

6 Summary / Zusammenfassung

The objective of my PhD project was to elucidate aspects of the molecular mechanism underlying the tethering event in vesicular transport mediated by the TRAPP (transport protein particle) complex. TRAPP is a highly conserved tethering complex that had been described to be essential for the proper trafficking from the ER to the Golgi in both yeast and mammalian cells. TRAPP possesses GEF activity for GTPases of the Rab class and is expected to function in the tethering process prior to membrane fusion. The crystal structures of two TRAPP subunits, Sedl and Bet3, had previously been determined. The structure of Sedl resembles the regulatory domain of some SNARE proteins and was suggested to be involved in SNARE assembly. Bet3 forms dimers and has a hydrophobic tunnel in its interior which is postulated to bind to an acyl chain of a Golgi receptor and thus to mediate membrane anchoring of TRAPP.

The structure determination of the TRAPP subunit Tpc6B revealed the same fold as observed for Bet3 and that both proteins dimerize in a similar manner, suggesting a possible heterodimerization of both proteins. This could be shown with association studies and a model for a putative TRAPP subcomplex was suggested, with Tpc6B and Bet3 utilizing their closely similar dimer interfaces. Considering the high structural similarity between Tpc6B and Bet3 it was presumed that the α/β -plait fold might represent the common fold for all paralogous Bet3 family members, including Tpc5. The sequence alignment and circular dichroism spectroscopy of all three proteins strongly supported that idea.

In the following the crystallization of the heterocomplex of Bet3 and Tpc6B could be accomplished. The structure of the Bet3:Tpc6B complex closely resembles the model proposed before. The only prominent structural rearrangement is seen in the $\alpha 1$ - $\alpha 2$ loop of Tpc6B which leads to the formation of a groove in the heterocomplex that might represent an interaction interface for a binding partner. Binding studies identified the interaction of Mum2 and synbindin to the Bet3:Tpc6B heterodimer, which led to the reconstitution of a tetrameric TRAPP subcomplex that was crystallizable.

Furthermore, two Tpc6 paralogs that both can form stable heterodimeric complexes with Bet3 but exist only in higher eukaryotes were characterized. Both isocomplexes are able to bind to Mum2 and synbindin and should thus both be able to participate in TRAPP complex formation. The investigation of six different mouse organs revealed that *tpc6b* expression levels are somewhat higher compared to *tpc6a*, but no tissue specificity in the *tpc6* paralog expression

pattern could be observed, indicating that both isoforms coexist. This could mean that in higher eukaryotes the TRAPP subunit isoforms might assemble into distinct TRAPP complexes that could differ in their cellular localization or function. On the other hand, two variants of the same protein might help to secure such an essential process as vesicle transport or one isoform might have a specialized function different from classical TRAPP function in the secretory pathway. Interestingly, a surface patch is conserved in all Tpc6 paralogs and orthologs, located at the putative membrane associated face of Tpc6. This patch might be involved in recruitment of TRAPP to the Golgi membrane *via* the interaction with an anchoring protein.

The most unusual feature of the TRAPP subunit Bet3 is its palmitoylation at a conserved cysteine residue. The fatty acid is located in the hydrophobic tunnel of Bet3 in the crystal structures but is not required for membrane association of the protein. However, palmitoylation of Bet3 has been shown to naturally occur inside mammalian and yeast cells. *In vitro* studies of the enzymology of the palmitoylation revealed an autocatalytic mechanism of the reaction that has an optimum at physiological pH and requires proper folding of Bet3 and a Pal-CoA concentration that corresponds to the intracellular concentration. The palmitoylation site of Bet3 is strictly conserved arguing that the self-palmitoylating activity observed is likely to be of physiological significance. It could be shown that the palmitoylation of Bet3 has a beneficial effect on protein stability. This is manifested in a reduced melting temperature of deacylated Bet3 *in vitro* and the more rapid degradation of unpalmitoylated Bet3 mutants *in vivo*. As a consequence, unpalmitoylated Bet3 mutants fail to bind Tpc6B *in vivo*.

Taken together, these data point towards a more diverse role of TRAPP and its subunits in mammalian cells than expected before.

Die Zielsetzung dieser Doktorarbeit war die detaillierte Beschreibung verschiedener Aspekte des Anheftungsprozesses im vesikulären Transport, die durch den TRAPP (Transport Protein Partikel) Komplex ausgeführt werden. TRAPP ist ein hochkonservierter Anheftungskomplex, der essentiell für den Transport von Vesikeln vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgi Apparat in Hefe- und auch Säugerzellen ist. TRAPP besitzt Nukleotidaustauschaktivität für GTPasen der Rab Klasse und wirkt im Anheftungsprozess vor der Membranfusion. Die Kristallstrukturanalyse zweier TRAPP-Untereinheiten, Sedl and Bet3, wurden bereits bestimmt. Sedl ähnelt in seiner Struktur der regulatorischen Domäne einiger SNARE Proteine und wird deshalb mit der Regulation der Zusammensetzung des SNARE Komplexes in Verbindung gebracht. Bet3 bildet Dimere und besitzt einen hydrophoben Tunnel in seinem Inneren, von dem postuliert wurde, dass er die Acylgruppe eines Golgi Rezeptors bindet und so die Membranbindung von TRAPP vermittelt.

Die Strukturaufklärung der TRAPP-Untereinheit Tpc6B zeigte den gleichen Faltungstyp, der auch bei Bet3 beobachtet wurde. Außerdem dimerisieren beide Proteine auf ähnliche Weise, was eine Heterodimerisierung von Bet3 and Tpc6B nahe legte. Dies konnte mit Assoziationsstudien bewiesen werden, was zur Entwicklung eines Modells für einen möglichen TRAPP Subkomplex führte, bei dem Tpc6B und Bet3 ihre ähnlichen Dimerisierungsoberflächen nutzen. Angesichts der hohen strukturellen Ähnlichkeit von Tpc6B and Bet3 wurde vermutet, dass dieser Faltungstyp bei allen Vertretern der Bet3 Proteinfamilie zu finden ist, die auch Tpc5 mit einschließt. Sequenzvergleiche und Untersuchungen mit Zirkulardichroismus unterstützen dieses Konzept.

Im Folgenden wurde die Kristallisation des Heterokomplexes aus Bet3 und Tpc6B erreicht. Die Struktur des Bet3:Tpc6B Komplexes ähnelt stark dem zuvor vorgeschlagenen Modell. Die einzige auffällige strukturelle Veränderung ereignet sich in der $\alpha 1$ - $\alpha 2$ Schleife of Tpc6B, wodurch der Heterokomplex eine Mulde bildet, die eine Interaktionsfläche für einen Bindungspartner darstellen könnte. Bindungsstudien zeigten die Assoziation von Mum2 und Synbindin an das Bet3:Tpc6B Heterodimer, was zu der Rekonstitution eines tetrameren TRAPP Subkomplexes führte, der auch kristallisiert werden konnte.

Darüber hinaus wurden zwei Tpc6-Paraloga charakterisiert, die nur in höheren Eukaryoten vorkommen und beide stabile Heterodimer-Komplexe mit Bet3 bilden können. Beide Isokomplexe können Mum2 und Synbindin binden und sollten daher auch an der Entstehung des gesamten TRAPP Komplexes beteiligt sein. Die Untersuchung von sechs verschiedenen Mausorganen zeigte dass die Expressionsstärke von *tpc6b* etwas höher ist als die von *tpc6a*,

aber es wurde keine gewebsspezifische Expressionsverteilung der *tpc6* Paraloge beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass die Isoformen der TRAPP-Untereinheiten in höheren Organismen an der Formierung unterschiedlicher TRAPP Komplexe beteiligt sind, die sich in ihren Funktion oder zellulären Lokalisation unterscheiden. Andererseits könnten zwei Proteinvarianten auch den essentiellen Vesikeltransportprozess absichern oder eine Isoform könnte eine spezialisierte Funktion außerhalb des TRAPP-Komplexes erfüllen. Interessanterweise ist ein Oberflächenbereich bei allen Tpc6 Paralogen und Orthologen konserviert, der sich an der voraussichtlich membranzugewandten Seite von Tpc6 befindet. Dieser Bereich könnte über die Interaktion mit einem Ankerprotein an der Rekrutierung von TRAPP an die Golgimembran beteiligt sein.

Das ungewöhnlichste Merkmal der TRAPP-Untereinheit Bet3 ist dessen Palmitoylierung an einer konservierten Cysteinseitenkette. Die Fettsäure befindet sich in den Kristallstrukturen in einem hydrophoben Tunnel von Bet3 und wird nicht für die Membranverankerung des Proteins benötigt. Trotzdem findet die Palmitoylierung von Bet3 unter physiologischen Bedingungen in Hefe- und Säugerzellen statt. *In vitro* Studien zur Enzymologie der Palmitoylierung zeigten einen autokatalytischen Mechanismus der Reaktion, der ein Optimum bei physiologischen pH besitzt und die korrekte Faltung des Proteins sowie eine Pal-CoA Konzentration im intrazellulären Bereich benötigt. Dass die Palmitoylierungsstelle von Bet3 strikt konserviert ist deutet auf die physiologische Signifikanz der Modifikation hin. Tatsächlich unterstützt die Palmitoylierung von Bet3 die Stabilität des Proteins. Dies zeigt sich in einer reduzierten Schmelztemperatur von deacyliertem Bet3 *in vitro* und der beschleunigten Degradation von nicht-palmitoylierten Bet3-Mutanten *in vivo*. Als Folge davon können die nicht-palmitoylierten Bet3-Mutaten Tpc6B *in vivo* nicht mehr binden.

Aus all diesen Daten lässt sich schließen, dass die Funktionsweise des TRAPP-Komplexes und seiner Untereinheiten vielfältiger ist als bisher angenommen.