM130

Mit Hilfe eines *Yeast-Two-Hybrid-Assays* wurde in *Saccharomyces cerevisiae* ein Interaktionspartner von Grh1 entdeckt und durch Immuno- und Co-Präzipitationsstudien verifiziert. Das 342 Aminosäuren lange Protein wurde Bug1 (***bound to Grh1 protein 1***) genannt (86). Sekundärstrukturvorhersagen zeigen eine sequenzielle Ähnlichkeit von Bug1 zu GM130. Bug1 besteht aus einer N-terminalen, basischen Region und einer potentiellen *coiled-coil* Domäne, die der von GM130 sehr ähnlich ist, und deshalb auf eine ähnliche Funktion innerhalb der Zelle schließen lässt. Co-Lokalisationsstudien mit GFP-Bug1 und Grh1-RFP zeigten eine wechselseitige Abhängigkeit der beiden Proteine bezüglich ihrer Lokalisation am Golgi-Apparat (86,96). Basierend auf Gelfiltrationsexperimenten wird vermutet, dass Bug1 und Grh1 ein Heterooligomer bilden, das aus je einem Dimer Bug1 und einem Dimer Grh1 besteht. Um die Bindung zwischen Bug1 und Grh1 genauer zu spezifizieren, wurden verschiedene Bug1-Konstrukte verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass die letzten 30 Aminosäuren für eine Interaktion mit Grh1 ausreichen, für eine Membranverankerung jedoch nicht genügen. Daher wird vermutet, dass Bug1, ähnlich wie bei GM130 und GRASP65, C-terminal mit Grh1 interagiert und die *coiled-coil* Region für die Lokalisation am Golgi-Apparat verantwortlich ist (86).

### 1.2.2 GRASP-Proteine

GRASP- (*Golgi reassembly and stacking proteins*) Proteine wurden 1997 erstmalig in einem *in vitro*-Assay als Golgi-Stapel-Faktoren erwähnt (84). In Säugerzellen finden sich zwei GRASP-Homologe: GRASP65 und GRASP55 (84,97). Während GRASP65 am *cis*-Golgi zu finden ist, ist GRASP55 am medialen Golgi-Apparat lokalisiert. Eine hohe Sequenzidentität von 70%, ein ähnlicher Domänenaufbau und die Golgi-Lokalisierung deuten auf eine Aufgabe beider GRASP-Proteine hinsichtlich der Stapelung der Zisternen im Golgi-Apparat hin. In „einfachen“ Organismen wie Fliegen und Würmern wurde bisher nur ein GRASP-Homolog gefunden. In Pflanzenzellen fehlen die GRASP-Proteine gänzlich, während homologe Proteine in einer Vielzahl anderer Organismen wie z.B. *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum*, *Trypanosoma brucei*, wie auch in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (Grh1) und *Pichia pastoris* (98), ebenso wie in anderen Eukaryoten, beispielsweise *Encephalitozoon cuniculi* gefunden wurden (99). Auch in all diesen Organismen wurden die GRASP-Proteine am Golgi-Apparat lokalisiert. Das *Drosophila*-Homolog dGRASP wurde darüber hinaus auch am ERES und ER gefunden. Eine Affinität

zu anderen Membranen wird derzeit diskutiert (100). In den meisten Organismen sind die GRASP-Proteine in der Membran verankert. Dies geschieht meistens über eine N-terminale Myristoylgruppe, aber auch eine Verankerung über Palmitoylgruppen oder über acetylierte amphipathische Helices sind bekannt (86).

### 1.2.2.1 Domänenarchitektur der GRASP-Proteine

Alle GRASP-Proteine sind in zwei Regionen unterteilt. Eine N-terminalen Hälfte, die, außer in Hefe, GRASP-Domäne genannt wird, und aus zwei PDZ-Domänen besteht (98). Die C-terminale Region zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Prolinen und Serinen aus, ist aber innerhalb der unterschiedlichen Organismen nicht konserviert.

Innerhalb der ersten PDZ-Domäne befinden sich zirka zehn Aminosäuren, die für eine Oligomerisierung in *trans* benötigt werden, wodurch sich die Verbindung der Golgi-Membranen erklären ließe. Diese *trans*-Oligomerisierungsdomäne findet sich – bis auf Hefe und *Trypanosoma* – in allen GRASP-Proteinen (101-103). Die SPR-Domäne (*serine/proline-rich*) am C-Terminus in den humanen Proteinen GRASP65 und GRASP55 beinhaltet eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen und spielt eine Rolle während der Mitose (100). In anderen Organismen können zusätzlich zu den Prolinen und Serinen noch eine überdurchschnittliche Anzahl an Threoninen, Glutaminen und Asparaginen vorkommen. Prolinreiche Sequenzen sind bekannte Interaktionspartner für SH3-Domänen (**Src homology 3**). Es liegt daher nahe, zukünftig GRASP-Proteine auf Interaktionen mit SH3-Domänen enthaltende Proteinen zu untersuchen (104).

Die Verankerung von GRASP-Proteinen in der Golgi-Membran erfolgt nicht durch eine Transmembrandomäne, sondern über eine Fettsäure, meist Myristin- oder Palmitinsäure, die an das konservierte N-terminale Glycin (Myristinsäure) oder Cystein (Palmitinsäure) gebunden ist (84,105). Die Knosphefe nutzt dagegen eine acetylierte amphipathische Helix, und der Malariaparasit *Plasmodium falciparum* kann – je nach *splice*-Variante – mit oder ohne gebundene Fettsäure mit der Membran verbunden sein (86,106). Darüber hinaus benötigt das humane GRASP65 zusätzlich das Golgin GM130 für eine Verankerung in der Membran, wie durch siRNA Experimente gezeigt werden konnte (85). Hierbei wurde festgestellt, dass ein Knock-Down von GRASP65 die Lokalisation von GM130 nicht beeinflusst, wohingegen ein Knock-Down von GM130 zu einer Dissoziation von GRASP65 und der Golgi-Membran führt (107,108). Die für die Interaktion verantwortlichen Regionen sind bekannt. Bei GRASP65 befinden sich diese am C-Terminus der GRASP-Domäne, die mit dem C-Terminus von GM130 interagiert. Das

GM130-Bindungsmotiv ist nicht konserviert, doch finden sich ähnliche Interaktionen in den Proteinkomplexen Grh1•Bug1 (*Saccharomyces cerevisiae*) und dGRASP•GM130 (*Drosophila melanogaster*) (100).

### 1.2.2.2 Rolle der GRASP-Proteine im Aufbau des Golgi-Apparates

Um die genauere Funktion und Rolle der GRASP-Proteine innerhalb des Golgi-Apparates zu untersuchen, wurden anti-GRASP65-Antikörper in NRK- (*normal rat kidney*) Zellen mikroinjiziert, was zu einem Auseinanderfallen der Golgi-Stapel gegen Ende der Mitose führte. Statt der Golgi-Stapel wurden tubuläre und vesikuläre, oft mit Hüllproteinen versehene Partikel beobachtet, was zu der Schlussfolgerung führte, dass GRASP65 eine wichtige Rolle für die Stapelung des Golgi-Apparates spielt (102,109). Andererseits zeigten siRNA-GRASP65-Studien keine nennenswerten Veränderung in der Lokalisation des Golgi-Apparates und dessen Organisation (107,108). Gleiches konnte auch bei siRNA-Experimenten mit GRASP55 beobachtet werden (110). Nur ein gleichzeitiger Knock-Out von GRASP65 und GRASP55 zeigte eine sichtbare Veränderung im Stapelverhalten, was zu der Annahme führte, dass GRASP65 und GRASP55 zueinander redundant sind. Durch ein FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) Experiment konnte gezeigt werden, dass es zu einer anomalen Ausbildung des Golgi *ribbon* durch Ausschalten von GRASP65 oder GRASP55 kommt (110). Daraus resultiert die Annahme, dass GRASP65 und GRASP55 in einer lateralen Verknüpfung der Zisternen zum Golgi-Komplex involviert sind und noch andere Proteine im Aufbau des Golgi-Komplexes beteiligt sind.

Zusätzliche Funktionen für die GRASP-Proteine ergeben sich aus der Beobachtung, dass das Hefehomolog Grh1 aus *Saccharomyces cerevisiae* nicht zum Aufbau des Golgi-Komplexes beiträgt, da in der Knosphefe nur wenig gestapelte Zisternen vorkommen und die Querverknüpfung von Zisternen-Stapeln zum Golgi-Komplex nicht bekannt ist. Ein Knock-Out dieses Proteins führt auch schon, wie im Falle von GRASP65, zu keiner Einbuße in der Zellentwicklung oder im Zellwachstum. Es konnte lediglich eine Interaktion mit am Vesikeltransport beteiligten Proteinen (COP) nachgewiesen werden (86,96).

In Zusammenhang mit dem Aufbau und der Struktur des Golgi-Apparates steht auch der Vesikeltransport. Durch Verringerung der GRASP65-Konzentration in HeLa- und U2OS-Zellen durch RNAi konnte keine Beeinflussung des anterograden Transports beobachtet werden. Weder der ER-Golgi Transport (mittels KDEL-Rezeptor), noch der ER-Plasmamembrantransport (VSV-G, *vesicular-stomatitis virus G*) wurden beeinflusst.

Ähnliches wird auch für GRASP55 berichtet. Durch einen Assay mit Meerrettich-Peroxidase oder VSV-G in *Dictyostelium discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae*, sowie *Pichia pastoris* konnte keine Veränderung im Zellwachstum festgestellt werden, was zu der Annahme führt, dass GRASP-Proteine keine große Rolle innerhalb des klassischen Sekretionsweges spielen (100,107,110,111).

### 1.2.2.3 GRASP65

GRASP65 (*Golgi reassembly and stacking protein*, 65 kDa) ist ein 65 kDa großes Protein, das entdeckt wurde, als in einem zellfreien Assay der Golgi-Apparat näher betrachtet wurde (84). Um Verwechslungen mit anderen Proteinen zu vermeiden, die ebenfalls GRASP als Synonym für GRIP (*glutamate receptor-interacting protein-associated protein*) genannt werden, ist GRASP65 auch unter den Namen GORASP1 (*Golgi reassembly stacking protein*) oder GOLPH5 (*Golgi phosphoprotein 5*) in den Datenbanken zu finden. In dieser Arbeit wird das Protein GRASP65 genannt.

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, besteht GRASP65 wie alle GRASP-Proteine aus zwei Regionen, der N-terminalen GRASP-Domäne (AS 1-204) und der C-terminalen SPR-Domäne (AS 205-440), dargestellt in Abbildung 5.

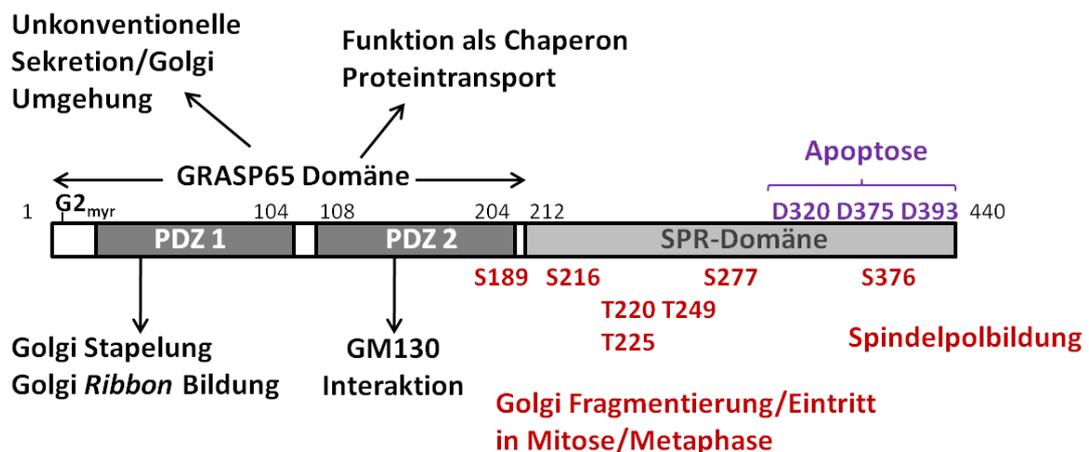


Abbildung 5: Domänenarchitektur und Übersicht der Funktionen von GRASP65. Dargestellt sind die beiden N-terminalen PDZ-Domänen (PDZ1 und PDZ2), sowie die C-terminale SPR-Domäne. Die beiden PDZ-Domänen von AS 1-204 bilden die GRASP Domäne, die durch das myristoylierte Glycin an Position 2 (G2<sub>myr</sub>) mit der Golgi-Membran verankert ist. In schwarz sind die Funktionen von GRASP65 während der Interphase dargestellt. In rot sind die Aminosäuren und Funktionen dargestellt, die während der Mitose eine Rolle spielen. Aminosäuren dargestellt in lila sind in die Apoptose involviert (100).

GRASP65 ist in die Stapelung von Golgi-Zisternen involviert und befindet sich an der *cis*-Seite des Golgi-Apparates. Durch Interaktion mit dem Golgin GM130 vermittelt GRASP65 das Andocken von Transportvesikeln an die Golgi-Membran. Doch weder ein Knock-Down von GRASP65 noch ein Knock-Down von GM130 durch RNAi beeinflusste den Vesikeltransport in großem Maße. Der relativ milde Phänotyp zeigt sich nur in der geringeren Anzahl der Zisternen. Allerdings führt ein gleichzeitiger Knock-Down von GRASP65 und GM130 zu einem Auseinanderbrechen des kompletten Golgi-Apparates (100).

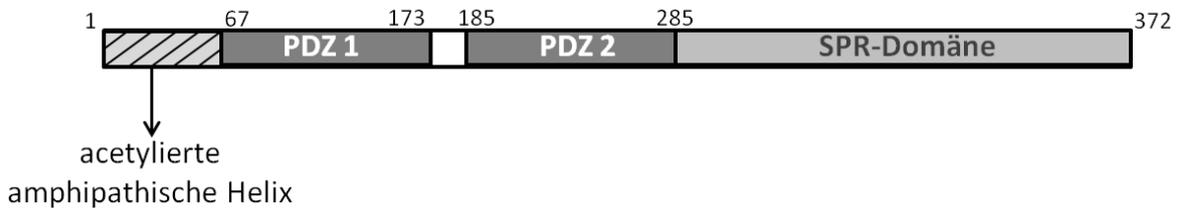
GRASP65 ist nicht nur in die Quervernetzung des Golgi-Apparates involviert. In GRASP65 defizienten HeLa-Zellen wurden multiple, unorganisierte und nicht-funktionale Spindelpole beobachtet, auch wurden die Chromosomen während der Metaphase unnatürlich angeordnet. Daraus resultierend verlassen GRASP65-defiziente Zellen sehr schnell die Phase der Mitose, und Apoptose wird eingeleitet (107). Dieser Effekt kann auch in GM130-defizienten Zellen beobachtet werden, was den Schluss nahelegt, dass die Spindelpolausbildung vom GRASP65•GM130-Komplex abhängig ist (112). Während der Apoptose wird GRASP65 innerhalb der SPR-Domäne (Asp320, Asp375 und Asp393) von Caspase 3 geschnitten. Resultat ist eine Fragmentierung des Golgi-Apparates (113). Eine Übersicht über die verschiedenen Funktionen und Aufgabengebiete von GRASP65 ist in Abbildung 5 gegeben.

### 1.2.2.4 GRASP55

GRASP55 ist ein 55 kDa großes Protein und befindet sich im medialen Golgi-Apparat und ist über eine Myristoyl- und eine Palmitoylgruppe mit der Membran verankert. Ebenso wie GRASP65 interagiert auch GRASP55 mit einem Golgin. In diesem Fall mit Golgin-45. Auch GRASP55 besteht aus einer GRASP-Domäne (114), die eine 70%ige Sequenzidentität zu GRASP65 aufweist. C-terminal enthält GRASP55 eine SPR-Domäne, die ebenfalls eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen beinhaltet. Die genaue Funktion von GRASP55 ist noch nicht geklärt. Die hohe Sequenzidentität zu GRASP65 und die Lokalisation am Golgi-Apparat legen die Vermutung nahe, dass beide Proteine eine ähnliche Funktion haben und in die Stapelung der Golgi-Zisternen involviert sind (115). Ein Knock-Down von GRASP55 beeinflusst die Organisation des Golgi-Apparates nur indirekt (110). Es konnte ein Einfluss beim Übergang in die Mitose festgestellt werden. Durch Phosphorylierung wird ein bisher unbekannter Bindungspartner entlassen, was dann zum Auseinanderfallen des Golgi-Apparates führt (111).

### 1.2.2.5 Grh1

Grh1 (**GRASP65 *homologue protein 1***) ist das GRASP65-Homolog in der Knosphefe *Saccharomyces cerevisiae*. Wie sein humanes Pendant ist auch Grh1 am Golgi-Apparat lokalisiert und in den Vesikeltransport zwischen ER und dem Golgi-Apparat involviert. Grh1 besteht, basierend auf Sekundärstrukturvorhersagen, aus zwei Regionen: einer C-terminalen Region, reich an Prolinen und Serinen, und einer Region am N-Terminus, die – ähnlich wie GRASP65 – zwei PDZ-Domänen enthält (Abbildung 6). Die Membranverankerung findet hier über eine ebenfalls N-terminal gelegene acetylierte, amphipathische Helix statt. Die Rekrutierung an die Golgi-Membran erfolgt über die N-terminale Acetyltransferase (NatC) (86).



**Abbildung 6: Domänenstruktur von Grh1.** Grh1 besteht aus zwei Domänen: zwei PDZ ähnlichen Domänen (AS 67-285) und einer serin- und prolinreichen Domäne (SPR) (AS 285-372). Die amphipathische Helix dient als Membrananker.

Die Interaktion mit dem kürzlich gefundenen GM130-Homolog Bug1 erfolgt – wie im Falle von GRASP65•GM130 – über den C-Terminus von Bug1 mit einer der beiden PDZ-ähnlichen Domänen (86). Diese Interaktion würde auf eine Funktion von Grh1 innerhalb des Vesikeltransportes hinweisen. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, welche Funktion Grh1 genau hat, da die Knosphefe, im Gegensatz zu Säugerzellen, über keine zu Golgi-Stapeln organisierten Zisternen verfügt. Kürzlich wurde in einer Studie eine Interaktion von Grh1 mit den COPII-Untereinheiten Sec23 und Sec24 am tER festgestellt (86). Eine Deletion von Grh1 in *Pichia pastoris* führte nicht zu einer Veränderung der tER-Golgi Einheiten. Wurde bei *Saccharomyces cerevisiae* der ER Export blockiert, vergrößerten sich die tER Seiten etwas. Die Assoziation zum *cis*-Golgi-Apparat wurde jedoch nicht beeinflusst, auch nicht als Grh1 fehlte. Daraus ergibt sich eine mögliche Funktion von Grh1 im frühen sekretorischen Transport. Für die Organisation der sekretorischen Kompartimente spielt Grh1 keine Rolle (75).

Wie auch beim humanen Homolog wurde der Phänotyp von Grh1 mit RNAi-Studien genauer untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Grh1 nicht essentiell für das Hefewachstum ist. Ein eventueller Einfluss von Grh1 auf den Zellzyklus, genauer den mitotischen *Checkpoint*, kann nicht ausgeschlossen werden (116).

Ein weiterer Interaktionspartner, der Hinweise auf eine genaue Funktion von Grh1 geben könnte, ist Uso1. Vor der Entdeckung von Bug1 galt die *coiled-coil* Region von Uso1 als potentieller Interaktionspartner auf Grund großer struktureller Ähnlichkeiten zwischen ihr und GM130. Durch die Tatsache, dass die *coiled-coil* Region in Uso1 rund dreimal länger ist als in humanem p115, besteht die Möglichkeit, dass Uso1 (206 kDa) eine Fusion von p115 und GM130 (218 kDa) ist (87,89).

## 1.3 PDZ-Domänen

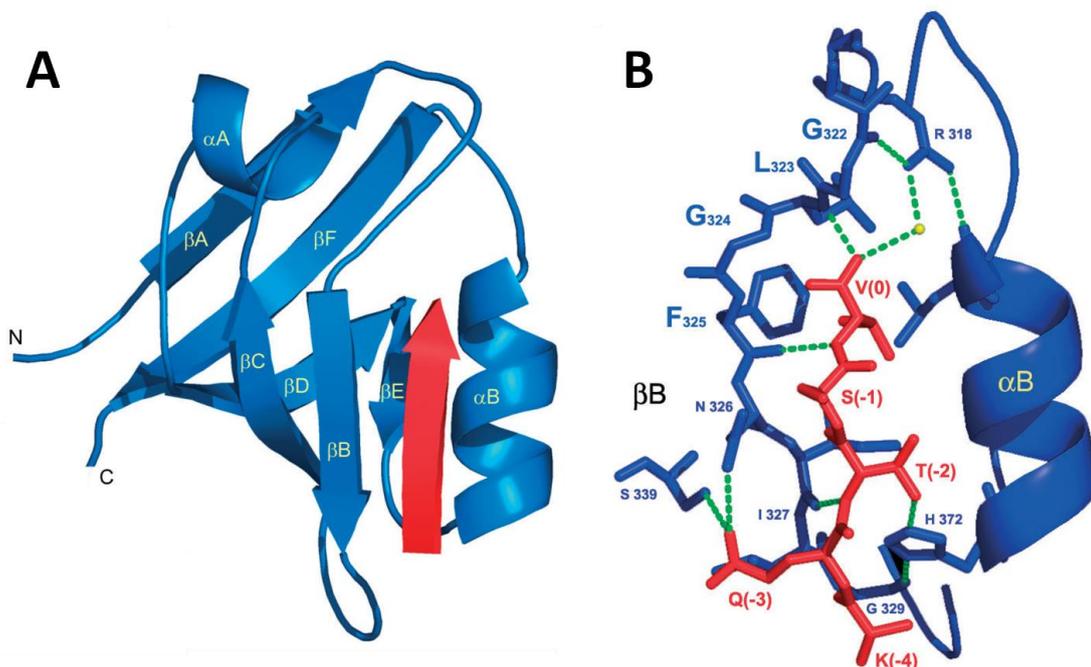
### 1.3.1 Vorkommen

Zu den häufigsten Proteininteraktionsdomänen, vor allem in Signalwegen innerhalb der Zellen, gehören die PDZ-Domänen. PDZ ist dabei ein Akronym der drei Proteine, in denen die PDZ-Domänen zuerst entdeckt wurden: PSD-95/SAP90 (*post synaptic density protein*) (117), Dlg (*discs-large*) (118) und ZO-1 (*zonula occludens 1*) (119). PDZ-Domänen sind ferner auch unter den Namen DHRs (*discs-large homology regions*) und GLGF *repeats* bekannt (120). Bis jetzt sind etwa 240 humane Proteine bekannt, die PDZ-Domänen enthalten. Aber auch in Bakterien, Hefen, Pflanzen, Insekten und Vertebraten wurden PDZ-Domänen identifiziert, wobei die Sequenzähnlichkeit zwischen den PDZ-Domänen der Metazoen und *Saccharomyces cerevisiae*, sowie *Schizosaccharomyces pombe*, sehr gering ausfallen, weshalb sie häufig nur als PDZ-ähnliche (*PDZ like*) Domänen bezeichnet werden (121). Funktionell finden sich PDZ-Domänen häufig als Gerüstproteine im Aufbau von Proteinnetzwerken aber auch während der Signaltransduktion und der Vermittlung von Wechselwirkungen mit dem Zytoskelett spielen PDZ-Domänen eine wichtige Rolle (122-124).

PDZ-Domänen können einzeln oder als Mehrfachkopien innerhalb eines Proteins vorkommen. Ein Großteil der PDZ-Domänen enthaltenden Proteine ist mit der Plasmamembran assoziiert. Häufig binden PDZ-Domänen das Carboxy-Ende eines Proteins, aber auch Interaktionen mit internen Peptidsequenzen oder Phospholipiden sind

bekannt (125). Die Affinitäten der Wechselwirkungen, die durch PDZ-Domänen vermittelt werden, bewegen sich meist im mikromolaren Bereich (10-100  $\mu\text{M}$ ).

PDZ-Domänen haben eine Länge von 80 bis 100 Aminosäuren und bilden auf struktureller Ebene eine globuläre  $\beta$ -sandwich Domäne, bestehend aus sechs  $\beta$ -Strängen ( $\beta\text{A}$ - $\beta\text{F}$ ) und flankiert von zwei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha\text{A}$  und  $\alpha\text{B}$ ) (126). Liganden binden in eine Bindungstasche, die sich zwischen dem  $\beta$ -Strang  $\beta\text{B}$  und der Helix  $\alpha\text{B}$  befindet. Die Carboxyl-Bindeschleife zwischen den Strängen  $\beta\text{A}$  und  $\beta\text{B}$  bindet dabei die C-terminale Carboxylgruppe des Liganden, wie in Abbildung 7 am Beispiel von PSD-95 dargestellt.



**Abbildung 7:** Struktur der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 und ihrer Ligandenbindungstasche. (A) Struktur der PDZ3-Domäne von PSD-95 mit gebundenem Peptid KQTSV, schematisch dargestellt als roter Pfeil. PDB Eintrag: 1BE9. (B) Detaillierte Darstellung der Bindung. Die Bindungstasche von PSD-95 ist in blau dargestellt, das Peptid in rot. Die Wasserstoffbrücken sind grün eingefärbt und Wassermoleküle gelb (120).

### 1.3.2 Proteine mit PDZ-Domänen

Wie bereits erwähnt, kommen PDZ-Domänen häufig als Multi-PDZ-Domänen vor, die meist aus Tandem-Wiederholungen von PDZ-Domänen bestehen, z.B. NHERF (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory cofactor*) mit einer Tandem-Wiederholung oder MUPP1 (*multiple PDZ domain protein*) mit 13 PDZ-Domänen. PDZ-Domänen können aber auch in

Kombination mit anderen Domänen vorgefunden werden, wie zum Beispiel in der Familie der MAGUK-Proteine (**M**embran **a**ssoziierte **G**uanylat**K**inasen), bei denen die PDZ-Domänen in Kombination mit GuK-Domänen (*guanylate-kinase-like*) und SH3-Domänen (*Src-homology 3 domain*) auftreten (123). Bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist PSD-95. Es kommen aber auch andere Domänen in Verbindung mit PDZ-Domänen vor, wie beispielsweise die Zink-bindende Domäne LIM, der GTP Austauschfaktor Rho-GEF, die Ras-bindende Domäne RBD oder die PH-Domäne (*pleckstrin homology*) (121). Eine Übersicht findet sich in Abbildung 8.

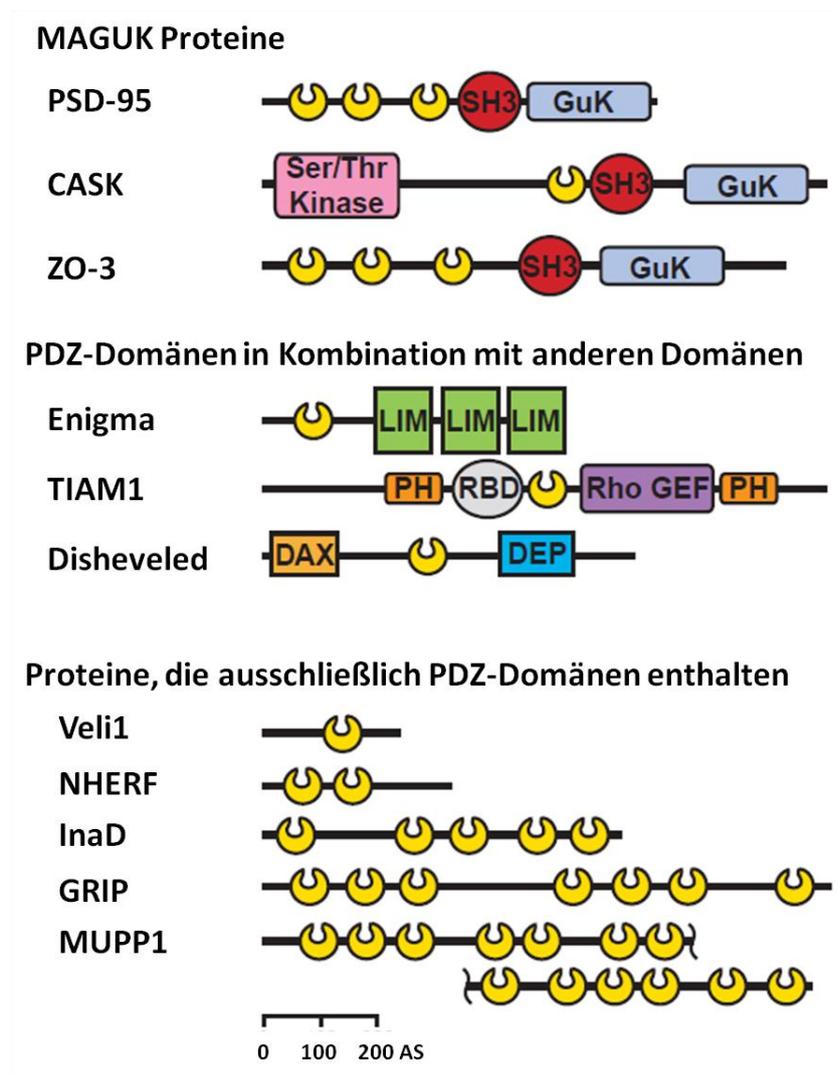


Abbildung 8: Beispiele von Proteinen, die mehrere PDZ-Domänen (gelb) oder PDZ-Domänen in Kombination mit anderen Domänen enthalten. SH3 (*Src-homology 3 domain*); GuK (*guanylate-kinase-like*); LIM (Zink bindende Domäne in Lin-11, Isl-1 und Mec-3); PH (*pleckstrin homology*); RBD (*Ras-binding domain*); GEF (*guanine nucleotide exchange factor*); DAX (Domäne, die in *Dishevelled* und *axin* vorliegt); DEP (*Dishevelled, Egl-10 und pleckstrin*) (121).

### 1.3.3 Ligandenbindung

PDZ-Domänen werden auch als Gerüstproteine (*scaffolds*) bezeichnet, die am Aufbau größerer Proteinkomplexe bestimmter subzellularer Kompartimente beteiligt sind (122,127). Wichtig für die Interaktionen zwischen PDZ-Domänen und Liganden ist dabei das R/K-XXX-G-Θ-G-Θ-Motiv (X steht dabei für eine beliebige Aminosäure, Θ für eine hydrophobe), auch Carboxyl-Bindeschleife (*carboxylate-binding loop*) genannt. Diese findet sich zwischen den β-Strängen βA und βB und ist konserviert. Das erste Glycin innerhalb des Motivs ist dabei variabel und kann durch ein Serin, Threonin oder Phenylalanin ersetzt werden. Die hydrophoben Aminosäuren bilden mit ihren Seitenketten die Bindungstasche für den Liganden (121). Der C-terminale Rest des Liganden wird als P0-Rest bezeichnet, die Folgenden als -1, -2, -3 und so weiter, wobei die Erkennungssequenzen für die PDZ-Domäne meist fünf oder sechs Aminosäuren lang ist (120).

Nachdem immer mehr PDZ-Domänen und interagierende Proteine (PPIs (*protein-protein/peptide interactions*)) gefunden wurden, wurden diese klassifiziert. Derzeit gibt es drei Hauptklassen, basierend auf dem Sequenzmotiv, das von der Carboxyl-Bindeschleife erkannt wird. Zur Klasse I zählen die PDZ-Domänen, die das Motiv X-S/T-X-Θ<sub>COOH</sub> erkennen; in Klasse II wird das Motiv X-Θ-X-Θ<sub>COOH</sub> erkannt und in Klasse III das Motiv X-E/D-X-Θ<sub>COOH</sub> (122,128,129). Allerdings lassen sich viele Proteine, die PDZ-Domänen enthalten, nicht immer eindeutig einer dieser Klassen zuordnen; viele Proteine stellen eine Mischform dar. Auf Grund dessen wird derzeit eine spezifischere Einteilung mit 16 Klassen diskutiert (130).

### 1.3.4 Krankheitsrelevante Mutanten

Es wurden in den letzten Jahren auch einige humane Krankheitsbilder mit Mutationen in PDZ-Domänen in Zusammenhang gebracht. Unter anderem das Usher-Syndrom (Hörsehbehinderung), das durch Mutationen in dem Gen hHARM ausgelöst wird. hHARM kodiert für das PDZ-Domänen enthaltende Protein Harmonin (131,132). Auch wurden Mutationen in dem PDZ-Domänen enthaltenden Protein Pariaxin gefunden, die zu Dejerine-Sottas Neuropathie führen (133,134), Deletionen in Dishevelled, das mit dem DiGeorge-Syndrom (Entwicklungsstörungen) (135) in Verbindung gebracht wird, und Deletionen in der LIM-Kinase1, die Ursache für das Williams-Syndrom (Neuronale Entwicklungsstörungen) ist (136).

## 1.4 Zielstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die strukturelle Charakterisierung der PDZ-Domänen der homologen Proteine GRASP65 (*Homo sapiens*) und Grh1 (*Saccharomyces cerevisiae*), sowie die Untersuchung des Bindemechanismus von GRASP65 und GM130 (Abbildung 9A). Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden ob Bug1 bzw. Uso1 an Grh1 bindet (Abbildung 9B und C).

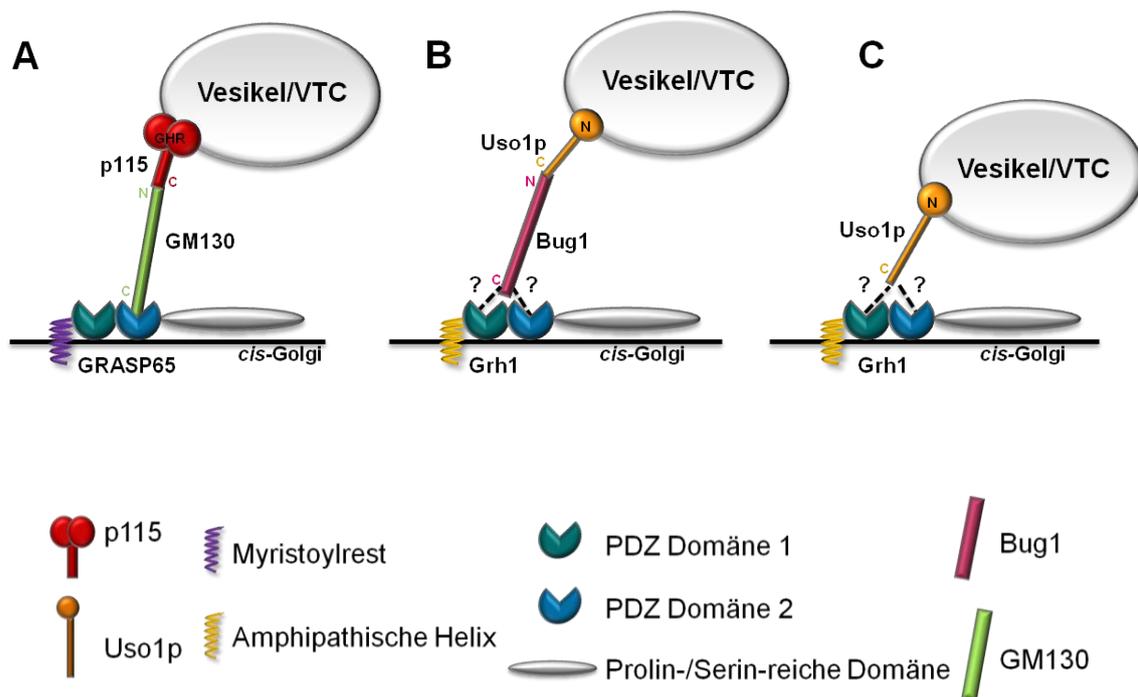


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Zielstellung dieser Arbeit. (A) Über p115, GM130 und GRASP65 vermittelte Anheftung eines Vesikels an die *cis*-Golgi-Membran in einer humanen Zelle. (B) Anheftung eines Vesikels in *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe des Proteins Bug1, das über seinen C-Terminus an Grh1 bindet und über seinen N-Terminus an Uso1 gebunden ist. (C) Anheftung eines Transportvesikels in *Saccharomyces cerevisiae* an die *cis*-Golgi-Membran, bei der Grh1 direkt mit Uso1 interagiert. (VTC=vesicular-tubular cluster).

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Bakterienschüttler	HAT-Multitron	INFORS
CD-Spektrometer	J-720	Jasco
Chromatographiesystem	Äkta Explorer	GE <i>Healthcare</i>
Chromatographiesystem	Äkta FPLC	GE <i>Healthcare</i>
Feinwaage	MR2002/CP2202S-0CE	Sartorius
Geldokumentationssystem	LAS-4000 mini	FujiFilm
Gelkammer (Agarosegel)	HG370/HG330	Savant
Gelkammer (SDS-PAGE)	Min 2-D Cell	Bio-Rad
Heizblock	Thermomixer 5437	Eppendorf
Inkubator	MIR153	Sanyo
ITC	VP-ITC Microcalorimeter	Microcal
Kamera	DXC-390P	Sony
Konzentratoren	Amicon Ultra	Millipore
Konzentratoren	Vivaspin	Sartorius
Kristallisationsobservationssystem	Homebase	The Automation Partnership
Kristallisationsobservationssystem		Formulatrix
Kristallisationsplatten	Crystal quick flat bottom	Greiner Bio-One
Kristallisationsroboter	Hydra II	Matrix Technologies
Leuchttisch	KL 2500LCD	Leica
Mikroskop	Wild M3C	Leica
Mikroskop	BX51	Olympus
Mikroskop	M420	Leica
Mikrowelle		Privileg

Nylon-Loops	Cryo-Loops	Hampton Research
pH-Meter	Lab850	Schott
Photometer Nanodrop	ND-1000	Peqlab
Pins	CrystalCap Copper	Hampton Research
Spannungsgerät	Power PAC 300	Bio-Rad
Spannungsgerät	Power Pack P25	Biometra
Thermocycler	PTC-200	MJ Research
Ultraschallgenerator	Sonoplus	Bandelin
Vortexer	Genie 2	Bender & Hobein AG
Waage	MC1 Analytical AC1205	Sartorius
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf
Zentrifuge	J2-MC	Beckmann
Zentrifuge	Biofuge 28RS	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge Stratos	Heraeus

---

## 2.2 Chemikalien und Kits

### 2.2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Detergenzien von Roth (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Fluka (Sigma-Aldrich) bezogen.

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Agar, granuliert	BD Bioscience
Agarose, ultra pure	Invitrogen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Invitrogen
Complete Mini EDTA-freier Proteaseinhibitor	Roche
DNase I	Roche
Glyzerin	Merck
Hefeextrakt	MP Biomedicals

## 2 Material

---

Isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG)	AppliChem
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA)	QIAGEN
Trypton	AppliChem

---

### 2.2.2 Kits

---

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
pET-46 Ek/LIC Vector Kit	Novagen
QIAGEN Plasmid Mini Prep Kit	QIAGEN
QiaPrep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Qiaquick Gelextraktionskit	QIAGEN
Qiaquick PCR Reinigungskit	QIAGEN
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

---

## 2.3 Bakterienstämme und cDNS

### 2.3.1 Stämme

---

#### Stämme

---

E. coli Rosetta T7 express + Rosetta2 Plasmid	NEB/Novagen
E. coli NovaBlue GigaSingles™	Novagen
E. coli BL21 (DE3) pLys	Promega
E. coli Lemo21(DE3)	NEB

---

### 2.3.2 cDNS

Die cDNS für die Grh1-Konstrukte wurde direkt aus *Saccharomyces cerevisiae* Zellen gewonnen und freundlicherweise von Franziska Zimmermann, AG Sommer (MDC, Berlin-Buch) zur Verfügung gestellt. Die humane cDNS für die GRASP65-Konstrukte wurde von Anup Arumughan, AG Wanker (MDC, Berlin-Buch) zur Verfügung gestellt.

## 2.4 Primer

### 2.4.1 Primer für Klonierung GRASP65

---

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
<i>grasp65_1F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccaggggcccggcctgggcgt cagcgc
<i>grasp65_13F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccaggggcccggcgcgaggg cttcac
<i>grasp65_16F_LIC</i>	gacgagacaagatgctggaagttctgttccaggggcccggcttccacctc cacggg
<i>grasp65_31F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccaggggcccggcggcctgga gcctac
<i>grasp65_94F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccaggggcccggcctactggg tgccagtgt
<i>grasp65_108F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccaggggcccggcagtgagca ggtgtggca
<i>grasp65_94R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttagccctggccgccccac
<i>grasp65_108R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttagccctgcccgaagctgcag
<i>grasp65_118R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttacacatccagcacatgccacac
<i>grasp65_197R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttaccatagccaatgccacatc
<i>grasp65_199R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttatagataccatagccaatgccaa
<i>grasp65_204R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttaagttgggatccgggtgtagataccatagccaa
<i>grasp65_208R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttagctggggggctgagttggg
<i>grasp65_208RPFE_LIC</i>	gaggagaagcccgggttactcaaattgggcgagttgggatccgggtgtagata
<i>grasp65_440R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttattattctgtggtagagatctgg

---

### 2.4.2 Primer für Mutagenese GRASP65

---

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
LI152-153AA_F	gacttctttacggccgcccaggtctcat
LI152-153AA_R	atgagactcggcggccgtaaagaagtc

---

### 2.4.3 Primer für Klonierung Grh1

Primer	Sequenz (5'→ 3')
<i>grh1_1F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccagggggccctttagaatagct aaaaacctcgt
<i>grh1_31F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccagggggcccgtttctttcag tctataccac
<i>grh1_67F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccagggggcccggctccgcatt gtttgggt
<i>grh1_159F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccagggggcccgcagagaggagg ccatctag
<i>grh1_166F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccagggggcccgggaagcgcac cagttcca
<i>grh1_173F_Adapt_LIC</i>	gcggggcccggccttggcactcgggttcaaagtcca
<i>grh1_173F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccagggggcccgcactcgggttc aaagtcca
<i>grh1_185F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccagggggcccgttccactttc acataccatat
<i>grh1_206F_LIC</i>	gacgacgacaagatgctggaagttctgttccagggggcccgggtcatccca gatgaaga
<i>grh1_144R_Adapt_LIC</i>	cgcgggcggccggttatataatgctgatataactcgtctc
<i>grh1_144R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttatataatgctgatataactcgtctc
<i>grh1_156R_Adapt_LIC</i>	cgcgggcggccggttatagagaaacatcgtccaaatcg
<i>grh1_156R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttatagagaaacatcgtccaaatcg
<i>grh1_162R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttacctcctctcgtcatggttttag
<i>grh1_173R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttatgcttggaaactggtgcgctt
<i>grh1_185R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttaagctatcaaaggcgtccattg
<i>grh1_281R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttatggttgaatcctgtgaagaaac
<i>grh1_285R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttaacagtgtttactgttggaaatcc
<i>grh1_372R_LIC</i>	gaggagaagcccgggttattaatcagaggatgactgtttttg

## 2.5 Peptide

Für die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) wurden Peptide des C-Terminus von Bug1, Uso1 und GM130 verschiedener Längen bei Peptide Specialty Laboratories GmbH (PSL), Heidelberg, bestellt. Die Peptide wurden, je nach Verbrauch, abgewogen, in Wasser gelöst und über Nacht gegen ITC-Puffer dialysiert, um das Fällungsmittel vollständig zu beseitigen. In Tabelle 3 sind die verwendeten Peptide aufgelistet.

**Tabelle 3: Peptidübersicht, der C-terminalen Peptide von Bug1, Uso1 und GRASP65.**

<b>Protein</b>	<b>Länge (AS)</b>	<b>MW (Da)</b>	<b>Sequenz (N- → C-Terminus)</b>
Bug1	6	694	GPIMEF
Bug1	12	1381	WRSIGSGPIMEF
Uso1	6	633	EEGQVA
Uso1	12	1365	DDEEDEEEGQVA
GM130	4	446	ITVI
GM130	5	574	KITVI
GM130	6	673	VKITVI
GM130	12	1347	ADENDEVKITVI
GM130	18	2171	IPFFYRADENDEVKITVI

## 2.6 Nährmedien und Lösungen

### 2.6.1 Nährmedien

<b>Medien</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Konzentration</b>
Luria-Bertani (LB) Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
LB-Agar	LB Medium	
	Agar 1,5 %	15 g/l
Superior-Broth (SB) Medium	Hefeextrakt	24 g/l
	Trypton	12 g/l
	Glyzerin	3,75 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 g/l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,5 g/l

## 2.6.2 Lösungen

### 2.6.2.1 Molekularbiologie

---

<b>Lösung</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Konzentration</b>
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid in TAE	10 mg/ml
TAE-Puffer	Tris HCl	40 mM
	Natriumacetat	5 mM
	EDTA	1 mM
	Essigsäure	auf pH 8,0 einstellen
DNS-Probenpuffer 5x	EDTA	100 mM
	Xylencyanol	0,05 % (v/v)
	Glyzerin	30 % (v/v)
	Bromphenolblau in TAE-Puffer	0,05 % (w/v)
DNS-Marker	100 bp Leiter	0,5 µg/µl
	1 kb Leiter	0,5 µg/µl

---

### 2.6.2.2 Proteinreinigung

---

<b>Lösung</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Konzentration</b>
His-Lyse-Puffer	HEPES, pH 8,0	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Glyzerin	10 % (v/v)
His-Wasch-Puffer	HEPES, pH 8,0	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	40 mM

## 2 Material

---

His-Elutions-Puffer	HEPES, pH 8,0	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM
Proteinpuffer	HEPES, pH 8,0	20 mM
	NaCl	500 mM
	EDTA	1 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	5 mM

---

### 2.6.2.3 Interaktionsstudien – ITC

---

Lösung	Bestandteile	Konzentration
ITC-Puffer	HEPES, pH 8,0	20 mM
	NaCl	250 mM
	EDTA	1 mM

---

### 2.6.2.4 SDS-PAGE

---

Lösung	Bestandteile	Konzentration
SDS-Elektrophoresepuffer	Tris	25 mM
	Glyzerin	190 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
Sammelgelpuffer	Tris/HCl, pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
Sammelgel	Trenngelpuffer	1 ml
	Acrylamid	1 ml
	ddH <sub>2</sub> O	2,95 ml
	10 % APS	50 $\mu$ l
	TEMED	5 $\mu$ l
	Bromphenolblau	50 $\mu$ l

## 2 Material

---

Trenngelpuffer	Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
Trenngel	Trenngelpuffer	2,5 ml
	Acrylamid	5 ml
	ddH <sub>2</sub> O	2,5 ml
	10 % APS	75 µl
	TEMED	10 µl
SDS-Probenpuffer	Tris/HCl, pH 6,8	200 mM
	SDS	8 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,4 % (w/v)
	Glycerin	40 % (v/v)
	DTT	400 mM
Proteinstandard (Mark12™, Invitrogen)	2.5, 3.5, 6.0, 14.4, 21.5, 31.0, 36.5, 55.4, 66.3, 97.4, 116.3, 200.0 kDa	
Coomassie-Färbelösung	Ethanol	50 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Coomassie	0,1 % (w/v)
Entfärbelösung	Ethanol	30 % (v/v)
	ddH <sub>2</sub> O	60 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

---

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaktion*, PCR) wird zur Amplifikation doppelsträngiger DNS ausgehend von einer Matrize verwendet. Dazu werden hitzestabile DNS-Polymerasen und spezifische Oligonukleotide, sogenannte 3'- und 5'- *Primer*, mit einer Länge von 20-30 Basen Länge verwendet, die komplementär zum 3'- und 5'-Ende der verwendeten Matrize sind. Über die Oligonukleotide werden Erkennungssequenzen, z.B. für Restriktionsendonukleasen oder spezifische Überhänge, im Falle der LIC-Klonierung, an das 3'- und 5'-Ende der zu amplifizierenden DNS angefügt. Die eigentliche Amplifikation erfolgt in drei Schritten: Denaturierung der Doppelstränge, *Annealing* (Hybridisierung der Oligonukleotide) und Elongation (Tabelle 6). Die Amplifikation der gewünschten DNS wurde mit der *Pfu* Polymerase durchgeführt (Tabelle 4), die im Gegensatz zur *Taq* Polymerase, die für die Kolonie-PCR verwendet wurde (Tabelle 5), eine geringere Fehlerrate hat (*Proofreading*). Die Kolonie-PCR diente zur Identifikation von Klonen, die die gewünschte DNS-Sequenz enthalten. Dazu wurde als Matrize keine DNS eingesetzt, sondern eine Kolonie von Zellen gepickt, die zuvor mit dem Ligationsansatz transformiert wurden und direkt in den PCR-Ansatz gegeben wurden.

**Tabelle 4: PCR mit *Pfu* Polymerase.**

Komponente	Endkonzentration
10x <i>Pfu</i> Puffer	1x
dNTPs	400 µM
5' Primer	0,5 µM
3' Primer	0,5 µM
Matrizen-DNS	0,3 ng/µl
<i>Pfu</i> Polymerase	5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 30 µl

**Tabelle 5: Kolonie-PCR mit *Taq* Polymerase.**

Komponente	Endkonzentration
10x <i>Taq</i> Puffer	1x
dNTPs	400 µM
5' Primer	0,5 µM
3' Primer	0,5 µM
Gepickte Kolonie	-
<i>Taq</i> Polymerase	0,5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

**Tabelle 6: Reaktionsprofil Standard-PCR.**

Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer (s)
Initiale Denaturierung	94	120
Denaturierung	94	30
Annealing	56	60
Elongation	72	150
Finale Elongation	72	600
Lagerung	4	∞

} 30 Zyklen

### 3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit einer Agarose-Gelelektrophorese können DNS-Fragmente unterschiedlicher Größe voneinander getrennt werden. Sie dient damit vor allem der Verifikation der PCR durch Abschätzung der Größe eines Fragmentes mit Hilfe eines Größenstandards, sowie der Abschätzung von Reinheit und Konzentration der DNS-Fragmente. Je nach Größe der Fragmente variierte die Agarosekonzentration zwischen 1%-2%. Zur leichteren Detektion der Fragmente wurde dem Agarosegel direkt 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die DNS-Fragmente wurden mit 4x Agaroseprobenpuffer versetzt. Die eigentliche Elektrophorese fand bei 220 mA in TAE-Puffer statt. Die Analyse des Gels erfolgte unter UV-Licht. Mit Hilfe des Größenstandards konnten die Größen und Konzentrationen der DNS-Fragmente bestimmt werden.

### 3.1.3 Reinigung von PCR-Produkten

Für die ligationsunabhängige Klonierung sollten PCR-Produkte frei von restlichen Nukleotiden aus der vorangegangenen PCR sein. Daher wurden alle PCR-Produkte mittels eines *PCR-Purification*- oder Gelextraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt.

### 3.1.4 Bestimmung der DNS-Konzentration

Für die ligationsunabhängige Klonierung ist es wichtig die genaue Konzentration der PCR-Produkte zu kennen. Diese wurde photometrisch mit dem NanoDrop-Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine  $Abs_{260}$  von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNS.

### 3.1.5 Ligationsunabhängige Klonierung

Bei der ligationsunabhängigen Klonierung (*ligation independent cloning*, LIC) (137) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem auf Restriktionsendonukleasen und dem damit verbundenen Restriktionsverdau, sowie auf eine klassische Ligationsreaktion verzichtet wird. Durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNS-Polymerase werden spezifische, einzelsträngige Überhänge am linearisierten Vektor und dem PCR-Produkt generiert, die sich aneinander anlagern (sog. *Annealing*). Die eigentliche Ligation erfolgt erst in der *E. coli*-Zielzelle, wo dann das PCR-Produkt kovalent mit dem Vektor verbunden wird. Die LIC-Klonierung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll TB163 der Firma Novagen.

### 3.1.6 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemokompetenter Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode (138,139). Für die Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde ein Aliquot Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von ca. 100 ng Plasmid wurde der Transformationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock, 30 s bei 42 °C, wurde der Ansatz 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium wurden die transformierten Zellen bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.1.7 Plasmid-Präparation

Plasmid-DNS wurde mit dem Plasmid-Präparationskit QIAGEN Plasmid Mini Prep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Dafür wurden 5 ml LB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

### 3.1.8 Mutagenese

Um die Spezifität der Bindung zwischen Protein und Ligand nachweisen zu können wurden Punktmutationen eingebracht, um die Bindungsstelle zu blockieren. Für die Mutagenese wurde das *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* Protokoll der Firma Stratagene (140) in leicht abgewandelter Form verwendet. Für die Amplifikation beider Stränge des Matrizen-Plasmids wurden Primer verwendet, die die gewünschte Mutation beinhalten. Um eine Ausbildung von Primer-Dimeren zu verhindern und die Effizienz der Mutagenese zu erhöhen, wurden, im Gegensatz zum Herstellerprotokoll, zuerst je ein Ansatz für den Vorwärts- und ein Ansatz für den Rückwärtsprimer angesetzt. Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der Mutageneseansätze.**

Komponente	Endkonzentration
10x <i>Pfu</i> Puffer	1x
dNTPs	400 µM
5' Primer	25 pmol
3' Primer	25 pmol
Matrizen-Plasmid	10 ng
<i>Pfu</i> Polymerase	5 U
DMSO	2,5%
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Nach den ersten zehn Zyklen der Amplifikation wurden beide Ansätze gemischt und weitere 20 Amplifikationszyklen durchgeführt. Das genaue Protokoll kann Tabelle 8 entnommen werden. Nach Abschluss der Amplifikation wurden die methylierten nicht modifizierten Stränge der Matrizen-Plasmide mit 1 µl (5 U) DpnI für 4 h bei 37 °C geschnitten. *E. coli GigaCells* wurden nach erfolgter Restriktion mit 5 µl dieses Ansatzes transformiert und auf Agarplatten, die entsprechende Antibiotika zur Selektion enthielten, inkubiert.

**Tabelle 8: PCR-Protokoll für die Mutagenese.**

	Reaktion	Temperatur (°C)	Dauer (s)
	Initiale Denaturierung	95	30
<b>Schritt 1: 10 Zyklen</b>	Denaturierung	95	30
	Annealing	50	150
	Elongation	72	600
	Mischen des Vorwärtsprimer-Ansatzes und des Rückwärtsprimer-Ansatzes.		
<b>Schritt 2: 20 Zyklen</b>	Denaturierung	95	30
	Annealing	50	150
	Elongation	72	600

### 3.1.9 DNS-Sequenzierung

Die Kontrolle der klonierten Plasmide und der Mutagenese erfolgte durch Sequenzierung des entsprechenden Plasmids durch die Firma Stratec. Dafür wurden T7Forward- und T7Reverse-Primer der Firma Stratec, Berlin verwendet. Die Analyse der Daten erfolgte mit den Programmen *Translate* (ExpASy – *Bioinformatics Resource Tool* (141)) und dem EMBOSS *Pairwise Alignment Tool* (EMBL-EBI (142)).

### 3.1.10 Konstrukte

In den folgenden beiden Tabellen werden die in dieser Arbeit für die Kristallisation und Bindungsstudien verwendeten Konstrukte von GRASP65 und Grh1 aufgelistet. Alle Konstrukte wurden mit Hilfe der LIC-Methode (Kapitel 3.1.5) in den Vektor pET-46Ek/LIC kloniert. Der Vektor verfügt über einen N-terminalen Hexa-Histidin-tag. Um den tag proteolytisch zu entfernen, wurde über den Forward-Primer eine *PreScission*-Schnittstelle zwischen tag und Gen eingefügt.

**Tabelle 9: Verwendete GRASP65-Konstrukte.**

Domäne	AS	MW (kDa)	Domäne	AS	MW (kDa)
GRASP65 <sup>FL</sup>	1-440	48,4	GRASP65 <sup>PDZ1_16-108</sup>	16-108	10,5
GRASP65 <sup>AN1-15</sup>	16-440	46,8	GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	1-118	13,0
GRASP65 <sup>AN1-30</sup>	31-440	45,1	GRASP65 <sup>PDZ1_16-118</sup>	16-118	11,7
GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2</sup>	1-204	22,3	GRASP65 <sup>PDZ2_94-204</sup>	94-204	12,3
GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2ΔN1-15</sup>	16-204	20,3	GRASP65 <sup>PDZ2</sup>	108-204	10,5
GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2ΔN1-30</sup>	31-204	19,1	GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2_13-197</sup>	13-97	20,3
GRASP65 <sup>PDZ1_1-94</sup>	1- 94	10,2	GRASP65 <sup>PDZ2108-197</sup>	108-197	10,1
GRASP65 <sup>PDZ1_16-94</sup>	16- 94	9,0	GRASP65 <sup>1-204_LI152-153AA</sup>	1-204	22,3
GRASP65 <sup>PDZ1_31-94</sup>	31- 94	7,5	GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2_13-208RPPFE</sup>	13-208	21,6
GRASP65 <sup>PDZ1_1-108</sup>	1-108	11,8	GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2_1-208</sup>	1-208	21,6

Die Indizes geben die Domänengrenzen bzw. die Deletionen an.

**Tabelle 10: Verwendete Grh1-Konstrukte.**

Domäne	AS	MW (kDa)	Domäne	AS	MW (kDa)
Grh1 <sup>FL</sup>	1-372	41,1	Grh1 <sup>PDZ1_67-185</sup>	67-185	13,7
Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2</sup>	1-281	31,5	Grh1 <sup>PDZ1_1-185</sup>	1-185	20,9
Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2ΔN1-30</sup>	31-281	28,0	Grh1 <sup>PDZ2_159-281</sup>	159-281	13,6
Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2ΔN1-66</sup>	67-281	24,1	Grh1 <sup>PDZ2_166-285</sup>	166-285	13,1
Grh1 <sup>PDZ1_67-162</sup>	67-162	11,3	Grh1 <sup>PDZ2_173-281</sup>	173-281	11,9
Grh1 <sup>PDZ1_1-144</sup>	31-144	13,0	Grh1 <sup>PDZ2_185-281</sup>	185-281	10,6
Grh1 <sup>PDZ1_PDZ1ΔβB</sup>	67-144	9,1	Grh1 <sup>PDZ2_206-281</sup>	206-281	8,3
Grh1 <sup>PDZ1_67-156</sup>	67-156	10,4	Grh1 <sup>PDZ1_67-185Δloop</sup>	67-185Δ142-166	10,5
Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2Coexpr.</sup>	67-156 173-281	10,4 11,9	Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2_67-281Δloop</sup>	67-281Δ142-166	21,0
Grh1 <sup>PDZ1_67-173</sup>	67-173	12,4			

Die Indizes geben die Domänengrenzen bzw. die Deletionen an.

## 3.2 Proteinreinigung

### 3.2.1 Expression in *Escherichia coli*

Zur Überexpression der gewünschten proteinkodierenden Gene wurde zuerst der Expressionsstamm *E. coli* Rosetta T7 Express mit dem gewünschten Konstrukt transformiert. Eine LB-Übernacht-Kultur mit entsprechenden Antibiotika (100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol) wurde mit einem Klon angeimpft. Mit dieser Übernacht-Kultur wurde dann die TB-Expressionskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1-0,2 angeimpft. Bei 37 °C und 110 rpm wurde die Kultur inkubiert bis ein OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8- 1,2 erreicht war. Bevor die Kultur mit 1 mM IPTG induziert wurde, wurde sie zuerst auf 20 °C abgekühlt. Die Expression erfolgte bei 20 °C über Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation 15 min bei 6500 x g pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Dafür wurde das Bakterienpellet in Aufschlusspuffer resuspendiert. Pro 10 g Bakterienpellet (Zellfeuchtgewicht) wurden 25 ml gekühlter (4 °C) Aufschlusspuffer, sowie eine Complete Mini EDTA-freie Proteaseinhibitortablette und eine Spatelspitze DNase I verwendet. Der Zellaufschluss erfolgte bei einer Frequenz von 0,9 mit 15 Zyklen zu je 15 s und einer Energieleistung von 90%. Um eine Überhitzung der Zellen zu vermeiden, wurden sie im Eisbad gekühlt. Der Aufschlussprozess wurde dreimal wiederholt, um eine möglichst hohe Aufschlusseffizienz zu erreichen. Dazwischen wurden Pausen von mind. 2 min gemacht, um die aufgeschlossenen Zellen nicht zu überhitzen und ein Denaturieren der Proteine zu verhindern. Zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wurde bei 4 °C und 65 000 x g für 30 min zentrifugiert und der Überstand (Rohextrakt) filtriert (0,45 µm).

### 3.2.3 Proteinreinigung durch Nickel-Nitrilotriacetat Agarose (Ni-NTA)

Alle verwendeten Proteinkonstrukte wurden als sogenannte Fusionsproteine exprimiert, die am N-Terminus sechs Histidine tragen (His<sub>6x</sub>-tag), welche über eine *PreScission*-Schnittstelle proteolytisch abgespalten werden können. Auf Grund dieses His<sub>6x</sub>-tags können die Fusionsproteine mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie über eine Nickel-Nitrilotriacetat Agarose (Ni-NTA, GE *Healthcare*) gereinigt werden. Die Matrix

besteht dabei aus NTA, das an Sepharose CL-6B gekoppelt ist, und komplexierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen. Jedes Ni<sup>2+</sup>-Ion hat eine freie Koordinationsstelle, an die Histidine mit hoher Affinität ( $\sim 1 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ ) binden, und somit das Fusionsprotein an die Matrix binden. Eluiert wird das Fusionsprotein durch Zugabe von Imidazol, das, im Überschuss zugegeben, die komplexierten Histidine von der Matrix verdrängt.

Zur Reinigung der Fusionsproteine wurde der Rohextrakt über eine zuvor mit Aufschlusspuffer äquilibrierte 5 ml HisTrap<sup>TM</sup> FF Säule (GE *Healthcare*) gegeben. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde anschließend mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 30 ml Elutionspuffer. Um den His<sub>6x</sub>-tag zu entfernen wurde *PreScission*-Protease mit GST-tag im Verhältnis 1:20 zum Eluat gegeben. Die Proteolyse erfolgte über Nacht bei 4 °C. Währenddessen wurde das Eluat gegen den Gelfiltrationspuffer dialysiert (Volumen Eluat x 100). Die Reinheit der Proteine wurde mittels Gelelektrophorese (Kapitel 3.3.1) überprüft.

#### **3.2.4 Größenausschlusschromatographie**

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie, oder auch Gelfiltrationschromatographie genannt, können Proteine entsprechend ihrer Größe und Form getrennt werden. Die Matrix der Säule besteht dabei aus inerten Polymerkügelchen definierter Größe. Kleine Moleküle sind in der Lage in die Zwischenräume der Polymerkügelchen zu diffundieren, was zu einer Verlangsamung führt, so dass die Elution später erfolgt, als bei größeren Molekülen. Zur Größenbestimmung eines Proteins wird die Säule mit globulären Standardproteinen bekannter Größe kalibriert. Zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen besteht ein logarithmischer Zusammenhang, daher kann das Molekulargewicht eines Proteins unbestimmter Größe anhand seines Elutionsvolumens abgeschätzt werden.

Für die hier beschriebenen Proteine wurde eine Superdex<sup>TM</sup> 75 26/60 (GE *Healthcare*) verwendet, die mit einem Äkta- oder FPLC-System der Firma GE *Healthcare* betrieben wurde. Der Lauf wurde in dem bereits genannten Gelfiltrationspuffer durchgeführt, mit dem zuvor die Säule bereits äquilibriert wurde. Das Auftragsvolumen für die Säule lag zwischen 5 und 10 ml. Die Elution der Proteine wurde anhand ihrer Absorption bei 280 nm detektiert und mit SDS-PAGE analysiert.

## 3.3 Proteincharakterisierung

### 3.3.1 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach Laemmli (1970) wird verwendet um die Reinheit der Proteinproben während der Reinigung zu analysieren und deren Größe zu ermitteln. Dazu wurden die Proteinproben mit einem  $\beta$ -Mercaptoethanolhaltigen Probenpuffer vermischt, 5 min aufgekocht und anschließend auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Bei einer Spannung von 120-140 Volt lief das Gel 50-70 min. Zum Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel für 10-20 min in Coomassie-Färbelösung und anschließend in Entfärbelösung gelegt, solange bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

Das Polyacrylamidgel besteht aus Acrylamid, das durch N,N'-Methylenbisacrylamid unter Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat und des Katalysators Tetramethylethyldiamin quervernetzt wird. Über das Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid kann die Porengröße des Gels bestimmt und den zu analysierenden Proteinen angepasst werden. Das Aufkochen der Proteinproben führt zu einer Denaturierung der Proben und das  $\beta$ -Mercaptoethanol zerstört eventuell vorhandene Disulfidbrücken. Durch Zugabe des anionischen Detergenz SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert. Nun bewegen sich alle Proteine, unabhängig von ihrer Ladung, mit gleicher Geschwindigkeit, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist, im Gel und können nach Größe bzw. Länge getrennt werden. Zur leichteren Analyse läuft ein Probenstandard mit, der Proteine bekannter Größe enthält.

### 3.3.2 Proteinkonzentration

Zur Konzentration der Proteinlösungen wurden Zentrifugationseinheiten von Amicon bzw. Millipore verwendet. Je nach Größe des Proteins wurden mit einem *molecular weight cut off* von 3.000, 5.000 oder 10.000 Da gearbeitet. Zentrifugiert wurde bei 4 °C und 2500 x g.

### 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer Proteinlösung kann durch ihre Absorption bei 280 nm photometrisch bestimmt werden. Durch die Anzahl der im Konstrukt vorhandenen Tryptophane (Trp), Tyrosine (Tyr) und Disulfidbrücken (Dis) kann nach Gleichung 1 der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  berechnet werden.

$$\epsilon_{280} = n_{Trp} \cdot \epsilon_{Trp} + n_{Tyr} \cdot \epsilon_{Tyr} + n_{Dis} \cdot \epsilon_{Dis} \quad (1)$$

$n_x$ : Anzahl der jeweiligen Aminosäuren im Protein

$\epsilon_x$ : Extinktionskoeffizient der jeweiligen Aminosäure bei 280 nm

mit  $\epsilon_{Trp}=5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{Tyr}=1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{Dis}=125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (144)

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 2) kann nun die molare Proteinkonzentration  $c$  ermittelt werden:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad (2)$$

Dabei ist  $A$  die gemessene Absorption bei 280 nm,  $d$  die Schichtdicke und  $\epsilon$  der Extinktionskoeffizient. Bei bekanntem Molekulargewicht des Proteins kann die Proteinkonzentration nun in mg/ml ermittelt werden.

### 3.3.4 Massenspektrometrie

Mit der Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF (**M**atrix-unterstützte **L**aser-**D**esoptio**n**-/Ionisations-Massenspektrometrie, kombiniert mit der Flugzeitanalyse (*time of flight* (TOF)) können chemische Verbindungen auf ihre Masse hin untersucht werden. Während der Proteinreinigung ist es ein gängiges Verfahren zur Bestimmung des Molekulargewichts. Dabei wird die Probe auf einem metallischen Träger in eine Matrix eingebettet und durch Laserbeschuss ionisiert. Die Matrix verdampft explosionsartig und reißt Probenmoleküle mit sich, wobei die Probenmoleküle ionisiert werden. In einem elektrischen Feld werden nun die ionisierten Probenmoleküle beschleunigt und in einer anschließenden feldfreien Driftröhre die Flugzeit bestimmt. Die Flugzeit hängt nach folgender Gleichung 3 von der Masse ( $m$ ) und der Ladungszahl ( $z$ ) des Moleküls ab. Ein

Ionendetektor am Ende der Messung wandelt die ankommenden Ionen in ein elektrisches Signal um.

$$tof \propto \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (3)$$

Das Verfahren wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, die untersuchten Proteine und Proteinkonstrukte zu verifizieren. Die Messungen und die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Gunnar Dittmar (MDC, Berlin-Buch).

### 3.3.5 Statische Lichtstreuung

Mit der Methode der statischen Lichtstreuung (SLS) lassen sich Makromoleküle auf Grund ihrer Eigenschaft Licht zu streuen hinsichtlich ihrer Form und Größe charakterisieren. Dabei wird der zeitliche Mittelwert der Streuintensität bestimmt, welcher sich nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{I_q}{I_0} = N \cdot b^2 \cdot P_q \cdot S_q \quad (4)$$

Dabei gibt N die Teilchenanzahl im Streuvolumen, b den Streuquerschnitt und  $S_q$  den Strukturfaktor an. Der Formfaktor  $P_q$  liefert Daten über den relativen Brechungsindex der Makromoleküle, sowie Informationen über deren Form und Größe. Berechnet werden kann der Formfaktor dabei entweder durch die Rayleigh-Debye-Gans-Näherung oder durch die Mie-Theorie (145). Für die Separation der Lösungskomponenten vor der Messung wurde eine analytische Superdex™ 75 10/300 verwendet. Die Proteine befanden sich in Proteinpuffer (Kapitel 2.6.2). Die Auswertung der Messdaten erfolgte in Kooperation mit Dr. Katja Fälber (MDC, Berlin-Buch).

### 3.3.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry, ITC*) ist ein Verfahren mit dem biochemische Reaktionen quantitativ und thermodynamisch untersucht werden. In einem einzigen Experiment können die Stöchiometrie  $N$ , die Bindungskonstante  $K$ , die Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  und die Reaktionsentropie  $\Delta S$  bestimmt werden. Grundlage ist, dass fast jede biochemische Reaktion mit einer Enthalpie-Änderung einhergeht. Entweder wird Wärme an die Umgebung abgegeben (exotherme Reaktion) oder es wird Wärme von der Umgebung aufgenommen (endotherme Reaktion). Diese Wärmeaufnahme oder -abgabe während einer biochemischen Reaktion wird bei der isothermen Titrationskalorimetrie direkt gemessen. Untersucht wird meist die Komplexbildung zweier Interaktionspartner A und B, dargestellt in Gleichung 5.



Die Bindungskonstante  $K$  definiert dabei die Gleichgewichtslage des Komplexes.

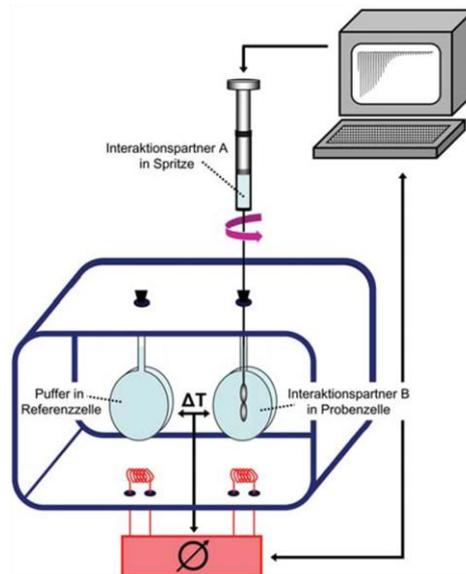
$$K = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} \quad (6)$$

Daraus lässt sich dann die freie Reaktionsenthalpie  $\Delta G$  berechnen, die ihrerseits aus der Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  und der Reaktionsentropie  $\Delta S$  besteht.  $T$  gibt die Temperatur an.

$$-RT \ln K = \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

Über die Bindungskonstante  $K$  kann nun eine Einschätzung abgegeben werden, wie stark oder schwach eine Interaktion ist.

In Abbildung 10 ist der Aufbau eines isothermen Kalorimeters dargestellt. Interaktionspartner B wird in der Probenzelle vorgelegt, während der andere Interaktionspartner (A) in die Spritze gegeben wird und zu titriert wird. Nach jeder erfolgten Injektion aus der Spritze wird durch die Komplexbildung Wärme freigegeben (exotherm) bzw. aufgenommen (endotherm). Um die Temperatur in der Probenzelle relativ zur Referenzzelle konstant (isotherm) zu halten wird nun vom Kalorimeter gekühlt bzw. geheizt. Die Wärmemenge, die vom Kalorimeter aufgenommen bzw. abgegeben wird ist die experimentelle Messgröße. Integration liefert die freigesetzte Wärmemenge, die dann gegen die Konzentration des Komplexes aufgetragen wird. Durch eine entsprechende Anpassung können nun die Bindungskonstante, die Bindungsenthalpie und die Stöchiometrie des Komplexes berechnet werden, sowie daraus folgend die Änderung der Entropie.



**Abbildung 10: Schematische Abbildung eines isothermen Titrationskalorimeters (146).**

Die Methode der isothermen Titrationskalorimetrie wurde in dieser Arbeit dazu verwendet die Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinkonstrukten und Peptiden zu untersuchen. Hierfür wurde eine 50-100  $\mu\text{M}$  Proteinlösung in der Probenzelle vorgelegt, zu der dann eine 1,5 M bis 2 M Peptidlösung titriert wurde. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 15  $^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Integration der Rohdaten erfolgte mit der Software ORIGIN (Version 7.0, OriginLab, Northampton, MA). Für die Analyse der Daten und die Bestimmung der Enthalpie ( $\Delta H$ ) durch die nichtlineare Methode der kleinsten Fehlerquadrate, sowie die Bestimmung der Bindungskonstanten ( $K_D$ ) mit einem A+B Heterodimerisierungsmodell, wurde das Programm SEDPHAT (Version 9.4 (147)) verwendet.

### 3.3.7 Circulardichroismus

Die Sekundärstruktur eines Proteins kann mit Hilfe der Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie bestimmt werden. Grundlage dafür ist linear polarisiertes Licht, das als Summe zweier zirkular polarisierter, rechts- und linkszirkularer, Komponenten betrachtet wird. Kombiniert man nun zwei circular polarisierte Komponenten unterschiedlicher Amplituden, so erhält man elliptisch polarisiertes Licht, dessen Elliptizität  $\theta$  vom Verhältnis der Ellipsenachsen zueinander abhängig ist. Des Weiteren macht man sich die optische Aktivität von Proteinen zu Nutze, die auf ihre Chiralität zurückzuführen ist.

Fällt circular polarisiertes Licht auf ein optisch aktives Molekül, so wird die Polarisationssebene gedreht und es findet eine unterschiedliche Absorption von links- und rechtscircular polarisiertem Licht statt. Das Licht verlässt das Medium mit elliptischer Polarisation. Die molare Elliptizität  $\theta$  ist hierbei Messgröße für die Änderung des rechts- und linkszirkular polarisierten Licht, dargestellt in Gleichung 8.

$$\theta_{MRW} = \frac{100 \cdot \theta \cdot M_r}{N_A \cdot c \cdot d} \left[ \frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad (8)$$

$\theta$ : gemessene Elliptizität

$c$ : Proteinkonzentration

$d$ : Schichtdicke der Küvette

$M_r$ : Molekulargewicht des Proteins

$N_A$ : Anzahl der Aminosäuren im Molekül

MRW: durchschnittliches Molekulargewicht einer Aminosäure (*mean residue weight*)

Über die molare Elliptizität können Anteile von Sekundärstruktur in Proteinen abgeschätzt werden. Auf diese Weise kann der Anteil an  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern, Schleifen und ungeordneten Strukturen bestimmt oder Änderungen in der Sekundärstruktur eines Proteins analysiert werden.

In dieser Arbeit diente die CD-Spektroskopie der Überprüfung der Faltung der Proteine. Die Auswertung der Messdaten erfolgte über den Webserver DICHROWEB (148,149).

### 3.4 Kristallographische Methoden

Um die dreidimensionale Struktur von Makromolekülen auf atomarer Ebene bestimmen zu können, ist die Röntgenstrukturanalyse, neben der NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*), die wichtigste derzeit genutzte Methode. Hauptaugenmerk der im Folgenden beschriebenen kristallographischen Verfahren, liegt auf den in dieser Arbeit verwendeten Methoden. Tiefergehende Erläuterungen und die vollständige Theorie können in den Monographien von Drenth (150) und Rhodes (151) nachgelesen werden.

#### 3.4.1 Methode der Proteinkristallisation

Für die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen werden diese in Form von großen, möglichst perfekt aufgebauten Kristallen, auch Einkristalle genannt, benötigt. Um diese Einkristalle zu erhalten, muss das Protein möglichst rein und monodispers in Lösung vorliegen. Die Löslichkeitsgrenze eines Proteins ist für die Kristallisation von entscheidender Bedeutung, denn nur aus einer übersättigten Lösung können sich Kristalle bilden. Initiator des Kristallwachstums ist die Keimbildung, auch Nukleation genannt.

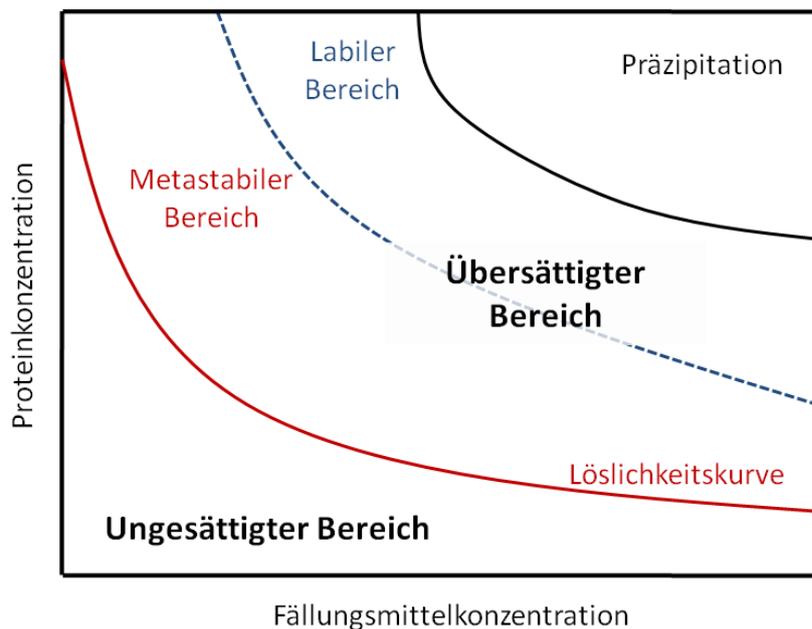


Abbildung 11: Phasendiagramm der Kristallisation (nach (152)).

Das Phasendiagramm (Abbildung 11) besteht aus drei Bereichen: dem ungesättigten und dem übersättigten Bereich, die durch die Löslichkeitskurve voneinander getrennt sind,

sowie dem Präzipitationsbereich. Der übersättigte Bereich ist in einen metastabilen und einen labilen Bereich unterteilt. Im labilen Bereich findet die Keimbildung statt, Kristallwachstum, das zu verwertbaren Einkristallen führt, findet jedoch nur im metastabilen Bereich statt.

Ziel eines Kristallisationsexperimentes ist es, die Lösungsparameter so anzupassen, dass Keimbildung und Kristallwachstum stattfinden können. Eine Übersättigung der Lösung führt aber nicht unweigerlich zu Kristallen. Makromoleküle können auch einen amorphen Niederschlag (Präzipitat) bilden. Dieser kommt wesentlich häufiger vor als Kristallwachstum und besteht überwiegend aus denaturiertem Protein.

Um eine Übersättigung zu erreichen, ohne dass das Protein präzipitiert, gibt es zahlreiche Methoden und Techniken. Die Häufigste, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die Dampfdiffusionstechnik. Dabei werden in gleichen Teilen Proteinlösung und Fällungsmittellösung (Präzipitans), gemischt und in einem Tropfenvolumen von 0,2 µl bis 5 µl als *hanging* oder *sitting drop* neben einer Reservoirlösung, die der Fällungsmittellösung entspricht und ein Volumen von 80 µl bis 1 ml haben kann, meist in 24- oder 96-*well* Platten angesetzt. Durch die geringere Fällungsmittelkonzentration im Tropfen kommt es zu einem Ausgleich der Konzentration des Fällungsmittels zwischen dem Reservoir und dem Kristallisationstropfen durch Diffusion des Wassers aus dem Tropfen ins Reservoir. Dabei steigt die Protein- und Fällungsmittelkonzentration im Tropfen, was im Idealfall zum Erreichen des labilen Übersättigungsbereiches führt. Durch die Keimbildung wird die Proteinkonzentration im Tropfen verringert, wodurch ein Übergang in den metastabilen Bereich stattfindet, in dem das Kristallwachstum stattfindet. Typische Fällungsmittel für die Kristallisation von Makromolekülen sind Salze, organische Lösungsmittel und Polymere, wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG), die alleine oder als Gemisch eingesetzt werden. Neben den Fällungsmitteln spielen aber noch weitere Faktoren eine Rolle: Temperatur, Zeit, Konzentration und pH-Wert der Protein- oder Fällungsmittellösung, Liganden oder Co-Faktoren, Reinheit und Monodispersität der Proteinlösungen, Konstrukt- und/oder Organismenwahl.

Um von Anfang an eine möglichst große Bandbreite an Kristallisationsbedingungen testen zu können, werden kommerziell erhältliche *sparse-matrix*, *grid*- und *incomplete-factorial-Screens* verwendet, die unterschiedlichste Fällungsmittel, Puffer, Konzentrationen und pH-Werte verwenden, die statistisch gesehen am häufigsten zu Kristallen geführt haben (153,154).

### 3.4.2 Durchführung Kristallisation

Vor dem Ansetzen der Kristallisationsplatten wurden die Proteine mit Amicon Ultra-zentrifugationseinheiten auf eine Konzentration von 10-15 mg/ml konzentriert und anschließend bei 14 000 x g für 5 min, bei 4 °C zentrifugiert, um eventuell vorhandenes präzipitiertes Protein abzutrennen. Für die Kristallansätze wurde das *sitting drop* Verfahren in 96-well Platten verwendet. Mit dem Pipettierroboter *Hydra II* von Matrix Technologies, wurden 300 nl Protein mit ebenso viel Fällungsmittellösung versetzt. Die Reservoirkammern wurden mit 80 µl Fällungsmittellösung befüllt. Anschließend wurden die Platten luftdicht mit Folie verschlossen. Die initialen Kristallisationsbedingungen stammten alle aus den kommerziell erhältlichen *sparse-matrix-Screens* der Firmen Qiagen und Jena Bioscience: *JCSG Suite*, *ProComplex Suite*, *pH Clear Suite I/II*, *JBS-Classic I/II*, *Cations Suite*. Die Kristallisationsplatten wurden im Beobachtungssystem (Formulatrix) entweder bei 20 °C oder bei 4 °C gelagert, automatisch fotografiert und visuell bewertet. Je nach Konstrukt dauerte die Kristallisation der Proteine zwischen 24 h und vier Wochen. Für die Datensammlung wurden die Kristalle in eine Gefrierschutzlösung (*Cryoprotectant*) überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.4.3 Röntgenbeugungsexperiment

Alle Daten, die während dieser Arbeit aufgenommen wurden, wurden an dem Synchrotron der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) aufgenommen. Die Detektion erfolgte mit einem Bruker AXS/Roentec X-Flash XRF Detektor (Messplatz MX 14.1) oder MX-225 ccd (*charged coupled-device*) (Messplatz MX 14.2). Die Daten wurden mit XDS prozessiert, skaliert und reduziert (155).

Proteinmoleküle in einem Kristall bilden ein Kristallgitter aus, das aus Elementarzellen besteht, der kleinsten Einheit, mit der der Kristall durch wiederholte Translation entlang seiner Kanten beschrieben werden kann. Dabei wird die Elementarzelle durch die drei Kantenlängen  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , sowie die drei Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  beschrieben (Raumgruppe). Bis auf die trikline Kristallform weisen alle Elementarzellen eine interne Symmetrie auf. Die Elementarzelle kann dabei durch eine kleinere Untereinheit, der asymmetrischen Einheit (AU), beschrieben werden. Durch Anwendung von Symmetrieeoperatoren kann mit der asymmetrischen Einheit der komplette Inhalt der Elementarzelle beschrieben werden. Der ganze Kristall kann durch Kombination der Elementarzelle, primitiv, flächenzentriert,

innenzentriert oder rhomboedrisch, mit einer oder mehreren Symmetrieoperationen, z.B. Rotation um eine Achse, dargestellt werden.

Die Charakterisierung der Raumgruppe und Größe der Elementarzelle erfolgt durch das Röntgenbeugungsexperiment. Der Kristall wird dabei einem monochromatischen Röntgenstrahl ausgesetzt und das Beugungsmuster detektiert. Bei den Röntgenstrahlen handelt es sich um elektromagnetische Wellen mit hoher Energie bzw. kurzer Wellenlänge, die anhand von Frequenz, Amplitude und Phase mathematisch beschrieben werden können.

Bestrahlt man einen Kristall mit Röntgenstrahlen, durchquert der größte Teil der Strahlung dabei den Kristall wechselwirkungsfrei. Ein kleiner Teil wechselwirkt jedoch mit den Elektronen der Atome im Kristall und regt diese zu elastischen Schwingungen an. Beim Übergang in den Grundzustand wird Sekundärstrahlung in alle Richtungen abgegeben. Da ein Kristall aus regelmäßig räumlich angeordneten Atomen besteht, kommt es zur Interferenz der emittierten Strahlung. Destruktive Interferenz sorgt dabei für Auslöschungen, während konstruktive Interferenz in einem gebeugten Röntgenstrahl resultiert. Die Überlagerung von gestreuten Strahlen kann durch das Braggsche Gesetz (Gleichung 9) beschrieben werden.

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (9)$$

$\lambda$ : Wellenlänge der Röntgenstrahlung

$d$ : Abstand zwischen den Gitterebenen

$\theta$ : Beugungswinkel des Röntgenstrahls

$n$  (ganzzahlig)  $\rightarrow$  Reflexe

$n$  (halbzahlig)  $\rightarrow$  Auslöschung

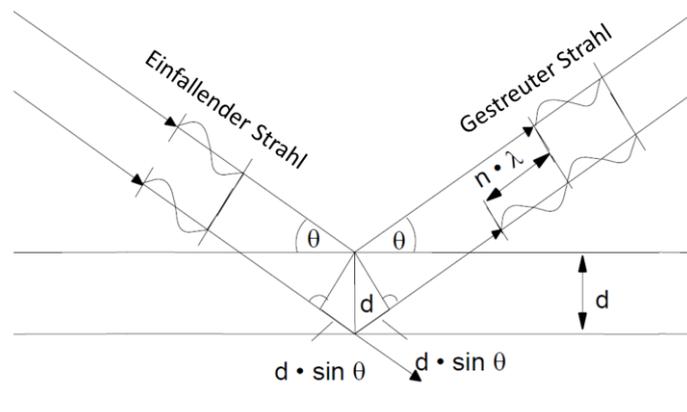


Abbildung 12: Darstellung des Braggschen Gesetzes.

Jeder beobachtete Reflex im Beugungsbild entspricht demnach einer Überlagerung von gestreuten Strahlen mit einem Gangunterschied, der einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge entspricht. Der kleinste beobachtbare Ebenenabstand  $d_{\min}$ , für den Reflexe gemessen werden können, wird als Auflösung des Beugungsbildes bezeichnet.

Für die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes müssen Reflexe von allen Gitternetzebenen aufgenommen werden. Dazu wird der Kristall während der Aufnahme rotiert. Eine graphische Darstellung ist die Ewald-Konstruktion, die in Abbildung 13 gezeigt wird.

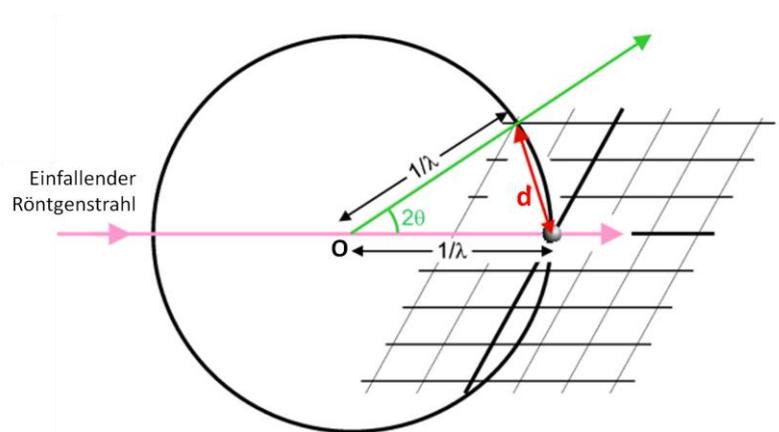


Abbildung 13: Ewald-Konstruktion.

### 3.4.4 Phasenbestimmung und Berechnung der Elektronendichte

Nach der Datensammlung wird eine Elektronendichte berechnet, die mittels eines Strukturmodells interpretiert wird. Zentrales Problem dabei ist das Wiedererlangen der Phaseninformation, ohne die die Berechnung der Elektronendichte nicht möglich ist.

Die gebeugten Strahlen werden als Reflexe in einem Diffraktionsbild aufgenommen und die Intensität von jedem Reflex bestimmt. Die Intensität ist dabei proportional zu dem Quadrat des Strukturfaktors  $F(hkl)$ .

$$I(hkl) : |F(hkl)|^2 \quad (10)$$

Mit Hilfe der Fouriertransformation kann, bei bekannter Phase  $\Phi$ , eine Elektronendichtekarte berechnet werden.

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} e^{i\phi(hkl)} \quad (11)$$

Zentrales Problem dabei ist das Wiedererlangen der Phaseninformation. Denn mit dem Diffraktionsexperiment werden nur die Strukturfaktoren  $F(hkl)$  der Reflexe bestimmt, nicht aber die Phase  $\Phi$ .

Eine direkte Information über die Phase  $\Phi$  kann bei der Messung an nativen Proteinkristallen im üblichen Auflösungsbereich ( $>1 \text{ \AA}$ ) nicht erhalten werden. Diese Problematik ist auch als „das Phasenproblem der Röntgenkristallographie“ bekannt. Um Phaseninformation zu erhalten gibt es mehrere Methoden:

- Anomale Diffraktion bei einer (SAD, *single-wavelength anomalous diffraction*) oder mehreren Wellenlängen (MAD, *multiple-wavelength anomalous diffraction*)
- Einfacher (SIR, *single isomorphous replacement*) oder multipler (MIR, *multiple isomorphous replacement*) isomorpher Ersatz
- Eine Kombination aus isomorphem Ersatz und anomaler Diffraktion (SIRAS/MIRAS)
- Molekularer Ersatz (MR, *molecular replacement*)
- Direkte Methoden
- Patterson-Methode

### 3.4.5 Anomale Diffraktion

Für die Ermittlung der Phase  $\Phi$  werden meist anomal streuende Atome in einem Kristall benötigt. Häufig wird dazu Selenomethionin verwendet, das in die Proteinsequenz anstelle von Methionin während der Expression eingebaut wird. Im Falle von Grh1 wurde auf intrinsische Schwefelatome in Cysteinen und Methioninen, sogenannte proteinogene Elemente, als anomal streuende Atome zurückgegriffen. Bei Atomen wie Kohlenstoff, Sauerstoff oder Stickstoff entsprechen die Amplituden der Strukturfaktoren  $|F_{hkl}|$  den Amplituden des Strukturfaktors  $|F_{-h-k-l}|$  (Friedel-Paar). Anomal streuende Atome dagegen absorbieren bei der spezifischen Wellenlänge der Absorptionskante einen Teil der Strahlungsenergie und geben diese als anomale Strahlung wieder ab. Für Diffraktionsdaten von Proteinen mit anomal streuenden Atomen, die an der Absorptionskante gemessen werden, wird Friedels Gesetz verletzt. Für die Friedel-Paare bei anomaler Streuung gilt nun:

$$|F_{hkl}| \neq |F_{-h-k-l}| \left\{ \begin{array}{l} |F^+| \equiv |F_{hkl}| = |F_{PH}(+)| \\ |F^-| \equiv |F_{-h-k-l}| = |F_{PH}(-)| \end{array} \right\} \quad (12)$$

Dabei lässt sich der Strukturfaktor  $F$  auch als Summe aller Atomformfaktoren  $f$  der Atome in der Elementarzelle ausdrücken.

$$F_{hkl} = \sum_i f_i e^{2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (13)$$

$F_P$ : Strukturfaktor des Proteins

$F_{PH}$ : Strukturfaktor des anomal streuenden Proteins

$F_H$ : Strukturfaktor der Teilstruktur der anomalen Streuer

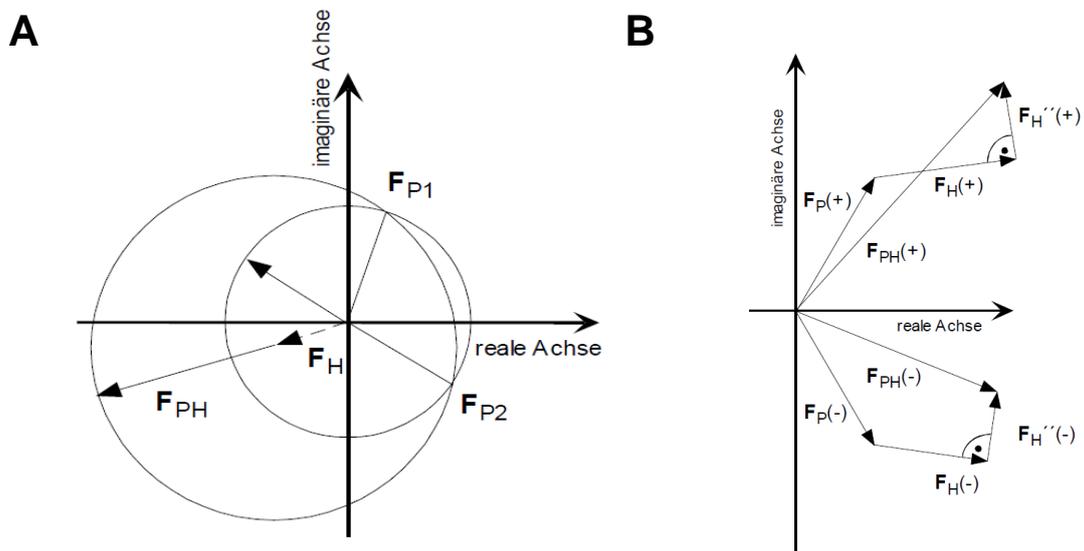
(+): Reflexe  $hkl$

(-): Reflexe  $-h-k-l$

Bei anomaler Streuung wird der Atomformfaktor  $f$ , der sich mit freien Elektronen ergeben würde, um zwei Korrekturfaktoren ergänzt: dem Realteil  $\Delta f'$  und dem Imaginärteil  $i\Delta f''$  des anomalen Streubetrages. Daraus resultiert bei anomaler Streuung für den Atomformfaktor  $f_{anom}$ :

$$f_{anom} = f + \Delta f' + i\Delta f'' = f' + i\Delta f'' \quad (14)$$

Mit Hilfe der Harker-Konstruktion (Abbildung 14A) und des Argand-Diagramms (Abbildung 14B) lassen sich die mathematischen Zusammenhänge (Gleichung 14) bei der anomalen Diffraction graphisch darstellen.



**Abbildung 14:** (A) Harker-Konstruktion für die Phasenbestimmung mit einem Schweratom-Derivat. (B) Argand-Diagramm für anomale Diffraction.  $F_{P(+)}$  und  $F_{P(-)}$ , sowie  $F_{H(+)}$  und  $F_{H(-)}$  sind in Bezug auf die reelle Achse bei anomaler Streuung nicht symmetrisch.

Da die Energie der Absorptionskante von der Umgebung der anomal streuenden Atome im Kristall abhängt, wird diese experimentell durch eine Fluoreszenzmessung am Kristall bestimmt. Wurde die Absorptionskante bestimmt, werden bei einem MAD-Experiment drei Messungen bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt, um aus den resultierenden Streufaktoren  $F(+)$  und  $F(-)$  Phaseninformation zu gewinnen. Dabei nutzt man zum einen die Extremwerte von  $\Delta f'$  (*peak*) und  $\Delta f''$  (*inflection point*) und eine weitere Wellenlänge, bei der  $\Delta f'$  möglichst positiv ist (*remote*). Hier wird ein Datensatz nahe der Energie der Absorptionskante (*peak*) aufgenommen werden, um eine maximale anomale Differenz zu erhalten. Aus der anomalen Differenz erhält man das Bijvoet-Paar mit dessen Hilfe man die Phasen nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\varphi_P = \varphi_H + \frac{\pi}{2} + \cos^{-1} \left[ \frac{|F_{PH}^+|^2 - |F_{PH}^-|^2}{4|F_P||F_H|} \right] = \varphi_{H''} + \cos^{-1} \left[ \frac{|F_{PH}^+|^2 - |F_{PH}^-|^2}{4|F_P||F_H|} \right] \quad (15)$$

Ein Problem bei dieser Methode ist das Auftreten einer Phasenambiguität (zwei mögliche Phasenwinkel für  $F_P$  (Abbildung 14A). Die Auswahl der richtigen Lösung kann durch Dichtemodifikation erleichtert werden.

Für die Phasierung der Daten von Grh1 wurde ein Datensatz an der Schwefelkante aufgenommen und ein Schwefel-SAD (S-SAD) durchgeführt (156). Für die Berechnung der Phasen wurde der Auto-Rickshaw Web Server verwendet (157,158).

### 3.4.6 Molekularer Ersatz (MR)

Der molekulare Ersatz (*molecular replacement*, MR) zur Berechnung der Phasen kann verwendet werden, wenn ein geeignetes Strukturmodell vorhanden ist. Dieses Modell kann von dem gleichen Protein, gelöst in einer anderen Raumgruppe, einer Mutante, einem homologen Protein, einem NMR-Modell oder von Fragmenten anderer Strukturen stammen. Die Kombination der Phasen des Modells mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden erlaubt es, eine Elektronendichtekarte für die noch unbekannte Struktur zu berechnen. Zuvor wird das Modell korrekt in der neuen Kristallzelle durch Rotations- und Translationssuche platziert. Für die Suche nach der Rotationsmatrix wird die Pattersonfunktion verwendet. Diese Funktion stellt eine Fourier-Summation ohne Phasen dar und kann direkt aus den gemessenen Daten ermittelt werden. Auf diese Weise kann auch ohne Kenntnis des Phasenwinkels Information über die Verteilung der Elektronendichte erhalten werden.

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}|^2 \cdot e^{-2i\pi(hu+kv+lw)} \quad (16)$$

Dabei sind  $u$ ,  $v$  und  $w$  die Koordinaten des Pattersonraumes.

Während der Rotationssuche werden die Schwerpunkte des Suchmodells und der gesuchten Struktur überlagert, und durch Drehen des Suchmodells die Orientierung mit dem niedrigsten R-Faktor (Gleichung 17) und höchster Korrelation ermittelt. Bei der Translationssuche wird das orientierte Suchmodell in der Einheitszelle positioniert. Ein Minimum des R-Faktors und ein Anstieg in der Korrelation deuten auf eine korrekte Lösung hin.

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad (17)$$

### 3.4.7 Modellbau und Strukturverfeinerung

Nach dem erstmaligen Einpassen des Strukturmodells in die Elektronendichte, wird das Strukturmodell weiter an die Elektronendichte angepasst. Dies geschieht in sich wiederholenden Zyklen von Modellbau und Verfeinerungsrechnung. Die Strukturverfeinerung dient dabei der Verbesserung der Übereinstimmung der berechneten Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{calc}}$  und der gemessenen Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{obs}}$ . Die Elektronendichte kann auf verschiedene Weisen dargestellt und berechnet werden. Die  $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  Karte stellt die Differenz zwischen der Elektronendichte des Modells und der tatsächlich gemessenen experimentellen Elektronendichte dar. Bei einem Differenzdichtenniveau von ca.  $3 \sigma$  können mit dieser Karte falsch platzierte bzw. noch fehlende Atome identifiziert werden (Gleichung 18). Die Elektronendichtekarte  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  (Gleichung 19) zeigt bei einem Differenzdichteniveau von  $1 \sigma$  die gut interpretierte Elektronendichte des Modells.

$$\varphi_{(F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}\| \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\phi_{\text{calc}}} \quad (18)$$

$$\varphi_{(2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}})} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \|2 \cdot F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}\| \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\phi_{\text{calc}}} \quad (19)$$

Zur Verfeinerung wurde das Programm REFMAC5 (159,160) verwendet, das basierend auf einem *maximum likelihood* Algorithmus das Proteinmodell an die gemessenen Daten angleicht, nachdem mit Hilfe von ARP/wARP ein erstes Modell der Strukturen generiert wurde. ARP/wARP platziert dabei zunächst einzelne Atome in der Dichte, um sie anschließend zu einem Peptidstrang zu verbinden. Durch alternierende Zyklen von manuellem Modellbau und Verfeinerung werden die ersten Modelle optimiert und vervollständigt. Zusätzlich zu REFMAC5 wurde noch das Programm TLSMD (161) benutzt, das die Verfeinerung eines anisotropen allgemeinen Temperaturfaktors erlaubt. Für den Modellbau wurde COOT verwendet (162,163). Die Strukturen wurden mit Hilfe von MOLPROBITY validiert (164) und mit PyMol dargestellt.

Die Qualität der Übereinstimmung zwischen den gemessenen Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{obs}}$  und den vom Modell stammenden  $F_{\text{calc}}$  wird durch den R-Faktor ausgedrückt:

$$R = \frac{\sum |F_{\text{obs}}(h, k, l) - F_{\text{calc}}(h, k, l)|}{\sum F_{\text{obs}}(h, k, l)} \quad (20)$$

Um eine Überinterpretation der Daten im Laufe des iterativen Modellbaus der Verfeinerungsschritte der Daten zu vermeiden, werden zwei R-Faktoren,  $R_{\text{work}}$  und  $R_{\text{free}}$ , berechnet. Deren Differenz sollte je nach Auflösung des Datensatzes 3-7% nicht überschreiten. Der freie R-Faktor  $R_{\text{free}}$  misst die Übereinstimmung des atomaren Modells mit einem Teil der beobachteten Reflexe, die nicht in der Verfeinerung verwendet werden (ca. 5-7% aller Reflexe). Die übrigen Reflexe werden für die Berechnung des  $R_{\text{work}}$  verwendet.

Über den Temperaturfaktor  $B$  (Gleichung 21), der mit der mittleren quadratischen Auslenkung  $u$  der Atome in deren Ruhelage verknüpft ist, wird im Laufe der Verfeinerung der isotrope Temperaturfaktor jedes Atoms verbessert.

$$B = 8\pi^2\langle u \rangle^2 \quad (21)$$

Welche Details des Proteins letztendlich interpretiert werden können, hängt von der Auflösung der Beugungsdaten ab. Je höher die Auflösung, desto mehr Reflexe stehen für die Bestimmung der Atomkoordinaten, Besetzungszahl und des B-Faktors zur Verfügung.

### 3.5 Erstellung des Bindungsmodells von GRASP65 und GM130

Für die Erstellung des Bindungsmodells von GRASP65 und GM130 wurden zuerst die beiden einzelnen PDZ-Domänen von GRASP65 mit dem *threading* Protokoll der RosettaCommons-Software (Version 3.2 (165)) zu einem Molekül, der GRASP-Domäne, zusammengefügt. Dieser Schritt erfolgte in Zusammenarbeit mit Marcel Jurk (AG Schmieder, FMP, Berlin). Da während der Erstellung dieser Arbeit die Struktur der GRASP-Domäne des humanen GRASP55 veröffentlicht wurde (114), wurde diese Struktur als Basis für die Berechnung verwendet.

Nachdem das Modell der GRASP-Domäne erstellt worden war, wurde das GM130-Peptid  $^{\text{N}}\text{VKITVI}^{\text{C}}$  mit den Programmen SYBYL-X 1.3 (166) und AMBER7 (167) platziert. Die Einpassung des Peptids erfolgte in Kooperation mit Jonas Protze (AG Gerd Krause, FMP, Berlin). Als Basis für die Positionierung des Peptids wurden die Kristallstrukturen von RseP (PDB-Eintrag: 3ID4 (168)) und MAGI-1 (PDZ1, PDB-Eintrag: 2I03 (169)) verwendet.

## 4 Ergebnisse

Für die strukturelle Charakterisierung der PDZ-Domänen der homologen Proteine GRASP65 und Grh1 wurde eine Vielzahl von unterschiedlich langen Proteinkonstrukten kloniert, gereinigt und mit diversen Kristallisation-Screens angesetzt. Für die Untersuchung des Bindemechanismus von GRASP65 an GM130, sowie Grh1 an Bug1 bzw. Uso1 wurden ITC-Interaktionsstudien durchgeführt. Für eine strukturelle Untersuchung der Bindung wurden nach den ITC-Experimenten erneut Kristallisationsexperimente durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass für die Kristallisationsansätze genügend Ligand vorlag, wurde ein 2 bis 5 facher Überschuss an Ligand eingesetzt.

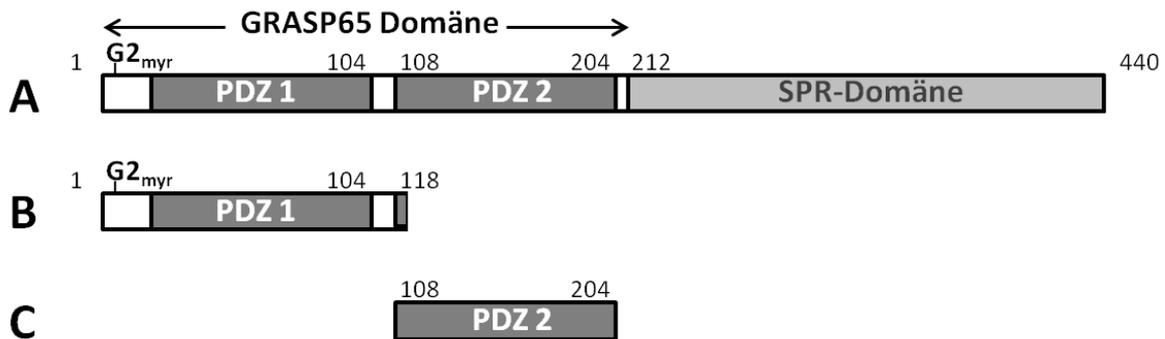
### 4.1 Strukturen der PDZ-Domänen GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup> des Golgi-assoziierten Proteins GRASP65

#### 4.1.1 Rekombinante Expression und Reinigung

Für initiale Kristallisationsversuche von GRASP65 wurden 20 unterschiedliche Konstrukte basierend auf Vorhersagen der Sekundärstruktur und Domänengrenzen entworfen, kloniert, in *E. coli* hergestellt und auf Löslichkeit getestet (Tabelle 9, Kapitel 3.1.10). Für alle Konstrukte wurde die kodierende DNS mittels PCR amplifiziert und durch die LIC-Klonierungsmethode in den Expressionsvektor pET-46 Ek/LIC kloniert. *E. coli* Rosetta T7 Express Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden transformiert. Die Expression erfolgte jeweils in 12 l SB-Medium, das mit 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt wurde. Alle Konstrukte wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen His<sub>6x</sub>-tag exprimiert. Um den tag proteolytisch entfernen zu können, wurde über den Vorwärts-Primer eine Schnittstelle für die *PreScission*-Protease eingefügt, die anstelle der intrinsischen Enterokinase-Schnittstelle verwendet wurde. Die Expression der Konstrukte wurde bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 1,0 mit 1 mM IPTG induziert, danach wurde die Expressionstemperatur von 37 °C auf 22 °C gesenkt und die Kulturen für 16-18 h inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

Im Folgenden werden die Reinigungsprofile für die Konstrukte GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup> gezeigt, da dies die beiden Konstrukte sind, die kristallisiert werden konnten. Graphisch ist die Domänenarchitektur der kristallisierten Konstrukte in Abbildung 15

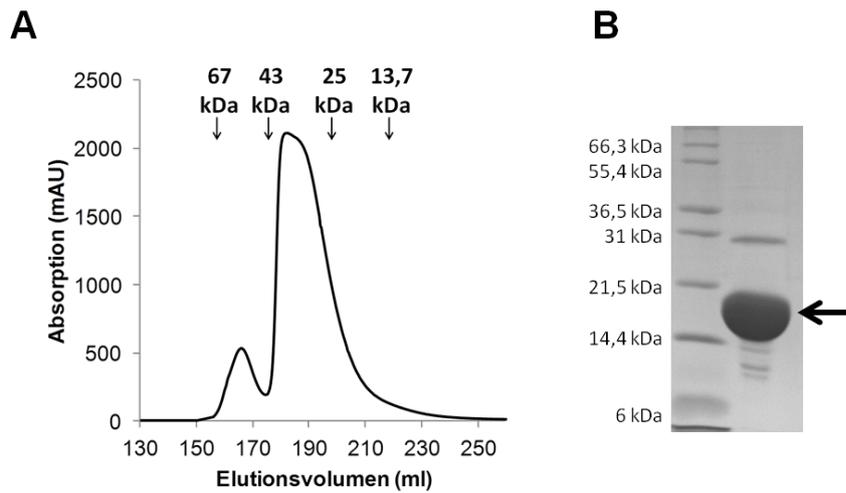
aufgeführt. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden auf die gleiche Art und Weise exprimiert und gereinigt.



**Abbildung 15:** Übersicht der Domänenarchitektur von GRASP65. (A) Domänenarchitektur von GRASP65 in Volllänge, gefolgt von den beiden Konstrukten GRASP65<sup>PDZ1</sup> (B) und GRASP65<sup>PDZ2</sup> (C), deren Kristallstrukturen bestimmt werden konnten. (G2<sub>myr</sub>: Position des myristoylierten Glycins).

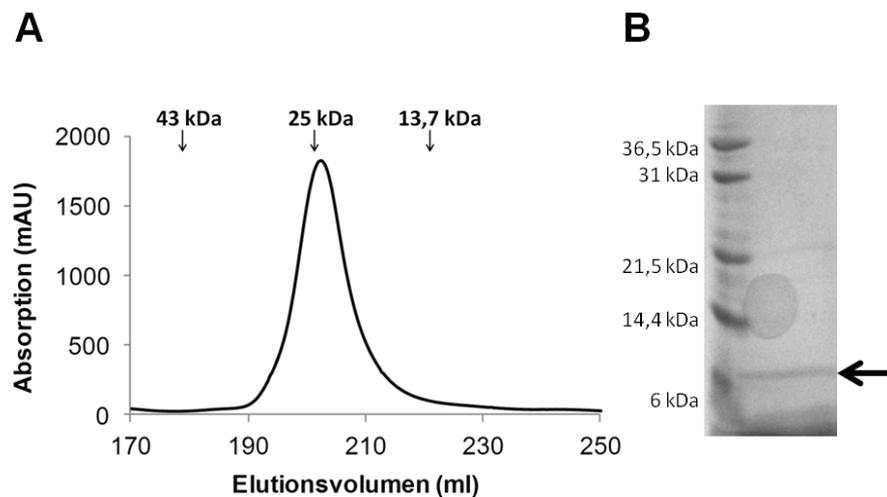
Für die Reinigung der Konstrukte wurden zuerst die *E. coli*-Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der erste Reinigungsschritt war eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose. Nach Proteolyse des His<sub>6x</sub>-tags während der Dialyse, zum Entfernen des Imidazols, wurde eine erneute Affinitätschromatographie durchgeführt, um den freien His<sub>6x</sub>-tag, ungeschnittenes Fusionsprotein und die Protease zu entfernen. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex<sup>TM</sup> 75 26/60 Säule durchgeführt. Die Reinheit der Konstrukte wurde nach jedem Reinigungsschritt mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese überprüft.

In Abbildung 16 ist das Reinigungsprofil von GRASP65<sup>PDZ1</sup> dargestellt. Das Protein eluierte in zwei Peaks, einem kleineren Peak, der Verunreinigungen enthielt, und einem größeren Peak, dem GRASP65<sup>PDZ1</sup> in hoher Reinheit zugeordnet werden konnte. Der Elutionszeitpunkt deutet auf einen hydrodynamischen Radius hin, der dem eines Dimers entspricht. Aus zwölf Litern Kultur konnten 288 mg Protein (24 mg/l) gereinigt werden.



**Abbildung 16: Reinigungsprofil von GRASP65<sup>PDZ1</sup>.** (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von GRASP65<sup>PDZ1</sup> durchgeführt mit einer Superdex<sup>TM</sup> 75 26/60. (B) SDS-PAGE des konzentrierten Proteins GRASP65<sup>PDZ1</sup>, welches zur Kristallisation verwendet wurde. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 13 kDa. Die Molekulargewichte der verwendeten Standardkalibrierungsproteine sind über dem Chromatogramm in (A) eingezeichnet.

Das Reinigungsprofil für GRASP65<sup>PDZ2</sup> ist in Abbildung 17 dargestellt. Dieses Konstrukt eluierte in einem einzelnen symmetrischen Peak in ausreichender Reinheit von der Gelfiltrationssäule. GRASP65<sup>PDZ2</sup> eluierte ebenfalls als Dimer. Aus zwölf Litern Kultur konnten 55 mg Protein (4,6 mg/l) gereinigt werden.



**Abbildung 17: Reinigungsprofil von GRASP65<sup>PDZ2</sup>.** (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von GRASP65<sup>PDZ2</sup> durchgeführt mit einer Superdex<sup>TM</sup> 75 26/60. (B) SDS-PAGE des konzentrierten Proteins, welches für die Kristallisation verwendet wurde. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt 10,5 kDa. Die Molekulargewichte der verwendeten Standardkalibrierungsproteine sind über dem Chromatogramm in (A) eingezeichnet.

Für die initialen Kristallisationsansätze wurden die Konstrukte mit Amicon Ultra-zentrifugationseinheiten auf 10-15 mg/ml konzentriert und anschließend bei 14.000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, um eventuell vorhandenes Präzipitat oder Verunreinigungen abzutrennen.

In Tabelle 11 sind die Ausbeuten aller verwendeten GRASP65-Konstrukte aufgelistet. Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf einen Liter SB-Medium. Für Kristallisationsansätze wurden alle Konstrukte verwendet, die eine Ausbeute > 1 mg/l erzielten.

**Tabelle 11: Ausbeuten an gereinigtem Protein der unterschiedlichen GRASP65-Konstrukte.**

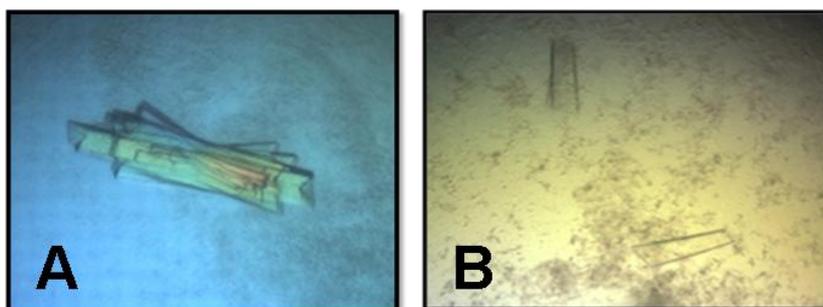
Domäne	Ausbeute pro l Kultur	Domäne	Ausbeute pro l Kultur
GRASP65 <sup>FL</sup>	-, unlöslich	GRASP65 <sup>PDZ1_16-108</sup>	-, unlöslich
GRASP65 <sup>ΔN1-15</sup>	-, unlöslich	GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	24,0 mg/l
GRASP65 <sup>ΔN1-30</sup>	-, unlöslich	GRASP65 <sup>PDZ1_16-118</sup>	-, keine Überexpression
GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2</sup>	2,9 mg/l	GRASP65 <sup>PDZ2_94-204</sup>	2,1 mg/l
GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2ΔN1-15</sup>	-, unlöslich	GRASP65 <sup>PDZ2</sup>	4,6 mg/l
GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2ΔN1-30</sup>	1,7 mg/l	GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2_13-197</sup>	0,6 mg/l
GRASP65 <sup>PDZ1_1-94</sup>	-, keine Überexpression	GRASP65 <sup>PDZ2108-199</sup>	3,5 mg/l
GRASP65 <sup>PDZ1_16-94</sup>	-, keine Überexpression	GRASP65 <sup>1-204_L1152-153AA</sup>	2,0 mg/l
GRASP65 <sup>PDZ1_31-94</sup>	-, keine Überexpression	GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2_13-208RPPFE</sup>	0,2 mg/l
GRASP65 <sup>PDZ1_1-108</sup>	1,0 mg/l	GRASP65 <sup>PDZ1+PDZ2_1-208</sup>	<<0,1 mg/ml

Die Indizes geben die Domänengrenzen/Deletionen an.

#### 4.1.2 Kristallisation von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup>

Die initialen Kristallisationsversuche wurden mit den *Sparse-Matrix*, *Grid*- und *Incomplete-Factorial-Screens* in 96-well Platten durchgeführt (Kapitel 3.4.1). Dabei wurde ein Tropfenvolumen von 600 nl (300 nl Protein und 300 nl Fällungsmittel) gewählt. Das Reservoirvolumen betrug 80 µl. Die Kristallisationsplatten wurden bei 20 oder 4 °C gelagert und regelmäßig observiert.

GRASP65<sup>PDZ1</sup> kristallisierte bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 10,7 mg/ml in einer Bedingung aus dem JBS-JCSG *Screen*, die 24% PEG1500 und 20% Glycerin enthielt. Erste kristalline Strukturen zeigten sich bereits 24 h nach dem Ansetzen der Kristallisationsplatte. Nach drei Tagen hatte der Kristall (Abbildung 18A) eine Größe von 300x200x100 µm<sup>3</sup> erreicht und wurde in eine Lösung überführt, die 80% des Fällungsmittels und 20% PEG 400 als Gefrierschutz enthielt. Der Kristall wurde mit einer Nylonschleife aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.



**Abbildung 18: GRASP65-Kristalle, von denen Diffraktionsdaten aufgenommen wurden. (A) Kristall des GRASP65<sup>PDZ1</sup>-Konstrukts. Das Protein kristallisierte in 24% PEG 1500 und 20% Glycerin bei 20 °C. Die Proteinkonzentration betrug 10,7 mg/ml. Der Kristall hatte eine Größe von 300x200x100 µm<sup>3</sup>. (B) Kristalle des GRASP65<sup>PDZ2</sup>-Konstrukts. Das Protein kristallisierte in 1,4 M Na/K Phosphat, pH 8,2 bei 20 °C. Die Proteinkonzentration betrug 9,7 mg/ml. Die Kristalle hatten eine Größe von 120x100x50 µm<sup>3</sup>.**

GRASP65<sup>PDZ2</sup> kristallisierte bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 9,7 mg/ml in 1,4 m Na/K Phosphat, einer Bedingung aus der pHClear-*Suite* (Qiagen). Nach etwa drei Wochen hatten die Kristalle (Abbildung 18B) eine Größe von 120x100x50 µm<sup>3</sup> erreicht. Sie wurden in eine Gefrierschutzlösung überführt, die aus 80% Reservoirlösung und 20% Glycerin bestand, mit einer Nylonschlinge aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 4.1.3 Datensammlung, Strukturbestimmung und Strukturverfeinerung

Die Kristalle von beiden Konstrukten wurden am Messplatz MX 14.1 am Synchrotron BESSY des Helmholtz-Zentrums Berlin für Materialien und Energie GmbH (HZB) vermessen. Für das Konstrukt GRASP65<sup>PDZ1</sup> wurden bei 100 K Diffraktionsdaten bis zu einer maximalen Auflösung von 2,7 Å aufgenommen. Für das Konstrukt GRASP65<sup>PDZ2</sup> konnten Diffraktionsdaten bis zu einer maximalen Auflösung von 2,1 Å aufgenommen werden.

Mit dem Programm XDS (155,170) wurden die Daten beider Konstrukte prozessiert, skaliert und reduziert. Die Datenstatistiken für GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup> befinden sich in Tabelle 13.

Durch Berechnung des Matthews-Koeffizienten (171) konnte die Anzahl der Moleküle pro asymmetrischer Einheit (mol/AU) bestimmt werden. Diese Werte, sowie der Lösungsmittelgehalt, die Auflösung und der initiale  $R_{\text{work}}$ -Wert sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Auflistung der Matthews-Koeffizienten, des Lösungsmittelgehalts und der initialen  $R_{\text{work}}$ -Werte von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup>.**

Konstrukt	Matthews-Koeffizient (Å <sup>3</sup> /Da)	Lösungsmittelgehalt (%)	Auflösung (Å)	Initialer $R_{\text{work}}$ (%)	mol/AU*
GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	2,23	45	2,7	31,5	1
GRASP65 <sup>PDZ2</sup>	2,32	47	2,1	33,6	2

\*Anzahl der Moleküle (mol) pro asymmetrischer Einheit (AU) (*molecules per asymmetric unit*)

Die Phaseninformationen für die Berechnung der Elektronendichteverteilung wurden für beide Strukturen durch molekularen Ersatz erhalten. Dazu wurde das Programm PHASER (172) aus dem CCP4-Softwarepaket (173,174) verwendet. Als Suchmodell dienten, sowohl für die Struktur von GRASP65<sup>PDZ1</sup>, als auch für die Struktur von GRASP65<sup>PDZ2</sup>, die Koordinaten von GRASP55 (PDB-Eintrag: 3RLE). Mit Hilfe von ARP/wARP konnten initiale Modelle erstellt werden. Durch alternierende Zyklen manuellen Modellbaus mit dem Programm COOT (162,163) und anschließender Maximum-Likelihood-Verfeinerung mit dem Programm REFMAC5 (159,160) konnte die Struktur von GRASP65<sup>PDZ1</sup>, nach individueller B-Faktorberechnung, auf einen finalen

$R_{\text{work}}$ -Wert von 22,3% und einen  $R_{\text{free}}$ -Wert von 27,3% verfeinert werden. Für die Struktur von GRASP65<sup>PDZ2</sup> wurden, nach einer TLSMD-Unterteilung (161) in zwei Gruppen, ein  $R_{\text{work}}$ -Wert von 21,3% und ein  $R_{\text{free}}$ -Werte von 26,3% erreicht.

Von den 118 Aminosäuren des Konstrukts GRASP65<sup>PDZ1</sup> waren die Aminosäuren 13-118 sehr gut in der Elektronendichte definiert. Für die Aminosäuren 1-12 wurde keine ausreichende Elektronendichte erhalten und dementsprechend konnte für diese Reste kein Modell gebaut werden. Zusätzlich zu den 118 Aminosäuren konnten zwei Wasser- und zwei Glycerinmoleküle zugeordnet werden.

Für das Konstrukt GRASP65<sup>PDZ2</sup> konnten für Kette A ein Modell mit 96 Aminosäuren (AS 109-204) und für Kette B ein Modell mit 95 Aminosäuren (AS 110-204) gebaut werden. In beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit sind einige Aminosäuren nicht genau definiert; für Kette A sind dies die Aminosäuren 108, sowie 142-146; für das Strukturmodell der Kette B sind die Aminosäuren 108, 109, sowie 140-147 nicht definiert, da keine ausreichende Elektronendichte vorhanden war.

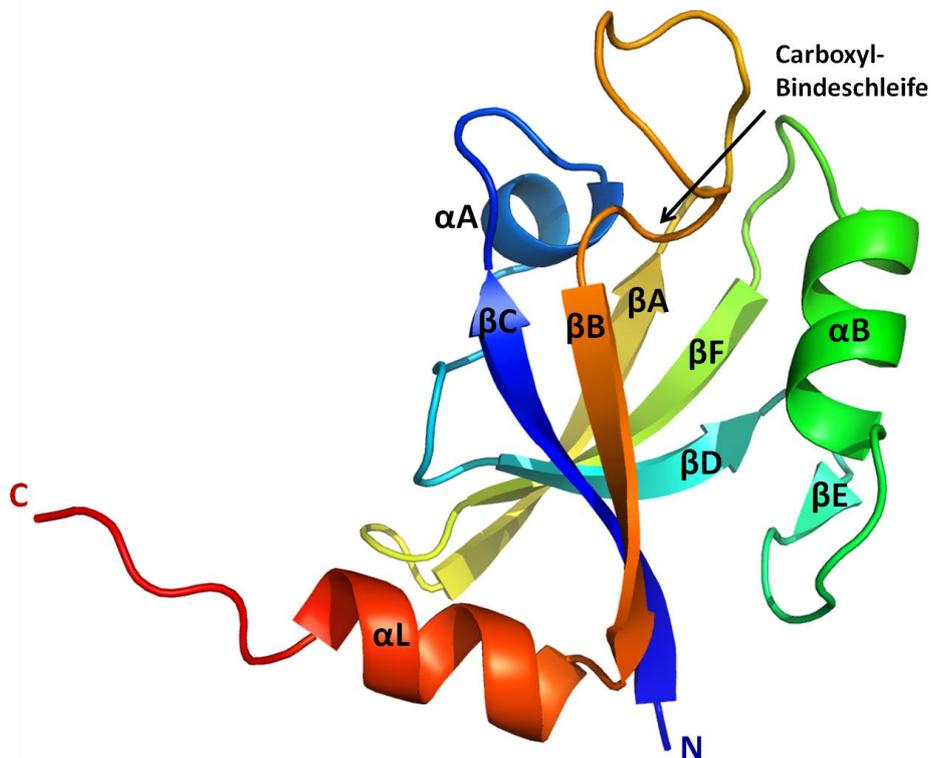
In der Ramachandran-Analyse (175) wurden für beide Strukturen keine ungewöhnlichen  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Dihedralwinkel festgestellt. Eine Zusammenfassung der Verfeinerungsstatistiken findet sich in Tabelle 13.

**Tabelle 13: Daten- und Verfeinerungstatistiken von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup>.**

	GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	GRASP65 <sup>PDZ2</sup>
<b>Datensammlung</b>		
Messplatz	BESSY-MX 14.1	BESSY-MX 14.1
Auflösung (Å)	33,93-2,67 (2,74-2,67)	26,85-2,12 (2,18-2,12)
Wellenlänge (Å)	0,91841	0,91841
Raumgruppe	C222 <sub>1</sub>	C2
Beobachtete Reflexe	15378 (1150)	43990 (3296)
Unabhängige Reflexe	3573 (260)	10761 (790)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	20,7 (2,3)	15,8 (3,0)
Redundanz	4,3 (4,4)	4,1 (4,2)
Vollständigkeit (%)	99,8 (100,0)	99,3 (100,0)
Lösungsmittelgehalt (%)	45	47
R <sub>meas</sub> (%)	6,2 (75,5)	7,8 (62,8)
<b>Zellkonstanten</b>		
a, b, c (Å)	46,38, 63,16, 80,81	50,83, 82,61, 49,22
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90, 90, 90	90, 110,82, 90
<b>Verfeinerung</b>		
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	22,3/27,3	21,3/26,3
Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome	854	1434
Anzahl der Wassermoleküle	2	49
Anzahl der Glycerine	1	2
Anzahl der Aminosäuren	106	191
<b>r.m.s.-Abweichungen</b>		
Bindungslängen (Å)	0,014	0,011
Bindungswinkel (°)	1,651	1,362
Mittlerer B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	57,67	18,45
<b>Ramachandran Statistik</b>		
Reste in bevorzugten Regionen (%)	92,4	94,2
Reste in erlaubten Regionen (%)	7,6	5,8
Reste in nicht erlaubten Regionen (%)	0	0

#### 4.1.4 Kristallstruktur von GRASP65<sup>PDZ1</sup>

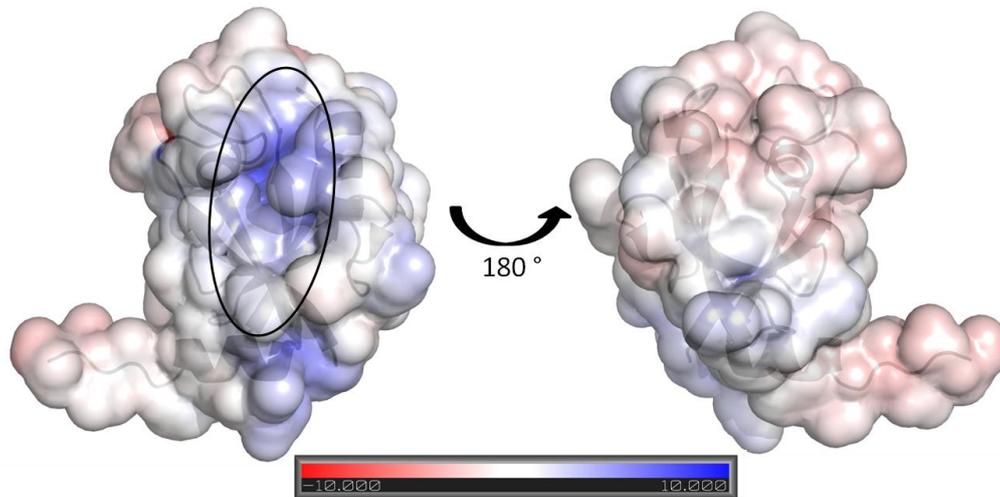
Die Kristallstruktur von GRASP65<sup>PDZ1</sup> (AS 1-118), der ersten PDZ-Domäne von GRASP65 ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19:** Kristallstruktur von GRASP65<sup>PDZ1</sup>. Das hier dargestellte Monomer enthält sechs  $\beta$ -Faltblattstränge ( $\beta$ A- $\beta$ F) und drei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ A,  $\alpha$ B, und  $\alpha$ L). Das Farbmuster verläuft vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot). Die Nummerierung der Sekundärstrukturelemente erfolgte analog zu bereits bekannten humanen PDZ-Domänen.

GRASP65<sup>PDZ1</sup> ist ein globuläres Protein, dessen Monomer (ca. 35 x 20 x 23 Å<sup>3</sup>) aus sechs antiparallelen  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ A- $\beta$ F), sowie einer kurzen ( $\alpha$ A) und einer langen ( $\alpha$ B)  $\alpha$ -Helix, die die  $\beta$ -Faltblätter flankieren, besteht. Die sechs  $\beta$ -Stränge weisen eine  $\beta$ -sandwich Faltung, bestehend aus zwei gegenüberliegenden  $\beta$ -Faltblätter auf, wie sie typischerweise in PDZ-Domänen vorkommt (114). Die C-terminale Helix  $\alpha$ L (L=*linker*) ist die Verknüpfung der ersten und der zweiten PDZ-Domäne innerhalb der GRASP-Domäne. Wie bereits für PDZ-Domänen bekannt, kommen der  $\beta$ C- und der terminale  $\beta$ B-Strang nebeneinander zu liegen. Der Strang  $\beta$ C ist in die Ausbildung einer Peptid-Bindungstasche involviert, die sich zwischen dem Strang  $\beta$ B und der Helix  $\alpha$ B befindet und an ihrem oberen Ende von der sogenannten Carboxyl-Bindeschleife begrenzt wird. Dabei handelt es sich um die Schleifenregion zwischen den Strängen  $\beta$ B und  $\beta$ A. Wie in Abbildung 20 zu sehen, ist die

Liganden-Bindungstasche der ersten PDZ-Domäne positiv geladen, während der Rest der Oberfläche eher hydrophober bis leicht negativer Natur ist.



**Abbildung 20:** Elektrostatistisches Oberflächenpotential von GRASP65<sup>PDZ1</sup>. Das Oberflächenpotential ist entsprechend der Ladung gefärbt, wobei rot -10 kT/e und blau +10 kT/e entspricht. Die Berechnung der elektrostatistischen Potentiale erfolgte mit dem Programm APBS (176).

#### 4.1.5 Kristallstruktur von GRASP65<sup>PDZ2</sup>

Da die Kristallisation der vollständigen GRASP-Domäne von GRASP65 nicht möglich war, wurden die beiden einzelnen PDZ-Domänen getrennt voneinander kristallisiert. In Abbildung 21 ist die 2,2 Å Kristallstruktur des GRASP65<sup>PDZ2</sup>-Konstrukts abgebildet, das der zweiten PDZ-Domäne von GRASP65 entspricht.

Die Strukturanalyse zeigt, dass es sich auch hier um eine PDZ-Domäne mit der typischen  $\beta$ -sandwich Faltung handelt. Das  $\beta$ -sandwich besteht aus fünf  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ A- $\beta$ D und  $\beta$ F), die von  $\alpha$ -Helices flankiert werden. Bei den  $\alpha$ -Helices handelt es sich um eine, zwischen den  $\beta$ -Strängen  $\beta$ C und  $\beta$ D gelegene, kürzere Helix ( $\alpha$ A), und um eine längere ( $\alpha$ B) Helix, die zwischen den  $\beta$ -Strängen  $\beta$ D und  $\beta$ F lokalisiert ist. Auf Grund fehlender Elektronendichte werden nicht definierte Reste (AS 140-146) als gestrichelte Linie dargestellt. Wie in der Struktur von GRASP65<sup>PDZ1</sup> kommen auch hier die beiden  $\beta$ -Stränge  $\beta$ C und  $\beta$ B nebeneinander zu liegen. Und auch hier ist der  $\beta$ -Strang  $\beta$ B am Aufbau der Peptid-Bindungstasche zusammen mit der Helix  $\alpha$ B beteiligt. Die Carboxyl-Bindeschleife am oberen Ende der Bindungstasche komplettiert die Peptid-Bindungstasche, die im

Gegensatz zur ersten PDZ-Domäne hydrophober Natur ist, während der Rest der Oberfläche tendenziell negativ geladen ist (Abbildung 22).

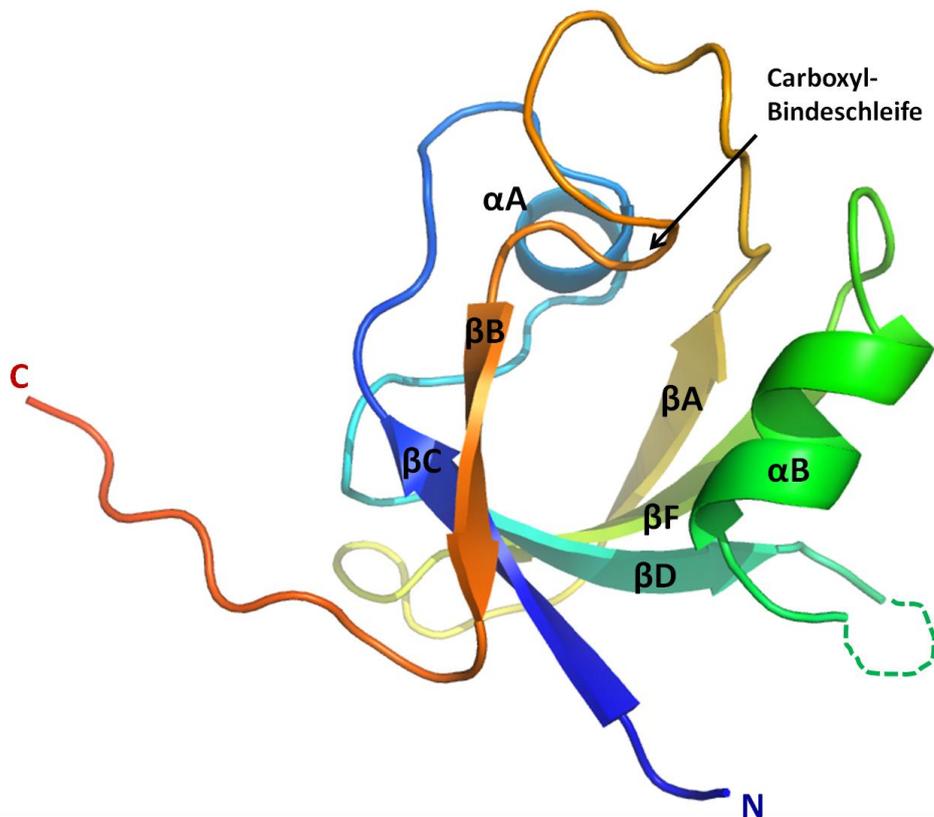


Abbildung 21: Kristallstruktur von GRASP65<sup>PDZ2</sup>. Das hier dargestellte Monomer der Kette A enthält fünf  $\beta$ -Stränge ( $\beta$ A-  $\beta$ D und  $\beta$ F) und zwei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ A und  $\alpha$ B). Das Farbmuster verläuft vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot). Ungeordnete Reste sind durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

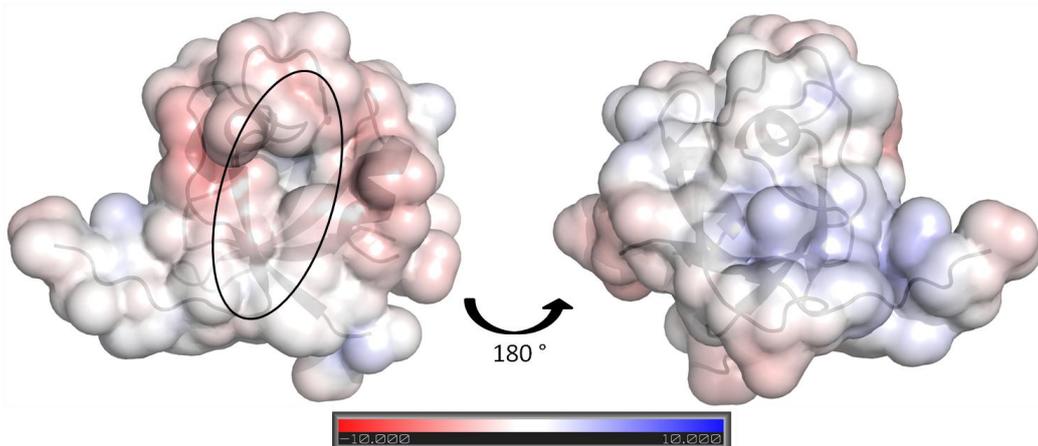


Abbildung 22: Elektrostatisches Oberflächenpotential von GRASP65<sup>PDZ2</sup>. Das Oberflächenpotential ist entsprechend der Ladung gefärbt, wobei rot -10 kT/e, und blau +10 kT/e entspricht. Die Berechnung der elektrostatischen Potentiale erfolgte mit dem Programm APBS (176).



Eine genauere Betrachtung des Sequenzvergleiches ergibt, dass sich die konservierten Reste in Bereichen befinden, die nicht an der Ausbildung der Peptid-Bindungstasche beteiligt sind. Namentlich sind dies Bereiche der Helix  $\alpha A$ , sowie innerhalb der  $\beta$ -Stränge  $\beta F$  und  $\beta A$ . Die beiden Strukturelemente, die die Peptid-Bindungstasche ausbilden,  $\beta$ -Strang  $\beta B$  und Helix  $\alpha B$ , hingegen sind nicht konserviert, wie sich bereits in den unterschiedlichen elektrostatischen Oberflächenpotentialen beider Bindungstaschen gezeigt hatte (Abbildung 20, Abbildung 22). Die Carboxyl-Bindeschleife weist dagegen einige konservierte Reste auf.

#### 4.1.7 Dimerisierung von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup>

Bereits während der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 16, Abbildung 17) war zu erkennen, dass es sich bei GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup> um dimere Proteine handelt. Eine Idee, wie diese Dimere aussehen könnten, ergibt sich aus den Kristallpackungen. Bei GRASP65<sup>PDZ1</sup>, das in der Raumgruppe C222<sub>1</sub> mit einem Molekül pro asymmetrischer Einheit kristallisierte, wird das Dimer über eine kristallographische zweizählige Achse aufgebaut. Bei GRASP65<sup>PDZ2</sup>, das in der Raumgruppe C2 mit zwei Molekülen pro asymmetrischer Einheit kristallisierte, wird das Dimer durch eine nicht kristallografische Symmetrie (*non-crystallographic symmetry*, NCS) dargestellt.

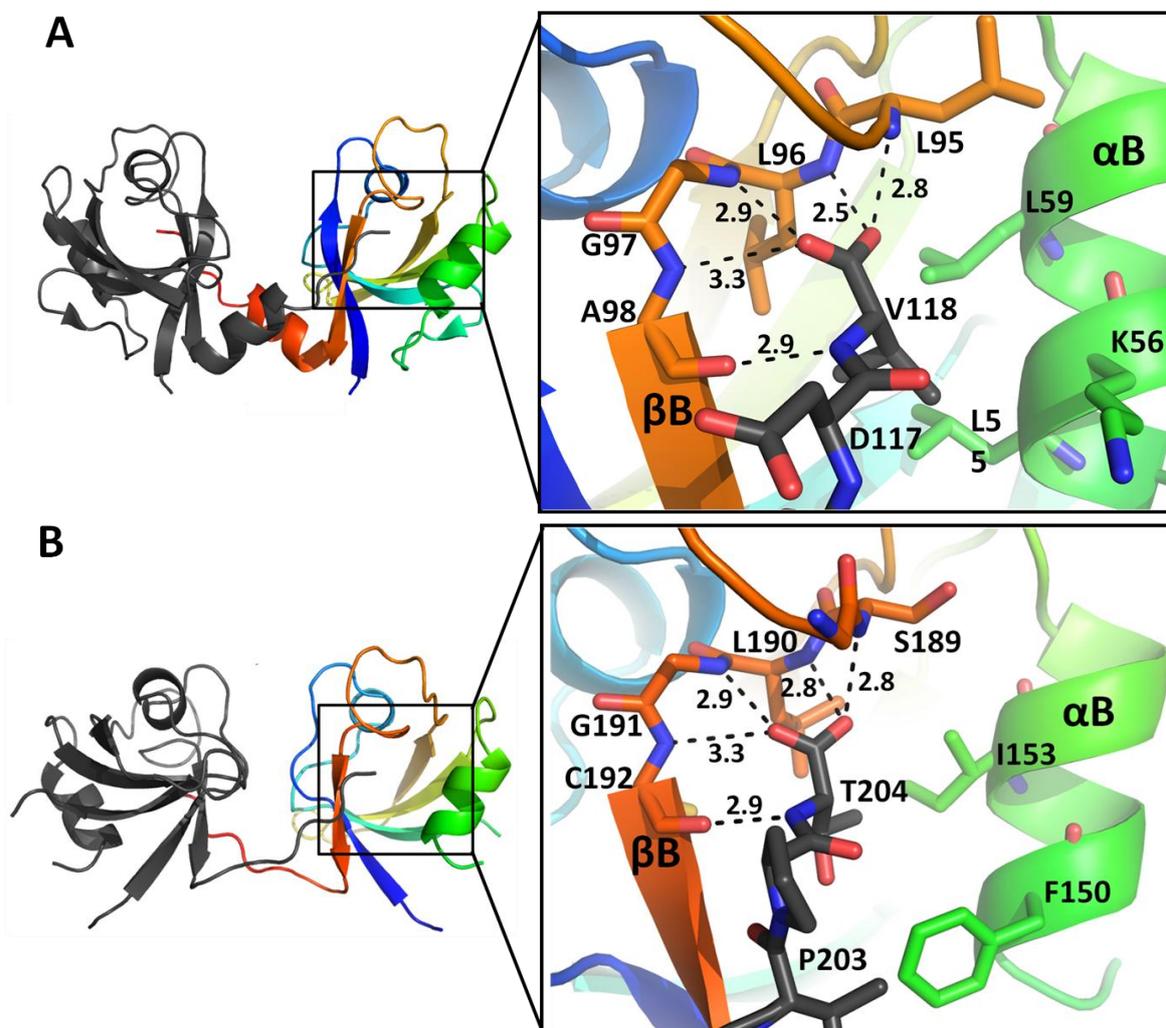
Sowohl bei GRASP65<sup>PDZ1</sup>, als auch bei GRASP65<sup>PDZ2</sup> wird das Dimer über die Peptid-Bindungstasche gebildet. Dabei bildet der C-Terminus des ersten Moleküls mit der Carboxyl-Bindeschleife des zweiten Moleküls Wasserstoffbrücken aus (Abbildung 24) und imitiert somit die Ligandenbindung, wie sie bei PDZ-Domänen vorkommt.

In der Struktur von GRASP65<sup>PDZ1</sup> (Abbildung 24A) bildeten sich vier Wasserstoffbrücken zwischen der Carboxylgruppe der letzten Aminosäure Val118 aus Molekül 2 und dem Peptidrückgrat der Aminosäuren Leu95, Leu96, Gly97 und Ala98 aus Molekül 1 aus. Zusätzlich interagiert die Seitenkette Ala98 mit dem Peptidrückgrat von Val118.

Bei GRASP65<sup>PDZ2</sup> interagiert die Carboxylgruppe des C-terminalen Thr204 (Molekül 2) mit dem Rückgrat der Aminosäuren Ser189, Leu190, Gly191 und Cys192 (Molekül 1), und bildet ebenfalls vier Wasserstoffbrücken aus (Abbildung 24B). Cys192 wechselwirkt über seine Seitenkette mit dem Peptidrückgrat von Thr204. Auf diese Weise bildet sich eine zusätzliche fünfte Wasserstoffbrücke aus.

Eine Berechnung der Kontaktfläche für beide PDZ-Domänen ergibt, dass mit 1027 Å<sup>2</sup> 9,5% der Gesamtoberfläche (10850 Å<sup>2</sup>) von GRASP65<sup>PDZ1</sup> an der Interaktion beteiligt

sind. Die Kontaktfläche des GRASP65<sup>PDZ2</sup> Dimers hat eine Größe von 833 Å<sup>2</sup>. Dies entspricht 8,5% der zugänglichen Oberfläche (SAS: *solvent accessible surface*). Die Daten wurden mit Hilfe des PDBe PISA-Servers berechnet (178).



**Abbildung 24:** Dimerisierung von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup>. (A) Dimer von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und Details der Bindungstasche. (B) Dimer von GRASP65<sup>PDZ2</sup> und Details der Bindungstasche. Molekül 1 des Dimers ist jeweils farbcodiert vom N-Terminus in blau bis zum C-Terminus in rot dargestellt. Molekül 2 wird in grau, Wasserstoffbrücken werden durch gestrichelte Linien dargestellt. Die Abstände zwischen den Atomen werden in Ångstrom (Å) angegeben. Sauerstoffatome werden in rot, Stickstoffatome in blau und Schwefelatome in gelb dargestellt.

Wie bereits in Kapitel 1.3.3 erwähnt, ist das typische Bindungsmotiv innerhalb der Carboxyl-Bindeschleife das R/K-XXX-G<sub>1</sub>-Φ<sub>2</sub>-G<sub>3</sub>-Φ<sub>4</sub>-Motiv. Dabei handelt es sich an Position 2 und 4 um hydrophobe Aminosäuren. An Position 1 ist eine variable Besetzung

– G/S/T/F – möglich. Dies ist bei GRASP65<sup>PDZ1</sup> der Fall. Die Carboxyl-Bindeschleife der ersten PDZ-Domäne von GRASP65 enthält mit XXX-L<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-G<sub>3</sub>-A<sub>4</sub> eine in Position 1 veränderte Variante anstelle des klassischen Bindungsmotivs. Die Peptid-Bindungstasche von GRASP65<sup>PDZ2</sup> enthält dagegen mit XXX-S<sub>1</sub>L<sub>2</sub>G<sub>3</sub>C<sub>4</sub> eine stark konservierte Carboxyl-Bindeschleife.

### 4.1.8 Die GRASP-Domäne

Wie in Abbildung 15 beschrieben, besteht GRASP65 aus einer N-terminalen GRASP- und einer C-terminalen SPR-Domäne. Da ein lösliches Konstrukt inklusive SPR-Domäne nicht hergestellt werden konnte, konnte GRASP65 nicht als Ganzes kristallisiert werden. Eine Kristallisation der GRASP-Domäne war durch eine Trennung ihrer beiden PDZ-Domänen möglich. Da zeitgleich zur Strukturbestimmung von GRASP65 in dieser Arbeit, die Struktur der GRASP-Domäne des humanen GRASP55 bestimmt wurde (114), wurde ein Modell auf Basis der vorhandenen GRASP55-Struktur (PDB-Eintrag: 3RLE) erstellt, um einen Einblick in den strukturellen Aufbau der GRASP-Domäne zu bekommen, der, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, eine wichtige Rolle für die Interaktion mit GM130 spielt. Das GRASP-Domänen-Modell von GRASP65 wurde unter Mithilfe von Marcel Jurk (AG Schmieder, FMP, Berlin) erhalten, indem in einem *comparative modelling* Ansatz (RosettaCommons 3.2; *threading* Protokoll (165)) die Strukturen der PDZ-Domänen 1 und 2 von GRASP65 rigide gehalten, und ausschließlich der Linker, sowie flexible Schleifenbereiche, variiert wurden.

Ein Vergleich von GRASP65 und GRASP55 in voller Länge zeigt, dass ihre Sequenzen zu 40% identisch sind (Abbildung 25). Die Sequenzidentität im Bereich der GRASP-Domäne, beträgt 68% (Tabelle 14).

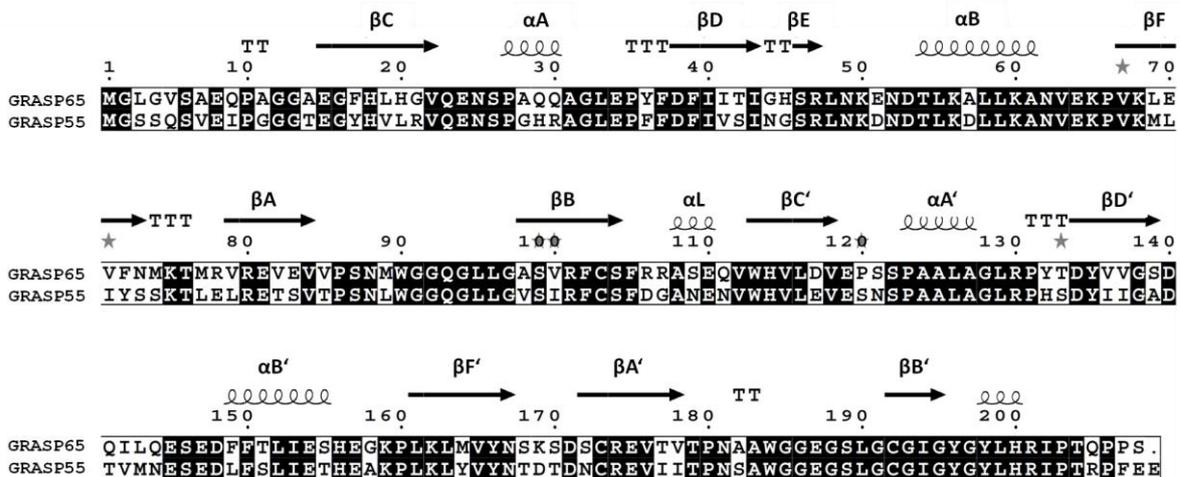


Abbildung 25: Sequenzanpassung der GRASP-Domänen von GRASP65 und GRASP55. Zusätzlich zur Sequenz sind die Sekundärstrukturelemente dargestellt, wie sie in den Kristallstrukturen vorgefunden wurden. Das Alignment wurde mit dem Programm ESPript 2.2 (177) erstellt. UniProt-Eintrag GRASP65: Q9BQQ3; UniProt-Eintrag GRASP55: Q9H8Y8.

Tabelle 14: Sequenzidentitätsvergleich zwischen GRASP55 und GRASP65.

Domäne	Konstrukte	Sequenzidentität (%)
Volllänge	GRASP55 <sup>1-452</sup> /GRASP65 <sup>1-440</sup>	40
PDZ1	GRASP55 <sup>7-108</sup> /GRASP65 <sup>13-118</sup>	66
PDZ2	GRASP55 <sup>108-208</sup> /GRASP65 <sup>108-204</sup>	70
GRASP-Domäne	GRASP55 <sup>1-208</sup> /GRASP65 <sup>1-208</sup>	68

In Abbildung 26 sind neben den GRASP-Domänen von GRASP65 (A) und GRASP55 (B), die sequenziellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede (C) beider Domänen farblich hervorgehoben. Bei blau dargestellten Resten handelt es sich um identische oder sehr ähnliche Reste. In gelb sind ungleiche Reste dargestellt. Innerhalb der zweiten PDZ-Domäne, besonders im Bereich der Peptid-Bindungstasche, finden sich die meisten identischen Aminosäuren. Innerhalb der ersten PDZ-Domäne finden sich zwar viele konservierte Aminosäuren, eine 100%ige Übereinstimmung, wie in PDZ2, liegt allerdings nicht vor. Die Linker-Helix zwischen den PDZ-Domänen unterscheidet sich, auf Basis der Sequenz in beiden Proteinen. Da es sich bei der GRASP-Domäne von GRASP65 um ein Modell, auf Basis von GRASP55, handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Linker-Region in GRASP65 eine andere Orientierung aufweist.

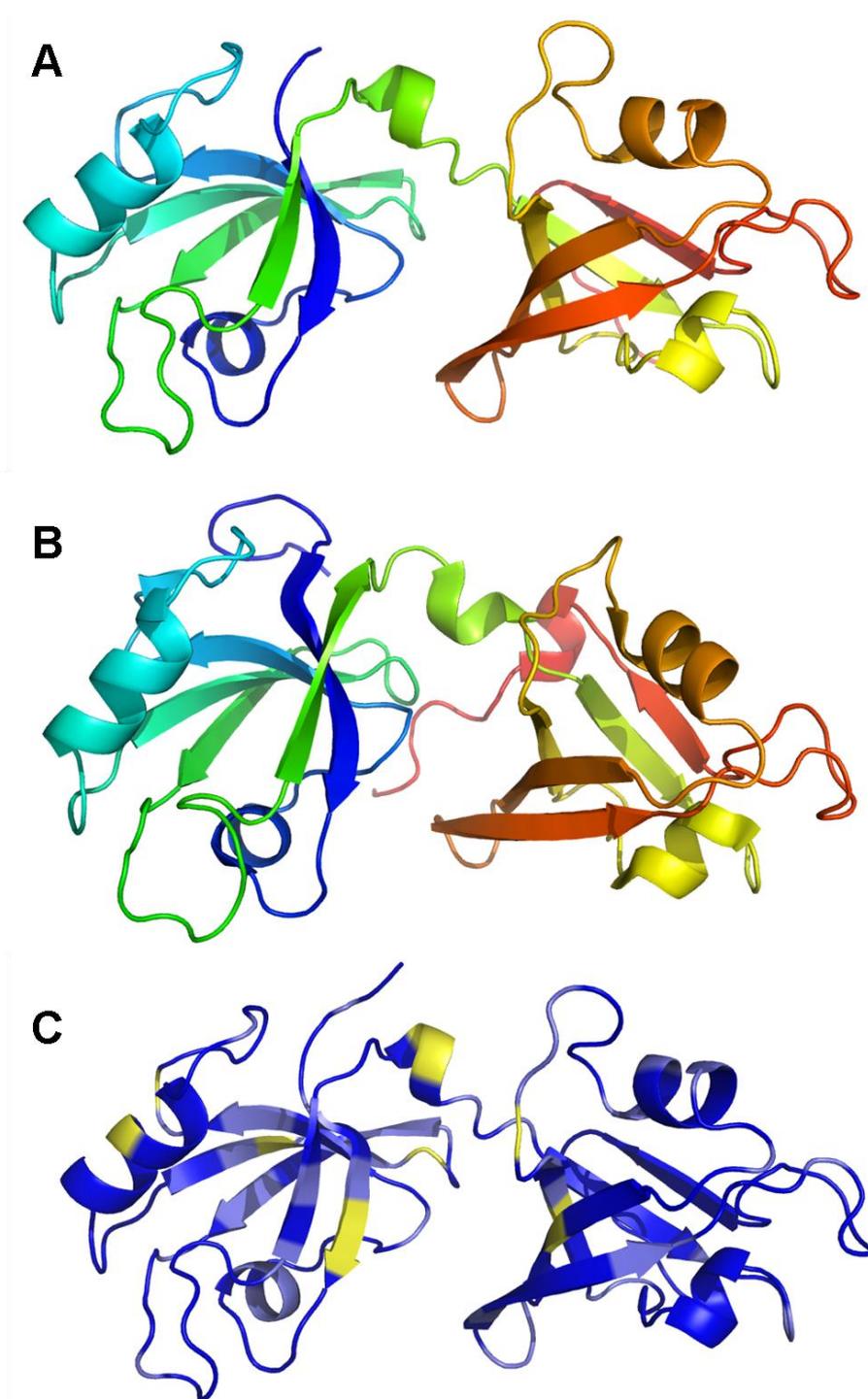
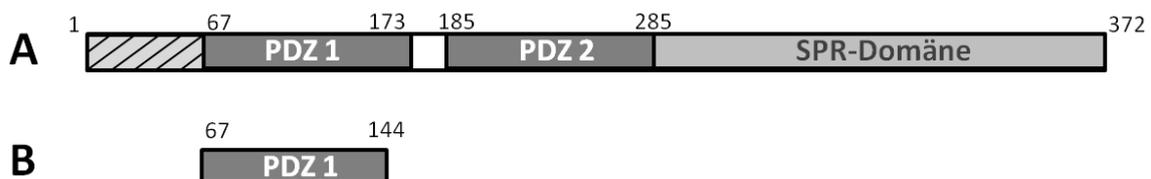


Abbildung 26: Vergleich der GRASP65-Domänen von GRASP65 und GRASP55. (A) GRASP-Domäne von GRASP65. Hierzu wurden die beiden einzelnen PDZ-Domänen mit dem *threading* Protokoll der RosettaCommons Software (Version 3.2 (165)) zu einem Molekül zusammengefügt. (B) GRASP-Domäne von GRASP55 (PDB-Eintrag: 3RLE). Das Farbmuster in (A) und (B) verläuft vom N-Terminus in blau hin zum C-Terminus in rot. (C) Vergleich der GRASP-Domänen aus (A) und (B). Sequenziell identische Reste sind in dunkelblau dargestellt, ähnliche Reste in hellblau, ungleiche Reste in gelb.

## 4.2 Grh1 – GRASP65 homologes Protein 1 aus *S. cerevisiae*

### 4.2.1 Rekombinante Expression und Reinigung

Von Grh1 aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde für 19 Proteinkonstrukte (Tabelle 10, Kapitel 3.1.10) die kodierende DNS mittels PCR amplifiziert und durch die LIC-Klonierungsmethode in den Expressionsvektor pET-46 Ek/LIC kloniert. *E. coli* Rosetta T7 Express Zellen wurden anschließend mit den Plasmiden transformiert. Die Expression erfolgte jeweils in 12 l SB-Medium, die mit 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt wurden. Alle Konstrukte wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen His<sub>6x</sub>-tag exprimiert. Um den tag proteolytisch entfernen zu können, wurde über den Vorwärts-Primer eine Schnittstelle für die *PreScission*-Protease eingefügt, die anstelle der Vektor-intrinsischen Enterokinase-Schnittstelle verwendet wurde. Die Expression der Konstrukte wurde bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von 1,0 mit 1 mM IPTG induziert. Danach wurde die Temperatur von 37 °C auf 22 °C gesenkt, und die Kulturen wurden für weitere 16-18 h inkubiert. Das in Abbildung 27B dargestellte Konstrukt, das die Aminosäuren 67-144 (Grh1<sup>PDZ1Δββ</sup>) umfasst, konnte rekombinant in ausreichender Menge, Homogenität und Reinheit hergestellt und kristallisiert werden. An diesem Konstrukt wird im Folgenden exemplarisch die Reinigung der Proteine beschrieben. Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Proteinkonstrukte von Grh1 wurden analog dazu gereinigt.

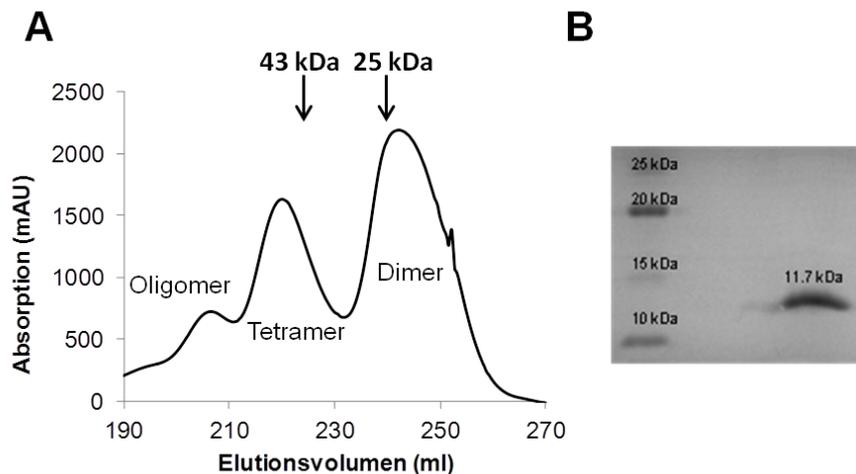


**Abbildung 27: Domänenübersicht von Grh1. (A) Volllänge. (B) Kristallisiertes Konstrukt Grh1<sup>PDZ1Δββ</sup>.**

Für die Reinigung des Konstrukts Grh1<sup>PDZ1Δββ</sup> wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Als erster Reinigungsschritt wurde eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose durchgeführt. Während der nachfolgenden Dialyse zum Entfernen des Imidazols, wurde der N-terminale tag mit der *PreScission*-Protease abgeschnitten, was jedoch zur Präzipitation des Proteins führte. Aus diesem Grund wurde bei den nachfolgenden Reinigungen auf ein Entfernen des tags bei diesem Konstrukt verzichtet.

Bei allen anderen Konstrukten konnte der *tag* proteolytisch entfernt werden. Durch den *tag* war das Konstrukt Grh1<sup>PDZ1ΔBB</sup> N-terminal um 21 Aminosäuren (<sup>N</sup>HHHHHH-VDDDDKM-LEVLFGQP<sup>C</sup>) gegenüber einem proteolytisch gespaltenen verlängert. Der finale Reinigungsschritt nach Dialyse des Proteins war eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex<sup>TM</sup> 75 26/60 Säule.

Das Reinigungsprofil der Größenausschlusschromatographie von Grh1<sup>PDZ1ΔBB</sup> ist in Abbildung 28A dargestellt. Das 11,7 kDa große Protein eluierte in drei Peaks; als Dimer, Tetramer und höheres Oligomer. Für die Kristallisationsansätze wurden die Fraktionen des Dimer-Peaks vereint und konzentriert. Die Reinheit des Proteins, das für die Kristallisation verwendet wurde, wurde mit SDS-Gelelektrophorese kontrolliert (Abbildung 28B).



**Abbildung 28: Reinigungsprofil von Grh1<sup>PDZ1ΔBB</sup>. (A) Chromatogramm der Superdex<sup>TM</sup> 200 26/60 für Grh1<sup>PDZ1ΔBB</sup> aufgenommen als Ergebnis einer Größenausschlusschromatographie. (B) SDS-PAGE des konzentrierten Proteins, welches für die Kristallisation verwendet wurde.**

In Tabelle 15 wurden alle getesteten Konstrukte nebst ihren Ausbeuten aufgelistet. Nur Konstrukte, die die einzelnen PDZ-Domänen enthielten, konnten in ausreichender Menge und Reinheit gereinigt werden. Konstrukte, die beide PDZ-Domänen enthielten, waren unlöslich oder nicht exprimierbar.

**Tabelle 15: Übersicht der gereinigten Konstrukte von Grh1.**

Konstrukt	Ausbeute pro l Kultur	Konstrukt	Ausbeute pro l Kultur
Grh1 <sup>FL</sup>	-, unlöslich	Grh1 <sup>PDZ1_67-185</sup>	-, unlöslich
Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2</sup>	-, keine Überexpression	Grh1 <sup>PDZ1_1-185</sup>	-, schwache Überexpression
Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2ΔN1-30</sup>	-, schwache Überexpression	Grh1 <sup>PDZ2_159-281</sup>	0,7 mg/l
Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2ΔN1-66</sup>	-, schwache Überexpression	Grh1 <sup>PDZ2_166-285</sup>	2,1 mg/l
Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2Coexpr.</sup>	-, keine Überexpression	Grh1 <sup>PDZ2_173-281</sup>	-, keine Überexpression
Grh1 <sup>PDZ1_1-144</sup>	-, unlöslich	Grh1 <sup>PDZ2_185-281</sup>	2 mg/l
Grh1 <sup>PDZ1ΔβB</sup>	8,7 mg/l	Grh1 <sup>PDZ2_206-281</sup>	-, unlöslich
Grh1 <sup>PDZ1_67-156</sup>	15,1 mg/l	Grh1 <sup>PDZ1_67-185Δloop</sup>	-, unlöslich
Grh1 <sup>PDZ1_67-162</sup>	-, unlöslich	Grh1 <sup>PDZ1+PDZ2_67-281Δloop</sup>	-, keine Überexpression
Grh1 <sup>PDZ1_67-173</sup>	10,8 mg/l		

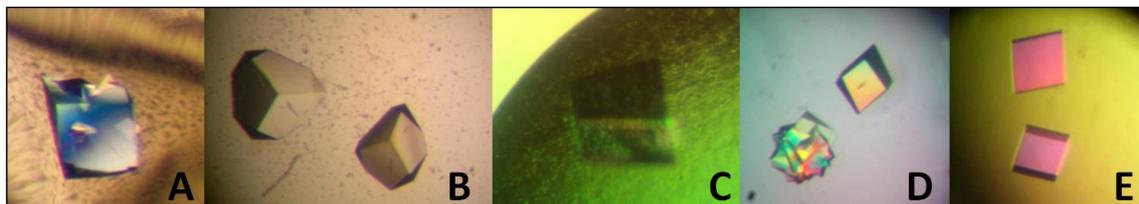
Die Indizes geben die Domänengrenzen/Deletionen an.

#### 4.2.2 Kristallisation von Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup>

Für initiale Kristallisationsansätze wurden die Fraktionen des Dimer-Peaks auf 15 mg/ml konzentriert und mit den *Sparse-Matrix*, *Grid*- und *Incomplete-Factorial-Screens* (Kapitel 3.4.2) in 96-well Platten angesetzt. Dabei wurde ein Tropfenvolumen von 600 nl (300 nl Protein und 300 nl Fällungsmittel) gewählt. Das Reservoirvolumen betrug 80 µl. Die Kristallisationsplatten wurden bei 20 oder 4 °C gelagert und regelmäßig observiert. Innerhalb von vier Wochen erreichten die Kristalle eine Größe von ca. 250x250x250 µm<sup>3</sup>. Alle Kristallisationsbedingungen waren Hochsalzbedingungen (2-3 M NaCl). Die Art des Puffers, sowie dessen pH-Wert hingegen spielte eine untergeordnete Rolle (100 mM MES, Bis-Tris, oder HEPES Puffer, pH 5,5-7,5). In Abbildung 29A-E ist eine Auswahl an Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup>-Kristallen gezeigt, die aus den oben genannten Bedingungen stammen.

In Abbildung 29E sind die Kristalle dargestellt, von denen der finale Datensatz aufgenommen wurde. Diese wuchsen in einer Bedingung aus dem JCSG-Screen (Jena Bioscience), die 3,0 M NaCl und 100 mM Bis-Tris, pH 5,5 enthielt.

Für die Datensammlung wurden die Kristalle in eine Gefrierschutzlösung bestehend aus 80% der jeweiligen Reservoirolösung und 20% Glycerin überführt, mit einer Nylonschlinge aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.



**Abbildung 29:** Kristalle von Grh1<sup>PDZ1Δββ</sup>. Die Kristalle erreichten innerhalb von vier Wochen eine Größe von 250x250x250 μm<sup>3</sup>. Die Proteinkonzentration betrug 15 mg/ml. Die Kristallisationsplatten wurden bei einer Temperatur von 20 °C gelagert. Der Proteinpuffer enthielt 20 mM HEPES, pH 8,0, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA und 5 mM β-ME. Die Kristallisationsbedingungen waren: (A) 3,0 M NaCl, 100 mM HEPES, pH 7,0, (B) 2,5 M NaCl, 100 mM MES, pH 6,0, (C) 2,0 M NaCl, 100 mM HEPES, pH 7,5, (D) 3,0 M NaCl, 100 mM MES, pH 6,5 und (E) 3,0 M NaCl, 100 mM Bis-Tris, pH 5,5.

### 4.2.3 Datensammlung und Strukturbestimmung

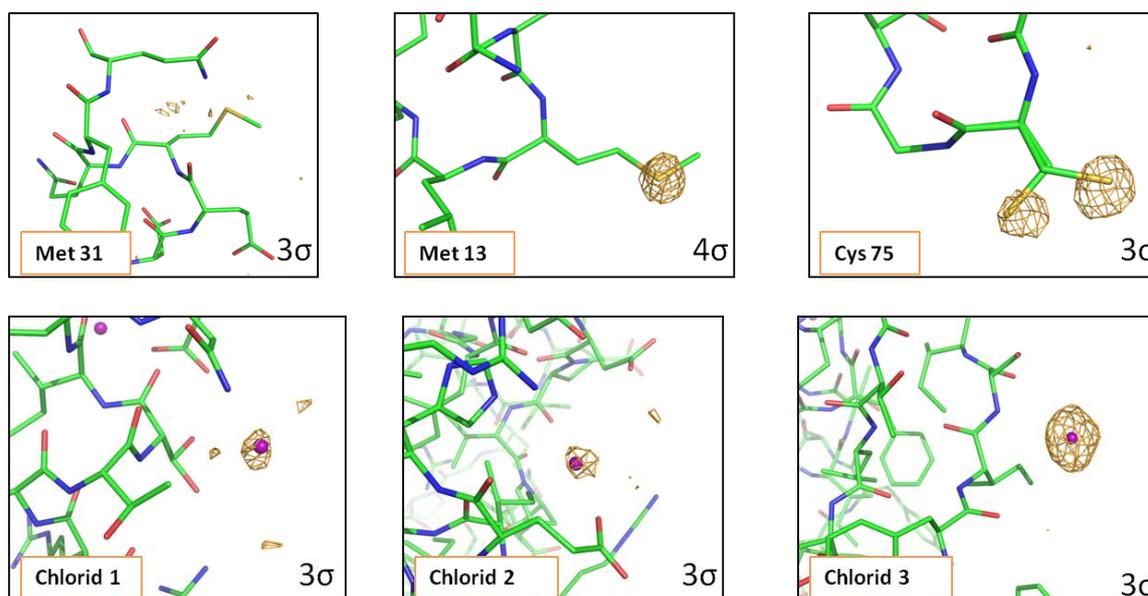
Von den besten Kristallen des Konstrukts Grh1<sup>PDZ1Δββ</sup> konnten Diffraktionsdaten bis zu einer maximalen Auflösung von 1,4 Å aufgenommen werden. Die Daten wurden mit XDS prozessiert, skaliert und reduziert (155). Die Datenstatistik ist in Tabelle 16 zusammengefasst.

Da kein geeignetes Suchmodell für den molekularen Ersatz gefunden wurde, wurde für die Phasierung ein Schwefel-SAD Experiment durchgeführt (156). Der dafür verwendete Kristall stammte aus der gleichen Bedingung wie der native Kristall und streute bis zu einer maximalen Auflösung von 1,8 Å. Durch Berechnung des Matthews-Koeffizienten ( $V_m=2,32 \text{ Å}^3/\text{Da}$ ) (171) wurde festgestellt, dass ein Monomer des Grh1<sup>PDZ1Δββ</sup>-Moleküls pro asymmetrischer Einheit vorliegt. Der Lösungsmittelgehalt des Kristalls betrug 47%. Auf Grund der guten Auflösung der Kristalle konnte auf die intrinsischen Schwefel-Atome (zwei Methionine und ein Cystein) als anomal streuende Atome zurückgegriffen werden (S-SAD). Der anomale Datensatz wurde bei einer Wellenlänge von 1,77 Å aufgenommen. Es wurde die Aufzeichnung von 1800 Bildern in 1°-Schritten gestartet. Die Datensammlung konnte nach rund 1450 Bildern abgebrochen werden, da eine Lösung des Phasenproblems mit dem Programm Auto-Rickshaw gefunden wurde.

Eine initiale Elektronendichte wurde mit dem SAD-Protokoll des Auto-Rickshaw Web Servers berechnet (157,158). Die Raumgruppe und die Zellachsen des anomalen Datensatzes stimmen mit denen des nativen Datensatzes überein. Ein initiales Modell

wurde mit dem Programm ARP/wARP erstellt. Der initiale  $R_{\text{work}}$ -Wert betrug 27,8%. Die Struktur wurde durch alternierende Zyklen von Modellbau mit dem Programm COOT (162,163) und Energieminimierung mit dem Programm REFMAC5 (159,160) verfeinert. Durch eine TLSMD-Unterteilung (161) von vier TLS-Einheiten konnte ein finaler  $R_{\text{work}}$ -Wert von 19,7% und ein  $R_{\text{free}}$ -Wert von 22,7% erzielt werden. Eine Übersicht der Verfeinerungsstatistik findet sich in Tabelle 16.

Durch Berechnung einer anomalen Elektronendichtekarte wurden die Positionen der Schwefelatome bestimmt. Wie in Abbildung 30 zu sehen, trugen nur Met13 und Cys75 zur anomalen Streuung bei. Für Met31 konnte keine Dichte detektiert werden. Die doppelte Konformation von Cys75 führte zu einem zusätzlichen, dritten anomal streuenden Atom mit partieller Beteiligung. Auf Grund des hohen Salzgehaltes in der Kristallisationsbedingung lagerten sich Chlorid-Ionen in die Kristallpackung ein, die, wie in Abbildung 30 zu sehen, ebenfalls zur Phasierung beitragen, da sie bei der verwendeten Wellenlänge der Röntgenstrahlung ebenfalls anomal streuen.



**Abbildung 30: Anomale Elektronendichtekarte der intrinsischen Schwefel von Grh<sup>1PDZ1ΔBB</sup> und der gebundenen Chlorid-Ionen.**

Insgesamt enthielt das kristallisierte Konstrukt Grh<sup>1PDZ1ΔBB</sup> inklusive His<sub>6x</sub>-tag 99 Aminosäuren, wovon die ersten zehn Aminosäuren in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar waren. Des Weiteren ist eine Schleifenregion zwischen Aminosäure 35 und 39 nicht definiert. Die übrigen Aminosäuren weisen, laut Ramachandran-Analyse, eine

korrekte Stereochemie der  $\Phi$ - und  $\Psi$ -Dihedralwinkel auf. Es konnten zusätzlich noch drei Chloridionen und 49 Wassermoleküle in die Elektronendichte eingepasst werden.

**Tabelle 16: Daten- und Verfeinerungsstatistik von Grh1<sup>PDZ1ΔBB</sup>.**

	<b>Nativ</b>	<b>S-SAD</b>
<b>Datensammlung</b>		
Messplatz	BESSY-MX 14.1	BESSY-MX 14.2
Auflösung (Å)	35-1,4 (1,50-1,40)	35-1,75 (1,84-1,75)
Wellenlänge (Å)	0,91841	1,77122
Raumgruppe	P3 <sub>1</sub> 21	P3 <sub>1</sub> 21
Beobachtete Reflexe	109573 (19961)	248326 (24272)
Unabhängige Reflexe	16914 (3115)	16337 (2510)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	22,96 (3,40)	36,55 (3,24)
Redundanz	6,48 (6,41)	15,2 (9,67)
Vollständigkeit	99,7 (99,6)	98,9 (93,6)
Lösungsmittelgehalt (%)	35,5	35,5
R <sub>meas</sub> (%)	4,2 (61,5)	5,3 (70,5)
<b>Zellkonstanten</b>		
a, c (Å)	53,44, 50,92	53,46, 50,97
<b>Verfeinerung</b>		
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	19,7/22,7	
Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome	779	
Anzahl der Wassermoleküle	49	
Anzahl der Ionen (Cl <sup>-</sup> )	3	
Anzahl der Aminosäuren	89	
<b>r.m.s.-Abweichungen</b>		
Bindungslängen (Å)	0,02	
Bindungswinkel (°)	1,873	
Mittlerer B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	8,05	
<b>Ramachandran Statistik</b>		
Reste in bevorzugten Regionen (%)	98,8	
Reste in erlaubten Regionen (%)	1,2	
Reste in nicht erlaubten Regionen (%)	0	

#### 4.2.4 Kristallstruktur der ersten PDZ-Domäne von Grh1

Die bei 1,4 Å bestimmte Kristallstruktur des Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup>-Konstrukts ist in Abbildung 31 dargestellt. Das Protein kristallisierte in der Raumgruppe P3<sub>1</sub>21. Die Struktur konnte bis zu einem finalen R<sub>work</sub>-Wert von 19,7% und einem finalen R<sub>free</sub>-Wert von 22,7% verfeinert werden.

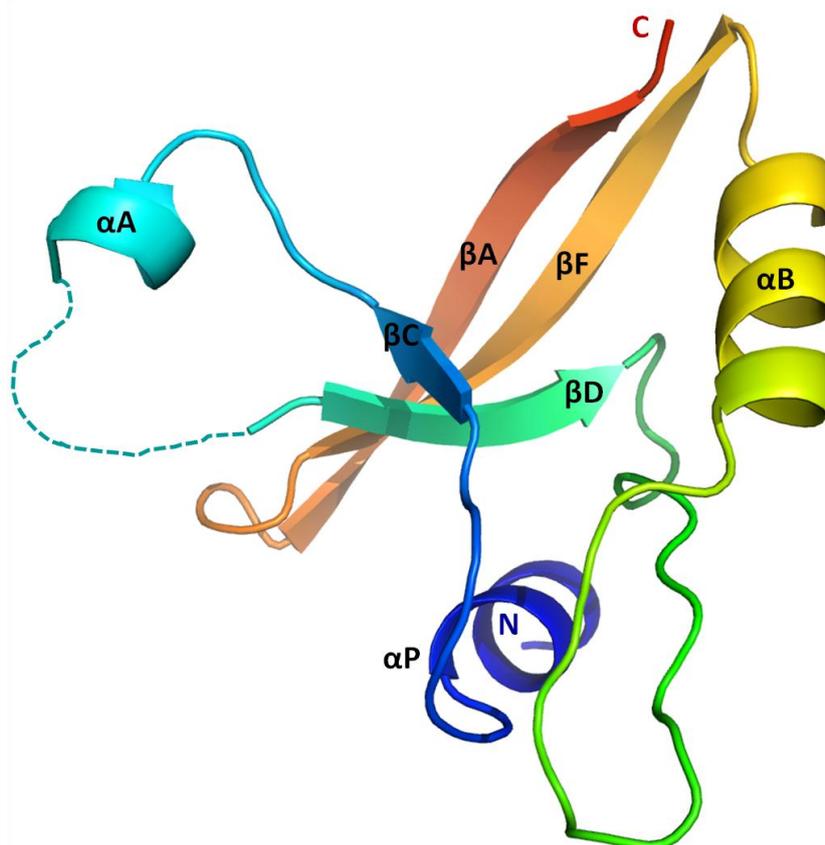


Abbildung 31: Kristallstruktur von Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup>. Die Benennung der Sekundärstrukturelemente erfolgte in Anlehnung an humane PDZ-Domänen. Die Helix  $\alpha P$  (P=PreScission) ist kein Teil der PDZ-Domäne, sondern zum His<sub>6x</sub>-tag gehörig. Die Struktur wird farblich von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) dargestellt. Ungeordnete Aminosäuren zwischen  $\alpha A$  und  $\beta D$  werden durch eine gestrichelte Linie dargestellt.

Die monomere, globuläre Struktur (35x40x30 Å<sup>3</sup>) besteht aus einem  $\beta$ -Faltblatt, das aus drei antiparallelen Strängen ( $\beta A$ ,  $\beta D$  und  $\beta F$ ) besteht, denen ein vierter  $\beta$ -Strang  $\beta C$  gegenüberliegt. Umrahmt wird das Faltblatt von drei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha A$ ,  $\alpha B$  und  $\alpha P$ ). Zwischen Helix  $\alpha B$  und Strang  $\beta D$  befindet sich eine große Schleifenregion. Eine weitere Schleifenregion (AS 36-38) zwischen Helix  $\alpha A$  und  $\beta$ -Strang  $\beta D$  konnte auf Grund fehlender Elektronendichte nicht genauer definiert werden und ist als gestrichelte Linie

dargestellt. Die Helix  $\alpha P$  gehört sequenziell nicht zu Grh1. Diese Helix wird von Aminosäuren ausgebildet, die Teil des His<sub>6x</sub>-tags sind und der Erkennungssequenz der *PreScission*-Protease entsprechen. Obwohl die Carboxyl-Bindeschleife und der Strang  $\beta B$  fehlen, weist die Struktur eindeutig Merkmale einer PDZ-Domäne auf. Um dies zu verdeutlichen wurde die Struktur der ersten PDZ-Domäne von GRASP65 und die hier gezeigte Struktur des Konstrukts Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup> übereinandergelagert (Abbildung 32).

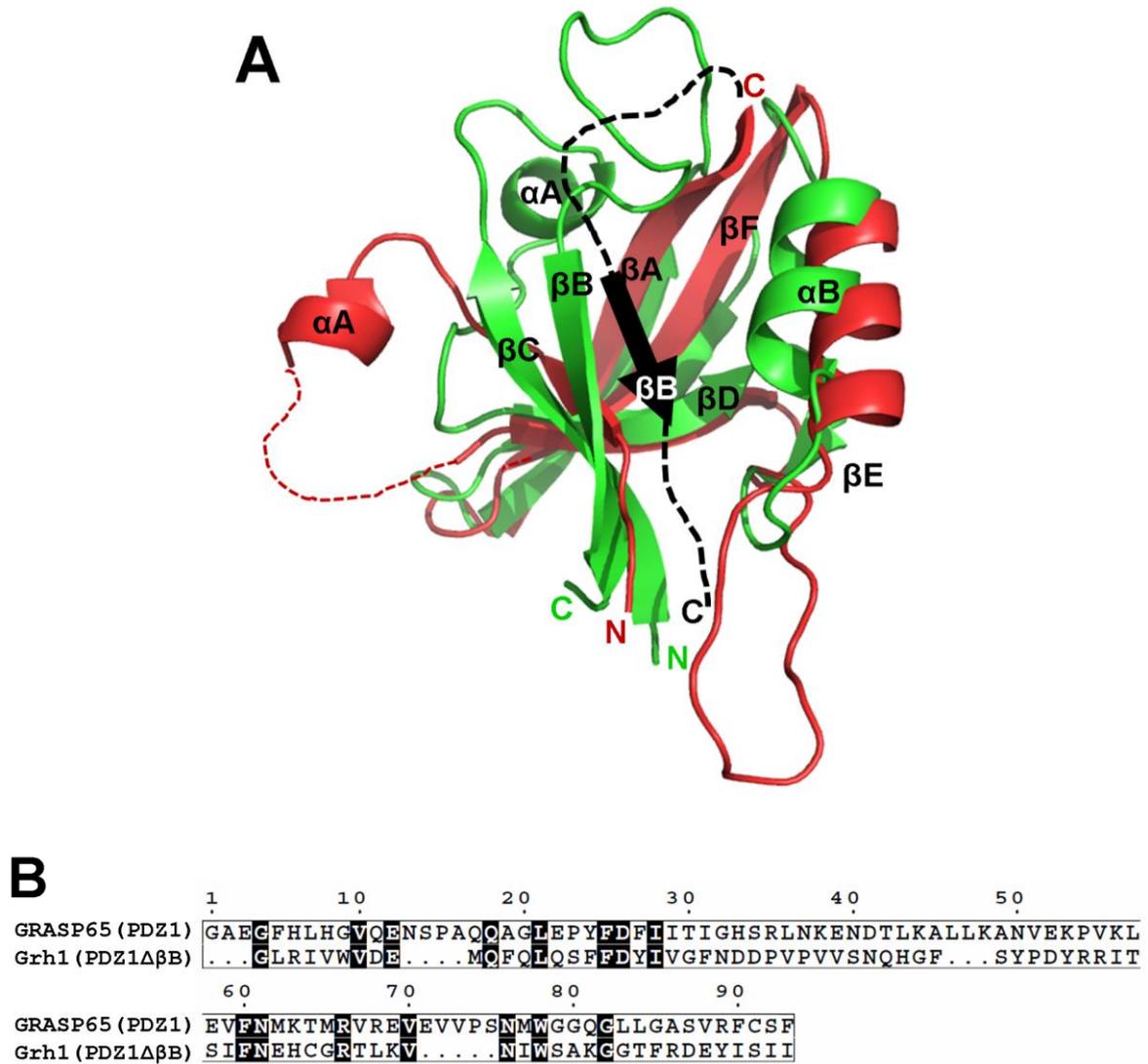


Abbildung 32: Strukturelle und sequenzielle Überlagerung von GRASP65<sup>PDZ1</sup> (grün) und Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup> (rot). (A) Überlagerung der Kristallstrukturen. Die Helix  $\alpha P$  von Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup> und die Helix  $\alpha L$  von GRASP65<sup>PDZ1</sup> wurden der besseren Übersicht wegen nicht dargestellt. In schwarz wurden schematisch die fehlende Carboxyl-Bindeschleife und der fehlende  $\beta$ -Strang  $\beta B$  von Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup> eingezeichnet. (B) Sequenzsynchronisierung der PDZ-Domänen von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup>.

Die drei antiparallelen  $\beta$ -Stränge  $\beta$ A,  $\beta$ F und  $\beta$ D sind strukturell sehr ähnlich. Der kurze Strang  $\beta$ E von GRASP65<sup>PDZ1</sup> wurde in Grh1 durch eine ausgeprägte Schleifenregion ersetzt. Die an der Ausbildung der Peptid-Bindungstasche beteiligte Helix  $\alpha$ B ist in beiden Strukturen an gleicher Position. Um die Peptid-Bindungstasche von Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup> zu vervollständigen, ist der fehlende Strang  $\beta$ B schematisch als schwarzer Pfeil eingezeichnet. Die genaue Positionierung des Stranges wurde dabei von GRASP65<sup>PDZ1</sup> übernommen. Die Carboxyl-Bindeschleife zwischen dem Strang  $\beta$ B und  $\beta$ A ist, ebenso wie der C-Terminus, als gestrichelte schwarze Linie eingezeichnet. Die kurze Helix  $\alpha$ A von Grh1 könnte durch Interaktion mit der Carboxyl-Bindeschleife eine ähnliche Position einnehmen, wie die Helix  $\alpha$ A in GRASP65. Trotz der sehr geringen Sequenzidentität von 10% und einer unvollständigen Grh1 PDZ-Domäne ergibt sich eine *r.m.s.*-Abweichung von nur 3,2 Å ( $C_\alpha$ ), mit einem Z-score von 4,8 (berechnet mit DaliLite (179)), was auf eine strukturelle Konservierung der PDZ-Domäne in der Familie der GRASP-Proteine schließen lässt.

Das elektrostatische Oberflächenpotential von Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup> (Abbildung 33) lässt eine tendenziell hydrophobe Peptid-Bindungstasche erkennen. Diese stimmt mit ihrem Oberflächenpotential nicht mit der positiv geladenen der ersten PDZ-Domäne von GRASP65 überein, doch ähnelt das Ladungspotential der zweiten PDZ-Domäne von GRASP65. Eine genaue Aussage über die Gesamtladung von Grh1<sup>PDZ1</sup> kann aufgrund der fehlenden Strukturelemente nicht getroffen werden.

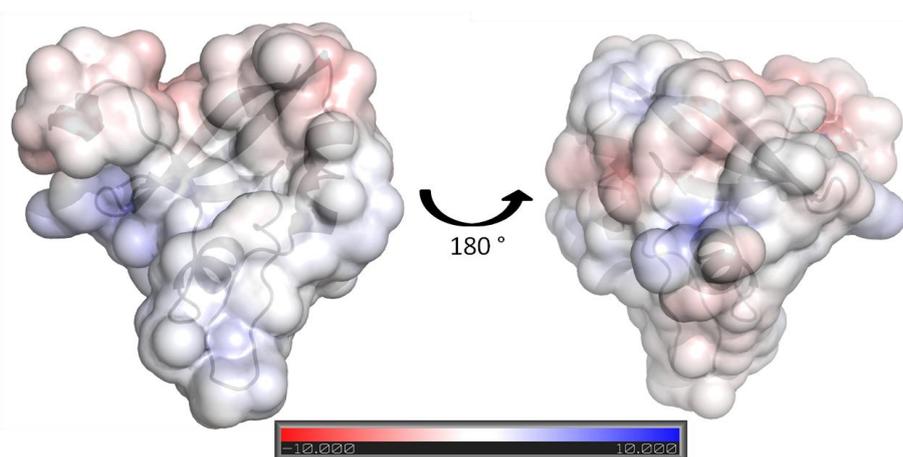


Abbildung 33: Elektrostatisches Oberflächenpotential von Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup>. Das Oberflächenpotential ist entsprechend der Ladung gefärbt, wobei rot -10 kT/e und blau +10 kT/e entspricht. Die Berechnung der elektrostatischen Potentiale erfolgte mit dem Programm APBS (176).

### 4.2.5 Dimerisierung von Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup>

Obwohl Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup>, wie die einzelnen PDZ-Domänen von GRASP65 auch, in Lösung als Dimer vorliegt (Abbildung 28), unterscheiden sich die Strukturen im Aufbau ihrer Dimere. Die unvollständig ausgebildete PDZ-Domäne Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup> dimerisiert nicht über die Bindung des C-Terminus eines Moleküls in die Peptid-Bindungstasche eines anderen Moleküls, wie dies für GRASP65 gezeigt wurde. Bei Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup> erfolgt die Dimerisierung stattdessen über die Fortsetzung des zentralen  $\beta$ -Faltblattes. Dabei lagert sich der  $\beta$ -Strang  $\beta C$  des einen Moleküls antiparallel an den  $\beta$ -Strang  $\beta C'$  des anderen Moleküls an. Dadurch entsteht im Dimer ein großes  $\beta$ -Faltblatt, das durch die Stränge  $\beta A$ - $\beta F$ - $\beta D$ - $\beta C$ - $\beta C'$ - $\beta D'$ - $\beta F'$ - $\beta A'$  gebildet wird. Zusätzliche Kontaktstellen entstehen zwischen den beiden Helices  $\alpha B$  und  $\alpha B'$ , zwischen dem C-Terminus (Molekül 1) und der Helix  $\alpha B$  (Molekül 2), sowie zwischen der Helix  $\alpha A$  (Molekül 1) und der Schleifenregion zwischen den  $\beta$ -Strängen  $\beta A$  und  $\beta F$  (Molekül 2). Dadurch wird die Peptid-Bindungstasche von Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup> verdeckt. Der Kontaktbereich zwischen den Untereinheiten des dimeren Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup>-Konstruktes hat eine Größe von 1501 Å<sup>2</sup>, dies entspricht 17% der Gesamtoberfläche des Dimers (8840 Å<sup>2</sup>).

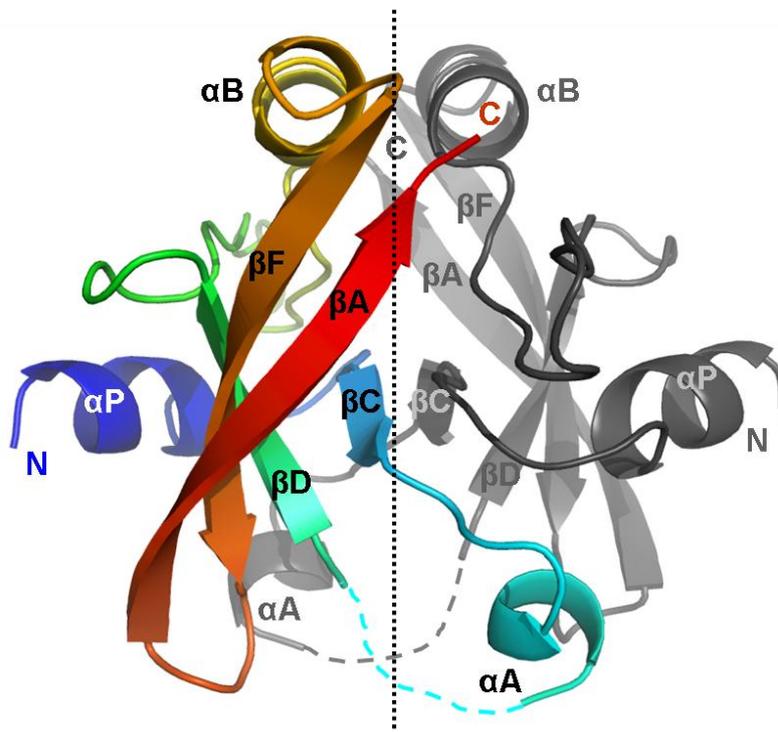


Abbildung 34: Dimer von Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup>. Monomer 1 ist im Farbverlaufschema vom N-Terminus in blau zum C-Terminus in rot dargestellt. Monomer 2 ist in grau dargestellt. Nicht definierte Reste sind als gestrichelte Linie gezeichnet. Die zweizählige Achse, die das Dimer erzeugt, ist als gepunktet Linie eingezeichnet.

### 4.3 Interaktionsstudien

Für Interaktionsstudien zwischen GRASP65 und GM130, sowie Grh1 und Bug1 bzw. Uso1, wurde die Methode der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) verwendet. Mit Hilfe dieser biophysikalischen Methode sollte die Bindung zwischen Protein und Peptid detektiert und eine Bindungskonstante, sowie Reaktionsenthalpien, wie -entropien bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Proteinkonstrukte (Kapitel 3.2, 4.2.1 und 4.1.1) hergestellt. Die lyophilisierten Peptide (PSL, Heidelberg) wurden abgewogen und in Wasser aufgenommen. Sowohl die Protein-, wie auch die Peptidlösungen wurden dialysiert, um ein Pufferungleichgewicht zu vermeiden, und entgast, um störende Luftblasen zu entfernen. In die Probenzelle wurden je Messung 2 ml einer 50-100  $\mu\text{M}$  Proteinlösung vorgelegt. Die Spritze wurde mit ca. 280  $\mu\text{l}$  einer 1,5-2 mM Peptidlösung befüllt. Es wurden je Messung 60 Injektionen in einem Intervall von jeweils 240 s durchgeführt. Ein Volumen von 2,5  $\mu\text{l}$  wurde für die erste Injektion und ein Volumen von 5  $\mu\text{l}$  für die folgenden Injektionen gewählt. Gemessen wurde bei einer Temperatur von 15 °C mit einer Rührergeschwindigkeit von 307 rpm. Die Daten wurden mit der ORIGIN-Software integriert und mit dem Programm SEDPHAT (147) analysiert.

#### 4.3.1 Interaktion von GRASP65-Konstrukten mit GM130-Peptiden

In vorangegangenen Co-Immunopräzipitationsstudien konnte bereits eine Interaktion zwischen GRASP65 und GM130 festgestellt werden (85,180), jedoch keine Bindungskonstante bestimmt werden. Die verwendeten Proteinkonstrukte wurden in diesen Studien *in vitro* translatiert oder es wurden GST-Fusionspeptide verwendet. In dieser Arbeit wurden ITC als Methode, und rekombinant hergestellte Proteine und *tag*freie Peptide als Proben verwendet, um zum einen die Bindungskonstante zwischen GRASP65 und GM130 bestimmen zu können, und um zum anderen etwaige Wechselwirkungen mit Fusionsproteinen ausschließen zu können. Für die Interaktionsstudien zwischen GRASP65 und dem C-Terminus von GM130 wurden GRASP65-Konstrukte verwendet, die entweder die PDZ-Domänen alleine oder beide PDZ-Domänen (GRASP-Domäne) umfassen. Alle verwendeten Konstrukte, sowie die verwendeten GM130-Peptide, sind in Tabelle 17 aufgelistet.

**Tabelle 17: Übersicht der ITC-Messungen.**

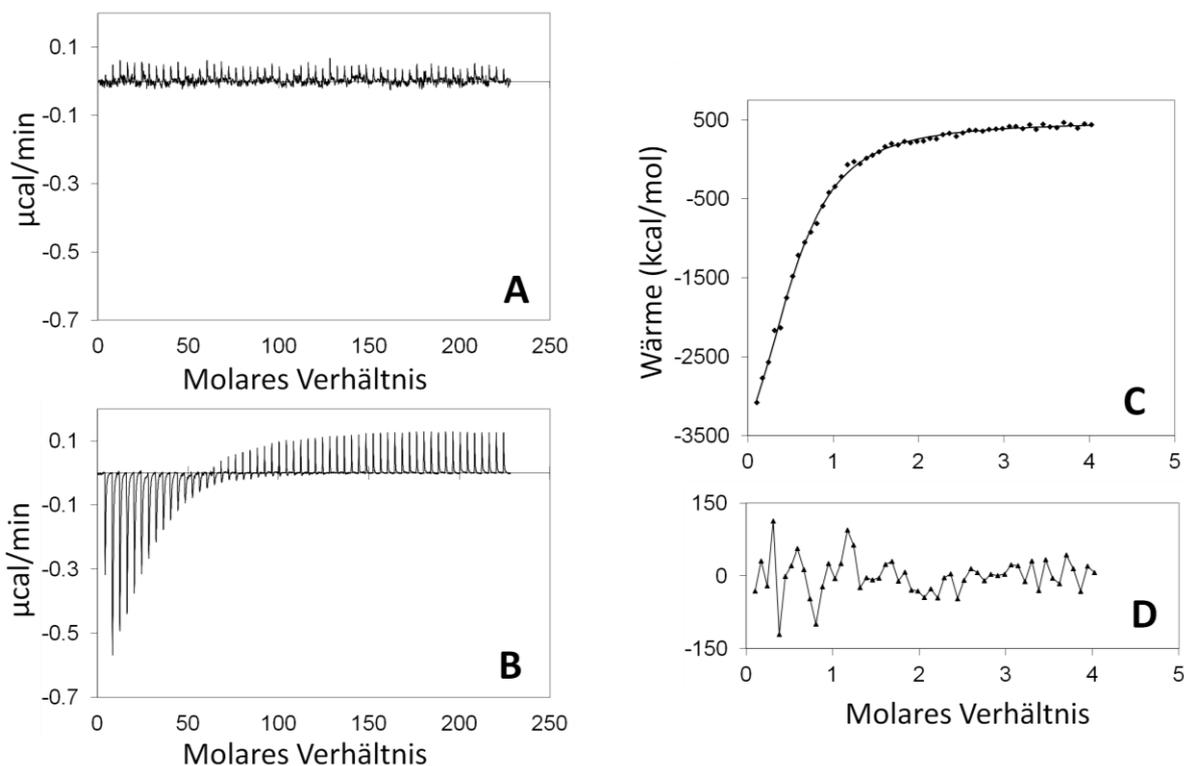
Domäne	Konstrukt	Länge GM130-Peptide (AS)
PDZ1	GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	6 / 12
	GRASP65 <sup>108-199</sup>	6
PDZ2	GRASP65 <sup>PDZ2</sup>	5 / 6
	GRASP65 <sup>94-204</sup>	12 / 18
	GRASP65 <sup>1-204</sup>	6 / 12
	GRASP65 <sup>1-108</sup> + GRASP65 <sup>108-204</sup>	6
GRASP65-Domäne (PDZ1+PDZ2)	GRASP65 <sup>13-197</sup>	5
	GRASP65 <sup>1-208</sup>	6
	GRASP65 <sup>1-199</sup>	5 / 6
	GRASP65 <sup>13-208RPFE</sup>	4

Die Aminosäuresequenzen der GM130-Peptide finden sich in Tabelle 13, Kapitel 2.5.

Um sicherzustellen, dass die verwendeten Peptide nicht unspezifisch mit der ersten PDZ-Domäne interagieren, wurde das Konstrukt GRASP65<sup>PDZ1</sup> mit GM130-Peptiden titriert. Wie erwartet konnte keine Interaktion zwischen dem Konstrukt GRASP65<sup>PDZ1</sup> und dem C-Terminus von GM130 detektiert werden. Eine unspezifische Bindung von GM130 an GRASP65<sup>PDZ1</sup> kann somit ausgeschlossen werden.

Es konnten drei verschieden lange Konstrukte der zweiten PDZ-Domäne hergestellt werden (GRASP65<sup>108-199</sup>, GRASP65<sup>PDZ2</sup> und GRASP65<sup>94-204</sup>). Alle drei Konstrukte wurden auf ihre Affinität gegenüber GM130 getestet. Obwohl in früheren Experimenten (85,180) die Interaktionsstelle zwischen GRASP65 und GM130 auf die zweite PDZ-Domäne eingegrenzt wurde, konnte bei den ITC-Messungen keine Bindung beobachtet werden. In Abbildung 35A sind die Rohdaten der Titration von GRASP65<sup>PDZ2</sup> mit einem sechs Aminosäuren langen GM130-Peptid abgebildet, bei dem keine Interaktion stattfand. Auch nach einer Verdoppelung der Proteinkonzentration in der Probenzelle und der Verwendung von längeren Peptiden und GRASP65-Konstrukten, konnte keine Bindung festgestellt werden.

Abschließend wurden Konstruktvarianten getestet, die die GRASP-Domäne umfassen. Für das Konstruktdesign wurde sich sowohl an den bereits bekannten GRASP65 PDZ-Domänen, wie auch an der Struktur von GRASP55 orientiert. Von den getesteten Konstruktvarianten zeigte nur GRASP65<sup>1-204</sup> eine Affinität zu GM130.



**Abbildung 35:** Titrations von GRASP65-Konstrukten mit dem GM130-Peptid <sup>N</sup>VKITVI<sup>C</sup>. (A) Rohdaten der Titration von GRASP65<sup>PDZ2</sup> mit dem GM130-Peptid. (B) Rohdaten der Titration der GRASP-Domäne GRASP65<sup>1-204</sup> mit dem GM130-Peptid. (C) Darstellung der Datenpunkte (◆), die sich aus der Integration über das Wärmesignal ergeben. An die Datenpunkte wurde eine Bindungsisotherme angepasst. Daraus ergibt sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D=10,0 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . (D) Abweichung der experimentellen Daten bezogen auf die angepasste Bindungsisotherme. Die Messung wurde in 20 mM HEPES, 250 mM NaCl, pH 8,0 bei 15 °C durchgeführt. Die Proteinkonzentration in der Probenzelle betrug 75  $\mu\text{M}$ . Die Peptidkonzentration in der Spritze betrug 1,5 mM. Die Rohdaten wurden mit der Software ORIGIN integriert und mit dem Programm SEDPHAT (147) analysiert.

In Abbildung 35C ist die Bindungsisotherme von GRASP65<sup>1-204</sup> mit dem GM130-Peptid <sup>N</sup>VKITVI<sup>C</sup> dargestellt. Aus der Bindungsisothermen ergab sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D=10,0 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . Die Messung wurde dreimal wiederholt, sowie bei 15 und 25 °C mit kürzeren (5 AS) und längeren (12 AS) Peptiden durchgeführt, jedoch ohne

erkennbaren Einfluss auf das Bindungsverhalten. Alle erhaltenen Dissoziationskonstanten bewegen sich in einem Bereich von 6-15  $\mu\text{M}$ .

Erstaunlicherweise war GRASP65<sup>1-204</sup> das einzige GRASP-Domänen-Konstrukt, das mit GM130 interagiert. Um sicherzugehen, dass es sich bei der Bindung zwischen GRASP65<sup>1-204</sup> und GM130 um eine spezifische Bindung handelt, wurde die Mutante GRASP65<sup>1-204LI152-153AA</sup> hergestellt, bei der in früheren Experimenten gezeigt wurde (181), dass sie die Interaktion zwischen GRASP65 und GM130 unterbindet. Für die Mutante GRASP65<sup>1-204LI152/153AA</sup> konnte tatsächlich keine Interaktion zwischen GRASP65 und GM130 detektiert werden. Es ist also davon auszugehen, dass GM130 spezifisch an GRASP65<sup>1-204</sup> bindet.

Wurden die beiden einzelnen PDZ-Domänen von GRASP65, GRASP65<sup>1-108</sup> und GRASP65<sup>108-204</sup>, zusammen inkubiert und gegen GM130-Peptid titriert, konnte keine Bindung detektiert werden.

Es liegt nahe, dass die Anordnung der beiden PDZ-Domänen zueinander die Bindung von GM130 an GRASP65 beeinflusst. Jedoch muss die Bindungsstelle für GM130 komplett vorhanden sein, wie in Konstrukt GRASP65<sup>1-204</sup> der Fall. Eine verkürzte Variante der GRASP-Domäne, GRASP65<sup>13-197</sup>, wie sie für die Kristallisation hergestellt wurde, enthält die Bindungsregion nicht vollständig. Mit diesem Konstrukt konnte keine Bindung zwischen GRASP65 und GM130 festgestellt werden.

Die beiden längsten getesteten Konstrukte GRASP65<sup>1-208</sup> und GRASP65<sup>13-208RPFE</sup> zeigten keinerlei Affinität gegenüber den GM130-Peptiden. Diese Konstrukte waren für die Kristallisation verlängert worden, um Kristallkontakte aus vorhandenen Strukturen (GRASP55, PDB-Eintrag: 3RLE, (114)) zu imitieren. Vermutlich hat der verlängerte C-Terminus dieser Konstrukte mit der Bindungstasche interagiert und diese blockiert, wie es schon bei den Kristallstrukturen von GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup> beobachtet werden konnte (Kapitel 4.1.7)

In Tabelle 18 wurden die Ergebnisse der ITC-Messungen zusammengefasst.

**Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der ITC-Messungen der GRASP65-Konstrukte und GM130-Peptide.**

Domäne	Konstrukt	Bindung an GM130
PDZ1	GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	Keine Bindung
PDZ2	GRASP65 <sup>108-199</sup>	Keine Bindung
	GRASP65 <sup>PDZ2</sup>	Keine Bindung
	GRASP65 <sup>108-197</sup>	Keine Bindung
	GRASP65 <sup>94-204</sup>	Keine Bindung
GRASP65-Domäne (PDZ1+PDZ2)	GRASP65 <sup>1-204</sup>	$K_D=10,0\pm 2,9 \mu\text{M}$
	GRASP65 <sup>1-108</sup> + GRASP65 <sup>108-204</sup>	Keine Bindung
	GRASP65 <sup>13-197</sup>	Keine Bindung
	GRASP65 <sup>1-208</sup>	Keine Bindung
	GRASP65 <sup>1-199</sup>	Keine Bindung
	GRASP65 <sup>13-208RPFE</sup>	Keine Bindung
Kontrolle	GRASP65 <sup>1-204</sup> (Zelle) gegen Messpuffer (Spritze)	
	Messpuffer (Zelle) gegen Peptid GM130_6AS (Spritze)	

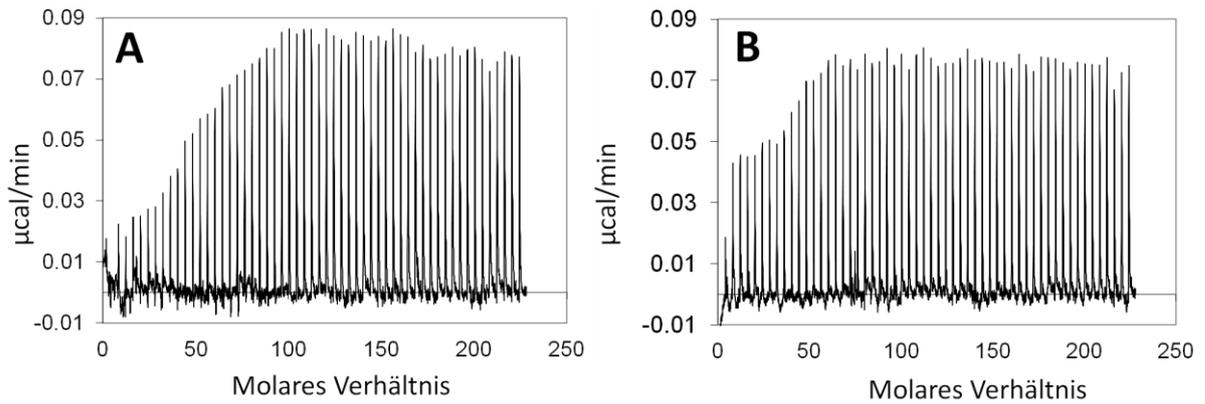
### 4.3.1 Interaktion von Grh1 mit Bug1- bzw. Uso1-Peptiden

ITC-Interaktionsstudien mit Grh1 aus Hefe wurden zum einen durchgeführt, um die Interaktion zwischen Grh1 und Bug1 genauer zu spezifizieren und zum anderen um eine putative Interaktion zwischen Grh1 und Uso1 genauer zu untersuchen. Hierfür wurden Grh1-Konstrukte verwendet, die entweder die erste oder zweite PDZ-Domäne umfassten. Es sollte bestimmt werden, ob Bug1 bzw. Uso1 analog zum humanen Komplex GRASP65•GM130 an Grh1 binden. Als Liganden wurden Peptide der letzten sechs Aminosäuren der C-Termini der beiden Proteine Bug1 und Uso1 verwendet. In Tabelle 19 sind die verwendeten Grh1-Konstrukte aufgelistet. Jedes Protein-Konstrukt wurde auf Interaktion mit Bug1 und Uso1 untersucht.

**Tabelle 19: Übersicht der Grh1-Konstrukte für die ITC-Interaktionsstudien.**

Domäne	Konstrukt	Domäne	Konstrukt
PDZ1	Grh1 <sup>PDZ1ΔβB</sup>	PDZ2	Grh1 <sup>159-281</sup>
	Grh1 <sup>67-156</sup>		Grh1 <sup>166-285</sup>
	Grh1 <sup>67-173</sup>		Grh1 <sup>185-281</sup>

Für alle getesteten Protein-Peptid-Kombinationen konnte keine Interaktion detektiert werden. Es ist daher nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen mit welcher PDZ-Domäne von Grh1 Bug1 oder Uso1 interagiert und ob dies mit der gleichen Affinität wie bei GRASP65 und GM130 geschieht. In Abbildung 36A ist eines der ITC-Experimente exemplarisch dargestellt. Hier wurde das kristallisierte Konstrukt Grh1<sup>PDZ1ΔβB</sup> mit dem Bug1-Peptid titriert. Wie sich jedoch nach Bestimmung der Kristallstruktur herausgestellt hat, umfasst dieses Konstrukt nicht die vollständige PDZ-Domäne. Die Peptid-Bindungstasche ist nicht vollständig ausgebildet, da der zentrale β-Strang βB fehlt (Abbildung 32, Kapitel 4.2.4). Daraufhin wurden zwei weitere Konstrukte hergestellt, um die PDZ-Domäne zu komplettieren. Doch auch Grh1<sup>67-156</sup> und Grh1<sup>67-173</sup> banden nicht an die Peptide von Bug1 bzw. Uso1 (Titration von Grh1<sup>67-173</sup> mit Bug1 in Abbildung 36B).



**Abbildung 36: ITC-Interaktionsstudie von Grh1 mit dem C-terminalen Peptid von Bug1. (A) Titration von Grh1<sup>PDZ1ΔBB</sup> mit dem Bug1-Peptid. (B) Titration von Grh1<sup>67-173</sup> mit dem Bug1-Peptid. Es wurden 100 µM Protein und 2 mM Peptid eingesetzt. Die Messung wurde bei einer Temperatur von 15 °C durchgeführt. Der Signalanstieg innerhalb der ersten Injektionen ist auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen.**

Weiterführende Experimente mit drei verschiedenen Konstrukten der putativen zweiten PDZ-Domäne von Grh1 auf Interaktion mit Bug1 bzw. Uso1 blieben ebenfalls erfolglos. Auch hier konnte keine Bindung detektiert werden. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur und mit höheren Protein- und Peptidkonzentrationen wiederholt, um einen größeren Bindungsbereich abdecken zu können. Das Resultat der Messungen blieb jedoch unverändert.

Mit einem Konstrukt, das beide PDZ-Domänen beinhaltet, konnten analog zu GRASP65, keine Interaktionsstudien durchgeführt werden, da keines dieser Konstrukte in ausreichender Menge löslich war.

## 5 Diskussion

### 5.1 Strukturanalyse

#### 5.1.1 Strukturen von GRASP65

Durch die strukturelle Charakterisierung mittels Röntgenkristallographie konnte die Topologie der beiden GRASP65-Konstrukte GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup> bestimmt werden, die im Folgenden als Grundlage dienen sollte, die Interaktion mit des GRASP65 mit GM130 genauer zu beschreiben. Bei einer Auflösung von 2,7 Å für GRASP65<sup>PDZ1</sup> und einer Auflösung von 2,1 Å für GRASP65<sup>PDZ2</sup> bestätigten die Kristallstrukturen die Domänen- und Sekundärstrukturvorhersage, dass es sich bei beiden Strukturen um PDZ-Domänen handelt. Der konservierte  $\beta$ -sandwich Faltungstyp einer PDZ-Domäne ist bei beiden Strukturen vorhanden. Trotz gleicher Topologie liegt zwischen GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup> nur eine Sequenzidentität von 35% vor (Tabelle 20), wohingegen die Strukturen eine *r.m.s.*-Abweichung von nur 0,8 Å für äquivalente C $\alpha$ -Atome aufweisen. Auf diese mehr strukturell, denn sequenziell basierende Verwandtschaft wird in Kapitel 5.1.3 näher eingegangen.

#### 5.1.2 Struktur von Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$ $\beta$ B</sup>

Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, welche Funktion Grh1 in Hefe hat. Obwohl in der Knosphefe keine zu Golgi-Stapeln organisierten Zisternen vorliegen, enthält sie mit Grh1 ein Protein, das homolog ist zu GRASP65, welches an der Golgi-Stapelung in Säugerzellen beteiligt ist.

Die Bestimmung der Kristallstruktur sollte ein erster Schritt sein, die Funktion von Grh1 aufzuklären. Sekundärstrukturvorhersagen wiesen auf eine PDZ-Domänen ähnliche Faltung hin. Es war möglich das Grh1-Konstrukt Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup> mit einer Auflösung von 1,4 Å strukturell zu charakterisieren. Doch erst eine Überlagerung der Grh1-Struktur mit der ersten PDZ-Domäne von GRASP65, GRASP65<sup>PDZ1</sup>, zeigte, dass es sich auch hier um eine PDZ-Domäne handelt. Da es nur möglich war, ein unvollständiges Konstrukt, Grh1<sup>PDZ1 $\Delta$  $\beta$ B</sup>, der ersten PDZ-Domäne von Grh1 zu kristallisieren, kann die Lage der fehlenden Sekundärstrukturelemente nur basierend auf den entsprechenden Elementen der ersten PDZ-Domäne von GRASP65, GRASP65<sup>PDZ1</sup>, modelliert werden. Orientiert man

sich jedoch an den GRASP65-Strukturen, ergibt sich ein deutliches Bild für die PDZ-Domäne von Grh1. Auch hier ist die Faltung der PDZ-Domäne im Vergleich mit GRASP65<sup>PDZ1</sup> strukturell (*r.m.s.*-Abweichung für C<sub>α</sub>s: 3,2 Å) und weniger sequenziell (Sequenzidentität: 10%) konserviert. Die PDZ-Domäne von Grh1 weist, wie auch GRASP65 im Vergleich mit kanonischen PDZ-Domänen, eine zirkuläre Permutation ihrer Sequenz auf (Kapitel 5.1.3, Abbildung 38).

Trotz zahlreicher Versuche konnte kein Grh1-Konstrukt kristallisiert werden, das weitere Teile des Proteins enthält. Es kann daher nur auf Basis der Sekundärstrukturvorhersagen vermutet werden, dass Grh1 ebenfalls über zwei PDZ-Domänen in Folge, ähnlich der GRASP-Domäne von GRASP65, verfügt.

### 5.1.3 PDZ-Domänen im Vergleich

Die strukturelle Verwandtschaft innerhalb der PDZ-Familienmitglieder zeigt sich bei einem Vergleich mit anderen pro- und eukaryotischen PDZ-Domänen (Abbildung 37). Strukturell unterscheiden sich die PDZ-Domänen von GRASP65, Grh1, PSD-95 (*R. norvegicus*, PDB-Eintrag: 1TP3) und RseP (*regulator of sigma E protease*, *E. coli*, PDB-Eintrag: 3ID2 (168)) mit *r.m.s.*-Abweichung der C<sub>α</sub>-Atome zwischen 1,8 und 3,2 Å nur geringfügig. Dennoch weisen die genannten PDZ-Domänen nur geringe Sequenzidentitäten auf (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Sequenzieller und struktureller Vergleich verschiedener PDZ-Domänen.**

PDZ-Domäne 1	PDZ-Domäne 2	Sequenzidentität (%)	<i>r.m.s.d.</i> (Å)*	Z-score <sup>#</sup>
GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	GRASP65 <sup>PDZ2</sup>	35	0,8	14,2
GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	PSD-95 (1TP3)	18	2,9	4,4
GRASP65 <sup>PDZ2</sup>	PSD-95 (1TP3)	10	2,6	3,3
GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	RseP (3ID2)	26	1,8	9,7
GRASP65 <sup>PDZ2</sup>	RseP (3ID2)	27	2,2	9,6
Grh1 <sup>PDZ1ΔBB</sup>	GRASP65 <sup>PDZ1</sup>	10	3,2	4,8
Grh1 <sup>PDZ1ΔBB</sup>	RseP (3ID2)	16	3,2	3,9

\*Bezogen auf die äquivalenten C<sub>α</sub>-Atome.

<sup>#</sup>Wert, der die Qualität des Vergleiches angibt (179). Z>20: Homologie der Strukturen ist gegeben, Z=8-20: Homologie ist wahrscheinlich gegeben. Z<2: Nicht signifikant.

Aus dem strukturellen Vergleich (Abbildung 37) der oben genannten PDZ-Domänen ergibt sich für die PDZ-Domänen von GRASP65 eine Besonderheit. Die für eukaryotische PDZ-Domänen typische Organisation der Sekundärstrukturelemente  $\beta\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$  findet sich innerhalb der PDZ-Domänen von GRASP65 nicht. Stattdessen liegt mit  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta$  eine zirkulär permutierte Sekundärstrukturelementabfolge vor, die der von bakteriellen PDZ-Domänen, beispielsweise RseP, gleicht. Diese zirkuläre Permutation gibt einen Hinweis auf eine evolutionäre Verbindung zwischen pro- und eukaryotischen PDZ-Domänen (182,183).

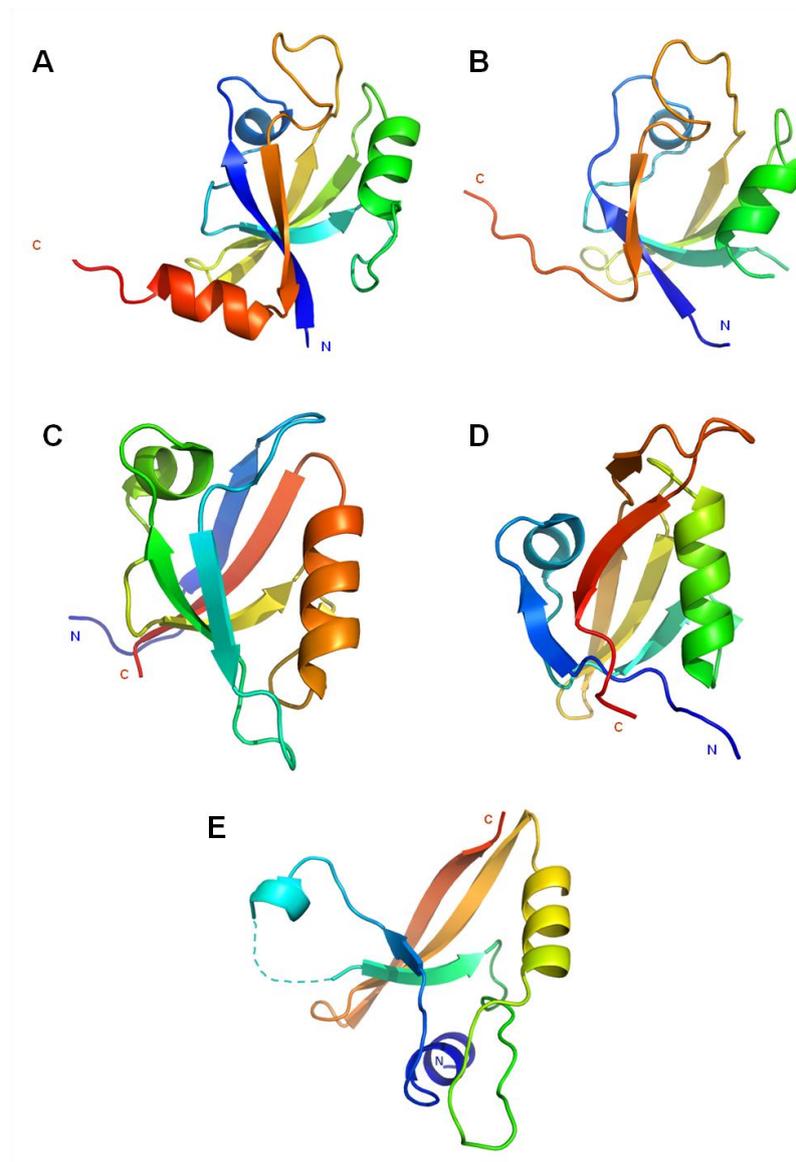
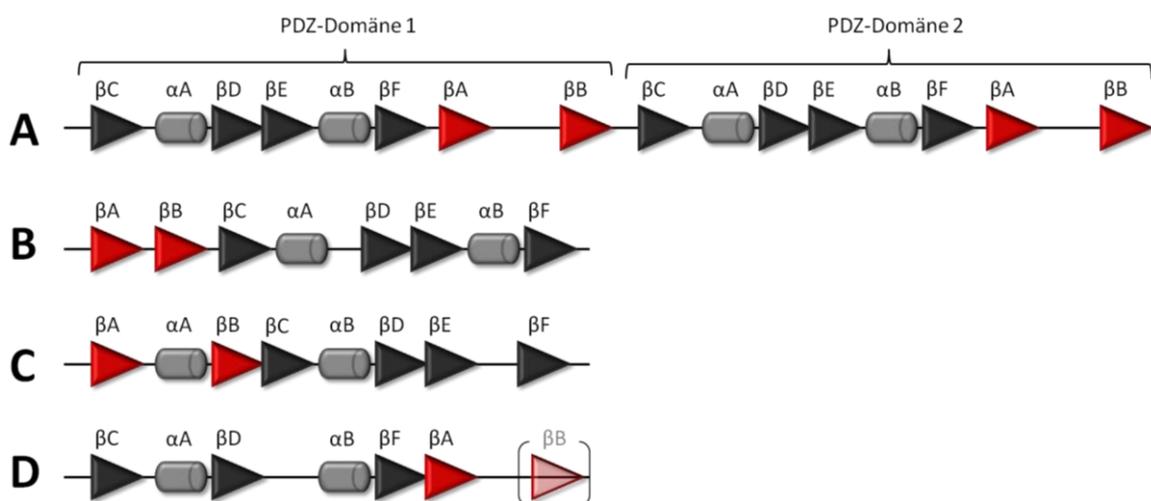


Abbildung 37: PDZ-Domänen im Vergleich. (A) GRASP65<sup>PDZ1</sup> (*H. sapiens*). (B) GRASP65<sup>PDZ2</sup> (*H. sapiens*). (C) Dritte PDZ PSD-95 (*R. norvegicus*, PDB-Eintrag: 1TP3). (D) RseP (*E. coli*, PDB-Eintrag: 3ID2). (E) Grh1<sup>PDZ1AβB</sup> (*S. cerevisiae*). Das Farbmuster verläuft vom N-Terminus in blau hin zum C-Terminus in rot.

Alle fünf Strukturen sind mit Blick auf die Peptid-Bindungstasche der PDZ-Domäne dargestellt. Wie an der Farbgebung zu erkennen ist, unterscheiden sich die Strukturen jedoch in der Abfolge der Sekundärstrukturelemente.

Die Nummerierung der Sekundärstrukturelemente erfolgt in humanen PDZ-Domänen vom N-Terminus, beginnend mit dem  $\beta$ -Strang  $\beta$ A, und endet mit dem C-terminalen Strang  $\beta$ F. Auf diese Weise wird die Peptid-Bindungstasche vom  $\beta$ -Strang  $\beta$ B und der Helix  $\alpha$ B ausgebildet, was hier am Beispiel der PDZ-Domäne von PSD-95 (Abbildung 38B) gezeigt ist. Bei Beibehaltung dieser Nummerierung – Strang  $\beta$ B und Helix  $\alpha$ B als zentrales Element der PDZ-Domäne – ist festzustellen, dass diese Nummerierung bei GRASP65 (Abbildung 38A) und Grh1 (Abbildung 38D) nicht direkt übernommen werden kann. Mit dem  $\beta$ -Strang  $\beta$ B und der Helix  $\alpha$ B als Fixpunkt innerhalb der Zuordnung, ergibt sich für GRASP65 und Grh1 der  $\beta$ -Strang  $\beta$ C als N-terminaler und  $\beta$ B als C-terminaler  $\beta$ -Strang, im Gegensatz zu den Strängen  $\beta$ A und  $\beta$ F, die bei PSD-95 N- und C-terminal nebeneinander zu liegen kommen. Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente einer bakteriellen PDZ-Domäne (Abbildung 38C) hingegen entspricht exakt der, die bei GRASP65 und Grh1 vorliegt. Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente von GRASP65 und Grh1 ähnelt demnach mehr der einer prokaryotischen als einer eukaryotischen PDZ-Domäne. Diese Verschiebung von N- und C-Terminus ist als zirkuläre Permutation (114,182,184) bekannt und könnte ein Hinweis auf die evolutionäre Entstehung und Optimierung von PDZ-Domänen sein.



**Abbildung 38: Vergleich der Sekundärstrukturelementeorganisation humaner und bakterieller PDZ-Domänen. (A) GRASP-Domäne von GRASP65 (*H. sapiens*). (B) PDZ3 von PSD-95 (*R. norvegicus*, PDB-Eintrag: 1TP3). (C) PDZ2 von RseP (*E. coli*, PDB-Eintrag: 3ID2). (D) PDZ1 von Grh1 (*S. cerevisiae*). Der in der Struktur fehlende  $\beta$ -Strang  $\beta$ B ist der Vollständigkeit halber in Klammern dargestellt.  $\beta$ -Stränge sind als Dreiecke dargestellt,  $\alpha$ -Helices als Zylinder.**

## 5.2 Modell der Bindung von GRASP65 an das Golgin GM130

Um Bindungskonstanten zwischen Ligand und PDZ-Domäne zu bestimmen, wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von Methoden genutzt, allerdings mit oft sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Affinitäten im nano- bis mikromolaren Bereich). Sogenannte *solid-phase* Methoden stellten sich dabei als sehr fehlerbehaftet heraus. Bei diesen Methoden, zu denen unter anderem ELISA- (*enzyme-linked immunosorbent assay*) und SPR- (*surface plasmon resonance*) Analysen gehören, stellte sich tendenziell eine zu hohe Bindungsaffinität heraus. Methoden, bei denen das Protein frei in Lösung bleibt (z.B. ITC), stellten sich als geeigneter heraus, denn sie führten zu konstanteren und besser vergleichbaren Ergebnissen (121). Nicht zu vergessen ist die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), mit der die Bindungskonstante abgeschätzt werden könnte, was allerdings ein zeitintensives Verfahren darstellt. Diese Methode könnte auch, wie Röntgenkristallographie, zur strukturellen Untersuchung der Bindung verwendet werden (185).

Hier wurde die Bindungsaffinität zwischen GRASP65 und GM130 mit der Methode der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt. Hierbei liegt das Protein zum einen in Lösung vor, zum anderen handelt es sich bei dieser Methode um eine nicht invasive Methode. Dies war insbesondere wichtig, da die Proben nach erfolgter ITC-Messung für Kristallisationsansätze weiter verwendet werden sollten.

Da die Interaktion zwischen GM130 und GRASP65 auf eine Aminosäuresequenz innerhalb der zweiten PDZ-Domäne von GRASP65 kartiert wurde (85), sollte mit entsprechenden Konstrukten die Bindungsaffinität bestimmt werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass keines der getesteten Konstrukte der zweiten PDZ-Domäne von GRASP65 mit dem GM130-Peptid interagierte. Auch nach Variation der Protein- und Peptidkonzentrationen, sowie der Messtemperatur, konnte keine Interaktion detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Dimerisierung der PDZ-Domäne sein (Abbildung 24). Durch die Bindung des C-Terminus eines Moleküls (Molekül 2) in die Peptid-Bindungstasche eines anderen Moleküls (Molekül 1) wird diese blockiert, woraufhin eine Bindung des GM130-Peptids möglicherweise geschwächt ist oder nicht mehr stattfinden kann. Um den vermuteten Effekt der Autoinhibition ausschließen zu können, wurden C-terminal verkürzte Konstrukte von GRASP65<sup>PDZ2</sup> hergestellt. Diese um fünf oder um sieben Aminosäuren verkürzten Konstrukte sollten einen derart verkürzten C-Terminus aufweisen, dass dieser nicht mehr in die Bindungstasche eines zweiten

Moleküls binden kann. Jedoch interagierten auch keines der verkürzten Konstrukte mit den verwendeten GM130-Peptiden.

Erst die Messung eines für die Kristallisation vorgesehenen Konstrukts zeigte eine Affinität von  $10,0 \pm 2,9 \mu\text{M}$  zu einem GM130-Peptid (6 AS). Bei diesem Konstrukt handelte es sich um die vollständige GRASP-Domäne von GRASP65, die beide PDZ-Domänen von Aminosäure 1 bis 204 umfasst.

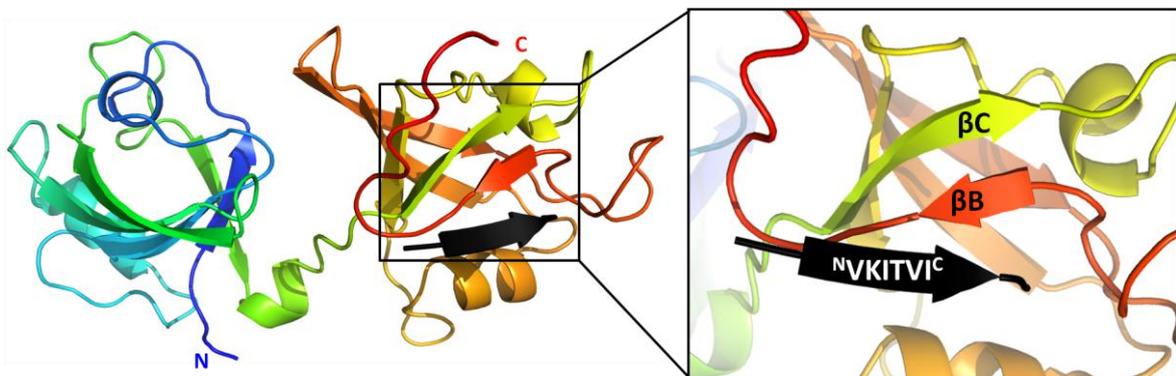
Um sicherzugehen, dass das Peptid direkt in die Peptid-Bindungstasche bindet, wurden die Reste Leu152 und Ile153 durch ortsgerichtete Mutagenese des Gens gegen Alanine ausgetauscht. Diese bereits bekannte Doppelmutation unterbindet die Interaktion zwischen GRASP65 und GM130, woraufhin GRASP65 nicht länger am Golgi-Apparat lokalisiert ist (181). Eine Titration der GRASP-Domäne GRASP65<sup>1-204LI152-153AA</sup> mit dem GM130-Peptid zeigte keinerlei Affinität von GM130 gegenüber GRASP65. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das Peptid spezifisch mit der Peptid-Bindungstasche interagiert. Der kristallographische Nachweis zur Bindung des Peptids an die GRASP-Domäne konnte jedoch nicht erbracht werden, da trotz diverser Modifikationen der Konstrukte keine Kristalle gezüchtet werden konnten.

Wie bereits bei den elektrostatischen Oberflächenpotentialen zu erkennen war, sollte zwischen dem hydrophoben C-Terminus von GM130 und der positiv geladenen PDZ-Domäne von GRASP65<sup>PDZ1</sup> keine Interaktion stattfinden, was durch die durchgeführten ITC-Messungen bestätigt werden konnte. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier die Dimerisierung zu einer Autoinhibition geführt hat.

Die Interaktion zwischen GRASP65 und GM130 wurden bis dato nur mit GST-Fusionspeptiden oder mit *in vitro* translatierten Proteinkonstrukten detektiert (85,180). *In vivo* translatierte Proteine mit ungetaggten Peptiden wurden nicht verwendet. Hier konnte zum ersten Mal eine Interaktion zwischen GRASP65 und GM130 *in vitro* detektiert werden, wobei rekombinant hergestelltes Protein und Peptide ohne *tag* verwendet wurden. Durch diese Messungen konnte für die Bindung der GRASP-Domäne von GRASP65 an GM130 eine Bindungskonstante von  $10,0 \pm 2,9 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Da der kristallographische Beweis einer Bindung von GM130 an GRASP65 nicht erbracht werden konnte, wurde ein Modell des Peptid-Proteinkomplexes erstellt (Abbildung 39), um dennoch einen strukturellen Einblick in die Bindung von GM130 an GRASP65 zu erhalten. Dazu wurden zuerst die beiden einzelnen PDZ-Domänen mit dem *threading* Protokoll der RosettaCommons Software (Version 3.2 (165)) von Marcel Jurk (AG Schmieder, FMP,

Berlin) zu einem Molekül zusammengefügt. Da während der Erstellung dieser Arbeit die Struktur der GRASP-Domäne des humanen GRASP55 veröffentlicht wurde (114), wurde diese Struktur als Basis für die Berechnung verwendet. Nachdem das Modell der GRASP-Domäne erstellt worden war, wurde das GM130-Peptid  $^N\text{VKITVI}^C$  mit den Programmen SYBYL-X 1.3 (166) und AMBER7 (167) eingepasst. Die Einpassung des Peptids erfolgte in Kooperation mit Jonas Protze (AG Gerd Krause, FMP, Berlin). Als Basis für die Positionierung des Peptids wurden die Kristallstrukturen von RseP (PDB-Eintrag: 3ID4 (168)) und MAGI-1 (PDZ1, PDB-Eintrag: 2I03 (169)) verwendet.

In Abbildung 39 ist das Modell der GRASP-Domäne von GRASP65 dargestellt. Wie in der Detailaufnahme deutlich zu erkennen ist, bildet das Peptid zusammen mit den beiden  $\beta$ -Strängen  $\beta\text{B}$  und  $\beta\text{C}$  ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt aus. Dieses Bindungsmuster ist typisch für die Bindung von Liganden an PDZ-Domänen und wurde bereits in Kapitel 1.3 anhand der PDZ-Domäne von PSD-95 (120) beschrieben.

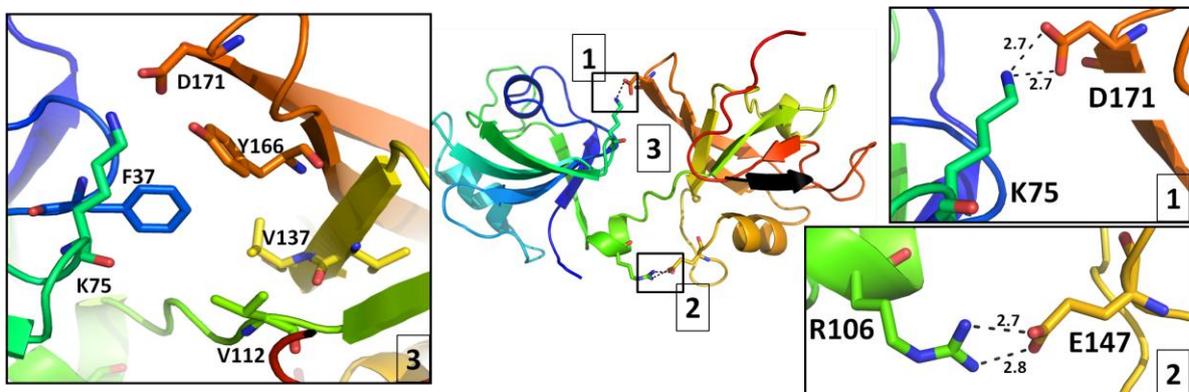


**Abbildung 39:** Modell der GRASP-Domäne von GRASP65 mit gebundenem GM130-Peptid ( $^N\text{VKITVI}^C$ , dargestellt in schwarz). Zuerst wurden die beiden einzelnen PDZ-Domänen von GRASP65, GRASP65<sup>PDZ1</sup> und GRASP65<sup>PDZ2</sup>, mit dem *threading* Protokoll der Rosetta Commons Software (Version 3.2 (165)) zu einer Domäne zusammengefügt. Das GM130-Peptid wurde mit den Programmen SYBYL-X 1.3 (166) und AMBER7 (167) eingepasst. Als Basis dienen die Strukturen der Proteine RseP (PDB-Eintrag: 3ID4) und MAGI-1 (PDB-Eintrag: 2I03). Das Farbmuster der GRASP-Domäne verläuft vom N-Terminus (blau) hin zum C-Terminus (rot).

Beide PDZ-Domänen nehmen in diesem Modell eine verdrehte Ausrichtung zueinander ein, sodass die unterschiedlich geladenen Bindungstaschen (Abbildung 20, Abbildung 22) der jeweiligen PDZ-Domänen in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Stabilisiert wird diese Konformation durch Salzbrücken (Abbildung 40, 1+2) und hydrophobe Wechselwirkungen (Abbildung 40, 3). Die prägnantesten Salzbrücken bilden sich dabei zwischen den Aminosäuren Lys75 (GRASP65<sup>PDZ1</sup>) und Asp171 (GRASP65<sup>PDZ2</sup>), sowie

Arg106 (GRASP65<sup>PDZ1</sup>) und Glu147 (GRASP65<sup>PDZ2</sup>) aus. Der hydrophobe Kern, der die beiden PDZ-Domänen zusammenhält, wird durch die Reste Tyr166, Val137, Val112 und Phe37 ausgebildet.

Ein Grund für die entgegengesetzte Ausrichtung der beiden PDZ-Domänen könnte die Bindung an unterschiedliche Bindungspartner sein. Während die hydrophobe Oberfläche der zweiten PDZ-Domäne GRASP65<sup>PDZ2</sup> prädestiniert ist, den hydrophoben C-Terminus von GM130 (<sup>N</sup>VKITV<sup>I</sup><sup>C</sup>), zu binden, wird für die positiv geladene Bindungstasche der ersten PDZ-Domäne GRASP65<sup>PDZ1</sup> momentan ein interner Ligand als Interaktionspartner diskutiert (180,185,186).

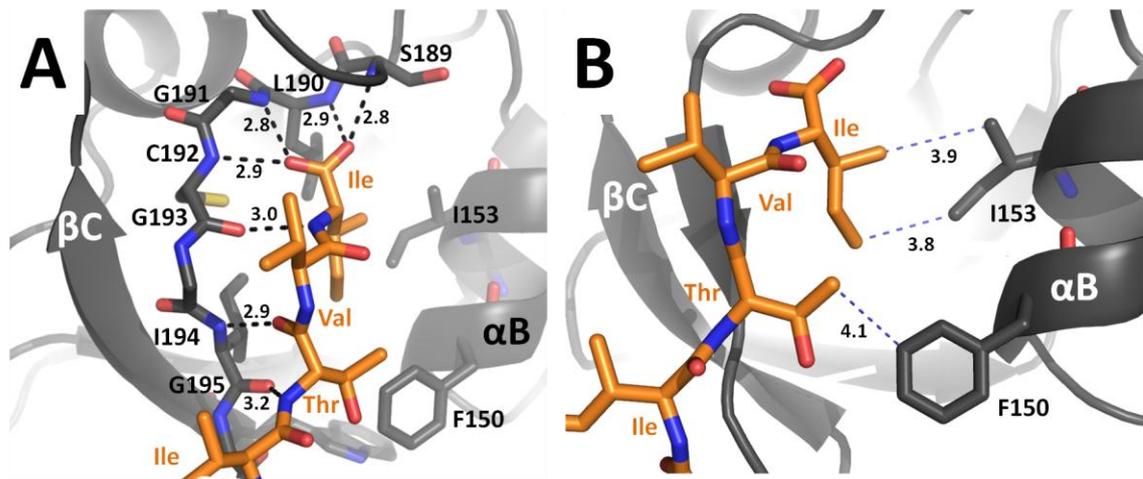


**Abbildung 40:** Konformation der GRASP-Domäne von GRASP65. Die Ausrichtung der beiden einzelnen PDZ-Domänen innerhalb der GRASP-Domäne erfolgt über zwei prägnante Salzbrücken (1+2) und einen hydrophoben Kern (3).

Einen detaillierten Einblick in die Bindung von GM130 und GRASP65 erhält man durch Abbildung 41. In Abbildung 41A ist die vom Modell postulierte Wechselwirkung des Peptidrückgrates des  $\beta$ -Strangs  $\beta$ B mit dem Peptid dargestellt. Allein zwischen den letzten drei Aminosäuren des Peptids Ile<sub>0</sub>-Thr<sub>2</sub> bilden sich sieben Wasserstoffbrücken aus, von denen vier das typische Wasserstoffbrückenbindungsmuster eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts zeigen. Diese Wechselwirkungen werden durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Resten Ile153 und Phe150 der Helix  $\alpha$ B und den Resten Ile und Thr des Peptides gefestigt (Abbildung 41B).

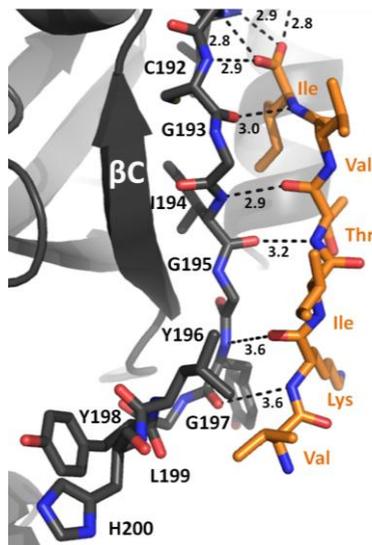
Diese Darstellung verdeutlicht nochmals die Wichtigkeit der Reste Leu152 und Ile153, die zur Verifizierung der Peptidbindung mutiert worden waren. Die Seitenkette des Ile153 bildet van der Waals-Kontakte mit der Seitenkette des Ile<sub>0</sub> des Peptids aus. Das Leu152 spielt dabei in der Positionierung des Ile153 eine Rolle. Durch eine Mutation dieser beiden Reste zu Alanin geht ein großer Teil der Wechselwirkungen verloren, was dann, wie

bereits gezeigt (181), zu einem Auseinanderbrechen der Bindung zwischen GRASP65 und GM130 führt.



**Abbildung 41: Detailansichten der Bindungstasche von GRASP65. (A) Darstellung der Wasserstoffbrücken zwischen GM130-Peptid (orange) und Proteinrückgrat des  $\beta$ -Stranges  $\beta$ B (grau). (B) Darstellung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Peptid (orange) und der Helix  $\alpha$ B (grau). Die Wasserstoffbrücken (schwarz) und die van der Waals-Kontakte (blau) werden als gestrichelte Linien dargestellt. Die Abstände zwischen den Atomen sind in Ångström (Å) angegeben.**

Die in Abbildung 41 gezeigten Wechselwirkungen sind wichtig für die initiale Bindung des Liganden an die PDZ-Domäne. Die Spezifität der Bindung wird jedoch von der bereits



kartierten Region  $^{194}\text{IGYGYLH}^{200}$  (85) innerhalb von GRASP65 ausgehen. Entlang dieser Sequenz werden ebenfalls Wasserstoffbrücken zwischen Protein- und Peptidrückgrat vorhergesagt (Abbildung 42). Bestätigt werden kann dieses Resultat durch die Ergebnisse der ITC-Experimente, in denen C-terminal verkürzte GRASP-Domänen-Konstrukte nicht mehr in der Lage waren, GM130-Peptide zu binden (Kapitel 4.3.1).

**Abbildung 42: Detailansicht der Interaktion des GM130-Peptids und des  $\beta$ -Strangs  $\beta$ B. Die Wasserstoffbrücken werden als gestrichelte Linien dargestellt. Die Abstände zwischen den Atomen sind in Ångström (Å) angegeben.**

### 5.3 Biochemische Analyse von Grh1

Bereits im Jahre 1997 gab es Vermutungen, dass mit Uso1 ein Interaktionspartner für Grh1 vorliegen könnte. Da ein Homolog zu GM130 in Hefe zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war, ging man davon aus, dass Uso1, eine mögliche Kombination aus p115 und GM130, ein möglicher Interaktionspartner für Grh1 sein könnte (87). Zehn Jahre später fand man mit Bug1 ein GM130 homologes Protein in Hefe (86,87). Um zu verifizieren, welche dieser Annahmen stimmt, wurden diverse Grh1-Konstrukte der ersten und zweiten PDZ-Domäne hergestellt und auf Interaktion mit Bug1 oder Uso1 getestet.

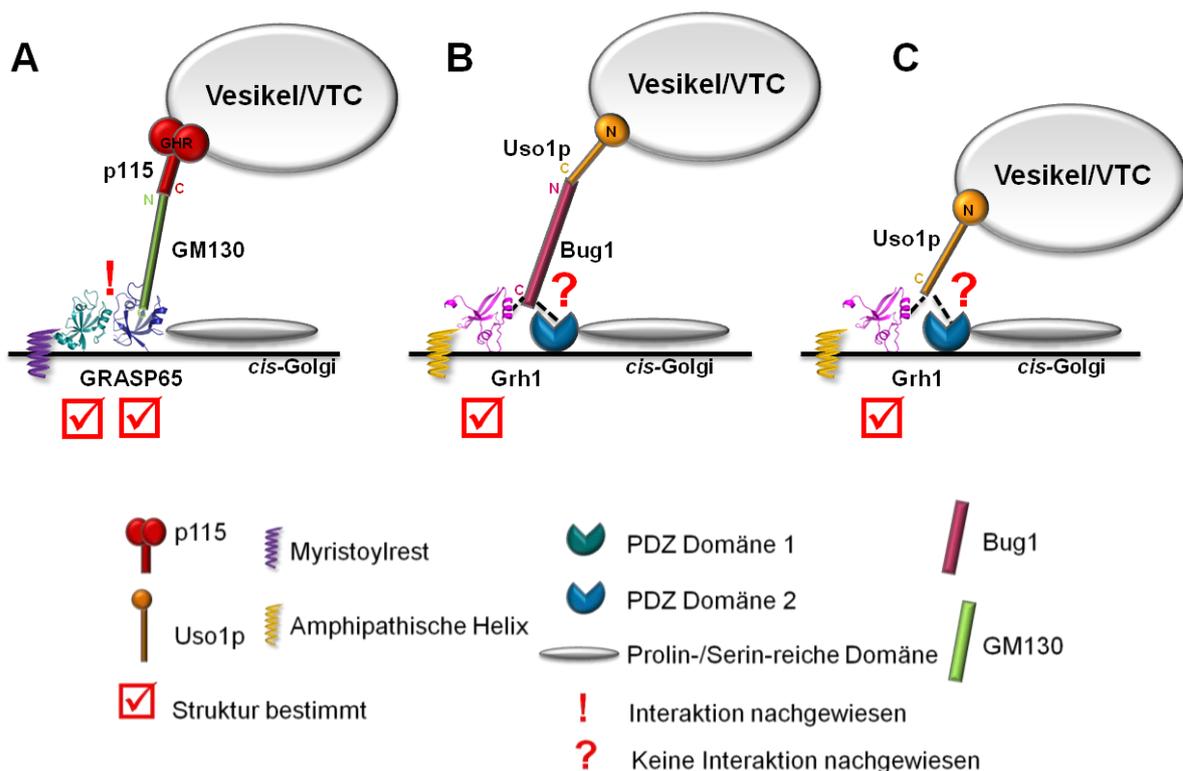
Die ersten ITC-Messungen mit dem Konstrukt Grh1<sup>PDZ1Δβ</sup> zeigten keine Interaktion, weder mit Bug1, noch mit Uso1. Durch Bestimmung der Kristallstruktur wurde deutlich, weshalb keine Bindung der Peptide an das Konstrukt detektiert werden konnte: das verwendete Konstrukt war nicht vollständig, da der für die Peptidinteraktion wichtige β-Strang βB und die Carboxyl-Bindeschleife in diesem Konstrukt nicht vorhanden waren. Daraufhin wurde das Konstrukt C-terminal verlängert, um sicherzustellen, dass die PDZ-Domäne danach eine vollständig ausgebildete Peptid-Bindungstasche aufweist. Interaktionsstudien mit diesen verlängerten Konstrukten zeigten allerdings auch keine Interaktion zwischen Grh1 und Bug1 bzw. Uso1. Da Kartierungen der Bindungsstelle nicht bekannt sind, legen die bisherigen Ergebnisse die Vermutung nahe, dass die Interaktionsstelle innerhalb der beiden PDZ-Domänen lokalisiert ist oder die Peptid-Bindungstasche durch Autoinhibition (Bindung des C-Terminus in die Peptid-Bindungstasche), wie bei GRASP65 beobachtet, nicht zugänglich ist. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass bei Titrationsstudien zwischen diversen Konstrukten der zweiten PDZ-Domäne von Grh1 und Bug1 bzw. Uso1 keine Bindung nachgewiesen werden konnte.

Um zu analysieren, ob die vollständige GRASP-Domäne für eine Interaktion notwendig ist, wurden diverse GRASP-Domänen-Konstrukte von Grh1 entworfen. Keines dieser Konstrukte konnte jedoch in ausreichender Menge und Reinheit hergestellt werden, um biochemische Studien oder Kristallstrukturanalysen durchzuführen. Eine umfangreiche Mutationsstudie von oberflächenexponierten Resten (*surface entropy reduction*) könnte hier eventuell weiterhelfen.

Insofern kann nach Abschluss der Untersuchungen keine Aussage darüber getroffen werden, mit welcher Affinität Bug1 oder Uso1 an Grh1 bindet bzw. welches Protein von Grh1 als Interaktionspartner präferiert wird.

## 6 Schlussfolgerung

Die Kristallstrukturen der einzelnen PDZ-Domänen von GRASP65 konnten bestimmt werden (Abbildung 43A). Auch konnte von einem Teil des Hefeproteins Grh1 die Struktur bestimmt werden (Abbildung 43B/C). Ein struktureller und sequenzieller Vergleich von Grh1 mit GRASP65 und anderen PDZ-Domänen zeigte, dass die Strukturen gut übereinstimmen und dass die PDZ-Domänen innerhalb der GRASP-Proteine strukturell konserviert sind. In Interaktionsstudien mittels ITC konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion zwischen GRASP65 und GM130 die vollständige GRASP-Domäne mit beiden PDZ-Domänen notwendig ist. Eine Interaktion zwischen der isolierten zweiten PDZ-Domäne und GM130, wie aus vorangegangenen Experimenten bekannt, konnte nicht verifiziert werden. Für Grh1 bleibt weiterhin die Frage offen, ob Bug1 der einzige Interaktionspartner ist, oder ob auch eine Interaktion mit Uso1 möglich ist (Abbildung 43B/C).



**Abbildung 43: Graphische Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit. (A) Über p115, GM130 und GRASP65 vermittelte Anheftung eines Vesikels an die *cis*-Golgi-Membran in einer humanen Zelle. (B) Anheftung eines Vesikels in *S. cerevisiae* mit Hilfe des Proteins Bug1. (C) Anheftung eines Vesikels in *S. cerevisiae*, bei der Grh1 direkt mit Uso1 interagiert. Die Strukturen der kristallographisch bestimmten PDZ-Domänen sind als Cartoons dargestellt.**

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004) *Cell* **116**, 153-166
2. Roth, T. F., and Porter, K. R. (1964) *J Cell Biol* **20**, 313-332
3. Crowther, R. A., and Pearse, B. M. (1981) *J Cell Biol* **91**, 790-797
4. Kirchhausen, T., and Harrison, S. C. (1981) *Cell* **23**, 755-761
5. Vigers, G. P., Crowther, R. A., and Pearse, B. M. (1986) *EMBO J* **5**, 529-534
6. Le Borgne, R., Griffiths, G., and Hoflack, B. (1996) *J Biol Chem* **271**, 2162-2170
7. Schekman, R., and Orci, L. (1996) *Science* **271**, 1526-1533
8. Dell'Angelica, E. C., Klumperman, J., Stoorvogel, W., and Bonifacino, J. S. (1998) *Science* **280**, 431-434
9. Dell'Angelica, E. C., Ohno, H., Ooi, C. E., Rabinovich, E., Roche, K. W., and Bonifacino, J. S. (1997) *EMBO J* **16**, 917-928
10. Robinson, M. S., and Bonifacino, J. S. (2001) *Curr Opin Cell Biol* **13**, 444-453
11. Orci, L., Glick, B. S., and Rothman, J. E. (1986) *Cell* **46**, 171-184
12. Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994) *Cell* **77**, 895-907
13. Barlowe, C. (1995) *FEBS Lett* **369**, 93-96
14. Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., and Scheller, R. H. (2001) *Nature* **409**, 839-841
15. Baker, D., Hicke, L., Rexach, M., Schleyer, M., and Schekman, R. (1988) *Cell* **54**, 335-344
16. Kaiser, C. A., and Schekman, R. (1990) *Cell* **61**, 723-733
17. Espenshade, P., Gimeno, R. E., Holzmacher, E., Teung, P., and Kaiser, C. A. (1995) *J Cell Biol* **131**, 311-324
18. Barlowe, C., and Schekman, R. (1993) *Nature* **365**, 347-349
19. Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H. P. (1999) *Nat Cell Biol* **1**, 330-334
20. Kuehn, M. J., Herrmann, J. M., and Schekman, R. (1998) *Nature* **391**, 187-190
21. Sohn, K., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Bremser, M., Lottspeich, F., Fiedler, K., Helms, J. B., and Wieland, F. T. (1996) *J Cell Biol* **135**, 1239-1248
22. Short, B., Haas, A., and Barr, F. A. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1744**, 383-395
23. Gillingham, A. K., and Munro, S. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1641**, 71-85
24. Allan, B. B., Moyer, B. D., and Balch, W. E. (2000) *Science* **289**, 444-448
25. Bentley, M., Liang, Y., Mullen, K., Xu, D., Sztul, E., and Hay, J. C. (2006) *J Biol Chem* **281**, 38825-38833

26. Beard, M., Satoh, A., Shorter, J., and Warren, G. (2005) *J Biol Chem* **280**, 25840-25848
27. Mills, I. G., Jones, A. T., and Clague, M. J. (1998) *Curr Biol* **8**, 881-884
28. Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., and Zerial, M. (1995) *Cell* **83**, 423-432
29. TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D., and Novick, P. (1996) *EMBO J* **15**, 6483-6494
30. Grindstaff, K. K., Yeaman, C., Anandasabapathy, N., Hsu, S. C., Rodriguez-Boulan, E., Scheller, R. H., and Nelson, W. J. (1998) *Cell* **93**, 731-740
31. Boyd, C., Hughes, T., Pypaert, M., and Novick, P. (2004) *J Cell Biol* **167**, 889-901
32. Wu, H., Rossi, G., and Brennwald, P. (2008) *Trends Cell Biol* **18**, 397-404
33. Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., and Novick, P. (1999) *EMBO J* **18**, 1071-1080
34. Wurmser, A. E., Sato, T. K., and Emr, S. D. (2000) *J Cell Biol* **151**, 551-562
35. Seals, D. F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W. T., and Price, A. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9402-9407
36. Markgraf, D. F., Ahnert, F., Arlt, H., Mari, M., Peplowska, K., Epp, N., Griffith, J., Reggiori, F., and Ungermann, C. (2009) *Mol Biol Cell* **20**, 5276-5289
37. Conibear, E., Cleck, J. N., and Stevens, T. H. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 1610-1623
38. Reggiori, F., Wang, C. W., Stromhaug, P. E., Shintani, T., and Klionsky, D. J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 5009-5020
39. Ungar, D., Oka, T., Vasile, E., Krieger, M., and Hughson, F. M. (2005) *J Biol Chem* **280**, 32729-32735
40. Oka, T., and Krieger, M. (2005) *J Biochem* **137**, 109-114
41. Sohda, M., Misumi, Y., Yoshimura, S., Nakamura, N., Fusano, T., Ogata, S., Sakisaka, S., and Ikehara, Y. (2007) *Traffic* **8**, 270-284
42. Hu, W. H., Pendergast, J. S., Mo, X. M., Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Li, F., Walters, W. M., Blits, B., He, L., Schaal, S. M., and Bethea, J. R. (2005) *J Biol Chem* **280**, 29233-29241
43. Lafrenière, R. G., Kibar, Z., Rochefort, D. L., Han, F. Y., Fon, E. A., Dubé, M. P., Kang, X., Baird, S., Korneluk, R. G., Rommens, J. M., and Rouleau, G. A. (1997) *Gene* **198**, 313-321
44. Wang, W., Sacher, M., and Ferro-Novick, S. (2000) *J Cell Biol* **151**, 289-296
45. Jones, S., Newman, C., Liu, F., and Segev, N. (2000) *Mol Biol Cell* **11**, 4403-4411
46. Cai, Y., Chin, H. F., Lazarova, D., Menon, S., Fu, C., Cai, H., Sclafani, A., Rodgers, D. W., De La Cruz, E. M., Ferro-Novick, S., and Reinisch, K. M. (2008) *Cell* **133**, 1202-1213
47. Yu, S., Satoh, A., Pypaert, M., Mullen, K., Hay, J. C., and Ferro-Novick, S. (2006) *J Cell Biol* **174**, 359-368
48. Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M., and Ferro-Novick, S. (2001) *Mol Cell* **7**, 433-442

49. Cai, H., Zhang, Y., Pypaert, M., Walker, L., and Ferro-Novick, S. (2005) *J Cell Biol* **171**, 823-833
50. Aoki, T., Ichimura, S., Itoh, A., Kuramoto, M., Shinkawa, T., Isobe, T., and Tagaya, M. (2009) *Mol Biol Cell* **20**, 2639-2649
51. Sun, Y., Shestakova, A., Hunt, L., Sehgal, S., Lupashin, V., and Storrie, B. (2007) *Mol Biol Cell* **18**, 4129-4142
52. Kraynack, B. A., Chan, A., Rosenthal, E., Essid, M., Umansky, B., Waters, M. G., and Schmitt, H. D. (2005) *Mol Biol Cell* **16**, 3963-3977
53. Jahn, R., and Scheller, R. H. (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-643
54. Fasshauer, D. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1641**, 87-97
55. Hong, W. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1744**, 493-517
56. Poirier, M. A., Xiao, W., Macosko, J. C., Chan, C., Shin, Y. K., and Bennett, M. K. (1998) *Nat Struct Biol* **5**, 765-769
57. Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., and Jahn, R. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15781-15786
58. Fabene, P. F., and Bentivoglio, M. (1998) *Brain Res Bull* **47**, 195-198
59. Rabouille, C., Misteli, T., Watson, R., and Warren, G. (1995) *J Cell Biol* **129**, 605-618
60. Lowe, M., Nakamura, N., and Warren, G. (1998) *Trends Cell Biol* **8**, 40-44
61. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2004) *Molekularbiologie der Zelle*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
62. Farquhar, M. G., and Palade, G. E. (1998) *Trends Cell Biol* **8**, 2-10
63. Hsu, V. W., Yuan, L. C., Nuchtern, J. G., Lippincott-Schwartz, J., Hammerling, G. J., and Klausner, R. D. (1991) *Nature* **352**, 441-444
64. Griffiths, G., and Simons, K. (1986) *Science* **234**, 438-443
65. Schweizer, A., Fransen, J. A., Bächli, T., Ginsel, L., and Hauri, H. P. (1988) *J Cell Biol* **107**, 1643-1653
66. Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J., and Glick, B. S. (2006) *Nature* **441**, 1002-1006
67. Elsner, M., Hashimoto, H., and Nilsson, T. (2003) *Mol Membr Biol* **20**, 221-229
68. Grasse, P. P. (1957) *C R Hebd Seances Acad Sci* **245**, 1278-1281
69. Pelham, H. R., and Rothman, J. E. (2000) *Cell* **102**, 713-719
70. Colley, K. J. (1997) *Glycobiology* **7**, 1-13
71. Tu, L., and Banfield, D. K. (2010) *Cell Mol Life Sci* **67**, 29-41
72. Rabouille, C., and Jokitalo, E. (2003) *Mol Membr Biol* **20**, 117-127
73. Kondylis, V., and Rabouille, C. (2003) *J Cell Biol* **162**, 185-198
74. Kondylis, V., and Rabouille, C. (2009) *FEBS Lett* **583**, 3827-3838
75. Levi, S. K., Bhattacharyya, D., Strack, R. L., Austin, J. R., and Glick, B. S. (2010) *Traffic* **11**, 1168-1179

76. Papanikou, E., and Glick, B. S. (2009) *FEBS Lett* **583**, 3746-3751
77. Chan, E. K. L., and Fritzler, M. J. (1998) *Electronic Journal of Biotechnology* **1**
78. Nakamura, N. (2010) *J Pharmacol Sci* **112**, 255-264
79. Nozawa, K., Casiano, C. A., Hamel, J. C., Molinaro, C., Fritzler, M. J., and Chan, E. K. (2002) *Arthritis Res* **4**, R3
80. Ramirez, I. B., and Lowe, M. (2009) *Semin Cell Dev Biol* **20**, 770-779
81. Lupashin, V., and Sztul, E. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1744**, 325-339
82. Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T. E., and Warren, G. (1995) *J Cell Biol* **131**, 1715-1726
83. Fritzler, M. J., Hamel, J. C., Ochs, R. L., and Chan, E. K. (1993) *J Exp Med* **178**, 49-62
84. Barr, F., Puype, M., Vandekerckhove, J., and Warren, G. (1997) *Cell* **91**, 253-262
85. Barr, F. A., Nakamura, N., and Warren, G. (1998) *EMBO J* **17**, 3258-3268
86. Behnia, R., Barr, F. A., Flanagan, J. J., Barlowe, C., and Munro, S. (2007) *J Cell Biol* **176**, 255-261
87. Nakamura, N., Lowe, M., Levine, T. P., Rabouille, C., and Warren, G. (1997) *Cell* **89**, 445-455
88. Striegl, H., Roske, Y., Kümmel, D., and Heinemann, U. (2009) *PLoS One* **4**, e4656
89. Sapperstein, S. K., Walter, D. M., Grosvenor, A. R., Heuser, J. E., and Waters, M. G. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 522-526
90. An, Y., Chen, C. Y., Moyer, B., Rotkiewicz, P., Elsliger, M. A., Godzik, A., Wilson, I. A., and Balch, W. E. (2009) *J Mol Biol* **391**, 26-41
91. Valsdottir, R., Hashimoto, H., Ashman, K., Koda, T., Storrie, B., and Nilsson, T. (2001) *FEBS Lett* **508**, 201-209
92. Moyer, B. D., Allan, B. B., and Balch, W. E. (2001) *Traffic* **2**, 268-276
93. Sinka, R., Gillingham, A. K., Kondylis, V., and Munro, S. (2008) *J Cell Biol* **183**, 607-615
94. Vasile, E., Perez, T., Nakamura, N., and Krieger, M. (2003) *Traffic* **4**, 254-272
95. Munro, S. (2011) *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**
96. Schuldiner, M., Collins, S. R., Thompson, N. J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J. F., Weissman, J. S., and Krogan, N. J. (2005) *Cell* **123**, 507-519
97. Shorter, J., Watson, R., Giannakou, M. E., Clarke, M., Warren, G., and Barr, F. A. (1999) *EMBO J* **18**, 4949-4960
98. Kinseth, M. A., Anjard, C., Fuller, D., Guizzunti, G., Loomis, W. F., and Malhotra, V. (2007) *Cell* **130**, 524-534
99. Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretaillade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., and Vivarès, C. P. (2001) *Nature* **414**, 450-453

100. Vinke, F. P., Grieve, A. G., and Rabouille, C. (2011) *Biochem J* **433**, 423-433
101. Wang, Y., Satoh, A., and Warren, G. (2005) *J Biol Chem* **280**, 4921-4928
102. Wang, Y., Seemann, J., Pypaert, M., Shorter, J., and Warren, G. (2003) *EMBO J* **22**, 3279-3290
103. Sengupta, D., Truschel, S., Bachert, C., and Linstedt, A. D. (2009) *J Cell Biol* **186**, 41-55
104. Kay, B. K., Williamson, M. P., and Sudol, M. (2000) *FASEB J* **14**, 231-241
105. Shorter, J., Watson, R., Giannakou, M., Clarke, M., Warren, G., and Barr, F. (1999) *EMBO J* **18**, 4949-4960
106. Struck, N. S., Herrmann, S., Langer, C., Krueger, A., Foth, B. J., Engelberg, K., Cabrera, A. L., Haase, S., Treeck, M., Marti, M., Cowman, A. F., Spielmann, T., and Gilberger, T. W. (2008) *J Cell Sci* **121**, 2123-2129
107. Sütterlin, C., Polishchuk, R., Pecot, M., and Malhotra, V. (2005) *Mol Biol Cell* **16**, 3211-3222
108. Puthenveedu, M. A., Bachert, C., Puri, S., Lanni, F., and Linstedt, A. D. (2006) *Nat Cell Biol* **8**, 238-248
109. Wang, Y., Wei, J., Bisel, B., Tang, D., and Seemann, J. (2008) *PLoS One* **3**, e1647
110. Feinstein, T. N., and Linstedt, A. D. (2008) *Mol Biol Cell* **19**, 2696-2707
111. Duran, J. M., Kinseth, M., Bossard, C., Rose, D. W., Polishchuk, R., Wu, C. C., Yates, J., Zimmerman, T., and Malhotra, V. (2008) *Mol Biol Cell* **19**, 2579-2587
112. Kodani, A., and Sütterlin, C. (2008) *Mol Biol Cell* **19**, 745-753
113. Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J., and Lowe, M. (2002) *J Cell Biol* **156**, 495-509
114. Truschel, S. T., Sengupta, D., Foote, A., Heroux, A., Macbeth, M. R., and Linstedt, A. D. (2011) *J Biol Chem* **286**, 20125-20129
115. Pfeffer, S. R. (2001) *J Cell Biol* **155**, 873-875
116. Norman, T. C., Smith, D. L., Sorger, P. K., Drees, B. L., O'Rourke, S. M., Hughes, T. R., Roberts, C. J., Friend, S. H., Fields, S., and Murray, A. W. (1999) *Science* **285**, 591-595
117. Tsunoda, S., Sierralta, J., and Zuker, C. S. (1998) *Curr Opin Genet Dev* **8**, 419-422
118. Cho, K. O., Hunt, C. A., and Kennedy, M. B. (1992) *Neuron* **9**, 929-942
119. Kennedy, M. B. (1995) *Trends Biochem Sci* **20**, 350
120. Jeleń, F., Oleksy, A., Smietana, K., and Otlewski, J. (2003) *Acta Biochim Pol* **50**, 985-1017
121. Harris, B. Z., and Lim, W. A. (2001) *J Cell Sci* **114**, 3219-3231
122. Nourry, C., Grant, S. G., and Borg, J. P. (2003) *Sci STKE* **2003**, RE7
123. Hung, A. Y., and Sheng, M. (2002) *J Biol Chem* **277**, 5699-5702

124. Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., and Seeburg, P. H. (1995) *Science* **269**, 1737-1740
125. Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E., and Blake, D. J. (1997) *Bioessays* **19**, 469-479
126. Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M., and MacKinnon, R. (1996) *Cell* **85**, 1067-1076
127. Sheng, M., and Sala, C. (2001) *Annu Rev Neurosci* **24**, 1-29
128. Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M., and Cantley, L. C. (1997) *Science* **275**, 73-77
129. Stricker, N. L., Christopherson, K. S., Yi, B. A., Schatz, P. J., Raab, R. W., Dawes, G., Bassett, D. E., Brecht, D. S., and Li, M. (1997) *Nat Biotechnol* **15**, 336-342
130. Tonikian, R., Zhang, Y., Sazinsky, S. L., Currell, B., Yeh, J. H., Reva, B., Held, H. A., Appleton, B. A., Evangelista, M., Wu, Y., Xin, X., Chan, A. C., Seshagiri, S., Lasky, L. A., Sander, C., Boone, C., Bader, G. D., and Sidhu, S. S. (2008) *PLoS Biol* **6**, e239
131. Bitner-Glindzicz, M., Lindley, K. J., Rutland, P., Blaydon, D., Smith, V. V., Milla, P. J., Hussain, K., Furth-Lavi, J., Cosgrove, K. E., Shepherd, R. M., Barnes, P. D., O'Brien, R. E., Farndon, P. A., Sowden, J., Liu, X. Z., Scanlan, M. J., Malcolm, S., Dunne, M. J., Aynsley-Green, A., and Glaser, B. (2000) *Nat Genet* **26**, 56-60
132. Verpy, E., Leibovici, M., Zwaenepoel, I., Liu, X. Z., Gal, A., Salem, N., Mansour, A., Blanchard, S., Kobayashi, I., Keats, B. J., Slim, R., and Petit, C. (2000) *Nat Genet* **26**, 51-55
133. Boerkoel, C. F., Takashima, H., Stankiewicz, P., Garcia, C. A., Leber, S. M., Rhee-Morris, L., and Lupski, J. R. (2001) *Am J Hum Genet* **68**, 325-333
134. Sherman, D. L., Fabrizi, C., Gillespie, C. S., and Brophy, P. J. (2001) *Neuron* **30**, 677-687
135. Pizzuti, A., Novelli, G., Mari, A., Ratti, A., Colosimo, A., Amati, F., Penso, D., Sangiuolo, F., Calabrese, G., Palka, G., Silani, V., Gennarelli, M., Mingarelli, R., Scarlato, G., Scambler, P., and Dallapiccola, B. (1996) *Am J Hum Genet* **58**, 722-729
136. Tassabehji, M., Metcalfe, K., Fergusson, W. D., Carette, M. J., Dore, J. K., Donnai, D., Read, A. P., Pröschel, C., Gutowski, N. J., Mao, X., and Sheer, D. (1996) *Nat Genet* **13**, 272-273
137. Aslanidis, C., and de Jong, P. J. (1990) *Nucleic Acids Res* **18**, 6069-6074
138. Mandel, M., and Higa, A. (1970) *J Mol Biol* **53**, 159-162
139. Dagert, M., and Ehrlich, S. D. (1979) *Gene* **6**, 23-28
140. Wang, W., and Malcolm, B. A. (1999) *Biotechniques* **26**, 680-682
141. [www.expasy.org](http://www.expasy.org)
142. [www.ebi.ac.uk/Tools/psa](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa)
143. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685

144. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) *Protein Sci* **4**, 2411-2423
145. Wang, R. T., and van de Hulst, H. C. (1991) *Appl Opt* **30**, 106-117
146. Praefcke, G. J. K., and Herrmann, C. (2005) Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen. *Biospektrum*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
147. Houtman, J. C., Brown, P. H., Bowden, B., Yamaguchi, H., Appella, E., Samelson, L. E., and Schuck, P. (2007) *Protein Sci* **16**, 30-42
148. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) *Nucleic Acids Res* **32**, W668-673
149. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2008) *Biopolymers* **89**, 392-400
150. Drenth, and Jan. (1998) *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
151. Rhodes, and Gale. (2006) *Crystallography Made Crystal Clear. A Guide for Users of Macromolecular Models*, Academic Press
152. McPherson, A. (1999) *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
153. Jancarik J., K. S.-H. (1991) *Journal of Applied Crystallography* **24**, 409-4011
154. Newman, J., Egan, D., Walter, T. S., Meged, R., Berry, I., Ben Jelloul, M., Sussman, J. L., Stuart, D. I., and Perrakis, A. (2005) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 1426-1431
155. Kabsch, W. (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132
156. Hendrickson, W. A., and Teeter, M. M. (1981) *Nature* **290**, 107-113
157. Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S., and Tucker, P. A. (2009) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**, 1089-1097
158. Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S., and Tucker, P. A. (2005) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 449-457
159. Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 355-367
160. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255
161. Painter, J., and Merritt, E. A. (2006) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 439-450
162. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501
163. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132
164. Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12-21
165. Kaufmann, K. W., Lemmon, G. H., Deluca, S. L., Sheehan, J. H., and Meiler, J. (2010) *Biochemistry* **49**, 2987-2998

166. International, T. SYBYL-X 1.3. 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA
167. Case D.A., Pearlman D.A., Caldwell J.W., Cheatham III T.E., Wang J., Ross W.S., Simmerling C.L., Darden T.A., Merz K.M., Stanton R.V., Cheng A.L., Vincent J.J., Crowley M., Tsui V., Gohlke H., Radmer R.J., Duan Y., Pitera J., Massova I., Seibel G.L., Singh U.C., Weiner P.K., and Kollman P.A. (2002) AMBER 7. University of California, San Francisco
168. Li, X., Wang, B., Feng, L., Kang, H., Qi, Y., Wang, J., and Shi, Y. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14837-14842
169. Zhang, Y., Dasgupta, J., Ma, R. Z., Banks, L., Thomas, M., and Chen, X. S. (2007) *J Virol* **81**, 3618-3626
170. Kabsch, W. (1993) *J Appl Crystallogr* **26**, 795-800
171. Matthews, B. W. (1968) *J Mol Biol* **33**, 491-497
172. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674
173. Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 235-242
174. Collaborative Computational Project, N. m. (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-763
175. Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., and Sasisekharan, V. (1963) *J Mol Biol* **7**, 95-99
176. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10037-10041
177. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Métoz, F. (1999) *Bioinformatics* **15**, 305-308
178. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) *J Mol Biol* **372**, 774-797
179. Holm, L., and Park, J. (2000) *Bioinformatics* **16**, 566-567
180. Sengupta, D., and Linstedt, A. D. (2010) *J Biol Chem* **285**, 39994-40003
181. Bachert, C., and Linstedt, A. D. (2010) *J Biol Chem* **285**, 16294-16301
182. Montanier, C., Flint, J. E., Bolam, D. N., Xie, H., Liu, Z., Rogowski, A., Weiner, D. P., Ratnaparkhe, S., Nurizzo, D., Roberts, S. M., Turkenburg, J. P., Davies, G. J., and Gilbert, H. J. (2010) *J Biol Chem* **285**, 31742-31754
183. Jeltsch, A. (1999) *J Mol Evol* **49**, 161-164
184. Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Hopp, T. P., and Edelman, G. M. (1979) *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3218-3222
185. Lee, H. J., and Zheng, J. J. (2010) *Cell Commun Signal* **8**, 8
186. Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Bredt, D. S., and Lim, W. A. (1999) *Science* **284**, 812-815

## Anhang

### A. Abkürzungsverzeichnis

<b>(v/v)</b>	Volumen / Volumen
<b>(w/v)</b>	Gewicht / Volumen
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Å</b>	Ångstrom
<b>A<sub>280</sub></b>	Absorption bei 280 nm
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AP</b>	Adapterproteinkomplex
<b>APS</b>	Ammoniumperoxidisulfat
<b>Arf</b>	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>BESSY</b>	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
<b>BIS-TRIS</b>	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BUG</b>	<i>Bound to Grh1 protein</i>
<b>Cam</b>	Chloramphenicol
<b>Carb</b>	Carbenicillin
<b>CCV</b>	<i>Clathrin coated vesicle</i>
<b>CD</b>	Zirkulardichroismus
<b>CGN</b>	<i>Cis-Golgi Netzwerk</i>
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>COP</b>	<i>Coat protein complex</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Bidestilliertes Wasser
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonucleotid
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ERGIC</b>	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i>
<b>GEF</b>	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
<b>GRASP</b>	<i>Golgi reassembly and stacking protein</i>
<b>Grh</b>	<i>GRASP65 homologue protein</i>
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferasen
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b><i>H. sapiens</i></b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>HEPES</b>	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethan-Sulfon-Säure
<b>His<sub>6x</sub></b>	Sechsfach-Histidin-tag
<b>IPTG</b>	Isopropylthiogalactosid
<b>ITC</b>	<i>Isothermal titration calorimetry</i>
<b>k</b>	Kilo
<b>K</b>	Kelvin
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria-Bertani Medium
<b>LIC</b>	<i>Ligation independent cloning</i>
<b>MAD</b>	<i>Multiple wavelength anomalous diffraction</i>
<b>MDC</b>	Max-Delbrück-Centrum
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MW</b>	<i>Molecular Weight</i>
<b>MWCO</b>	<i>Molecular Weight Cutoff</i>
<b>NatC</b>	N-Acetyltransferase
<b>NSF</b>	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
<b>OD<sub>600</sub></b>	Optische Dichte bei 600 nm
<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Base</i>

<b>PDZ</b>	<i>Post synaptic density protein (PSD-95/SAP90), discs-large (Dlg) und zonula occludens 1 (ZO-1)</i>
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b><i>R. norvegicus</i></b>	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>Rab</b>	<i>Ras-related in brain</i>
<b>Ras</b>	<i>Rat sarcoma</i>
<b>RFP</b>	<i>Red fluorescence protein</i>
<b>r.m.s.d.</b>	<i>Root mean square deviation</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SAD</b>	<i>Single wavelength anomalous diffraction</i>
<b>SB</b>	<i>Superior Broth</i>
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>SLS</b>	Statische Lichtstreuung
<b>SNAP</b>	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein</i>
<b>SNARE</b>	<i>SNAP receptor</i>
<b>SPR</b>	Serin-, prolinreiche Region
<b>TAE-Puffer</b>	Tris(hydroxymethyl)aminoethan-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TB-Medium</b>	<i>Terrific Broth</i> Medium
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>tER</b>	<i>Transitional ER</i>
<b>TGN</b>	<i>Trans-Golgi</i> Netzwerk
<b>TRAPP</b>	<i>Transport protein particle</i>
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>VTC</b>	<i>Vesicular-tubular cluster</i>
<b>β-ME</b>	β-Mercaptoethanol

## **B. Danksagung**

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mir während der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben, sei es durch die Bereitstellung und Hilfe bei der Ausarbeitung des Themas, intensive Diskussionen über den Fortgang des Projekts, Bereitstellung von Geräten, Berechnungen von Modellen, hilfreichen Tipps für den Laboralltag oder einfach nur ein offenes Ohr, wenn wieder einmal alles schief ging.

Vielen lieben Dank an:

Udo Heinemann

Anup Arumughan, Sofia Banchenko, BESSY, Sarbani Bhattacharya, Kerstin Böhm, David Miles Carter, Birgit Cloos, Oliver Daumke & Gruppe, Gunnar Dittmar, Tracy Dornblut, Katja Fälber, Anette Feske, Ulrich Gohlke, Doris Haas, Jennifer Hanna, Marcel Jurk, Andreas Knespel, Bettina König, Gerd Krause, Silke Kurths, Ulf Lenski, Klaas Max, Florian Mayr, Jürgen-Joachim Müller, Uwe Müller, Heide Peters, Jonas Protze, Yvette Roske, Anja Schütz, SFB740, Harald Striegl, Janett Tischer, Chencheng Wang, Manfred Weiss, Sükran Zaralioglu, Franziska Zimmermann.

## **C. Lebenslauf**

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