

Fachbereich Biologie/Chemie  
Abteilung für Biochemie

**Protein-Protein-Wechselwirkungen**  
**bei der AP-3-Vesikelbildung und –fusion**  
**und**  
**der Protonenleitung durch die ATP-Synthase**

**Dissertation zur Erlangung des Grades**

**Doktor der Naturwissenschaften**  
**(Dr. rer. nat.)**

eingereicht am Fachbereich Biologie/Chemie der

**Universität Osnabrück**

von

**Lars Langemeyer**

Osnabrück, im Mai 2010

---

---

Hauptberichterstatter: apl. Prof. Dr. Siegfried Engelbrecht-Vandré

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Ungermann

---



---

## **I. Verzeichnisse**

### **I.1 Inhaltsverzeichnis**

<b>I. Verzeichnisse .....</b>	<b>5</b>
I.1 Inhaltsverzeichnis .....	5
I.2 Abbildungsverzeichnis.....	10
I.3 Tabellenverzeichnis .....	13
I.4 Abkürzungen .....	14
<b>II. Vorwort .....</b>	<b>17</b>
<b>III. Zusammenfassung .....</b>	<b>18</b>
<b>IV. Summary .....</b>	<b>20</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>23</b>
1.1 Aufbau eukaryotischer Zellen.....	23
1.2 Transport von neu synthetisierten Proteinen zum Zielorganell .....	23
1.2.1 Vesikulärer Transport.....	25
1.3 Prozesse an der Donormembran .....	27
1.3.1 Initiation der Vesikelbildung durch GTPasen .....	27
1.3.2 Entstehung der Vesikel an einer Membran durch Hüllproteine .....	28
1.3.3 Abschnüren der Vesikel .....	29
1.4 Prozesse an der Akzeptormembran.....	30
1.4.1 <i>Tethering</i> der Vesikel an das Zielorganell.....	30
1.4.2 <i>Docking</i> und Fusion der Vesikel mit dem Zielorganell .....	31
1.5 Biosynthetische Transportwege vom Golgi zur Vakuole in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	33
1.5.1 Die GTPase Arf1 rekrutiert den AP-3 Komplex an die Membran des Golgi .....	34
1.5.2 Adaptorprotein-Komplex 3.....	35
1.5.3 Sortierungssignale .....	37
1.5.4 Abschnüren der Vesikel .....	37
1.5.5 <i>Tethering</i> und Andocken der AP-3 Vesikel an die Vakuole .....	38
1.5.6 Das Ypt7-Effektorprotein Vps41 .....	39
1.5.7 Fusion der AP-3 Vesikel mit der Vakuole .....	39

---

<b>2. Aufgabenstellung</b> .....	<b>41</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
3.1 Das Reporterprotein GFP-Nyv1-Snc1(Transmembrandomäne) .....	42
3.2 N-terminale Verkürzungen von Vps41 zeigen einen Defekt im ALP-Weg 44	
3.3 Die PEST-Deletion zeigt keine Auswirkung auf andere Funktionen von Vps41	
.....	45
3.3.1 Der CPY-Weg in Zellen des Vps41 $\Delta$ PEST Stammes ist nicht beeinflusst45	
3.3.2 Zusammensetzung und Lokalisation des HOPS-Komplexes im VPS41 $\Delta$ PEST	
Stamm .....	47
3.4 Phosphorylierungsstatus ist nicht Grund für den Vps41 $\Delta$ PEST Phänotyp . 50	
3.4.1 Lokalisation von Vps41-GFP ist aufgrund der Deletion der PEST-Domäne	
verändert.....	50
3.4.2 Überproduktion der GTPase Ypt7 erhöht den vakuolären Anteil von	
Vps41 $\Delta$ PEST .....	52
3.4.3 Fehlsortierung der Caseinkinase 3 in Vps41 $\Delta$ PEST .....	52
3.4.4 Eine Phosphorylierung von Vps41 $\Delta$ PEST ist nicht nachweisbar .....	53
3.4.5 Mutationen in den Phosphorylierungsstellen von Vps41 haben keinen Effekt auf	
den Vps41 $\Delta$ PEST Phänotyp .....	55
3.4.6 Mutationen der Phosphorylierungsstellen im Vps41 haben keinen Einfluss auf	
die Interaktion mit Apl5 .....	56
3.5 Auswirkung der PEST-Deletion auf den AP-3 Komplex .....	57
3.5.1 Die Lokalisation von Apl5 ist im Vps41 $\Delta$ PEST Stamm verändert .....	57
3.5.2 Die PEST-Domäne wird für Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41	
benötigt.....	58
3.5.3 Vps41 interagiert über ein Di-Leucin-Sortierungssignal mit Apl5.....	60
3.5.4 Die gesamte Vps41-PEST-Domäne ist notwendig für die Interaktion mit Apl5	
<i>in vitro</i> .....	62
3.6 Membranbindung von Vps41 .....	64
3.6.1 Vps41 Bindung an kleine Liposomen ist nicht beeinträchtigt in Vps41 $\Delta$ PEST	
.....	64
3.6.2 Kompetitive Bindung zwischen Apl5 und Liposomen an Vps41 .....	65
3.7 Rettung des Phänotyps der PEST-Deletion.....	66

---

3.7.1 Keine Suppression des Defekts im ALP-Weg durch Vps41-Vps39-Fusion	66
3.7.2 Keine Rettung der Apl5-Lokalisation durch die Fusion von Vps41 mit Vps39	
.....	67
3.8 AP-3 Überproduktion	70
3.8.1 Lokalisation von Vps41 in Gal-AP3 Stämmen	71
3.8.2 Co-Immunopräzipitation des AP-3 Komplex durch Vps41	72
3.8.3 Aufreinigung des AP-3 Komplex	74
3.8.4 Co-Immunopräzipitation mit dem AP-3 Komplex	78
3.8.5 Funktionalität des überproduzierten AP-3-Komplexes	79
3.8.6 Rettung der Vakuolenmorphologie in Gal-AP3 durch Vps41-Überproduktion	
.....	80
3.8.7 Subzelluläre Lokalisation des überproduzierten AP-3 Komplexes	81
3.8.8 Vakuolenmorphologie und Funktionalität des ALP-Weges in Gal-HA-AP3 Stämmen	82
3.8.9 Funktionalität des ALP-Weges bei Überproduktion der AP-3 Untereinheiten	
.....	83
<b>4. Diskussion</b>	<b>86</b>
4.1 Modelle zur Funktion von Vps41 im ALP-Weg	86
4.2 Effekte der PEST-Deletion beeinträchtigen nur den ALP-Weg	89
4.2.1 PEST-Deletion zeigt keinen Einfluss auf CPY-Weg	89
4.2.2 Funktion des HOPS-Komplex mit Vps41 $\Delta$ PEST ist nicht beeinflusst	89
4.3 Einfluss der Phosphorylierung von Vps41 auf seine Funktion	92
4.4 Verlust der Interaktion von Apl5 und Vps41 führt zu Defekt im ALP-Weg	93
4.5 Auswirkungen der Überproduktion des AP-3 Komplexes	102
4.6 Affinitätsaufreinigung des AP-3-Komplexes	103
<b>5. Ausblick</b>	<b>107</b>
<b>6. Material und Methoden</b>	<b>109</b>
6.1 Medien	109
6.1.1 Vollmedien	109
6.1.2 Synthetische Medien	109
6.1.3 Verwendete Antibiotika	110
6.2 Verwendete Stämme und Vektoren	110

---

6.2.1 <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	110
6.2.2 <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta.....	110
6.3 Hefestämme .....	111
6.4 Zellanzucht .....	111
6.5 Stammkulturen.....	111
6.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....	111
6.6.1 Plasmid-Isolierung .....	111
6.6.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgrades .....	112
6.6.3 Transformation mit Plasmid-DNA.....	112
6.6.4 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	112
6.6.5 Standard-PCR zur Amplifizierung von Teilen genomischer DNA .....	113
6.6.6 Mutagenese durch PCR.....	114
6.6.7 <i>Dpn</i> I -Verdau .....	115
6.6.8 Sequenzierung von Plasmiden.....	116
6.6.9 Knop-PCR .....	116
6.6.10 Restriktionsschnitte von Plasmid-DNA .....	118
6.6.10.1 Analytische Schnitte.....	118
6.6.10.2 Präparative Schnitte.....	118
6.6.12 Agarose-Gelelektrophorese .....	119
6.6.13 Ligation.....	119
6.6.14 Transformation von DNA aus PCR- und Ligationsreaktionen in <i>E. coli</i> .....	120
6.6.15 Transformation von Plasmiden oder PCR-Fragmenten in <i>S. cerevisiae</i> .....	120
6.6.16 Hefe-2-Hybrid Untersuchungen.....	121
6.7 Biochemische Arbeitsmethoden .....	122
6.7.1 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	122
6.7.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	122
6.7.2.1 SDS-Gelelektrophorese .....	122
6.7.2.2 Western Blot .....	123
6.7.3 Affinitätsaufreinigung heterolog exprimierter Proteine aus <i>E. coli</i> .....	123
6.7.4 Ganzzellhomogenisate von <i>S. cerevisiae</i> .....	124
6.7.5 GST-Interaktionsstudien mit <i>Apl-ear</i> -Domänen .....	124

---

6.7.6 Tandem-Affinity-Purification.....	125
6.7.8 Mini-TAP.....	127
6.7.9 (Co-) Immunopräzipitation von GFP-Fusionsproteinen .....	127
6.7.10 Subzelluläre Fraktionierung von Hefezellen .....	127
6.7.11 Untersuchung des Vps41-Phosphorylierungsstatus .....	128
6.7.12 CPY-Sekretionstest .....	128
6.7.13 Liposomen-Herstellung .....	129
6.7.14 Liposomen-Flotationstest .....	129
6.8 Mikroskopie.....	130
6.8.1 FM4-64-Färbung der Vakuole .....	130
<b>7. Literaturverzeichnis I .....</b>	<b>131</b>
<b>8. Einleitung .....</b>	<b>139</b>
8.1 Substratkettenphosphorylierung und oxidative Phosphorylierung .....	139
8.2 Der chemiosmotische Mechanismus.....	140
8.3 Die Struktur von $EF_0EF_1$ .....	142
8.4 Funktionsweise von $EF_0EF_1$ .....	144
8.4.1 Funktion des $F_0$ -Komplexes .....	146
<b>9. Aufgabenstellung.....</b>	<b>149</b>
<b>10. Veröffentlichung (BBA 1767 (2007) p. 998-1005) .....</b>	<b>150</b>
<b>11. Literaturverzeichnis II.....</b>	<b>158</b>
<b>12. Anhang.....</b>	<b>167</b>
12.1 Verwendete Hefestämme.....	167
12.2 Eidesstattliche Erklärung .....	171

---

## I.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Biosynthetischen Transportwege in eukaryotischen Zellen .....	24
Abb. 1.2: Schematischer Ablauf der Vesikelbildung und –fusion .....	26
Abb. 1.3: Der GTPase Zyklus .....	27
Abb. 1.4: Übersicht der Lokalisation verschiedener Hüllproteine in <i>S. cerevisiae</i> .....	28
Abb. 1.5: Mechanochemisches Modell zur Funktionsweise der GTPase Dynamin.....	29
Abb. 1.6: Lokalisation von <i>Tethering</i> -Faktoren in <i>S. cerevisiae</i> .....	30
Abb. 1.7: Modell für die Struktur von <i>Tethering</i> -Komplexen .....	31
Abb. 1.8: Funktion von SNARE Proteinen .....	32
Abb. 1.9: Biosynthetische Transportwege vom Golgi-Apparat zur Vakuole .....	33
Abb. 1.10: Membranrekrutierung des Adaptorprotein-Komplex 3 .....	34
Abb. 1.11: Schematische Darstellung des Aufbaus der Adaptorprotein-Komplexe .....	36
Abb. 1.12: Schematische Darstellung des HOPS- <i>Tethering</i> Komplexes .....	38
Abb. 3.1: Das Reporterprotein GFP-Nyv1-Snc1TMD .....	43
Abb. 3.2: Funktionalität des ALP-Weges hängt von der PEST-Domäne im Vps41 ab ..	45
Abb. 3.3: CPY-Weg ist durch PEST-Deletion nicht beeinflusst.....	46
Abb. 3.4: Der Stamm Vps41 $\Delta$ PEST sezerniert kein CPY .....	47
Abb. 3.5: Lokalisation der HOPS-Untereinheit GFP-Vps39 .....	48
Abb. 3.6: Co-Immunopräzipitation des HOPS-Komplexes aus Vps41-TAP-Stämmen.	49
Abb. 3.7: Interaktion zwischen Ypt7 und Vps41 ist in der $\Delta$ PEST Mutante beeinflusst	50
Abb. 3.8: Lokalisation von Vps41-GFP wird durch PEST-Deletion cytosolisch .....	51
Abb. 3.9: Relokalisation von Vps41 $\Delta$ PEST an die Vakuole nach Ypt7-Überproduktion .....	52
Abb. 3.10: GFP-Yck3 wird in Vps41 $\Delta$ PEST fehlsortiert .....	53
Abb. 3.11: Nachweis der Phosphorylierung von Vps41 .....	54
Abb. 3.12: Phosphorylierung von Vps41 durch Inkubation mit Wildtyp-Vakuolen.....	55
Abb. 3.13: Mutationen in den Phosphorylierungsstellen von Vps41 $\Delta$ PEST .....	56
Abb. 3.14: Vps41 bindet <i>in vitro</i> unabhängig von der Phosphorylierung an Apl5 .....	57
Abb. 3.15: Lokalisation von Apl5-GFP in Vps41-Wildtyp und - $\Delta$ PEST .....	58
Abb. 3.16: Hefe-2-Hybrid-Untersuchung zur Vps41-Apl5-Wechselwirkung .....	59
Abb. 3.17: Co-Immunopräzipitation zeigt Notwendigkeit der PEST-Domäne .....	59

---

Abb 3.18: Der minimale Bereich in Vps41 für die Wechselwirkung mit Apl5 sind die Aminosäuren 95-102.....	61
Abb. 3.19: Mutation der Leucine in der Sortierungssignal-ähnlichen Sequenz.....	62
Abb 3.20: Nur Vps41-Wildtyp interagiert mit GST-Apl5- <i>ear in vitro</i> .....	63
Abb. 3.21: Krümmungsabhängige Bindung von Vps41 an Liposomen .....	64
Abb. 3.22: Inhibition der Bindung von Vps41 an Liposomen durch Apl5 .....	66
Abb 3.23: Funktionalität des ALP-Wegs in Stämmen mit Vps41-Vps39-Fusionsprotein .....	67
Abb 3.24: Lokalisation von Apl5-GFP in Stämmen mit Vps41-Vps39-Fusionsproteinen .....	68
Abb. 3.25: Übersicht über die hergestellten AP-3-Überproduktionsstämme.....	71
Abb. 3.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Vps41 Stämmen .....	72
Abb. 3.27: Co-Immunopräzipitation mit Vps41-TAP .....	74
Abb. 3.28: Aufreinigung des AP-3 Komplex durch Co-Immunopräzipitation.....	77
Abb. 3.29: Co-Immunopräzipitation des AP-3 Komplex und massenspektrometrische Analyse.....	79
Abb. 3.30: Vakuolenmorphologie und Funktionalität des ALP-Weges in Gal-AP3 (Apl5-TAP) und Gal-AP3 (Apl5-TAP) Gal-Vps41.....	80
Abb. 3.31: Subzelluläre Fraktionierung des Gal-AP 3 Stammes .....	82
Abb. 3.32: Vakuolenmorphologie und Funktionalität des ALP-Weges .....	83
Abb. 3.33: Vakuolenmorphologie und Funktionalität des ALP-Weges .....	85
Abb. 4.1: Modelle zur Funktion von Vps41 im ALP-Weg.....	87
Abb. 4.2: Konservierung der PEST-Domäne in Vps41 .....	88
Abb. 4.3: Modell zur Rolle von Vps41 in der Destabilisierung der Vesikelhülle.....	96
Abb. 4.4: Membranrekrutierung ändert die Konformation des AP-3 Komplexes .....	97
Abb. 4.5: Das identifizierte Bindemotiv für Apl5 in Vps41 ist konserviert .....	98
Abb. 4.6: Binde- und Interaktionsstellen im N-terminalen Bereich von Vps41 .....	99
Abb. 4.7: Modell zur Funktion von Vps41 .....	101
Abb. 8.2: Modell zur chemiosmotischen Theorie .....	141
Abb. 8.3: Strukturmodell der F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-Synthase aus <i>E. coli</i> .....	144
Abb. 8.4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung der Rotation mit EF <sub>0</sub> F <sub>1</sub> .....	146

---

---

Abb. 8.5: Struktur des $F_0$ -Komplexes .....	147
Abb. 8.6: Funktion der Aminosäure $a_{R210}$ zur Gleichrichtung der Rotation des c-Ringes .....	148



---

### **I.3 Tabellenverzeichnis**

Tab. 6.1: Verwendete Antibiotika.....	110
Tab. 6.2: PCR-Cycler Programm für Standard-PCR.....	113
Tab. 6.3: Pipettierschema für Standard-PCR .....	113
Tab. 6.4: PCR-Cycler Programm für Mutagenese-PCR .....	114
Tab. 6.5: Pipettierschema für Mutagenese-PCR .....	115
Tab. 6.6: Zur Einführung von Mutationen genutzte Primer.....	115
Tab. 6.7: PCR-Cycler Programm für Knop-PCR.....	117
Tab. 6.8: Pipettierschema für Mutagenese-PCR .....	117
Tab. 6.9: Pipettierschema Analytischer Restriktionsschnitt.....	118
Tab. 6.10: Pipettierschema präparativer Restriktionsschnitt.....	119
Tab. 6.11: Pipettierschema für Ligationsansätze und Blindproben .....	120

---

## I.4 Abkürzungen

(v/v)	Volumenanteil
(w/v)	Gewichtsanteil
4-AB	4-Aminobenzamidin
ACMA	9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin
6-AHA	6-Aminohexansäure
Å	Angström
A <sub>xxx</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von xxx nm
ADP	Adenosindiphosphat
ALP	Alkalische Phosphatase (Pho8)
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin (Bovine serum albumin)
CPY	Carboxypeptidase Y
ddNTP	Didesoxynukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynukleotide
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EF <sub>1</sub>	Hydrophiler, katalytisch aktiver Teilkomplex der ATP-Synthase von <i>E.coli</i>
EF <sub>0</sub>	In die Membran integrierter, hydrophober Teilkomplex der ATP-Synthase von <i>E. coli</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	bidestilliertes Wasser

---

kDa	Kilodalton
LB-Medium	Medium nach Luria-Bertani
M	Konzentration in Mol pro Liter
MeOH	Methanol
MW	Molmasse (molecular weight)
NADH	$\beta$ -Nicotinamid-Adenindinucleotid
n.d.	Nicht bestimmt ( <i>not determined</i> )
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat (inorganic phosphate)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
t <sub>D</sub>	Verdopplungszeit
TMD	Transmembrandomäne
TMH	Transmembranhelix
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Einheit enzymatischer Aktivität (units)
Upm	Umdrehungen pro Minute

---

---

## **II. Vorwort**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit zwei sehr unterschiedlichen Themengebieten der Biologie.

Der erste Teil ist der Protonentranslokation durch den  $F_o$ -Teil der ATP-Synthase aus dem Prokaryoten *Escherichia coli* gewidmet. Diese Arbeiten wurden im Zeitraum vom Januar 2006 bis Mai 2007 in der Abteilung Biophysik durchgeführt, sie bauen auf den Ergebnissen meiner Diplomarbeit (Langemeyer, 2005) auf und wurden mit einer Veröffentlichung (Langemeyer und Engelbrecht-Vandré, 2007) abgeschlossen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der ALP-Transportweg im eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Dieser Teil der Arbeit wurde in der Abteilung Biochemie vom Mai 2007 bis Mai 2010 durchgeführt. Er resultierte in bisher einer Veröffentlichung (Cabrera, Langemeyer *et al.*, eingereicht 2010).

Die Teilung der Arbeit in diese beiden weit auseinander liegenden Themen bot sich infolge der Auflösung der Biophysik nach dem Ausscheiden von Prof. Wolfgang Junge und dem dadurch bedingten Umzug in die neu eröffnete Abteilung Biochemie unter Prof. Christian Ungermann an. Den Einstieg in ein völlig neues Themengebiet betrachte ich auch hinsichtlich der Erweiterung meiner Kenntnisse und des Methodenrepertoires als durchaus wünschenswert.

Die vorgelegte Arbeit ist aufgrund dieser Umstände in zwei voneinander unabhängige Teile gegliedert.

---

### III. Zusammenfassung

Zu den Eigenschaften eukaryotischer Zellen gehört ihre Kompartimentierung, welche durch die Abtrennung verschiedener Reaktionsräume durch Lipiddoppelschichten erreicht wird. Verschiedene Vesikel-Transportwege verbinden diese Kompartimente miteinander, einer dieser Wege in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist der sogenannte ALP-Weg. Dieser gehört zu den biosynthetischen Wegen, über die neue Proteine an ihren Bestimmungsort gebracht werden, in diesem Falle die Vakuole. Ausgehend vom Golgi-Apparat werden die Vesikel dieses Weges mit Hilfe des Adaptorproteinkomplexes-3 (AP-3) gebildet. Ein weiteres Protein, das eine spezifische Funktion in diesem Weg übernimmt, ist Vps41. Ein aktuelles Modell beschreibt seine Funktion in der Aufnahme der Vesikel an der Vakuole. Es konnte gezeigt werden, dass Vps41 mit der sogenannten *ear*-Domäne von Apl5, einer Untereinheit des AP-3-Komplexes, interagiert.

In dieser Arbeit konnte ich nachweisen, dass die Interaktionsstelle im Vps41 innerhalb einer konservierten PEST-Domäne liegt. Eine Deletion dieser Domäne beeinflusste die Funktion des Proteins im ALP-Weg jedoch nicht die in der homotypischen Vakuolenfusion und im CPY-Weg. Eine weitere Eingrenzung des deletierten Bereiches zeigte, dass die PEST-Domäne eine Sequenz enthält, die einem Di-Leucin-Sortierungssignal ähnlich ist. Dieses konnte ich als minimal notwendigen Bereich für die Wechselwirkung mit der Apl5-*ear*-Domäne bestimmen. Meine Daten zeigen, dass dieser Bereich des Proteins notwendig ist für das *Docking* der AP-3-Vesikel an der Vakuole. Weiterhin konnte ich eine kompetitive Bindung von Liposomen und Apl5 an die N-terminale Hälfte von Vps41 zeigen. Zusammengefasst und mit aktuellen Veröffentlichungen in Zusammenhang gebracht, ergänzen meine Daten das Modell der Funktion von Vps41 in der Vesikelaufnahme an der Vakuole:

Vps41 wird durch die Rab-GTPase Ypt7, als deren Effektorprotein, an späte Endosomen gebunden. An dieser stark gekrümmten Membran taucht ein kürzlich identifiziertes ALPS (*amphipathic lipid packing sensor*)-Motiv im Vps41 in die Membran des Organells ein und zieht so den N-terminalen Bereich mit der Bindestelle für die AP-3-Vesikel an die Oberfläche des Organells wodurch eine verfrühte Fusion

---

der AP-3-Vesikel mit dem Endosom verhindert wird. Erst nach der Reifung zur Vakuole wird die PEST-Domäne für die Bindung an Apl5 verfügbar, da sich die Membrankrümmung ändert. Zusätzlich wird das ALPS-Motiv phosphoryliert, so dass dieses nicht mehr in die Membran eintauchen kann. Erst jetzt ist eine Interaktion zwischen Apl5 und Vps41 und damit eine Fusion der AP-3-Vesikel mit der Vakuole möglich.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Protonentranslokation durch den  $F_o$ -Teil der ATP-Synthase aus *Escherichia coli*. Durch Mutagenese wurden ATP-Synthasen hergestellt, in denen die beiden für den Protonentransport essentiellen Aminosäurereste D61 in der Untereinheit **c** und R210 in der Untereinheit **a** in der  $\alpha$ -Helix in der sie liegen, entweder einzeln oder beide zusammen, um je eine Helixwindung nach oben oder unten verschoben wurden. Dies führt zu einer Verlängerung bzw. Verkürzung der Protonenzu- und austrittskanäle. Durch die Untersuchung der Funktionalität dieser ATPasen auf sowohl aktives und passives Protonenpumpen, als auch ATP-Synthese konnte ich zeigen, daß die Position der beiden essentiellen Aminosäurereste  $c_{D61}$  und  $a_{R210}$  zueinander nicht entscheidend ist. Werden beide Reste in die gleiche Richtung verschoben, so daß ihre Position zueinander gleich bleibt, kommt es unabhängig von der Richtung immer zu einem kompletten Funktionsverlust. Weiterhin läßt sich aus meinen Daten folgern, daß die Position des Restes  $a_{R210}$  in der Mitte der Membran wichtig ist. Beim Verschieben des Restes auf die Position 206 (*a-up*) geht die gesamte Funktion des  $F_o$ -Teiles verloren, während das Verschieben auf die Position 214 (*a-down*) zu einem passiven Ausströmen der Protonen durch den  $F_o$ -Teil führt.

Die Position des Restes  $c_{D61}$  in der Membran ist flexibler. Obwohl die Repositionierung des Aspartats auf die Position 57 (*c-up*) jegliche Funktionalität des  $F_o$ -Teiles beeinträchtigt, ermöglicht ein Verschieben auf die Position 65 (*c-down*) aktives und passives Protonenpumpen, sowie die Synthese von ATP.

---

## **IV. Summary**

The organelles of the eukaryotic endomembrane system are connected through several vesicle transport pathways. One of these pathways is the ALP-pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which directs newly synthesized proteins from the Golgi-Apparatus to the vacuole, bypassing the endosome. At the Golgi the vesicles are formed by the activity of the adaptorprotein-complex-3 (AP-3), which consists of the subunits Apl5, Apl6, Apm3 and Aps3. In addition the protein Vps41, a subunit of the HOPS-tethering-complex, has a specific, but unclear function in this pathway. The recent model describes a function for Vps41 in the docking of AP-3-vesicles at the vacuole. It was shown, that Vps41 interacts with the so called ear-domain of Apl5.

I was able to show, that the region, which is necessary for the interaction with Apl5 is situated within a conserved PEST-domain in the N-terminal region of Vps41. Deletion of this domain causes a specific defect in the ALP-pathway, but not in homotypic vacuole fusion or the CPY-pathway. Further investigations showed, that the minimal region within the PEST-domain which is necessary for the described effect contains a dileucin-sorting-signal-like sequence. My results indicate that this motif is the minimal domain for interaction to Apl5 and plays a role in the docking of AP-3-vesicles at the vacuole. Furthermore I showed a competitive binding of Apl5-ear-domain and liposomes to the N-terminal part of Vps41. In summary my results add new details to the recent model of the Vps41function in the consumption of AP-3-vesicles at the vacuole:

Vps41 is recruited to endosomes through the interaction with the active Rab-GTPase Ypt7. At these highly curved membranes the N-terminal part of Vps41, including the binding-site for AP-3-vesicles, is bound via a recently described ALPS (amphipathic lipid packing sensor)-motif to the surface of the membrane. Under these conditions, the binding site for Apl5 is not available. This avoids the premature fusion of AP-3-vesicles to endosomes. At the vacuole the membrane-curvature changes and in addition the ALPS-motif gets phosphorylated. The N-terminal part of Vps41 is released from membranes, the binding site for Apl5 is exposed and the AP-3-vesicles are able to fuse with the vacuole.



---

The second part of my work concentrates on the function of the proton translocating  $F_o$ -part of the ATP-synthase of *Escherichia coli*. By site directed mutagenesis, the position of either one or both essential residues (R210 within subunit **a** and D61 within subunit **c**) is changed vertically within the membrane depth by one helical turn. I analyzed the mutant F-ATP-synthases for active and passive proton conduction and ATP-synthesis-activity.

The repositioning of the essential arginine to position 214 (a-down) leads to a short circuit of the passive proton-translocation through the  $F_o$ -part, all other functions are lost. All up-mutants are not functional, but the shift of aspartate to position 65 (c-down) leads to a mutant which is capable of active and passive proton-conduction and ATP-synthesis.

---

---

## **1. Einleitung**

### **1.1 Aufbau eukaryotischer Zellen**

Eukaryotische Zellen zeichnen sich unter anderem durch ihre Organellen aus, die verschiedene Reaktionsräume in der Zelle schaffen. Durch diese Kompartimentierung werden Stoffwechselprozesse räumlich voneinander getrennt. Die einzelnen Kompartimente sind von einer semipermeablen Membran umschlossen. Diese besteht ebenso wie die Plasmamembran aus einer Lipiddoppelschicht.

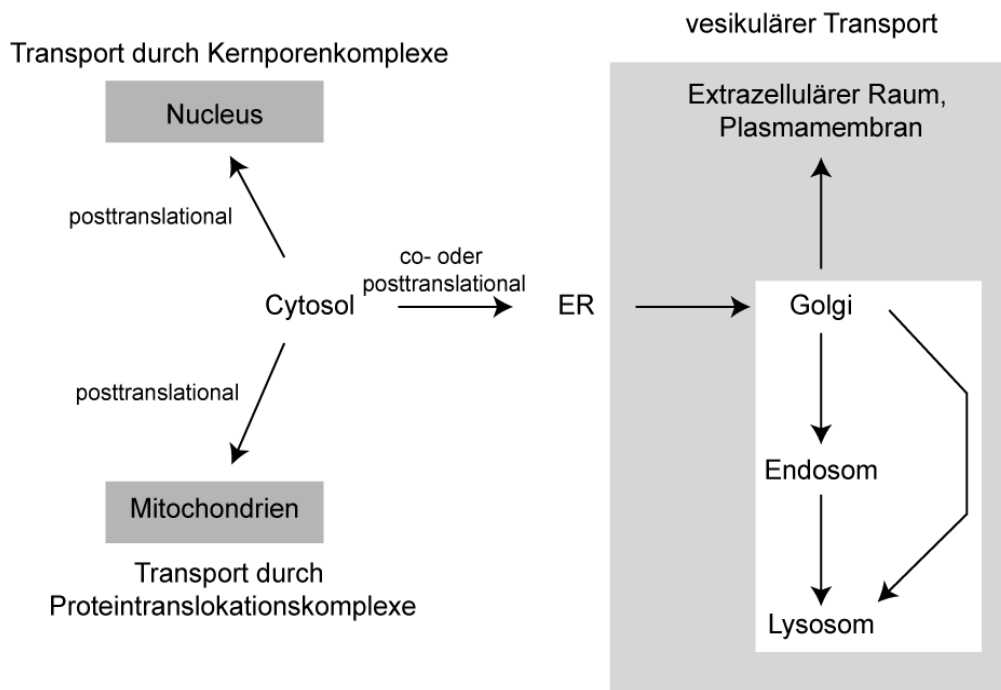
Zu den Organellen einer eukaryotischen Zelle gehören die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, sowie das Endosom und das Lysosom. Jede Art von Organell hat eine spezielle Funktion, ermöglicht durch einen exklusiven Satz an Proteinen: das Lysosom etwa mittels Proteasen, Lipasen und Phosphatasen.

Um Proteine zielgerichtet an ihren Bestimmungsort zu transportieren, gibt es in eukaryotischen Zellen eine spezielle Maschinerie aus Proteinen und Lipiden, die diesen Transport organisiert und koordiniert. Die Identität der Organellen wird durch bestimmte, ausschließlich auf diesen Organellen lokalisierte Proteine gewahrt. Diese Proteine oder Proteinkomplexe sind meist an der Aufnahme von Transportgut in das Zielorganell beteiligt. Der eigentliche Transport der Proteine erfolgt durch Vesikel, die ebenfalls von einer Lipiddoppelschicht umgeben sind. Sie gehen durch Knospung aus dem Donororganell hervor und verschmelzen später mit dem Akzeptororganell.

### **1.2 Transport von neu synthetisierten Proteinen zum Zielorganell**

Die Proteinbiosynthese eukaryotischer Zellen findet entweder an freien, cytosolischen oder an ER-gebundenen Ribosomen statt. Die Proteine enthalten, soweit sie nicht im Cytosol verbleiben sollen, eine Prosequenz, welche bestimmt, zu welchem Organell das Protein transportiert werden soll. Der Transport in die Mitochondrien oder den Zellkern findet immer posttranslational durch Proteintranslokationskomplexe bzw. Kernporenkomplexe statt. Nur das raue ER, mit seinen gebundenen Ribosomen

ermöglicht einen cotranslationalen Transport der entstehenden Polypeptidkette in das Lumen des ER bzw. in die ER-Membran. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, aber auch andere Pilze, bilden hier eine Ausnahme, da der Transport in das ER ebenfalls posttranslational erfolgen kann. Lösliche Proteine werden komplett in das Lumen des ER entlassen, Proteine mit Transmembrandomänen werden beim Transport in das ER in dessen Membran eingelagert. Bereits hier wird die spätere Topologie festgelegt, d.h. welcher Teil später am Zielorganell in das Cytoplasma ragen wird. Das Lumen des ER entspricht topologisch der Aussenseite der Zelle bzw. dem Lumen des Zielorganells. Außerdem werden im ER Proteine durch das Anhängen von Kohlenhydraten modifiziert.



**Abb. 1.1: Biosynthetischen Transportwege in eukaryotischen Zellen**

Im Cytosol synthetisierte Polypeptidketten werden in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und von dort aus durch den Transport mit Vesikeln bis zu ihrem Zielorganell gebracht.

Vom ER kommend werden korrekt gefaltete Proteine durch Vesikel zum Golgi-Apparat (kurz: Golgi) transportiert. Diesen kann man als die zentrale Verteilstation der Zelle betrachten. Bevor aber von hier der Weitertransport zu den Zielorganellen

---

stattfindet, werden die Proteine nach Bedarf prozessiert. Hierbei werden sie durch Verkürzungen, das Anhängen weiterer Kohlenhydratreste oder die proteolytische Spaltung von Polypeptidketten weiter modifiziert. Abhängig von bestimmten Aminosäuresequenzabschnitten der Proteine, den Sortierungssignalen, werden diese durch spezifische Transportwege an die verschiedenen Zielorte gebracht (Abb. 1.1). Hierzu zählen die Plasmamembran bzw. der extrazelluläre Raum, das Endosom und das Lysosom bzw. hiermit verwandte Organellen, wie die Vakuole in *S. cerevisiae*. Auf die Transportwege zum Endosom und zur Vakuole wird später genauer eingegangen. Die Transportwege „vorwärts“ (z.B. Golgi → Endosom) in diesem System werden unter dem Begriff des anterograden Transports zusammengefasst. Der Weg „rückwärts“ (z.B. Endosom → Golgi) wird als retrograder Transport bezeichnet. Hierbei werden Proteine, die entweder fehlsortiert wurden oder die eine Funktion im anterograden Transport haben, für die erneute Verwendung zurück zum Donororganell transportiert.

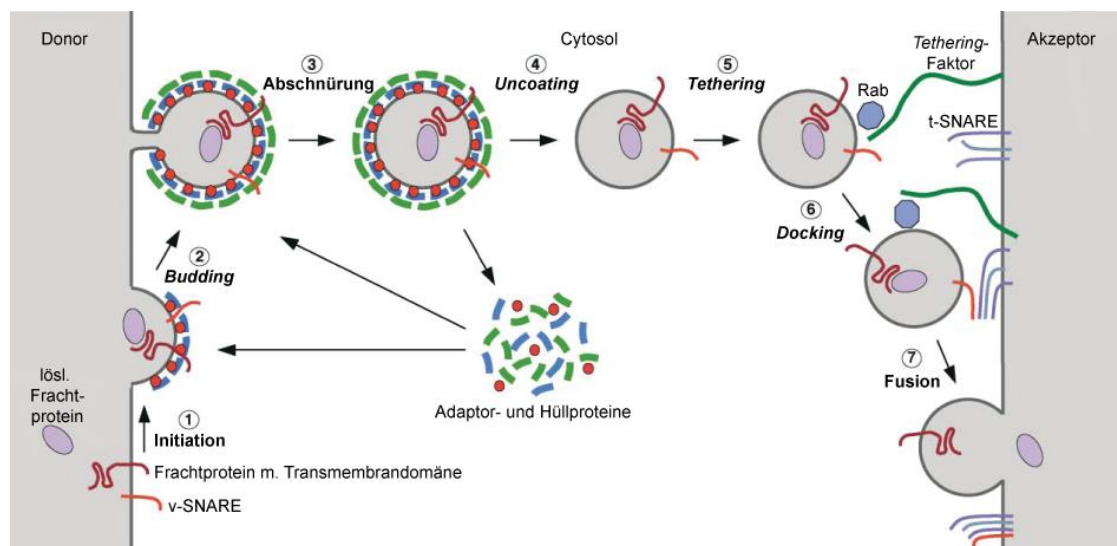
### **1.2.1 Vesikulärer Transport**

Im Allgemeinen bilden sich Vesikel (Abb. 1.2), indem Adaptorproteine (Kap. 1.3.2) durch Interaktion mit membranassoziierten GTPasen aus dem Cytosol an die Donormembran rekrutiert werden (**Initiation**). Diese Adaptoren reichern die zu transportierenden Proteine über deren Signal-Sortierungssequenzen (Kap. 1.5.3) an und induzieren eine Membrankrümmung (*Budding*). Zusammen mit zusätzlichen Proteinen, wie z.B. Clathrin, bilden sie eine netzartige Struktur, die sogenannte Hülle (*Coat*). Mit Hilfe dieser Hüllproteine und weiteren Proteinen werden die entstehenden Transportvesikel dann von der Donormembran abgeschnürt (**Abschnürung**). Die Vesikeln erreichen das Zielorganell und damit die Akzeptormembran entweder durch freie Diffusion oder unter Mitwirkung gerichteter Transportprozesse entlang des Cytoskeletts.

Bald nach der Abschnürung dissoziieren viele Hüllproteine durch die Inaktivierung der GTPase von der Vesikelmembran (*Uncoating*) und stehen als cytosolischer Pool erneut für die Bildung von Vesikeln zur Verfügung. Der Zeitpunkt für das *Uncoating*

kann, je nach Adaptor- bzw. Hüllprotein, direkt nach der Vesikelbildung oder erst beim Andocken der Vesikel an der Zielmembran erreicht sein.

In räumlicher Nähe zum Zielorganell findet eine lose Anbindung von Vesikeln an die Akzeptormembran statt (*Tethering*). Hierbei stellen sogenannte *Tethering*-Komplexe (Kap. 1.4.1), den ersten reversiblen Kontakt zwischen Vesikel und dem Zielorganell her. Nach dem *Tethering* der Vesikel lagern sich Proteine, die spezifisch auf beiden Membranen lokalisiert sind, aneinander an (*Docking*). Die Wechselwirkung der SNARE-Proteine (*soluble NSF [N-ethylmaleimide-sensitive factor] attachment protein receptors*) und die dadurch initiierte Annäherung der Membranen führt zum irreversiblen Verschmelzen der Lipiddoppelschichten und damit zur **Fusion** der Vesikel- und Akzeptormembran (Kap. 1.4.2). Neben dieser heterotypischen Fusion zwischen Vesikel- und Organellmembran, bei der beide Membranen eine unterschiedliche Proteinkomposition haben, gibt es noch die homotypische Fusion, bei der zwei gleiche Organellen, z.B. zwei Vakuolen mit gleicher Proteinkomposition, miteinander fusionieren.



**Abb. 1.2: Schematischer Ablauf der Vesikelbildung und -fusion**

Nach der Knospung der Vesikel an der Donormembran wandern sie durch Diffusion oder aktiven Transport zum Zielorganell. Dort werden sie in einem ersten Schritt von *Tethering*-Komplexen erkannt und fusionieren schließlich durch die Wechselwirkung von SNARE-Proteinen mit der Akzeptormembran. (verändert nach Bonifacino, 2004)

v-SNARE: vesikuläres SNARE; t-SNARE: SNARE auf Zielorganell (*target*-SNARE)

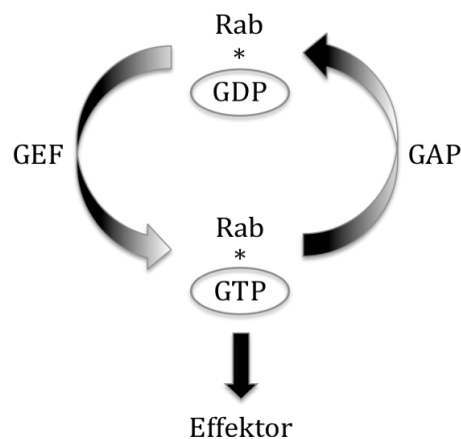
---

Im Weiteren soll anhand der Funktionsweise der beteiligten Proteine näher auf die Prozesse eingegangen werden, die der Vesikelbildung und der Fusion der Vesikel- mit der Akzeptormembran zu Grunde liegen.

### **1.3 Prozesse an der Donormembran**

#### **1.3.1 Initiation der Vesikelbildung durch GTPasen**

Hauptregulatoren der Vesikelbildung sind kleine GTPasen. Diese können in einer aktiven und einer inaktiven Konformation in der Zelle vorliegen (siehe Abb. 1.3). Die aktive Form ist immer mit GTP, die inaktive mit GDP beladen. Der Wechsel zwischen diesen beiden Zuständen wird durch zwei weitere Proteine vermittelt. Der Austausch von gebundenem GDP zu GTP erfolgt durch einen GTPase-spezifischen Guanin-Austauschfaktor (*GEF*, *guanine exchange factor*), die Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP wird durch ein spezifisches GTPase-aktivierendes Protein (*GAP*, *GTPase activating protein*) katalysiert. In der GTP- gebundenen Form wechselwirken GTPasen mit einem Effektorprotein, das GTPase-abhängig verschiedene zelluläre Prozesse steuert (B. Antonny *et al*, 2005). Im Falle der Vesikelbildung sind die kleinen GTPasen dafür notwendig, die Hüllproteine auf die Donormembran zu rekrutieren und dadurch die Vesikelknospung zu initiieren.



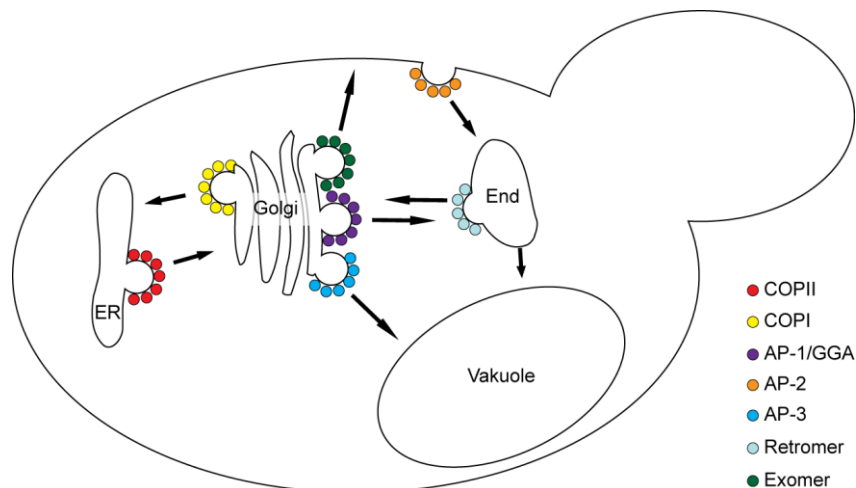
**Abb. 1.3: Der GTPase Zyklus**

GTPasen, wie z.B. die Rab-GTPasen, schalten zwischen einer GTP enthaltenden, aktiven Form, in der sie mit einem Effektorprotein interagieren können, und einer GDP enthaltenden, inaktiven Form hin und her. Der Austausch von GDP zu GTP wird durch ein GEF (*Guanine exchange factor*) katalysiert, die Hydrolyseaktivität der GTPase wird durch ein GAP (*GTPase activating protein*) merklich erhöht.

---

### 1.3.2 Entstehung der Vesikel an einer Membran durch Hüllproteine

Die durch GTPasen an die Membran rekrutierten Hüllproteine, meist multimere Proteinkomplexe, binden an spezifische Sortierungssignale, definierte Aminosäuresequenzen in den cytoplasmatischen Teilen von Frachtproteinen und konzentrieren diese dadurch in dem Bereich der Membran, an welcher sich dann die Vesikel bildet. Um eine spezifische Sortierung der Frachtproteine zu erreichen, sind für jeden Transportweg in der Zelle andere Adaptor- oder Hüllproteine zuständig. Für den anterograden Transport zwischen ER und Golgi wird der COPII-, für den retrograden Transport der COPI-*Coat* genutzt. Der Adaptorprotein-Komplex 1 (AP-1) ist am Transport zwischen Golgi und Endosom beteiligt, AP-2 am endocytotischen Weg und AP-3 umhüllt die Vesikel zwischen Golgi und Vakuole. Die AP-1 und 2 Komplexe wechselwirken zusätzlich mit Clathrin, um eine Hülle um die Vesikel zu bilden. Für den retrograden Transport zwischen Endosom und Golgi wird der sogenannte Retromer-Komplex an die Membran rekrutiert, die Exocytose vom Golgi zur Plasmamembran erfolgt analog mit dem Exomer. Abbildung 1.4 bietet eine Übersicht, Details zu den einzelnen Komplexen sind in den folgenden Übersichtsartikeln zu finden (Langer *et al.*, 2007; Béthune *et al.*, 2006; McMahon *et al.*, 2004).



**Abb. 1.4: Übersicht der Lokalisation verschiedener Hüllproteine in *S. cerevisiae***

Für jeden Transportweg in der Zelle gibt es einen spezifischen Satz an Adaptor- oder Hüllproteinen, die eine eindeutige Sortierung von Frachtproteinen zum richtigen Organell ermöglichen. (ER-Endoplasmatisches Retikulum; End-Endosom)



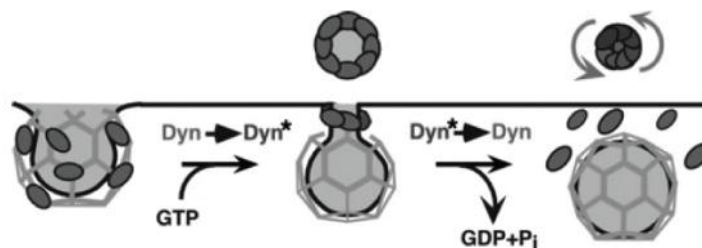
---

Durch die Bindung und Oligomerisierung der Hüllproteine wird die Donormembran nach außen in Richtung Cytosol gekrümmt, was letztlich zur Ausstülpung der Vesikel führt.

### 1.3.3 Abschnüren der Vesikel

In Abhängigkeit vom Ausmaß der Membranausstülpung kommt es zur Abschnürung der Vesikel durch die Hüllproteine. In einigen Fällen sind auch GTPasen notwendig, um die nötige Energie für das Abschnüren der Vesikel zur Verfügung zu stellen. In Säugerzellen ist dies das Protein Dynamin, in Hefe das homologe Vps1 (Bowers und Stevens, 2005).

Dynamin oligomerisiert in helikalen Strukturen. Ein aktuelles Modell beschreibt (Abb. 1.5), die Oligomerisierung der Dynaminmoleküle an der stark gekrümmten Membran, durch die die entstehende Vesikel noch mit der Donormembran verbunden ist. Die helikale Struktur umschließt diesen "Flaschenhals" und durch eine mit der Hydrolyse von GTP einhergehende Konformationsänderung wird die Trennung der Vesikel- von der Donormembran erreicht. (Mettlen *et al.*, 2009).



**Abb. 1.5: Mechanochemisches Modell zur Funktionsweise der GTPase Dynamin**

Dynaminmoleküle (in *S. cerevisiae* das homologe Vps1) oligomerisieren an der stark gekrümmten Membran, durch welche die Vesikel noch mit der Donormembran verbunden ist. Durch die Hydrolyse des gebundenen GTP, einhergehend mit einer Konformationsänderung der oligomerisierten Moleküle, wird die Trennung der Vesikel vom Donororganell erreicht. (verändert nach Mettlen *et al.*, 2009)

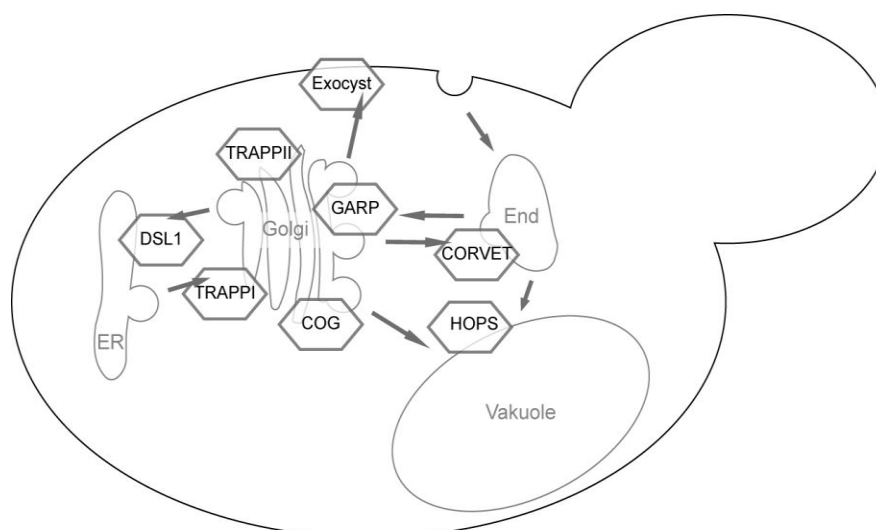
---

## 1.4 Prozesse an der Akzeptormembran

Vorraussetzung für die Fusion der Vesikel mit dem Zielorganell ist ein regulierter Ablauf des *Tethering* und der SNARE-Wechselwirkung zwischen Vesikel- und Akzeptormembran, was letztlich zur Vermischung der beiden Lipiddoppelschichten führt.

### 1.4.1 *Tethering* der Vesikel an das Zielorganell

Den Startpunkt der Fusionsprozesse bilden aktive, membranassoziierte Rab-GTPasen, die für das Zielorganell spezifische *Tethering*-Komplexe an die Akzeptormembran rekrutieren (Pfeffer, 2001, Grosshans *et al.*, 2006). Abbildung 1.6 gibt eine Übersicht über verschiedene *Tethering*-Faktoren und deren Lokalisation in der Zelle.



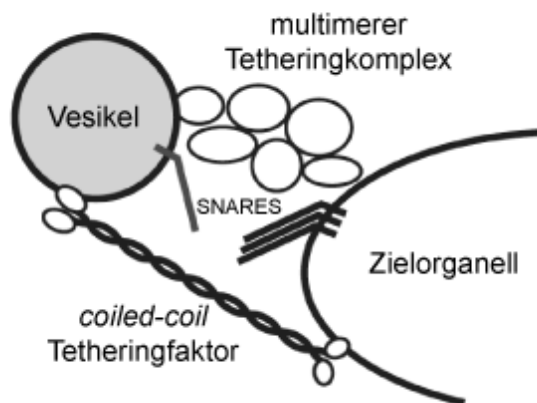
**Abb. 1.6: Lokalisation von *Tethering*-Faktoren in *S. cerevisiae***

Für jedes Organell gibt es mindestens einen spezifischen *Tethering*-Faktor, der den ersten spezifischen, aber reversiblen Membrankontakt zwischen Vesikel und Akzeptororganell herstellt.

Es gibt zwei Typen von *Tethering*-Faktoren: zum einen eine Gruppe von Proteinen mit einer langen, *coiled-coil* Struktur, zum anderen eine Reihe von multimeren Proteinkomplexen (Abb. 1.7). Beide sind in der Lage, vergleichsweise große

---

Entfernungen in der Zelle zu überbrücken, um so Vesikel aus dem Cytosol an das Zielorganell zu holen. Die genauen Abläufe des *Tetherings* sind noch nicht genau bekannt, allerdings sind zumindest einige *Tethering*-Faktoren in der Lage, das Andocken, also die erste Anlagerung der SNARE-Proteine auf beiden Membranen, zu überprüfen. Andere Untereinheiten von *Tethering*-Komplexen können die Membranassoziation des gesamten Komplexes beeinflussen, da sie als GEFs oder GAPs der zugehörigen GTPasen aktiv sind (Starai *et al.*, 2008).



**Abb. 1.7: Modell für die Struktur von *Tethering*-Komplexen**

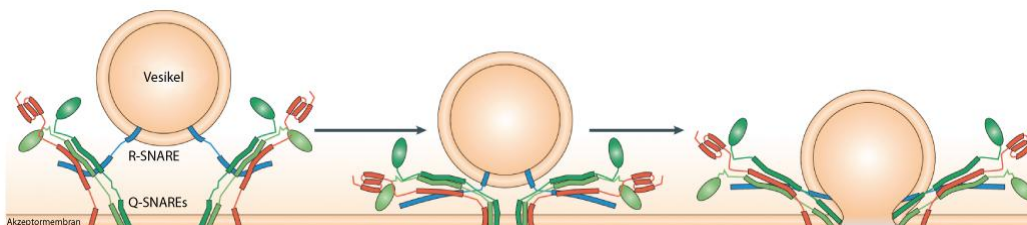
Neben den langen *Tethering*-Faktoren mit einer *coiled-coil* Struktur gibt es eine Reihe von multimeren Proteinkomplexen, welche den ersten Kontakt zwischen Vesikel und Organell herstellen, bevor die SNAREs in Aktion treten. (Whyte und Munro, 2002)

#### 1.4.2 Docking und Fusion der Vesikel mit dem Zielorganell

Nach dem reversiblen *Tethering* der Vesikel an das Zielorganell folgt die endgültige und nicht reversible Fusion der beiden Membranen. Hierzu werden SNAREs benötigt. Die meisten SNAREs haben an ihrem C-Terminus eine Transmembrandomäne, welche über eine kurze Verbindungsregion mit der charakteristischen SNARE-Domäne verbunden ist. SNAREs ohne Transmembrandomäne verfügen über einen Lipidanker oder aber über eine Lipidbindedomäne, um mit Membranen wechselwirken zu können. Die SNARE-Domäne enthält 60-70 Aminosäurereste und vermittelt die Kontaktfläche zwischen den verschiedenen SNAREs bei der Membranfusion. Eine erste Anlagerung

---

von einem SNARE auf der Vesikel und drei SNAREs auf dem Zielorganell stellt das sogenannte *Docking* der Vesikel mit dem Zielorganell dar. Bei der richtigen Kombination von SNAREs kommt es im nächsten Schritt zur irreversiblen Fusion der Vesikel- mit der Zielmembran (siehe Abb. 1.8). Hierzu bilden die vier SNARE Proteine mittels ihrer SNARE-Domänen eine sogenannte 4-Helix-Bündel-Struktur aus. Die SNARE-Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen, je nachdem welche konservierte Aminosäure an einer bestimmten Position, dem sogenannten *0-layer* zu finden ist. Zum einen gibt es die R-SNAREs mit einem Arginin, zum anderen die Q-SNAREs mit einem Glutamin an dieser Position. Die Bildung des 4-Helix-Bündels basiert auf der Wechselwirkung von einem R-SNARE, das meist in der Vesikelmembran sitzt, und drei Q-SNAREs in der Akzeptormembran. Der Mechanismus ähnelt einem Reißverschluss: Die einzelnen wechselwirkenden  $\alpha$ -Helices lagern sich parallel zueinander an und verdrehen sich vom N-terminalen Ende ausgehend bis zur C-terminal gelegenen Transmembrandomäne ineinander (*coiled coil*). Diese Struktur wird durch die Seitenketten der Aminosäurereste stabilisiert. Da die Verbindung zwischen Transmembrandomäne und SNARE-Domäne steif ist, führt diese Verdrehung zu einer Störung der Lipiddoppelschicht was wiederum die Durchmischung der beiden Membranen erleichtert (Jahn und Scheller, 2006). Neue Untersuchungen legen nahe, dass die Wechselwirkung der SNARE-Domänen bis in die Verbindungs- bzw. Transmembrandomänen der Proteine reicht und diese so direkt die Vermischung der Lipide aus beiden Membranen unterstützen (Stein *et al.*, 2009). Durch die Vermischung der Membranlipide werden die Frachtproteine der Vesikel in das Lumen bzw. in die Membran des Zielorganells entlassen.



**Abb. 1.8: Funktion von SNARE Proteinen**

Bei der Vesikelfusion mit dem Zielorganell kommt es in einem ersten Schritt zur Anlagerung eines R-SNARE an drei Q-SNARE auf der Akzeptormembran. Die Ausbildung des 4-Helix-Bündels führt letztlich zur Fusion der Vesikel- mit der Akzeptormembran. (verändert nach Jahn und Scheller, 2006)

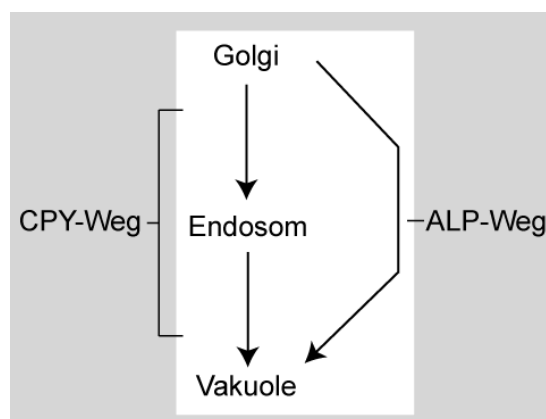
---

## 1.5 Biosynthetische Transportwege vom Golgi zur Vakuole in der Hefe

### *S. cerevisiae*

Als nächstes soll der in dieser Arbeit untersuchte ALP-Weg in der Hefe *S. cerevisiae* näher betrachtet werden. Hierzu wird die Funktion der an der Bildung und Fusion der AP-3 Vesikel beteiligten Proteine vorgestellt.

In *S. cerevisiae* führen vom Golgi zwei biosynthetische Transportwege zur Lysosom-ähnlichen Vakuole: zum einen der CPY-, zum anderen der ALP-Weg. (Abb. 1.9)



**Abb. 1.9: Biosynthetische Transportwege vom Golgi-Apparat zur Vakuole**

In der Hefe *S. cerevisiae* existiert neben dem CPY-Weg, der sich am Endosom mit endocytotischen Transportwegen mischt, noch der ALP-Weg. Dieser umgeht das Endosom.

Über den CPY-Weg werden eine Vielzahl verschiedener Hydrolasen transportiert, wie z.B. die Carboxypeptidase S (Cps1) oder Y (CPY). Die Vesikel dieses Transportweges fusionieren auf dem Weg zur Vakuole als Zwischenstation mit dem Endosom. Hier vermischen sich die Proteine aus dem biosynthetischen Transportweg mit solchen, die durch endocytotische Prozesse aufgenommen wurden und ebenfalls in die Vakuole gelangen. In der Hefe reift das Endosom dann über verschiedene Stadien zur Vakuole (Bowers, 2005), d.h. Protein- und Lipidkomposition ändern sich.

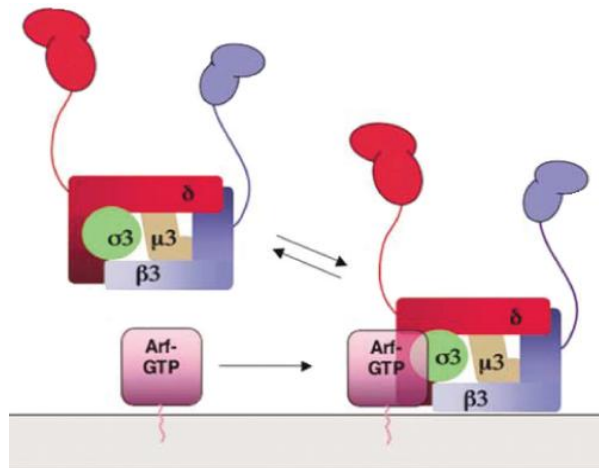
---

Zum anderen existiert der ALP- oder auch AP-3 Weg, über den eine definierte und kleine Auswahl an Proteinen direkt vom Golgi zur Vakuole transportiert wird: Als Beispiele seien hier die namensgebende alkalische Phosphatase (ALP/Pho8) genannt, oder die Caseinkinase Yck3 und die beiden SNARE Proteine Nyv1 und Vam3. Auf dem Weg zur Vakuole umgeht der ALP-Weg das Endosom, dieser Weg stellt also eine Art Kurzschluss des CPY-Weges dar.

### 1.5.1 Die GTPase Arf1 rekrutiert den AP-3 Komplex an die Membran des Golgi

Die GTPase Arf1 ist in ihrer aktiven Form unter anderem dafür notwendig, den Adaptorprotein-Komplex 3 aus dem Cytosol an die Golgi-Membran zu rekrutieren (siehe Abb. 1.10) (Ooi *et al.*, 1998).

Die kleine GTPase Arf1 (*ADP-ribosylation factor 1*) trägt an ihrem N-Terminus einen Myristoylrest als Lipidanker. In der GDP-gebundenen Konformation ist der Myristoylanker in einer hydrophoben Tasche im Protein verborgen, Arf1 ist im Cytosol zu finden. In der aktiven Form exponiert Arf1 diesen Lipidanker und bindet dadurch an Membranen.



**Abb. 1.10: Membranrekrutierung des Adaptorprotein-Komplex 3**

Die aktive und damit membrangebundene Form der GTPase Arf1 rekrutiert den AP-3 Komplex an die Donormembran und initiiert dadurch die Vesikelbildung. (verändert nach Lefrancois *et al.*, 2004)

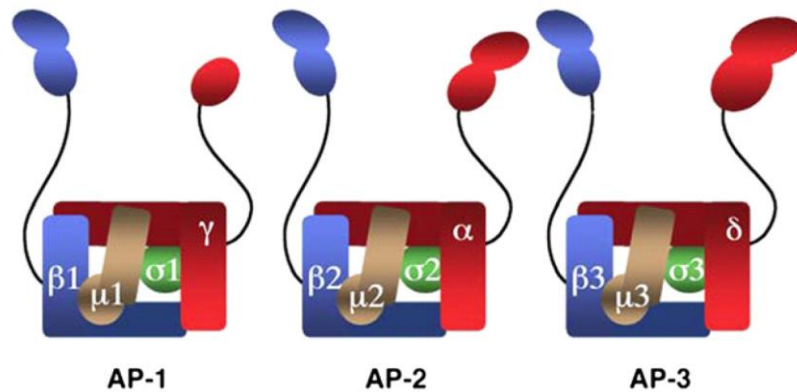
---

In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass neben Arf1 auch das entsprechende GAP-Protein für Arf1 (ARFGAP1) mit dem AP-3 Komplex zusammen an Membranen assoziiert. Eine Überproduktion dieses Proteins führt zu einer Dissoziation der AP-3 Komplexe von Membranen (Nie *et al.*, 2003).

Die Lokalisation des GAP auf den AP-3 Vesikeln ermöglicht zu einem späteren Zeitpunkt die Inaktivierung der GTPase Arf1 und damit das Abwerfen der Hüllproteine, was eine Vorbedingung für die Fusion der Vesikel mit dem Zielorganell ist.

### 1.5.2 Adaptorprotein-Komplex 3

Die für den ALP-Weg bestimmten Frachtproteine am Golgi werden vom Adaptorprotein-Komplex 3 (AP-3 Komplex) erkannt. Der AP-3 Komplex ist ein Heterotetramer und besteht in *S. cerevisiae* aus den vier Proteinen Apl5 (einem Homolog zum  $\delta$ -Adaptin in Säugerzellen), Apl6 ( $\beta$ -Adaptin), Apm3 ( $\mu$ -Untereinheit) und Aps3 ( $\sigma$ -Untereinheit). Apl5 und Apl6 sind die beiden großen Untereinheiten mit 107 kDa bzw. 92 kDa, die zusammen mit Apm3 (55 kDa) und der kleinsten Untereinheit Aps3 (22 kDa) den Rumpf des Komplexes bilden (Abb. 1.11). Die beiden großen Untereinheiten besitzen zudem sogenannte *ear*-Domänen, welche über einen längeren, flexiblen Bereich (*hinge*-Domäne) mit dem Rumpf des Proteinkomplexes verbunden sind. Homolog zum hier beschriebenen AP-3 Komplex sind die beiden Adaptorprotein-Komplexe 1 und 2 aufgebaut (Abb. 1.11), die für den Transport zum Endosom, ausgehend vom Golgi bzw. von der Plasmamembran benötigt werden. In Säugerzellen gibt es neben diesen drei Komplexen noch einen weiteren, den AP-4 Komplex. Dieser ist an der Exocytose ausgehend vom Golgi beteiligt. In der Hefe ist kein Homolog zu AP-4 bekannt. (Dell'Angelica *et al.*, 1999)



**Abb. 1.11: Schematische Darstellung des Aufbaus der Adaptorprotein-Komplexe**

Die Adaptorprotein-Komplexe 1-3 bestehen aus je 4 Untereinheiten, wobei die  $\beta$ -,  $\mu$ - und  $\sigma$ -Untereinheiten der einzelnen Komplexe große Homologien zueinander aufweisen, die  $\gamma$ -,  $\alpha$ - und  $\delta$ -Untereinheit dagegen unterschiedlicher sind. Die beiden großen Untereinheiten  $\beta$  bzw.  $\gamma/\alpha/\delta$  besitzen eine *ear*-Domäne, welche durch eine lange, flexible Verbindung am Rumpf des Komplexes hängt. Dieser Rumpf wird aus allen vier Untereinheiten gebildet (Bräulke und Bonifacino, 2009).

Eine Oligomerisierung der membranassoziierten und an Frachtproteine gebundenen AP-3 Komplexe führt zu einer Anreicherung der Frachtproteine im Bereich der knospenden Vesikel. Dieser Mechanismus ist zumindest für den AP-1 Komplex beschrieben und sollte auch bei den anderen homologen Komplexen zutreffen (Meyer *et al.*, 2005).

Neben den zu transportierenden Proteinen binden die Adaptorprotein-Komplexe ebenfalls das Hüllprotein Clathrin. Dieses wechselwirkt mit der *ear*-Domäne der  $\beta$ -Untereinheit (Bonifacino und Traub, 2003). Eine Ausnahme stellt hier der in dieser Arbeit untersuchte AP-3 Komplex dar. Hier konnte zumindest in der Hefe *S. cerevisiae* keine Abhängigkeit von Clathrin nachgewiesen werden (Dell'Angelica *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1997). Ob im ALP-Weg ein anderes Hüllprotein benötigt wird oder ob dieser Komplex ohne ein zusätzliches Hüllprotein auskommt, wie z.B. die COPII und COPI-Hüllen, konnte bislang nicht geklärt werden.



---

### 1.5.3 Sortierungssignale

Die Erkennung der Frachtproteine findet durch spezifische Sortierungssignale in deren cytosolischen Bereichen statt. Für den ALP-Weg gibt es zum einen ein Tyrosin-basiertes und zum anderen ein Di-Leucin-basiertes Sortierungssignal, welche von AP-3-Komplexen erkannt und gebunden werden. Bei dem Tyrosin-basierten Sortierungssignal handelt es sich um eine YXX $\Phi$ -Aminosäuresequenz. Hierbei steht X für eine beliebige und  $\Phi$  für eine Aminosäure mit großer, hydrophober Seitenkette. Ein Di-Leucin-Motiv entspricht der Sequenz [D/E]XXXL[L/I], wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Beide Arten von Sortierungssignalen sind typisch für die Adaptorprotein-Komplexe 1-3, wobei diskutiert wird, ob die Spezifität der Signale für die einzelnen Adaptoren und damit für die Transportwege in den variablen Aminosäuren (X) liegt (Bonifacino und Traub, 2003). Für AP-1 und AP-2 konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin-Sortierungssignal an die  $\mu$ -Untereinheit bindet. Für AP-2 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch Di-Leucin Signale an die  $\mu$ -Untereinheit binden, wobei die Wechselwirkung des sauren Aminosäurerestes auf Position -4, vom ersten Leucin aus gezählt, mit einem positiv geladenem Bereich erfolgt, der von Aminosäureresten der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\sigma 2$  gebildet wird (Kelly *et al.*, 2008). Es kann ausgeschlossen werden, dass beide Signale an dieselbe Stelle in der  $\mu$ -Untereinheit binden, da keine „Kompetition“ zwischen Proteinen mit den beiden Signalen gefunden werden konnte. (Rapoport *et al.*, 1998.) In einer weiteren Untersuchung wurde anhand eines Hefe-3-Hybrid Experiments gezeigt, dass Di-Leucin Signale mit einer Kombination aus den Untereinheiten  $\delta$  und  $\sigma 3$  des AP-3 Komplexes interagieren (Janvier, 2003).

Ein Beispiel für ein AP-3 Frachtprotein mit Tyrosin-basiertem Sortierungssignal ist die Caseinkinase Yck3 (Sun *et al.*, 2004), ein Di-Leucin basiertes Sortierungssignal enthält das SNARE Vam3 (Darsow *et al.*, 1998).

### 1.5.4 Abschnüren der Vesikel

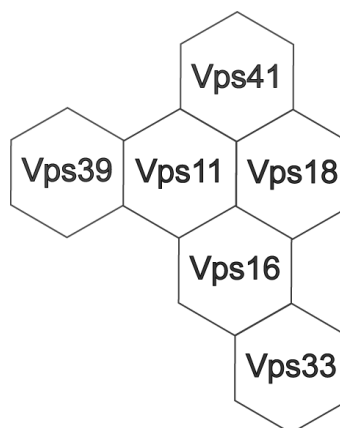
Eine Deletion der GTPase Vps1, ein Homolog des Dynamin führt zu einer kompletten Fehlsortierung der Proteine des CPY- und ALP-Weges zur Plasmamembran statt zur

---

Vakuole. Dies deutet darauf hin, dass Vps1 für das Abschnüren der Vesikel für beide Wege essentiell sein könnte (Nothwehr *et al.*, 1995).

#### 1.5.5 Tethering und Andocken der AP-3 Vesikel an die Vakuole

Der HOPS-Komplex (*homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting*) stellt einen ersten reversiblen Kontakt zwischen AP-3 Vesikeln und Vakuole her. Er ist auch der Fusion von Endosomen mit der Vakuole und der homotypischen Vakuolenfusion vorgeschaltet. Der HOPS-Komplex besteht aus sechs Untereinheiten, die einen heterooligomeren Komplex mit einer Masse von etwa 630 kDa bilden (Abb. 1.12). Die vier Untereinheiten Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33 bilden den sogenannten Vps-C Kern, der auch im homologen CORVET-Komplex zu finden ist. Die beiden zusätzlichen Untereinheiten Vps41 und Vps39 definieren den Unterschied zwischen HOPS- und CORVET-Komplex, durch den die Spezifität gewährleistet wird (Nickerson *et al.*, 2009). Bei Vps41 handelt es sich um das Effektorprotein der Rab-GTPase Ypt7. Vps39 wurde als GEF für Ypt7 beschrieben (Wurmser *et al.*, 2000). Neue Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass Vps39 keine GEF-Aktivität aufweist. Das für Ypt7 identifizierte GEF ist der Mon1-Ccz1 Proteinkomplex (Nordmann *et al.*, eingereicht 2010).



**Abb. 1.12: Schematische Darstellung des HOPS-*Tethering* Komplexes**

Der HOPS-Tethering-Komplex ist ein hexaoligomerer Proteinkomplex bestehend aus dem Vps-C Kern mit den Untereinheiten Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33. Die beiden Untereinheiten Vps41 und Vps39 sind für den HOPS-Komplex spezifisch. (nach Ostrowicz *et al.*, eingereicht 2010)

---

### 1.5.6 Das Ypt7-Effektorprotein Vps41

Vps41 ist eine Untereinheit des HOPS-*Tethering*-Komplexes, die als Effektorprotein an die aktive (GTP-haltige) Form der Rab-GTPase Ypt7 bindet (Ostrowicz *et al.*, eingereicht 2010). Außerdem wird eine Funktion des Vps41 im ALP-Weg vermutet, da eine Wechselwirkung zwischen Vps41 und der *ear*-Domäne von Apl5 nachgewiesen werden konnte (Rehling *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie wurden Punktmutationen im Gen des Proteins Vps41 beschrieben, die zu temperatur-empfindlichen Mutanten im ALP-Weg führen. Aufgrund der Positionen dieser Mutationen und einer Hefe-2-Hybrid Untersuchung konnte der für die Funktion im AP-3-Weg wichtige Abschnitt auf die N-terminale Hälfte des Vps41 eingeschränkt werden. Vps41 könnte aufgrund seiner Homologie im C-terminalen Bereich zum Hüllprotein Clathrin eine Aufgabe bei der Vesikelbildung übernehmen (Darsow *et al.*, 2001).

In einer aktuellen Veröffentlichung wurde gezeigt, dass Vps41 seine Funktion im ALP-Weg im Zusammenhang mit dem HOPS-Komplex erfüllt. Dies bedeutet allerdings, dass die Interaktion Vps41/Apl5 erst an der Vakuole stattfindet, dass Vps41 also eine Rolle im *Tethering* der AP-3 Vesikel an der Vakuole spielt (Angers *et al.*, 2009). Auf diesen Punkt wird später in der Diskussion der Ergebnisse näher eingegangen. Die Funktion von Vps41 im ALP-Weg scheint vom Phosphorylierungsstatus des Proteins abzuhängen. Eine nicht phosphorylierbare Mutante zeigt *in vivo* einen Defekt des ALP-Wegs (Cabrera *et al.*, 2009).

### 1.5.7 Fusion der AP-3 Vesikel mit der Vakuole

Die an der Fusion der AP-3-Vesikel beteiligten SNAREs sind auch bei der homotypischen Vakuolenfusion erforderlich. Als R-SNARE wirkt bei der Fusion von AP-3 Vesikeln mit der Vakuole wahrscheinlich Ykt6, anders als in der homotypischen Vakuolenfusion, an der Nyv1 beteiligt ist (Dilcher *et al.*, 2001). Als Q-SNARE fungieren in beiden Fällen Vam3, Vam7 und Vti1 (Darsow *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998; Fischer von Mollard *et al.*, 1999; Langosch *et al.*, 2007). Die SNARE-Proteine Nyv1 und Vam3 sind als Frachtproteine für den ALP-Weg beschrieben, d.h. sie sind auf den Vesikeln zu finden und würden auf jeden Fall als Teil der Fusionsmaschinerie

---

zur Verfügung stehen. Eine direkte Beteiligung von Vam3 an der Fusion von AP-3 Vesikel und Vakuole konnte bereits durch eine temperatursensitive Mutante dieses SNAREs nachgewiesen werden (Rehling *et al.*, 1999).

---

## **2. Aufgabenstellung**

Die Kenntnis der Proteine, die an der Biogenese der AP-3-Vesikel teilnehmen, ist gering. Die meisten im Zusammenhang mit AP-3 beschriebenen Proteine werden als Fracht transportiert oder auch im CPY Weg benötigt. Warum der ALP-Weg im Laufe der Evolution trotzdem als separater Weg aufrecht erhalten blieb, ist unklar.

Für den ALP-Weg wird bei der Vesikelbildung am Golgi neben der GTPase Arf1 der von dieser an die Membran assoziierte Adaptorprotein-Komplex 3 benötigt. Vor der Fusion mit der Vakuole findet das *Tethering* und Andocken der AP-3 Vesikel statt, vermutlich vermittelt durch die Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 als Untereinheit des HOPS-Komplexes. Schließlich fusionieren die AP-3 Vesikel mit der Vakuole durch die SNARE-vermittelte Vermischung der Membranen.

In einem genetischen Screen in der Hefe *S. cerevisiae* konnte neben den vier Untereinheiten des AP-3 Komplexes die Caseinkinase 3 (Yck3) als weiteres Protein identifiziert werden, dessen Deletion einen spezifischen Einfluss auf den ALP-, aber nicht auf den CPY-Weg hat (Anand *et al.*, 2009).

Eine genaue Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Apl5 als Untereinheit des AP-3 Komplexes und Vps41 als Untereinheit des HOPS-Komplexes, soll die Grundlage für ein Modell zum Verständnis der Fusion der AP-3-Vesikel mit der Vakuole liefern.

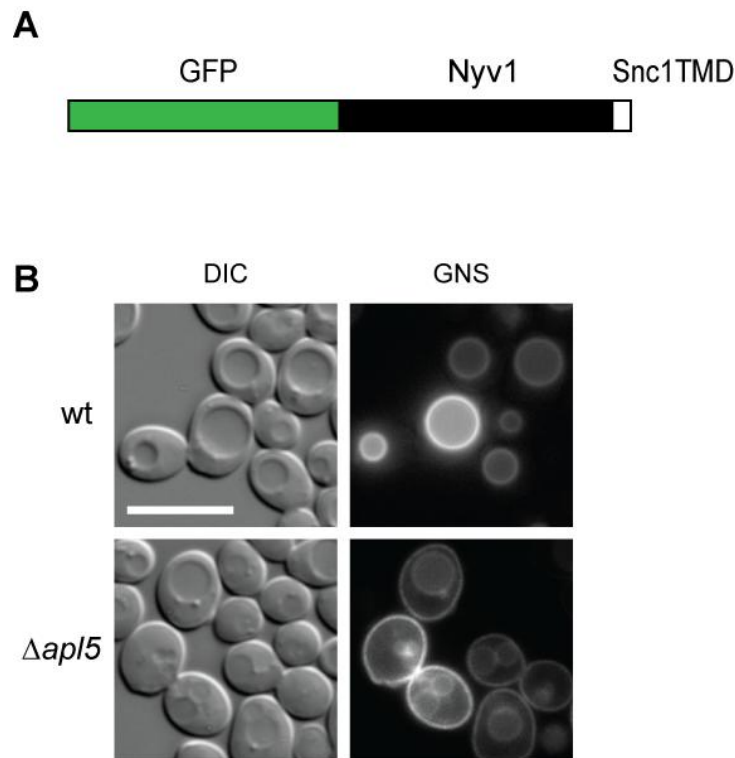
Eine *in vivo* Überproduktion des AP-3-Komplexes soll eine Identifikation weiterer, am ALP-Weg beteiligter Proteine ermöglichen und nach Affinitätsaufreinigung des überproduzierten AP-3-Komplexes eine Rekonstitution des ALP-Weges *in vitro* ermöglichen. Dies soll Aufschluss über den genauen Mechanismus der Vesikelbildung an der Golgi-Membran geben.

---

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Das Reporterprotein GFP-Nyv1-Snc1(Transmembrandomäne)**

Um die Funktionalität des ALP-Weges zu überprüfen, kann die zelluläre Lokalisation eines Reporterproteins bestimmt werden. Dieses Reporterprotein ist eine Fusion aus dem *Green-Fluorescent-Protein* (GFP), das vor den N-terminus des SNARE Nyv1, einem Cargo-Protein des ALP-Weges kloniert wurde. Die Transmembrandomäne von Nyv1 wurde in diesem Konstrukt durch die des SNARE Snc1 ausgetauscht (Abb. 3.1A; Reggiori *et al.*, 2000). Snc1 dient als v-SNARE bei der Exocytose und wird normalerweise zur Plasmamembran transportiert. Bei einem funktionalen ALP-Weg wird dieses Fusionsprotein (GNS) anhand des vom AP 3-Komplex erkannten Sortierungssignals im Nyv1 über diesen Weg zur Membran der Vakuole transportiert. Im Falle eines Defekts in diesem Weg, wird das Protein aufgrund der Snc1-Transmembrandomäne zur Plasmamembran sortiert und von dort aus durch Endocytose zur Vakuole gebracht. Die Fusion mit dem GFP ermöglicht die visuelle Bestimmung der Lokalisation in einem Fluoreszenzmikroskop (siehe Abb. 3.1B), ein Signal an der Plasmamembran deutet auf einen nicht funktionalen ALP-Weg hin, ist das Signal nur auf der Vakuolenmembran zu erkennen, ist der ALP-Weg funktional.



**Abb. 3.1: Das Reporterprotein GFP-Nyv1-Snc1TMD**

(A) Aufbau des GNS Fusionsprotein. GFP wurde vor den N-Terminus des SNARE Nyv1 fusioniert, dessen Transmembrandomäne durch die des SNARE Snc1 ersetzt wurde.

(B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Wildtyp-Stammes (wt) und eines Stammes mit Defekt im ALP-Weg ( $\Delta apl5$ ). Beide Stämme wurden mit einem Plasmid, welches das Reporterprotein GNS (GFP-Nyv1-Snc1TMD) kodiert, transformiert. Das GFP wurde für 500 ms angeregt und dessen Fluoreszenz anschließend detektiert.

Größenbalken = 10 $\mu$ m

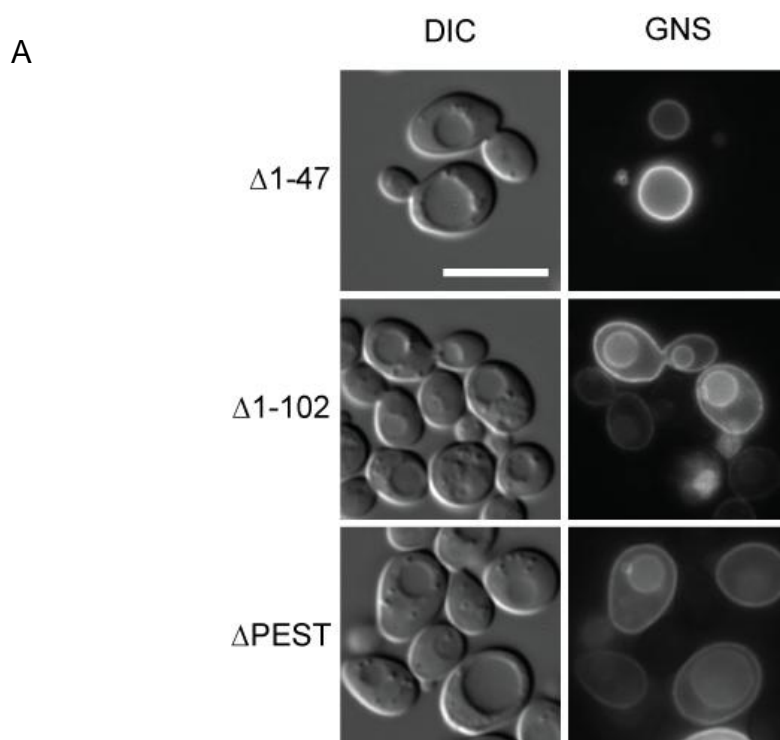
Neben den Effekten nach Überproduktion und der Aufreinigung des AP-3 Komplexes im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ebenfalls untersucht, welche Aufgabe Vps41 im ALP-Weg hat. Dies wurde mit der Beantwortung der Frage gestartet, welcher Teil von Vps41 für die Interaktion mit Apl5 notwendig ist.

---

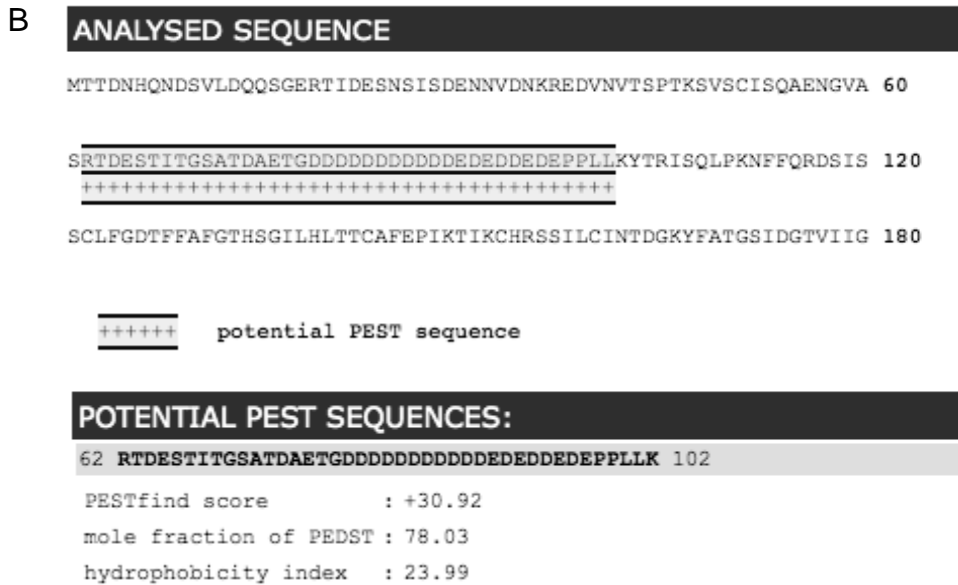
### **3.2 N-terminale Verkürzungen von Vps41 zeigen einen Defekt im ALP-Weg**

Zur Eingrenzung des für den ALP-Weg wichtigen Teiles der HOPS-Untereinheit Vps41 wurden N-terminale Deletionen dieses Proteins hergestellt. Die Funktionalität des ALP-Weges in der Zelle wurde durch die Lokalisation des bereits beschriebenen Reporterproteins GNS (siehe Kap. 3.1) überprüft.

In einer Mutante, in der Vps41 um die ersten 47 Aminosäuren verkürzt vorliegt, lokalisierte das GNS auf der Membran der Vakuole. Fehlen die ersten 102 Aminosäuren lokalisierte GNS auf der Plasma- und der Vakuolenmembran (siehe Abb. 3.2A). Eine genauere Betrachtung dieser N-terminalen Region im Vps41 zeigte, dass sich hier eine PEST-Domäne befindet (siehe Abb. 3.2B). Nach Deletion dieser Domäne (Aminosäure 62-102) lokalisierte das Reporterprotein GNS auf der Plasma- und Vakuolenmembran (siehe Abb. 3.2A), der ALP-Weg war nicht mehr funktionsfähig.







**Abb. 3.2: Funktionalität des ALP-Weges hängt von der PEST-Domäne im Vps41 ab**

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Hefestämmen mit verschiedenen Deletionen im N-terminalem Bereich von Vps41. Die Stämme exprimieren das ALP-Reporterprotein GNS, dessen GFP im Fluoreszenzmikroskop für 500 ms angeregt und die Emission detektiert wurde, um die Lokalisation des Proteins zu bestimmen.

Größenbalken = 10 µm

(B) Graphische Auswertung des Pestfind-Programms. Der N-terminale Bereich vom Vps41 beinhaltet eine PEST-Domäne, welche einen hohen Anteil an geladenen Aminosäuren aufweist.

(<http://www.es.embnnet.org/Services/EMBnetAT/htdoc/pestfind/>) (Rogers *et al.*,1986)

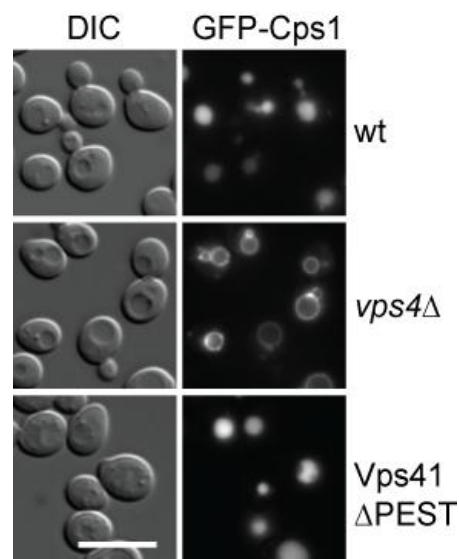
**3.3 Die PEST-Deletion zeigt keine Auswirkung auf andere Funktionen von Vps41**

3.3.1 Der CPY-Weg in Zellen des Vps41ΔPEST Stammes ist nicht beeinflusst

Die Deletion der PEST-Domäne im Vps41 führte zu einer Fehlsortierung des ALP-Reporterproteins GNS. Um zu überprüfen, ob auch die Funktion von Vps41 im zweiten biosynthetischen Transportweg vom Golgi-Apparat zur Vakuole von dieser Deletion betroffen ist, wurde der Vps41ΔPEST Stamm mit einem Plasmid transformiert, das ein GFP-Cps1 kodiert, ein Frachtprotein des CPY-Weges. Die

---

Lokalisation des GFP-Signals wurde nach Anregung im Fluoreszenzmikroskop überprüft (siehe Abb. 3.3). Im Wildtypstamm wurde das GFP-Cps1 in das Lumen der Vakuole transportiert. In einem *vps4Δ* Stamm, einer Kontrolle, in welcher der CPY-Weg defekt ist, wurde GFP-Cps1 nicht in das Lumen der Vakuole, sondern in deren Membran sortiert. Der *Vps41ΔPEST* Stamm zeigte eine Sortierung des GFP-Cps1 in das Lumen der Vakuole, wie in der Wildtyp Kontrolle. Eine Beeinflussung des CPY-Weges in der *Vps41ΔPEST*-Mutante ließ sich in diesem Experiment nicht nachweisen.



**Abb. 3.3: CPY-Weg ist durch PEST-Deletion nicht beeinflusst**

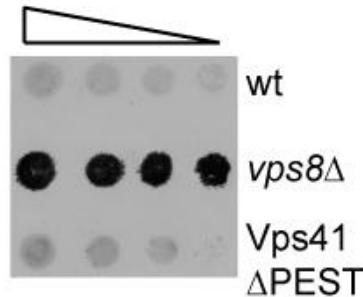
Die angegebenen Stämme wurden mit einem Plasmid transformiert, von dem ein GFP-Cps1 Fusionsprotein exprimiert wird. Die Lokalisation des Proteins wurde nach Anregung des GFP für 1500ms im Fluoreszenzmikroskop festgestellt.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

Als weitere Kontrolle der Funktionalität des CPY-Weges wurde die Sekretion der Carboxypeptidase Y durch einen Tropftest auf Nitrocellulosemembranen und anschließender Immunodetektion von sezerniertem Protein verfolgt (Abb 3.4). Im Wildtyp wird die Carboxypeptidase Y nicht sezerniert, sondern in die Vakuole transportiert. Im *vps8Δ* Stamm wird diese aufgrund eines Defektes im CPY-Weg sezerniert und ist deshalb auf der Nitrocellulosemembran durch eine Immunodetektion nachweisbar. Der *Vps41ΔPEST* Stamm zeigte wie der Wildtyp-Stamm keine Sekretion

---

der Peptidase. Auch hier ließ sich kein Defekt im CPY-Weg der Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen feststellen.



**Abb. 3.4: Der Stamm Vps41 $\Delta$ PEST sezerniert kein CPY**

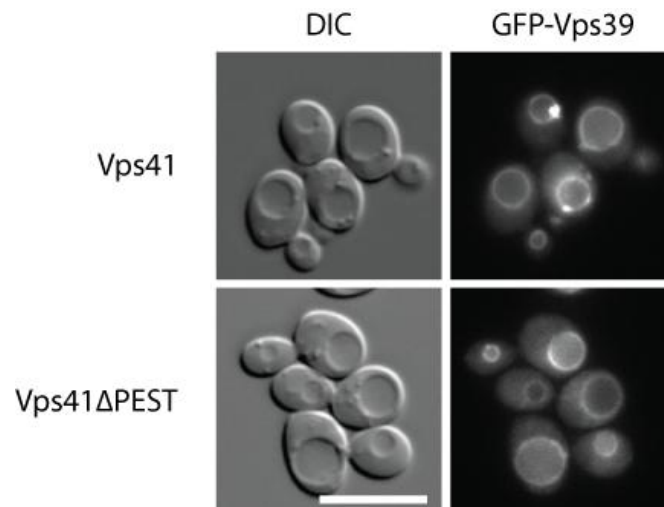
Von verschiedenen Verdünnungen (1; 0,1; 0,01; 0,001 OD<sub>600</sub>/ml) einer frischen YPD-Kultur der angegebenen Stämme wurden je 5  $\mu$ l auf eine YPD-Platte getropft, bei 30°C über Nacht inkubiert und auf eine Nitrocellulosemembran die auf einer YPD-Agarplatte lag gestempelt. Die Immunodetektion von sezerniertem CPY zeigte in welchen Stämmen diese falsch sortiert wurde.

### 3.3.2 Zusammensetzung und Lokalisation des HOPS-Komplexes im VPS41 $\Delta$ PEST

#### Stamm

Vps41 wird als Effektorprotein der Rab-GTPase Ypt7 als eine Untereinheit des HOPS-*Tethering*-Komplexes benötigt. Um einen Einfluss der Deletion der PEST-Domäne auf diese Funktionen zu überprüfen, wurde zum einen die intrazelluläre Lokalisation von GFP-Vps39 im Fluoreszenzmikroskop untersucht, als auch eine Co-Immuno-präzipitation über Vps41-TAP durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist, lokalisierte die HOPS Untereinheit GFP-Vps39 im Wildtyp auf der Vakuolenmembran und akkumulierte in Strukturen, welche im Fluoreszenzmikroskop als Punkt neben der Vakuole erschienen. Die Verteilung von Vps39 in Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen war ähnlich der im Wildtyp, das GFP-Signal war auf der Membran der Vakuole zu sehen, allerdings war die Anzahl der punktuellen Strukturen geringer.

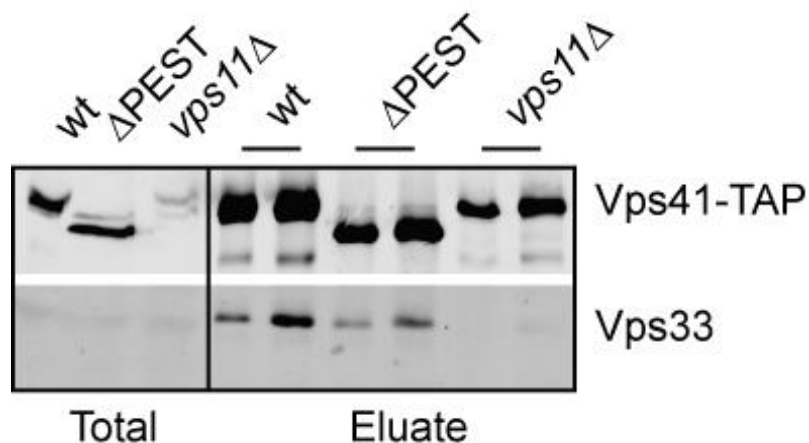


**Abb. 3.5: Lokalisation der HOPS-Untereinheit GFP-Vps39**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der angegebenen Hefestämme. Das GFP-Vps39 wurde für 1500 ms angeregt.

Größenbalken = 10  $\mu\text{m}$

Um festzustellen ob der HOPS-*Tethering*-Komplex auch im Vps41 $\Delta$ PEST-Stamm vollständig assembliert, wurde eine TAP-Aufreinigung aus einem Wildtyp-, einem Vps41 $\Delta$ PEST und einem *vps11* $\Delta$ -Stamm mit C-terminalem TAP-tag am Vps41 durchgeführt (siehe Abb. 3.6). Der *vps11* $\Delta$ -Stamm diente als Kontrolle, da der HOPS-Komplex in diesen Zellen aufgrund der Deletion dieser Untereinheit nicht assembliert (Ostrowicz *et al.*, eingereicht 2010). Die Eluate von der IgG-Sepharose-Säule wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western-Blot wurde Vps41 und als weitere Untereinheit des HOPS-Komplexes Vps33 immunologisch nachgewiesen. Im Wildtyp und im Vps41 $\Delta$ PEST-Stamm wurde Vps33 zusammen mit Vps41 präzipitiert; im *vps11* $\Delta$ -Stamm war wie erwartet kein Vps33 zu detektieren. Der HOPS Komplex assembliert demnach trotz der Deletion der PEST-Domäne.

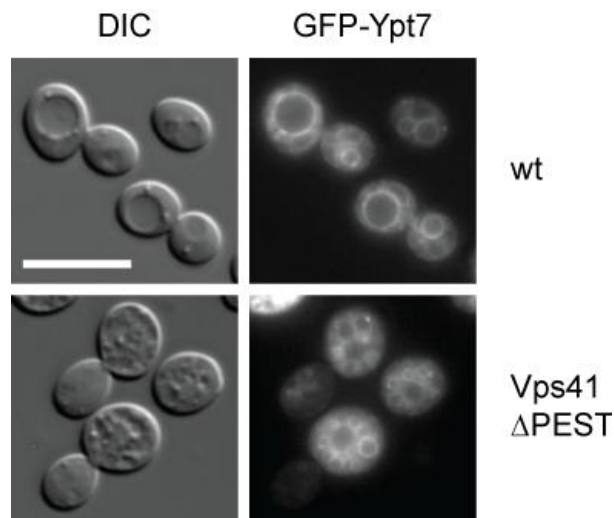


**Abb. 3.6: Co-Immunopräzipitation des HOPS-Komplexes aus Vps41-TAP-Stämmen**

Zellen (Äquivalent 500 OD<sub>600</sub>) eines Wildtyp-, eines Vps41ΔPEST- und eines *vps11*Δ-Stammes wurden lysiert und über eine IgG-Sepharose-Säule gegeben. Ein Teil des Lysates (Total; 0,2 %) und ein Teil des Eluates (Eluate; 10 % und 20 %) wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot weiter prozessiert. Im Eluat wurden immunologisch die HOPS-Untereinheiten Vps41 und Vps33 nachgewiesen.

Als Möglichkeit die Interaktion zwischen der Rab-GTPase Ypt7 und seinem Effektorprotein Vps41 *in vivo* zu testen, kann die Vakuolenmorphologie in Stämmen untersucht werden, in denen Ypt7 N-terminal mit einem GFP fusioniert wurde. Bei einer Störung der Interaktion zwischen Vps41 und Ypt7 kommt es aufgrund dieser Modifikation zu einer Fragmentierung der Vakuole, da die Funktionalität des Ypt7 durch die Fusion mit GFP bereits eingeschränkt zu sein scheint (Cabrera *et al.*, 2009).

Um die Vakuolenmorphologie zu untersuchen, wurde das GFP-Signal des GFP-Ypt7 im Fluoreszenzmikroskop betrachtet, im Wildtypstamm war in der Zelle eine große, runde Vakuole zu erkennen, in den Vps41ΔPEST-Zellen führte die Expression des GFP-Ypt7 zu einer Fragmentierung der Vakuole (siehe Abb. 3.7). Die Interaktion zwischen Vps41 und Ypt7 ist also im Vps41ΔPEST-Stamm gestört.



**Abb. 3.7: Interaktion zwischen Ypt7 und Vps41 ist in der  $\Delta$ PEST Mutante beeinflusst**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des GFP-Ypt7 im Wildtyp- (wt) und Vps41 $\Delta$ PEST-Stamm. Das GFP wurde für 1500 ms angeregt.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

### **3.4 Phosphorylierungsstatus ist nicht Grund für den Vps41 $\Delta$ PEST Phänotyp**

Das Protein Vps41 zeigt eine Lokalisation und Funktionalität im ALP-Weg abhängig vom Phosphorylierungsstatus einiger Aminosäurereste (S367, S368, S371, S372) (Cabrera *et al.*, 2009). Um auszuschließen, dass in der Vps41 $\Delta$ PEST Mutante derselbe Phänotyp betrachtet wurde, sollte die Phosphorylierung dieser Reste in Vps41 $\Delta$ PEST näher untersucht werden.

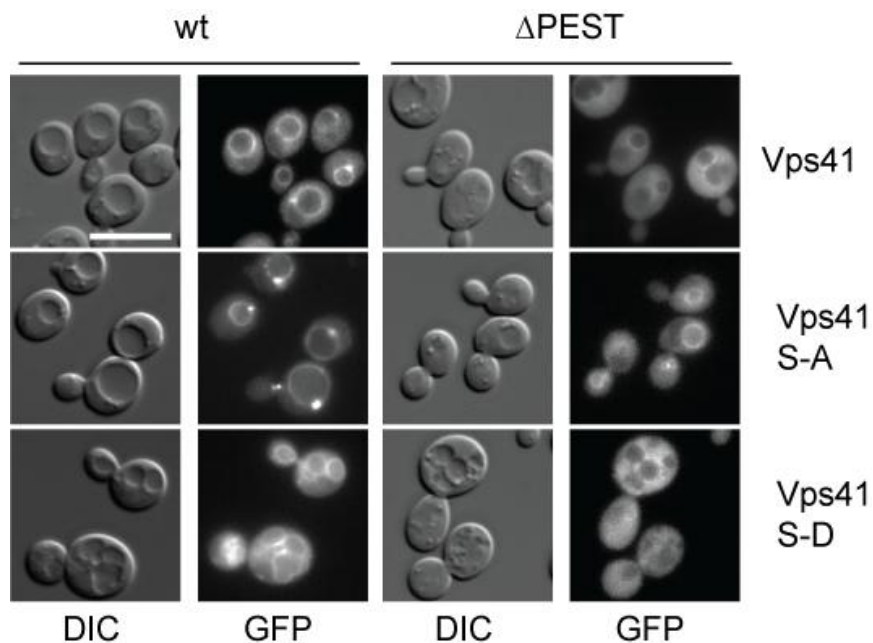
#### **3.4.1 Lokalisation von Vps41-GFP ist aufgrund der Deletion der PEST-Domäne verändert**

Zur Feststellung der intrazellulären Lokalisation von Vps41 wurde dieses in verschiedenen Stämmen mit GFP fusioniert. Bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop konnte man erkennen (Abb. 3.8), dass das GFP-Signal von Vps41 (wt) sowohl auf der Vakuolenmembran als auch im Cytosol zu finden ist. Durch die Mutation der phosphorylierbaren Aminosäurereste in Alanin (wt S-A)

---

akkumulierte Vps41-GFP in einer Struktur, die im Fluoreszenzmikroskop als Punkt neben der Vakuole zu erkennen war. Die Mutation derselben Reste in Aspartat (wt S-D) führte zu einer Verschiebung des GFP-Signals in das Cytosol. Diese Phänotypen stimmen mit bislang veröffentlichten Ergebnissen überein (Cabrera *et al.*, 2009).

Das GFP-Signal in den Vps41 $\Delta$ PEST-GFP Zellen war noch stärker im Cytosol lokalisiert als in der Vps41 S-D Mutante, es war kaum noch ein Signal auf der Membran der Vakuole zu erkennen. Wurden die bislang beschriebenen Mutationen in den Phosphorylierungsstellen mit der Deletion der PEST-Domäne kombiniert, so befand sich auch hier das GFP-Vps41 mehr im Cytosol als bei denselben Mutationen im Wildtyp-Hintergrund. In Vps41 $\Delta$ PEST-S-A-GFP war noch ein GFP-Signal auf der Membran der Vakuole zu erkennen, allerdings waren keine als Punkt erscheinenden Strukturen mehr neben der Vakuole sichtbar.



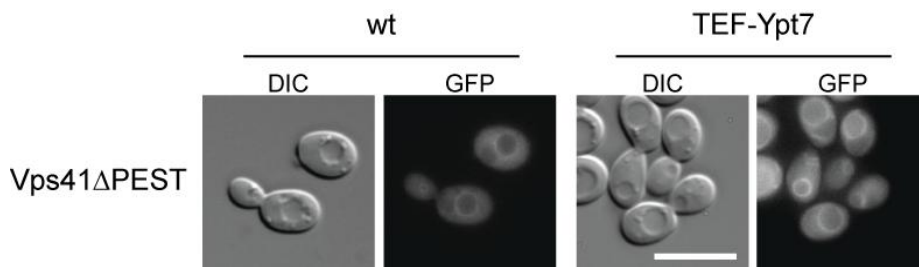
**Abb. 3.8: Lokalisation von Vps41-GFP wird durch PEST-Deletion cytosolisch**

Aufnahmen von Zellen der angegebenen Stämme im Fluoreszenzmikroskop. Das GFP am C-Terminus der entsprechenden Vps41-Varianten wurde für 1500 ms angeregt. Größenbalken = 10  $\mu$ m

---

### 3.4.2 Überproduktion der GTPase Ypt7 erhöht den vakuolären Anteil von Vps41 $\Delta$ PEST

Kann die mangelnde Lokalisation von VPS41 $\Delta$ PEST durch die gleichzeitige Überproduktion der GTPase Ypt7 wieder hergestellt werden? Zur Beantwortung dieser Frage wurde im Vps41 $\Delta$ PEST-GFP-Stamm die Expression von Ypt7, das für die Membranassoziation von Vps41 verantwortlich ist, unter die Kontrolle des TEF1-Promotors gestellt. Aufnahmen der Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 3.9) zeigten, dass sich VPS41 $\Delta$ PEST-GFP immer noch im Cytosol befand. Eine leichte Erhöhung des GFP-Signals an der Membran der Vakuole war allerdings zu erkennen.



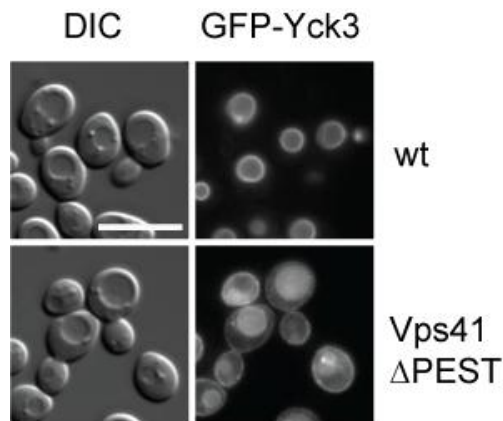
**Abb. 3.9: Relokalisation von Vps41 $\Delta$ PEST an die Vakuole nach Ypt7-Überproduktion**

Vergleich des GFP-Signals von Vps41 $\Delta$ PEST mit und ohne Überproduktion von Ypt7 unter dem Fluoreszenzmikroskop. Das GFP wurde für 1500 ms angeregt. Größenbalken = 10  $\mu$ m

### 3.4.3 Fehlsortierung der Caseinkinase 3 in Vps41 $\Delta$ PEST

Aufgrund des Funktionsverlusts des ALP-Wegs in Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen, wird die Caseinkinase Yck3, ein Cargoprotein dieses Transportweges, nicht auf die Membran der Vakuole, sondern zur Plasmamembran und von dort aus in das Lumen der Vakuole transportiert. Zu sehen war dies in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Stämmen mit einem GFP-Yck3-Fusionsprotein (siehe Abb. 3.10), in denen das GFP-Signal im Wildtyp (wt) auf der Membran der Vakuole zu erkennen war, während es in Vps41 $\Delta$ PEST Zellen sowohl auf der Plasmamembran als auch innerhalb der Vakuole zu sehen war.





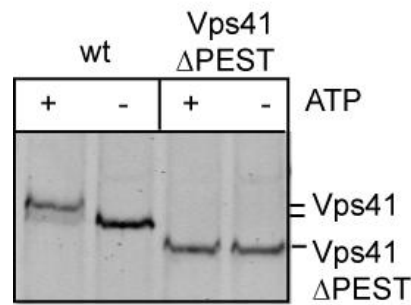
**Abb. 3.10: GFP-Yck3 wird in Vps41 $\Delta$ PEST fehlsortiert**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp- und Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen mit einem GFP-Yck3-Fusionsprotein. Das GFP wurde für 1500 ms angeregt. Größenbalken = 10  $\mu$ m

#### 3.4.4 Eine Phosphorylierung von Vps41 $\Delta$ PEST ist nicht nachweisbar

Die Fehlsortierung der Caseinkinase 3 legt nahe, dass *in vivo* keine Phosphorylierung des Vps41 $\Delta$ PEST vorliegt, da diese nur durch Yck3 an der Vakuole erfolgen kann. Um dies zu prüfen, wurden aus Wildtyp- und Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen Vakuolen präpariert und der Phosphorylierungsstatus des Vps41, wie im Methodenteil beschrieben (Kap. 6.7.11), anhand des Laufverhaltens auf einem SDS-Gel überprüft. Das phosphorylierte Vps41 zeigt eine langsamere Wanderung im Gel als das unphosphorylierte Vps41. Die Phosphorylierung in diesem System ist ATP abhängig, als Kontrolle wird jeweils ein Ansatz ohne ATP inkubiert.

Das Vps41 zeigte nach Inkubation mit ATP ein langsames Laufverhalten als ohne ATP. In Vps41 $\Delta$ PEST war keine solche Veränderung des Laufverhaltens nach ATP-Inkubation erkennbar (siehe Abb. 3.11).



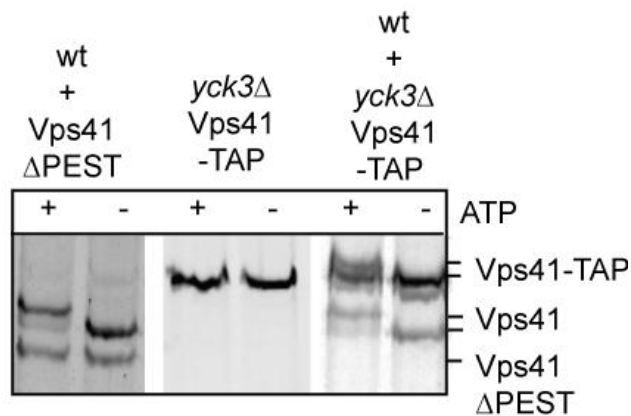
**Abb. 3.11: Nachweis der Phosphorylierung von Vps41**

Präparierte Vakuolen wurden in 0 % Ficoll resuspendiert (0,4 mg/ml) und 100 µl wurden mit und ohne ATP-regenerierendem System in Fusionsreaktionspuffer für 45 min bei einer Temperatur von 26°C inkubiert. Die pelletierten Vakuolen wurden in SDS-Ladepuffer resuspendiert und auf ein 7,5% SDS-Gel aufgetragen. Nach Western-Blot wurde Vps41 immunodetektiert. Die durch die Ladung der Phosphatreste bedingte Mobilitätsänderung von Vps41 führt zu einem langsameren Laufverhalten des phosphorylierten Proteins.

Da eine fehlende Phosphorylierung des Vps41ΔPEST durch die Fehlsortierung der Caseinkinase 3 bedingt sein könnte, wurden die Vakuolen, auf denen kein Yck3 vorhanden ist mit Vakuolen aus Wildtypzellen gemischt. In dem in Abbildung 3.12 gezeigten Experiment wurden Vakuolen aus Vps41ΔPEST Zellen mit denen von Wildtypzellen zusammen inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Stamm genutzt, in dem keine Phosphorylierung des Vps41-TAP möglich ist, da das Gen *yck3* deletiert ist und sich somit keine Caseinkinase 3 auf den Vakuolen befindet. Vakuolen dieses Stammes wurden ebenfalls zusammen mit Vakuolen aus dem Wildtyp inkubiert. Alle Inkubationen erfolgten mit und ohne ATP.

Der Ansatz mit Vakuolen aus Wildtyp- und Vps41ΔPEST-Zellen zeigte bei Inkubation mit ATP ein verlangsamtes Laufverhalten des Vps41-Wildtyp, nicht aber des Vps41ΔPEST. Die Kontrolle mit den Vakuolen aus *yck3*Δ-Zellen zeigte kein verändertes Laufverhalten des Vps41-TAP nach ATP-Inkubation, wohl aber wenn diese Vakuolen zusammen mit Vakuolen aus dem Wildtyp inkubiert wurden.

Die trans-Phosphorylierung von Vps41 nach Durchmischung zweier verschiedenener Vakuolenpräparationen funktioniert, nur die Phosphorylierung des Vps41ΔPEST lies sich auf diese Weise nicht nachweisen.



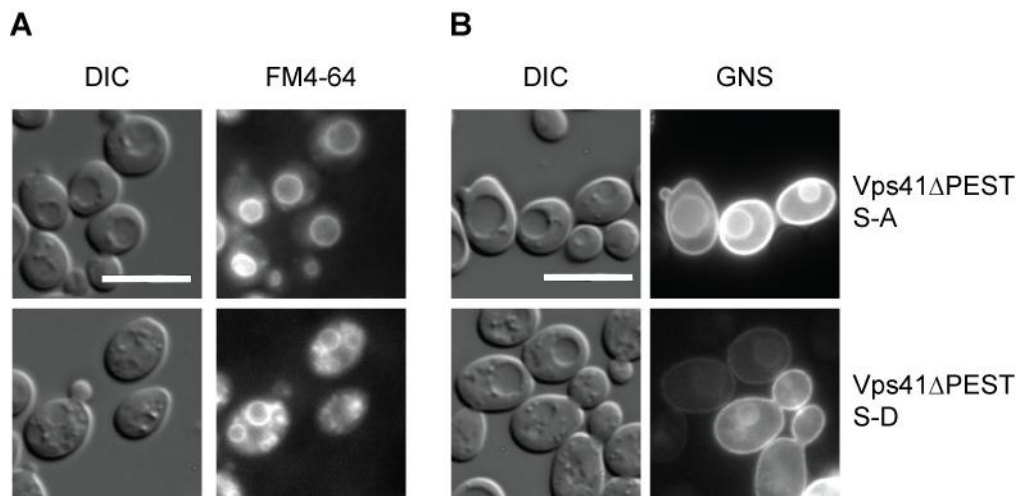
**Abb. 3.12: Phosphorylierung von Vps41 durch Inkubation mit Wildtyp-Vakuolen**

Der Vps41-Phosphorylierungstest wurde wie in Abb. 3.11 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden die Vakuolen auf eine Konzentration von 0,8 mg/ml verdünnt und je 50 µl in einen Test eingesetzt. Neben den Vakuolen, auf denen sich kein Yck3 befindet ( $\Delta$ PEST und *yck3* $\Delta$ ) wurden in jeden Ansatz auch Vakuolen aus Wildtyp-Zellen eingesetzt. Die Immunodetektion nach Western-Blot erfolgte mit einem Vps41-Antikörper.

#### 3.4.5 Mutationen in den Phosphorylierungsstellen von Vps41 haben keinen Effekt auf den Vps41 $\Delta$ PEST Phänotyp

Um die fehlende Phosphorylierung des Vps41 $\Delta$ PEST als Grund für den Defekt im ALP-Weg auszuschließen, wurde die Deletion der PEST-Domäne mit Punktmutationen im Vps41 kombiniert, die einer nicht phosphorylierbaren (Vps41 S-A) bzw. phosphomimetischen Version (Vps41 S-D) des Proteins entsprechen (Cabrera *et al.*, 2009).

Eine Färbung mit dem lipophilen Farbstoff FM 4-64 zeigte, dass die Vakuolen in Vps41 $\Delta$ PEST S-A Zellen nicht beeinträchtigt sind. Die Vakuole in Vps41 $\Delta$ PEST S-D Zellen zerfiel zu mehreren kleinen Vakuolen, wie auch für die Vps41 S-D Mutante beschrieben (Abb. 3.13A). Das GFP-Signal des ALP-Reporterproteins GNS (Abb. 3.13B) war auf der Plasmamembran und der Vakuole zu sehen, was auf einen Defekt im ALP-Weg hindeutet. Die fehlende Phosphorylierung von Vps41 $\Delta$ PEST scheint also nicht Grund für den Defekt im ALP-Weg zu sein.



**Abb 3.13: Mutationen in den Phosphorylierungsstellen von Vps41 $\Delta$ PEST**

(A) Aufnahmen der Fluoreszenz des lipophilen Farbstoffs FM 4-64 zur Färbung der Vakuolenmembran. Der Farbstoff wurde für 150 ms angeregt.

(B) GFP-Signal des Reporterproteins GFP-Nyv1-Snc1TMD zum Test der Funktionalität des ALP-Weges. Das GFP wurde für 500 ms angeregt.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

3.4.6 Mutationen der Phosphorylierungsstellen im Vps41 haben keinen Einfluss auf die Interaktion mit Apl5

Die Interaktion zwischen Apl5 und Vps41 konnte bereits *in vitro* nachgewiesen werden (Rehling *et al.*, 1999) Um den Einfluss der Phosphorylierung im Vps41 auf diese Interaktion zu testen, wurden Hefelysate aus Wildtyp, Vps41 S-A und Vps41 S-D Stämmen über immobilisiertes GST-Apl5-*ear* gegeben. Im Eluat konnte spezifisch an GST-Apl5-*ear* gebundenes Vps41 durch Immunodetektion nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Die Kontrolle mit immobilisiertem GST wies keine unspezifische Bindung von Vps41 auf.



**Abb. 3.14: Vps41 bindet *in vitro* unabhängig von der Phosphorylierung an Apl5**

Hefelysate aus Wildtyp- (wt), Vps41 S-A (S-A) und Vps41 S-D (S-D) (entsprechend einem Äquivalent von 100 OD<sub>600</sub> Zellen) wurden für eine Stunde bei 4°C mit immobilisiertem GST oder GST-Apl5-*ear* (je 200 µg) inkubiert, mehrfach gewaschen und das gebundene Material anschließend durch Aufkochen in SDS-Ladepuffer eluiert. Ein Aliquot der Lysate (load; 1%) und die Eluate (100%) wurden auf ein 7,5% SDS-Gel aufgetragen und nach Western-Blot mit einem Vps41-Antikörper dekoriert.

### **3.5 Auswirkung der PEST-Deletion auf den AP-3 Komplex**

Da im Vps41ΔPEST Stamm der ALP-Weg defekt ist, sollte neben den Auswirkungen dieser Deletion auf zelluläre Prozesse in Zusammenhang mit Vps41, wie sie bislang betrachtet wurden, auch der Defekt des ALP-Weges näher charakterisiert werden.

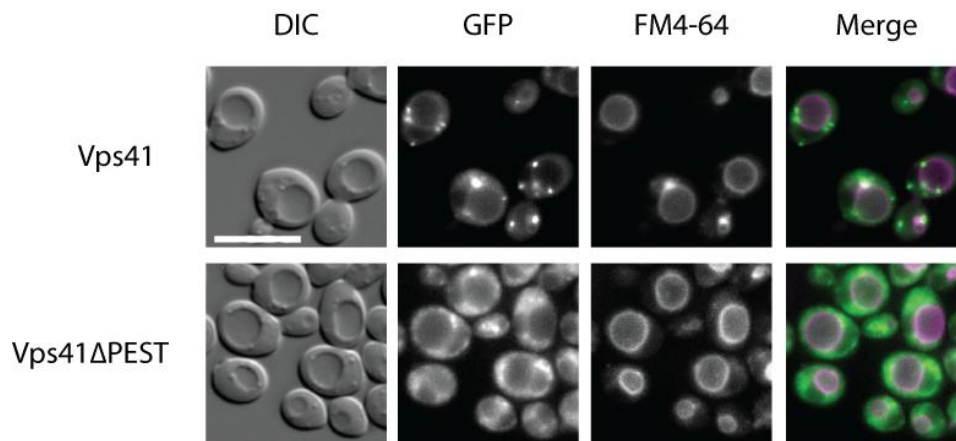
#### **3.5.1 Die Lokalisation von Apl5 ist im Vps41ΔPEST Stamm verändert**

Die Lokalisation von Apl5 konnte durch die Fusion mit GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Zur Verdeutlichung der Lokalisation wurde die vakuoläre Membran durch Färbung der Zellen mit FM 4-64 sichtbar gemacht.

In Zellen eines Wildtyp-Stammes befand sich das Apl5-GFP-Signal in mehreren punktförmig erscheinenden Strukturen in der Zelle verteilt. In einigen dieser Punkte überlappten das GFP- und das FM 4-64-Signal. Das Cytosol wies ebenfalls eine geringe Färbung durch GFP auf (Abb. 3.15, obere Reihe). In Zellen des Vps41ΔPEST-Stammes war keine Co-Lokalisation der beiden Fluoreszenzsignale mehr erkennbar. Das Apl5-GFP-Signal war über das gesamte Cytosol ungleichmäßig verteilt, an einigen Stellen schien eine Akkumulation von Apl5-GFP aufzutreten (Abb. 3.15, untere Reihe).

---

Diese Verteilung ließ auf einen Verlust der Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 $\Delta$ PEST schließen, da die im Wildtyp beobachteten Signal an der Vakuole nicht mehr zu beobachten waren.



**Abb. 3.15: Lokalisation von Apl5-GFP in Vps41-Wildtyp und - $\Delta$ PEST**

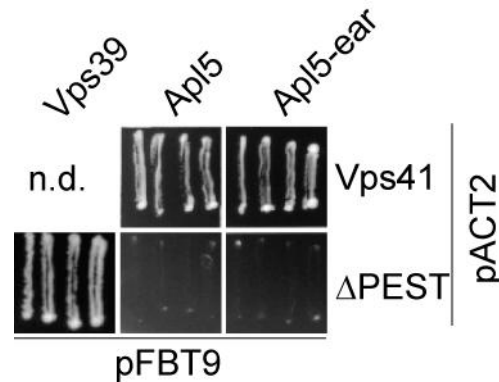
Aufnahmen der Apl5-GFP- und FM 4-64-Fluoreszenz in den beiden angegebenen Stämmen nach Anregung im Mikroskop für 3000 ms bzw. 150 ms.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

### 3.5.2 Die PEST-Domäne wird für Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 benötigt

Die Interaktion zwischen Apl5 und Vps41 wurde durch Untersuchungen mit dem Hefe-2-Hybrid-System überprüft. Abbildung 3.16 zeigt ein Foto der SDC –Ade –Leu – Trp –His-Platten (QDO-Platten), auf denen die geprüften Klone nur wachsen konnten, wenn beide Proteine miteinander interagierten. Die Zellen wuchsen auf dieser Platte, wenn Vps41 entweder mit dem Vollängen Apl5 oder mit der Apl5-*ear*-Domäne kombiniert wurde. Weder die Kombination von Vps41 $\Delta$ PEST mit Apl5 noch die mit der Apl5-*ear*-Domäne ermöglichten ein Wachstum der Zellen. Auf den nicht gezeigten Kontrollplatten (SDC –Trp –Leu) wuchsen diese Klone. Zur Kontrolle der Funktionalität des Vps41 $\Delta$ PEST-Konstrukts wurde dieses mit der HOPS-Untereinheit Vps39 kombiniert. Die Kombination dieser beiden Proteine ermöglichte das Wachstum der Zellen auf der QDO-Platte. Die Notwendigkeit der PEST-Domäne im

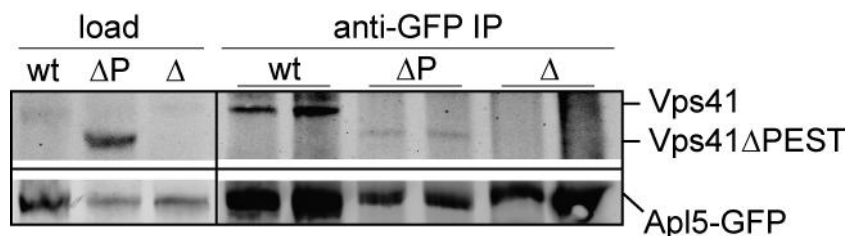
Vps41 für die Wechselwirkung mit Apl5 bestätigte sich auch in den Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen.



**Abb. 3.16: Hefe-2-Hybrid-Untersuchung zur Vps41-Apl5-Wechselwirkung**

Je vier Klone des Stammes PJ69-4A, der mit der angegebenen Kombination aus pACT2- und pFBT9-Plasmiden transformiert wurde, wurden sequentiell auf SDC –Ade –Leu –Trp –His-Platten (QDO-Platten) und auf SDC –Trp –Leu Platten (DDO-Platten) ausgestrichen und für drei Tage bei 30°C inkubiert. Die Zellen können auf den QDO-Platten nur wachsen, wenn die beiden zu testenden Proteine miteinander interagieren, die DDO-Platten dienen zur Kontrolle und sind hier nicht gezeigt.

Für die Bestätigung der im Hefe-2-Hybrid-System gewonnen Erkenntnisse in der *in vivo* Situation wurde aus den in Kapitel 3.5.1 vorgestellten Stämmen mit Apl5-GFP in Wildtyp- bzw. Vps41ΔPEST-Hintergrund eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Im Vps41-Wildtypstamm konnte mit Apl5-GFP ebenfalls Vps41 aufgereinigt werden. Im Vps41ΔPEST- und *vps41*Δ-Stamm eluierte kein Vps41 zusammen mit Apl5-GFP (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Co-Immunopräzipitation zeigt Notwendigkeit der PEST-Domäne**

Hefelysate aus dem Wildtyp- (wt), dem Vps41ΔPEST (ΔP) und dem *vps41*Δ-Stamm (Δ), in denen Apl5 mit GFP fusioniert ist, wurden auf eine Säule mit gekoppelten GFP-Antikörpern gegeben. Diese Säule wurde mehrfach gewaschen und die gebundenen Proteine durch einen pH-Sprung (Zugabe von 2x 200µl Glycin, pH = 2,6) eluiert. Die

---

Proteine wurden gefällt und zusammen mit einem Aliquot des Lysates (load) über SDS-PAGE und Western-Blot weiter verarbeitet. Die Membran wurde zum Nachweis von Vps41 und Apl5 mit entsprechenden Antikörpern inkubiert.

### 3.5.3 Vps41 interagiert über ein Di-Leucin-Sortierungssignal mit Apl5

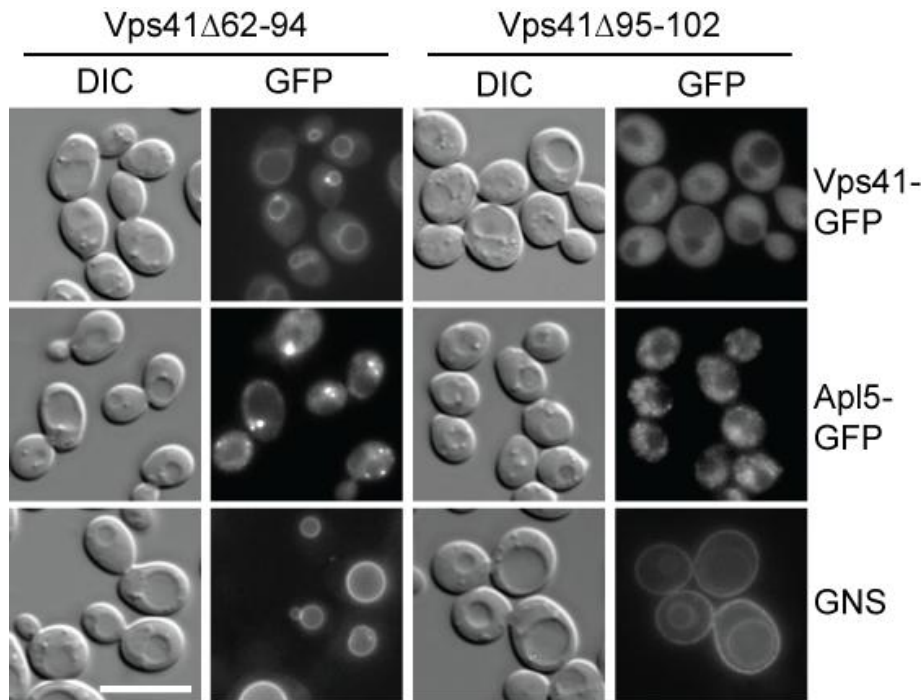
Eine genauere Betrachtung der Sequenz der PEST-Domäne im Vps41 zeigt, dass die Aminosäurereste 62-94 einer stark negativ geladenen Domäne entsprechen und die Aminosäurereste 95-102 Ähnlichkeit zu einem Di-Leucin-Sortierungssignal aufweisen.

Nach Deletion der Aminosäurereste 62-94 zeigte sich im Fluoreszenzmikroskop eine Vps41-GFP-Lokalisation an der Membran der Vakuole und ein leichter cytosolischer Hintergrund (Abb. 3.18). Auch ein Teil des Apl5-GFP befand sich im Cytosol, ein wesentlicher Teil war aber in Punkten zu erkennen. Zusätzlich war ein GFP-Signal im Cytosol zu erkennen. Das ALP-Reporterprotein GNS war auf der Membran der Vakuole zu sehen.

Die Deletion der Aminosäurereste 95-102 führte zu einer Lokalisation des Vps41-GFP Signals im Cytosol. Das Apl5-GFP zeigte ein punkartiges, diffus im Cytosol verteiltes Signal. Das GFP-Signal des Fusionsproteins GNS war auf der Plasmamembran und der vakuolären Membran zu sehen. Der Phänotyp dieser Mutante entsprach somit, im Gegensatz zu dem der Vps41 $\Delta$ 62-94-Zellen, dem Phänotyp der Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen.

Hieraus lässt sich folgern, dass die Aminosäuren 95-102 das minimale Motiv für die Wechselwirkung zwischen Vps41 und Apl5 darstellen, da hier der gleiche Phänotyp zu beobachten ist wie in Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen. Die Zellen der Mutante Vps41 $\Delta$ 62-94 zeigen in den untersuchten Fällen keinen auffälligen Phänotyp, hier scheint keine Beeinflussung der Interaktion zwischen Vps41 und Apl5 aufzutreten.





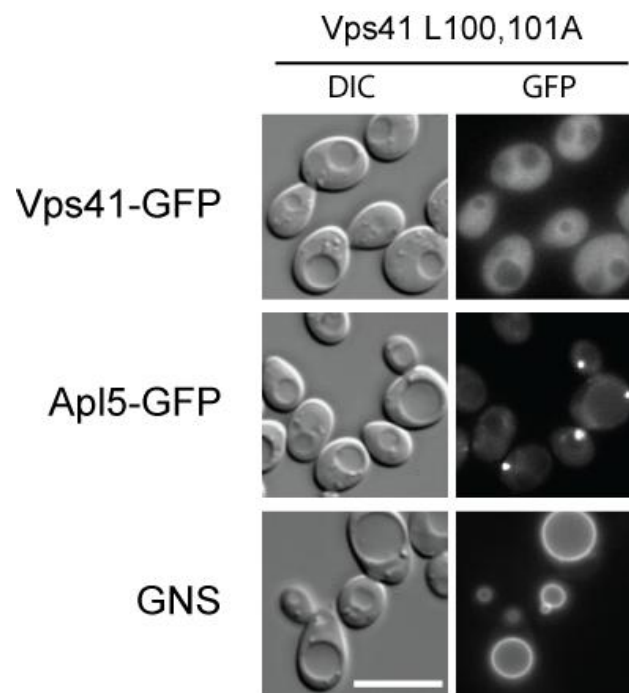
**Abb 3.18: Der minimale Bereich in Vps41 für die Wechselwirkung mit Apl5 sind die Aminosäuren 95-102**

Die Stämme Vps41 $\Delta$ 62-94 und Vps41 $\Delta$ 95-102 wurden mit einem GFP am C-Terminus von Vps41 oder Apl5 versehen bzw. mit dem Plasmid für das Reporterprotein GNS transformiert. Die Signale der einzelnen GFP-Fusionsproteine wurden im Fluoreszenzmikroskop nach Anregung für 1500 ms, 2000 ms bzw. 500 ms detektiert.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

Zum Nachweis, ob es sich bei den Aminosäureresten 95-102 im Vps41 um ein Di-Leucin- Sortierungssignal handelt, wurden durch Einfügen von Punktmutationen im Gen des Vps41 die beiden für dieses Signal essentiellen Leucine in Alanine getauscht. Zur Charakterisierung der Mutante wurden auch hier die Lokalisation von Vps41 und Apl5 anhand des GFP-Signals eines Fusionsproteins im Fluoreszenzmikroskop bestimmt (Abb. 3.19) Die Vps41-L100,101A-Mutante lokalisierte im Cytosol, vergleichbar mit der Vps41 $\Delta$ 95-102 Mutante. Das Signal für Apl5-GFP war nur leicht im Cytosol zu erkennen, der größte Teil des Apl5 schien in einem Punkt an der Vakuole zu akkumulieren. Das GNS-Reporterprotein, markiert durch GFP, war lediglich auf der Membran der Vakuole zu erkennen.

Die Aminosäuren 95-102 in Vps41 stellen anscheinend kein klassisches Di-Leucin-Sortierungssignal dar, da die Mutation des Leucins 100 und 101 in Alanin zwar die Lokalisation von Vps41-GFP beeinträchtigt, aber der ALP-Weg nicht beeinflusst zu sein scheint. Die Verteilung des Apl5-GFP ist anders als in der Vps41 $\Delta$ 95-102-Mutante. Die Akkumulation von Apl5-GFP deutet mehr auf eine Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 an der Vakuole hin, statt, wie man es im Falle eines klassischen Sortierungssignals erwartet hätte, auf eine Schwächung.



**Abb. 3.19: Mutation der Leucine in der Sortierungssignal-ähnlichen Sequenz**

Im Stamm Vps41 L100,101A, in dem die beiden essentiellen Leucine des putativen Sortierungssignals mutiert sind, wurde die Lokalisation von Vps41 bzw. Apl5 durch einen C-terminalen GFP-tag im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die Funktionalität des ALP-Weges wurde mit Hilfe der Lokalisation des GNS-Fusionsprotein getestet.

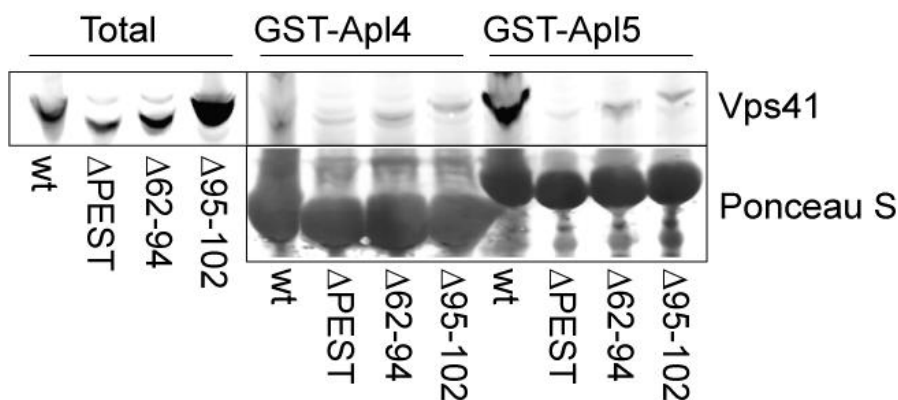
Größenbalken = 10  $\mu$ m

3.5.4 Die gesamte Vps41-PEST-Domäne ist notwendig für die Interaktion mit Apl5 *in vitro*

Die Interaktion zwischen Apl5 und dem Vps41-Wildtyp, Vps41 $\Delta$ PEST, Vps41 $\Delta$ 62-94 und Vps41 $\Delta$ 95-102 sollte *in vitro* nachgewiesen werden. Hierzu wurde die *ear-*

Domäne von Apl5 und zur Kontrolle die von Apl4, dem Homolog aus dem AP-1 Komplex, in *E. coli* als GST-Fusionsprotein heterolog exprimiert. Das GST-Fusionsprotein wurde an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit Hefelysate aus den vier angegebenen Stämmen inkubiert (Abb. 3.20). Die an GST-Apl5 bzw. -Apl4 gebundenen Proteine wurden eluiert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western-Blot immunologisch nachgewiesen. Die Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S zeigt, dass in allen Fällen die gleiche Menge an GST-Apl5 bzw. -Apl4 in dem Experiment eingesetzt wurde. Nach Immunodetektion des Vps41 zeigte sich, dass es keine unspezifische Bindung an GST-Apl4 gab. An GST-Apl5 hat nur Vps41-Wildtyp gebunden, die drei Formen des Proteins mit den Deletionen zeigten keine Bindung.

Hier zeigt sich, dass für die Wechselwirkung zwischen Vps41 und Apl5 *in vitro* die gesamte PEST-Domäne gebraucht wird. Anders als in der *in vivo* Situation, in der anscheinend der Bereich zwischen den Aminosäuren 95-102 notwendig zu sein scheint. Dies könnte auf einen dritten Interaktionspartner in der Bindung von AP-3-Vesikeln an die Vakuole hindeuten, der das Fehlen der Aminosäuren 62-94 von Vps41 *in vivo* ausgleichen kann.



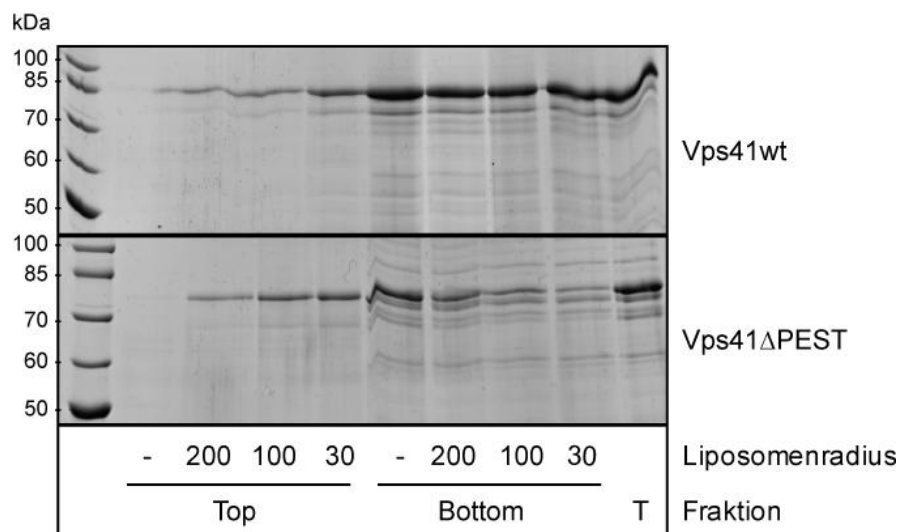
**Abb 3.20: Nur Vps41-Wildtyp interagiert mit GST-Apl5-ear *in vitro***

Zur Untersuchung der Interaktion von Apl5 bzw. Apl4 mit verschiedenen Mutanten von Vps41 wurden 200 µg des GST-Fusionsproteins an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit Hefelysate (entsprechend einem Äquivalent von 100 OD<sub>600</sub>) der Stämme Vps41, Vps41ΔPEST, Vps41Δ62-94 oder Vps41Δ95-102 für eine Stunde bei 4°C inkubiert, mehrfach gewaschen und anschließend durch Inkubation in SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95°C eluiert. Ein Äquivalent von 1 OD<sub>600</sub> des Hefelysats wurde als Ladekontrolle (Total) aufgetragen. Das Eluat und die Ladekontrolle wurden nach Western-Blot mit Ponceau S gefärbt um die Menge an GST-Fusionsprotein zu kontrollieren und anschließend mit Antikörper gegen Vps41 dekoriert.

### 3.6 Membranbindung von Vps41

#### 3.6.1 Vps41 Bindung an kleine Liposomen ist nicht beeinträchtigt in Vps41 $\Delta$ PEST

Vps41 zeigt eine Bindung an Liposomen, die abhängig von der Membrankrümmung ist. Um die Funktionalität dieser Membranbindung in der Vps41 $\Delta$ PEST Mutante zu überprüfen, wurde die N-terminale Hälfte (Aminosäuren 1-484) von Vps41 und Vps41 $\Delta$ PEST heterolog in *E. coli* exprimiert. Diese Proteine wurden mit Liposomen verschiedener, definierter Zusammensetzung und Radien (200 nm, 100 nm und 30 nm) inkubiert und in einer Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. An die Liposomen gebundene Proteine waren in der oberen Fraktion (*Top*) zu finden, nicht gebundene in der unteren Fraktion (*Bottom*). Sowohl die Menge an Vps41-Wildtyp als auch die an Vps41 $\Delta$ PEST nimmt in der *Top*-Fraktion mit abnehmendem Radius der Liposomen zu und in der *Bottom*-Fraktion ab (Abb 3.21). Die Fähigkeit von Vps41 an stark gekrümmte Membranen zu binden, wird also nicht durch die Deletion der PEST-Domäne beeinträchtigt.



**Abb. 3.21: Krümmungsabhängige Bindung von Vps41 an Liposomen**

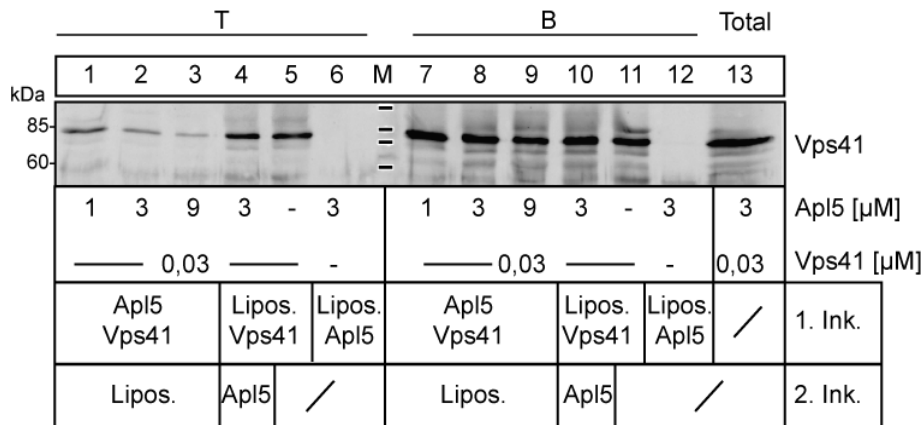
Liposomen verschiedener, definierter Radien (200 nm, 100 nm, 30 nm) wurden mit 0,75  $\mu$ M rekombinant hergestelltem Vps41 oder Vps41 $\Delta$ PEST (je die N-terminale Hälfte) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Als Kontrolle wurden in einem Ansatz die Liposomen nicht zugegeben (-). Sowohl die oberen Fraktionen (*Top*) mit den Liposomen und daran gebundenem Protein, als auch die unteren Fraktionen (*Bottom*) mit dem nicht gebundenem Protein wurden gesammelt, die Proteine mit TCA gefällt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Spur T zeigt alle in den Ansätzen zugegebenen Proteine.

---

### 3.6.2 Kompetitive Bindung zwischen Apl5 und Liposomen an Vps41

Um nachzuweisen, ob die Bindungen von Apl5 und Liposomen an Vps41 kompetitiv ist, wurde Vps41 entweder erst mit Apl5 und anschließend mit Liposomen inkubiert oder umgekehrt. Durch eine ansteigende Menge an Apl5 sollte ein Mengeneffekt gezeigt werden. Nach den beiden Inkubationen wurde der Versuchsansatz wie oben beschrieben in einer Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt und die mit den Liposomen in die obere Fraktion flotierten Proteine gegen die nicht gebundenen Proteine aufgetragen (siehe Abb. 3.22). Die Menge des mit den Liposomen flotierten Vps41 nahm bei Erstinkubation mit Apl5 gegenüber der Erstinkubation mit Liposomen ab (vergleiche Spur 1 mit 4). Je mehr Apl5 in der Erstinkubation zugegeben wurde, desto weniger Vps41 war in der oberen Fraktion zu finden (Spur 1-3). Die Menge des flotierten Vps41 nach Inkubation erst mit Liposomen und anschließend mit Apl5 (Spur 4) war die gleiche wie nach Inkubation nur mit Liposomen ohne Apl5 im Ansatz (Spur 5). Ohne Vps41 im Ansatz war kein unspezifisches Signal in der oberen Fraktion in Höhe von Vps41 auf dem Gel zu erkennen (Spur 6). Die Menge an Vps41 in den unteren (*Bottom*) Fraktionen war in allen Ansätzen gleich stark.

Die Wechselwirkung von Vps41 mit Apl5 konkurriert demnach mit der Bindung von Vps41 an Liposomen. Dies bedeutet, dass Apl5 *in vivo* nicht mit Vps41 wechselwirken kann, solange das ALPS-Motiv in Vps41 an die stark gekrümmte Membran der Endosomen bindet. Erst wenn sich Vps41 auf der Vakuole befindet, wird das hier beschriebene Bindemotiv für Apl5 aufgrund der geänderten Membrankrümmung zugänglich.



**Abb. 3.22: Inhibition der Bindung von Vps41 an Liposomen durch Apl5**

Die heterolog expremierte N-terminale Hälfte von Vps41 (0,03  $\mu$ M) wurde entweder zuerst mit Apl5 in steigenden Mengen (1, 3, 9  $\mu$ M) und anschließend mit Liposomen (30 nm Radius) inkubiert (Spur 1-3), oder es wurde erst mit Liposomen und danach mit Apl5 (3  $\mu$ M) inkubiert (Spur 4). Zur Kontrolle wurden nur Vps41 (Spur 5) oder nur Apl5 (Spur 6) mit den Liposomen inkubiert. Nach der ersten (1. Ink.) und zweiten Inkubation (2. Ink.) für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Flotierung wie in Abb. 3.21 beschrieben durchgeführt und *Top* (T; Spur 1-6) und *Bottom*-Fraktionen (B; Spur 7-13), neben einer Ladekontrolle (Total) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Immunodetektion von Vps41 erfolgte nach Western-Blot.

### **3.7 Rettung des Phänotyps der PEST-Deletion**

Um die Frage zu klären, ob die PEST-Domäne nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend für die Funktionalität des ALP-Weges ist, wurden verschieden lange N-terminale Stücke von Vps41 durch homologe Rekombination als Fusionsprotein vor den N-Terminus von Vps39 gesetzt.

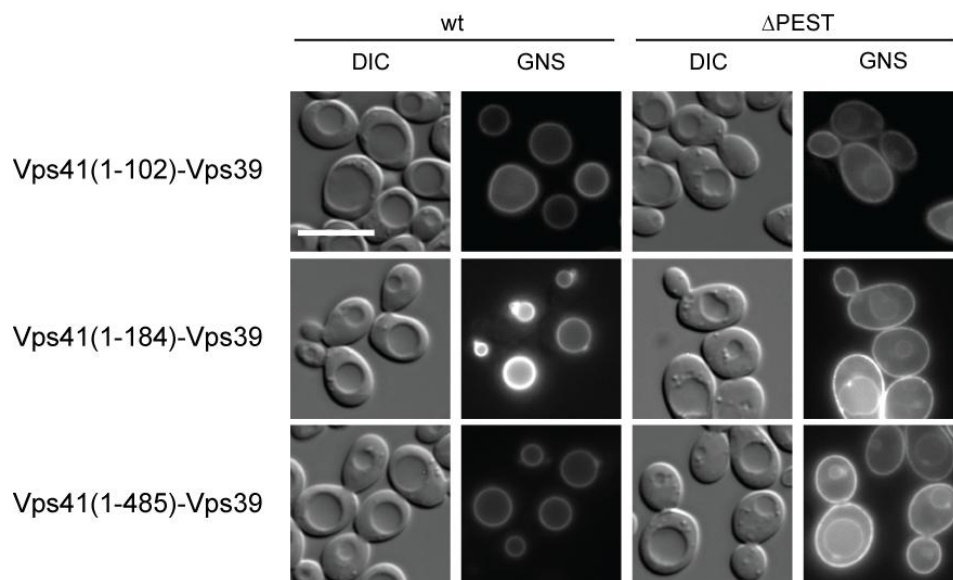
#### **3.7.1 Keine Suppression des Defekts im ALP-Weg durch Vps41-Vps39-Fusion**

Vor den N-Terminus von Vps39 wurden die ersten 102, 184 bzw. 485 Aminosäuren von Vps41 fusioniert. Die Funktionalität des ALP-Weges in diesen Stämmen wurde im Vps41-Wildtyp- und Vps41 $\Delta$ PEST-Hintergrund mit Hilfe des GNS Reporterproteins überprüft (Abb. 3.23). In den Stämmen mit einer Wildtyp-Kopie von Vps41 im Hintergrund lokalisierte das GNS an der Membran der Vakuole, in den

---

Stämmen mit Vps41 $\Delta$ PEST im Hintergrund war es auf der Plasmamembran und der Vakuole zu finden.

Auch wenn das Fusionsprotein im Wildtyphintergrund keinen Effekt zu haben scheint, so kann es nicht den Defekt des ALP-Weges in Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen ausgleichen. Dies deutet darauf hin, dass die PEST-Domäne notwendig für die Funktion von Vps41 im ALP-Weg ist. Entweder ist aber noch ein weiterer Faktor an der Aufnahme der AP-3-Vesikel beteiligt, oder das Vps41-Vps39-Fusionsprotein stellt die PEST-Domäne nicht an der richtigen Stelle zur Verfügung.



**Abb 3.23: Funktionalität des ALP-Weges in Stämmen mit Vps41-Vps39-Fusionsprotein**

Intrazelluläre Lokalisation des GFP-Signals von GFP-Nyv1-Snc1TMD im Fluoreszenzmikroskop nach Anregung für 500 ms. Gezeigt sind Wildtyp (wt) und Vps41 $\Delta$ PEST-Stämme ( $\Delta$ PEST), in denen verschieden lange Fragmente von Vps41 vor den N-Terminus von Vps39 fusioniert wurden.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

### 3.7.2 Keine Rettung der Apl5-Lokalisation durch die Fusion von Vps41 mit Vps39

Da die Bindestelle für Apl5 durch die Vps41-Vps39-Fusionsproteine wieder an der Vakuole verfügbar gemacht wurde, könnte die Fehllokalisierung von Apl5-GFP, die in Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen zu beobachten war, in diesen Stämmen nicht mehr auftreten. Um

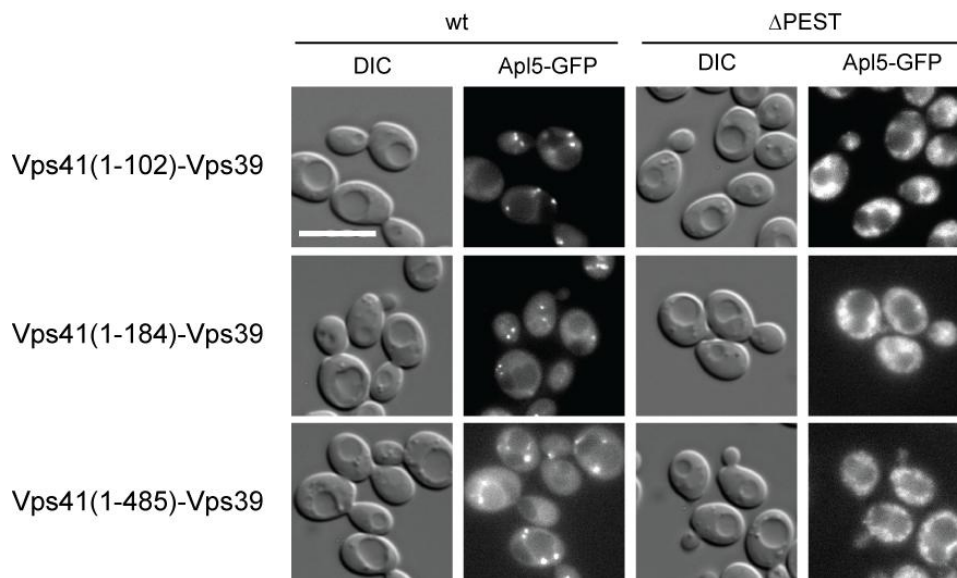
---

dies zu überprüfen, wurde die Lokalisation von Apl5-GFP in den bereits vorgestellten Stämmen mit den Vps41-Vps39-Fusionsproteinen überprüft.

Im Fluoreszenzmikroskop war zu erkennen (Abb. 3.24), dass das Signal für Apl5-GFP im Vps41-Wildtyp-Hintergrund wie in Zellen des Wildtyps lokalisiert war (siehe Abb. 3.15, obere Reihe).

Die Stämme mit Vps41 $\Delta$ PEST und Vps41-Vps39-Fusionsproteinen zeigten eine ähnlich diffuse Verteilung des Signals von Apl5-GFP wie der Vps41 $\Delta$ PEST-Stamm ohne Vps41-Vps39-Fusionsprotein (siehe Abb. 3.15, untere Reihe).

Die Lokalisation von Apl5-GFP wurde also in Stämmen mit Vps41-Wildtyp im Hintergrund nicht durch die Vps41-Vps39-Fusionsproteine geändert, man hätte erwarten können, dass mehr Apl5 an die Vakuole gezogen wird. Auch in den Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen mit den Fusionsproteinen fand keine Änderung der Lokalisation von Apl5-GFP im Vergleich zu Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen statt.



**Abb 3.24: Lokalisation von Apl5-GFP in Stämmen mit Vps41-Vps39-Fusionsproteinen**

Intrazelluläre Lokalisation des Apl5-GFP Signals im Fluoreszenzmikroskop nach Anregung für 3000 ms. Gezeigt sind Wildtyp (wt) und Vps41 $\Delta$ PEST ( $\Delta$ PEST) Stämme, in denen verschieden lange Fragmente von Vps41 vor den N-Terminus von Vps39 gesetzt wurden.

Größenbalken = 10  $\mu$ m



---

Die Untersuchungen der Vps41-Vps39-Fusionsproteine zeigte, dass die Position der PEST-Domäne im Vps41 und die des gesamten Proteins im zellulären Zusammenhang entscheidend ist für die Funktion des Proteins im ALP-Weg.

---

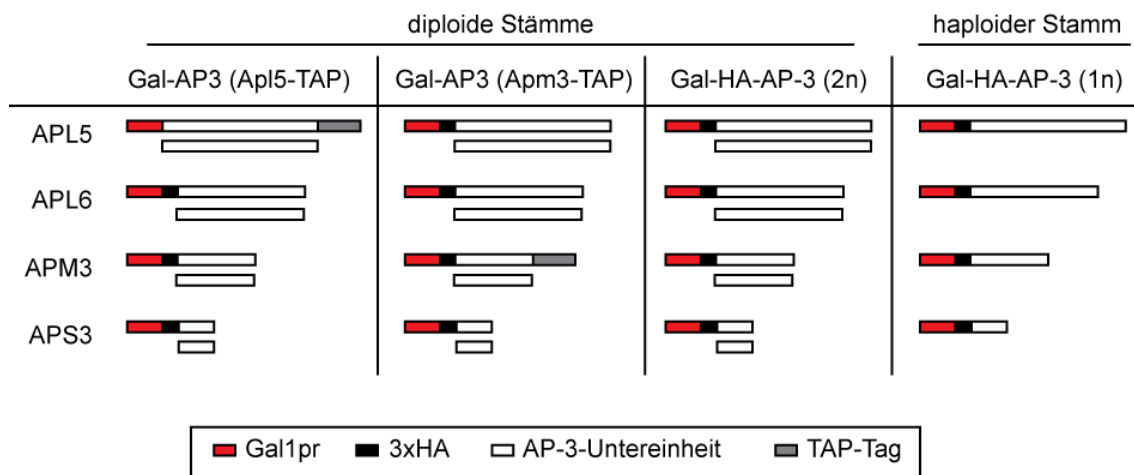
### **3.8 AP-3 Überproduktion**

Zur näheren Untersuchung des ALP-Weges sollte *in vitro* versucht werden, die Rekonstitution des Weges bzw. in einzelnen Schritten die Biogenese der AP-3-Vesikel und deren Fusion mit der Vakuole zu erreichen. Hierzu sollte durch eine Affinitätsaufreinigung der AP-3 Komplexes gewonnen werden. Um hierfür die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Expression der vier Untereinheiten des AP-3 Komplexes im Genom unter die Kontrolle eines durch Galaktose induzierbaren Promotors (GAL1-Promotor) gestellt. Hierzu wurden mehrere Hefestämme hergestellt. Eine Übersicht der hergestellten AP-3-Überproduktionsstämme gibt Abb. 3.25

In einem Stamm wurde *APL5* unter die Kontrolle eines GAL1-Promotors gestellt und C-terminal mit einem TAP-tag (*Tandem Affinity Purification-tag*) versehen. Ebenfalls wurde *APM3* unter die Kontrolle eines GAL1-Promotors gesetzt. In dem zweiten Hefestamm (BY 4732 *Mat a*) wurden die beiden Gene der AP-3 Untereinheiten *APL6* und *APS3* nacheinander unter die Kontrolle eines GAL1-Promotors gesetzt. Diese beiden Stämme wurden miteinander gekreuzt, so dass ein diploider Stamm entstand, in dem alle vier AP-3 Untereinheiten überproduziert sind. Neben der Überproduktion wurden alle Untereinheiten, außer *Apl5*, an ihrem N-Terminus mit einem 3x HA-tag fusioniert, um im Hefelysat die Expression nachweisen zu können. Dieser Stamm mit einem TAP-tag an *Apl5* wird als Gal-5T-AP3 abgekürzt.

Zur späteren Affinitätsaufreinigung des AP-3 Komplexes (siehe Kap. 3.8.3) wurde entweder, wie oben beschrieben *Apl5*, als eine der beiden großen Untereinheiten, oder auf dieselbe Weise *Apm3*, als eine der kleinen Untereinheiten, C-terminal mit einem TAP-tag (*Tandem Affinity Purification-tag*) fusioniert. Alle anderen Untereinheiten wurden N-terminal mit einem 3x HA-tag markiert.

Neben den AP-3 Überproduktionsstämmen mit TAP-tag an *Apl5* oder *Apm3* wurde ebenfalls noch ein diploider und ein haploider Stamm hergestellt, in denen die Expression aller vier Untereinheiten des AP-3 Komplexes unter der Kontrolle des GAL1-Promotors stehen und N-terminal einen 3x HA-tag tragen. Im diploiden Stamm ist von jedem Gen der Untereinheiten noch ein zweites Wildtyp-Allel vorhanden, das unter der Kontrolle des endogenen Promotors steht.



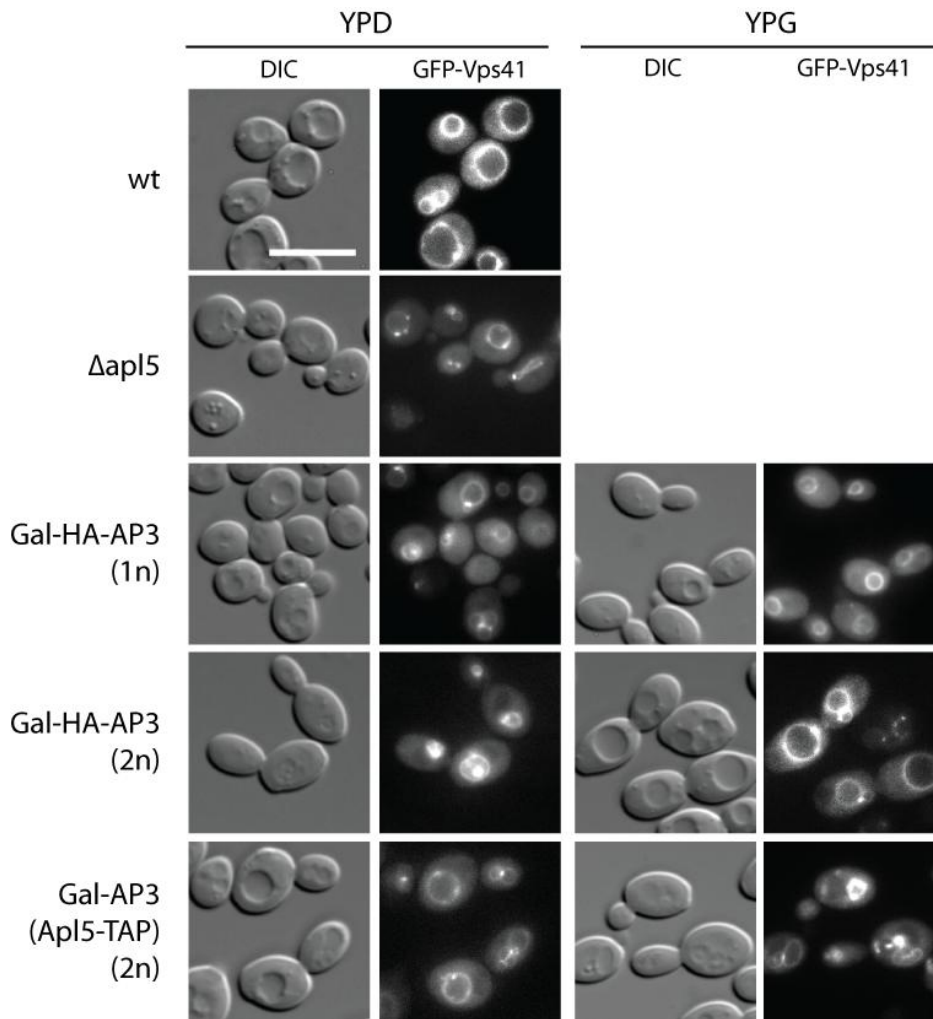
**Abb. 3.25: Übersicht über die hergestellten AP-3-Überproduktionsstämme**

Es wurden vier AP-3-Überproduktionsstämme hergestellt. Die Expression der Gene der einzelnen Untereinheiten wurde unter die Kontrolle eines, durch homologe Rekombination eingefügten Gal1-Promotors gestellt. Zusätzlich wurden ebenso Fusionsproteine zwischen den AP-3-Untereinheiten und 3xHA-tags bzw. einem TAP-tag hergestellt. In den drei diploiden Stämmen liegen zudem unveränderte Kopien der Gene vor.

### 3.8.1 Lokalisation von Vps41 in Gal-AP3 Stämmen

Um die Frage zu beantworten, ob die Überproduktion des AP-3 Komplexes einen Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation von Vps41 hat, wurde ein GFP vor den N-Terminus dieses Proteins fusioniert (Abb. 3.26). Im Wildtyp lokalisierte GFP-Vps41 gleichmäßig verteilt auf der Membran der Vakuole und zum Teil im Cytosol. Im *apl5Δ* Stamm bildeten sich an der Vakuole kleine Punkte in denen das GFP-Vps41 Signal stärker erschien, der cytosolische Anteil blieb aber erhalten. Derselbe Phänotyp war in den AP-3 Überproduktionsstämmen nach Anzucht in glukosehaltigem Medium, also ohne Expression des AP-3 Komplex zu beobachten. Nach Induktion der Gal1-Promotoren und Expression des AP-3 Komplexes in diesen Stämmen lokalisierte GFP-Vps41 wie im Wildtyp.

Eine Beeinflussung der Lokalisation von Vps41 in Zellen in denen der AP-3-Komplex überproduziert wurde, ließ sich nicht feststellen.



**Abb. 3.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Vps41 Stämmen**

Die angegebenen Stämme mit einem N-terminalem GFP am Vps41 wurden in glukose- (YPD) oder galaktosehaltigem Medium (YPG) angezogen. Das GFP-Vps41 wurde für 1500 ms im Fluoreszenzmikroskop angeregt und die Emission anschließend detektiert.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

### 3.8.2 Co-Immunpräzipitation des AP-3 Komplex durch Vps41

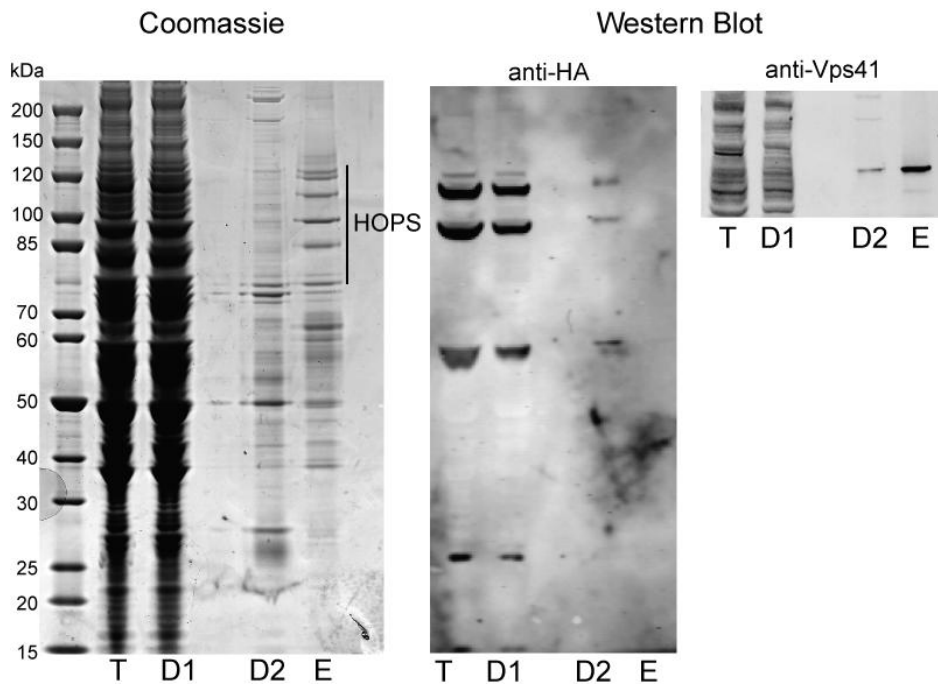
Um die Wechselwirkung zwischen dem AP-3 Komplex und Vps41 zu zeigen, wurde dieses Protein C-terminal mit einem TAP-tag fusioniert und zwar in einem Stamm mit Apl6 und Aps3 unter Kontrolle des Gal1-Promotors. Dieser Stamm wurde mit einem Stamm gepaart, in dem Apl5 und Apm3 unter der Kontrolle des Gal1-Promotors

---

stehen. Alle vier Untereinheiten des AP-3 Komplexes sind mit einem 3x HA-tag markiert.

Der diploide Stamm wurde in YPG-Medium angezogen, so dass der AP-3 Komplex exprimiert wurde. Die Zellen wurden lysiert und nach Protokoll der TAP-Aufreinigung weiter verarbeitet (Abb. 3.27). Ein Aliquot des Lysates (T), des Durchlaufes der IgG-Sepharose-Säule (D1), des Durchlaufes der Calmodulin-Säule (D2) und das Eluat von dieser Säule wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel mit Coomassie-Blau angefärbt. Zu erkennen war hier der HOPS-*Tethering*-Komplex, der mit Vps41-TAP co-immunopräzipitiert. Um den AP-3 Komplex nachzuweisen, wurde ein Aliquot der Proben in einem Western-Blot weiter verarbeitet und die 3x HA-tags an den Untereinheiten des AP-3 Komplexes immunodetektiert. Im Lysat und im Durchlauf der IgG-Sepharose war der Hauptteil des Komplexes zu finden, ein kleiner Teil band an die IgG-Sepharose, wurde durch den Schnitt mit der TEV-Protease eluiert und befand sich anschließend im Durchlauf der Calmodulin-Säule. Im Eluat dieser zweiten Aufreinigungssäule wurde keine der Untereinheiten des AP-3 Komplexes detektiert.

Die Interaktion von Vps41 mit dem AP-3-Komplex scheint nur schwach zu sein, da sie im zweiten Schritt der TAP-Aufreinigung verloren ging. Der AP-3-Komplex befand sich im Durchlauf, statt mit Vps41 zusammen an die Calmodulin-Sepharose zu binden. Diese Wechselwirkung ist demnach schwächer als die von Vps41 mit den anderen HOPS-Untereinheiten, welche bis zum letzten Reinigungsschritt an Vps41 assoziiert bleiben.



**Abb. 3.27: Co-Immunopräzipitation mit Vps41-TAP**

Der diploide Stamm BY Gal-HA-AP3 Vps41-TAP wurde in YPG-Medium angezogen, lysiert und erst über eine IgG-Sepharose-Säule aufgereinigt. Das TEV-Eluat wurde anschließend weiter über eine Calmodulin-Sepharose Säule gegeben. 0,01% des Zellysates (T) und dieselbe Menge an Durchlauf der IgG-Sepharose (D1) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Für das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Gel wurden 75%, für den Western-Blot 25% des Durchlaufes (D2) und des Eluates (E) der Calmodulin-Sepharose aufgetragen. Die Immunodetektion des AP-3 Komplexes und von Vps41 erfolgte über spezifische Antikörper gegen die HA-tags bzw. gegen Vps41.

### 3.8.3 Aufreinigung des AP-3 Komplex

Eine Affinitätsaufreinigung des AP-3-Komplexes aus den Überproduktionsstämmen sollte für eine spätere Verwendung des Komplexes in *in vitro* Untersuchungen erfolgen. Hierzu wurden die oben beschriebenen zwei diploiden Stämme genutzt, bei denen die vier Untereinheit des AP-3 Komplexes unter der Kontrolle des Gal1-Promotors stehen und damit unter Wachstumsbedingungen mit Galaktose im Medium (YPG) überproduziert werden. In einem der Stämme wurde Apl5 (Gal-AP3 (Apl5-TAP)), in dem anderen Apm3 (Gal-AP3 (Apm3-TAP)) C-terminal mit einem TAP-tag versehen (siehe Abb. 3.25). Zum Vergleich wurde auch in Wildtypstämmen ohne Überproduktion ein TAP-tag an je eines der beiden Proteine fusioniert. In Stämmen

---

mit einer Deletion der für den ALP-Weg wichtigen Proteine Vps41 ( $\Delta vps41$ ) oder Vam3 ( $\Delta vam3$ ) wurde der TAP-tag an Apl5 fusioniert. Der Vergleich der Aufreinigung aus den verschiedenen Stämmen sollte zeigen, welcher sich besser für eine Aufreinigung im großen Maßstab eignet, als Nachweis des AP-3 Komplexes diente der immunologische Nachweis des Verbleibs der mit einem TAP-tag versehenen Untereinheit (Abb. 3.28).

Über die Methode der TAP-Aufreinigung konnte in allen Fällen durch eine Co-Immunopräzipitation mit Apl5 bzw. Apm3 der gesamte Adaptorproteinkomplex aus Hefelysat aufgereinigt werden. Die Elution des Proteins von der IgG-Sepharose-Säule erfolgte durch Proteolyse eines Teiles des TAP-tags durch die TEV-Protease an einer spezifischen Schnittstelle. Diese Prozessierung ließ sich durch einen Laufhöhenunterschied im SDS-Gel nachvollziehen. Nicht eluiertes Protein wurde anschließend unter denaturierenden Bedingungen (Zugabe von SDS-Ladepuffer und Inkubation bei 95°C für 5 Minuten) von der Säule eluiert. Die verschiedenen Zwischenstufen der Aufreinigung wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und nach Western-Blot immunologisch nachgewiesen (Abb. 3.28).

In der Aufreinigung aus dem Wildtyp Stamm über Apl5-TAP oder Apm3-TAP wurde die effizientere Bindung an die IgG-Sepharose erreicht, allerdings fand sich im Eluat (E1/E2) der Apl5-TAP Aufreinigung auch von der TEV-Protease ungeschnittenes Protein. Weiterhin befand sich auf der IgG-Sepharose sowohl ungeschnittenes als auch geschnittenes Protein, das nicht durch den proteolytischen Schnitt mit der TEV-Protease, sondern erst durch denaturierende Bedingung von der Säule eluierte (B).

In den Gal-AP3 Stämmen befand sich bei der Aufreinigung über Apl5-TAP kein ungeschnittenes Protein im TEV-Eluat, aber in der unter denaturierenden Bedingungen eluierten Fraktion (B) in derselben Menge wie geschnittenes Protein.

Die Aufreinigung des AP-3-Komplexes über Apm3-TAP aus dem Überproduktionsstamm war nicht effizient, da 90% des Proteins im Durchlauf zu finden waren, weiterhin eluierte von der Säule eine gleich große Menge an geschnittenem und ungeschnittenem Protein.

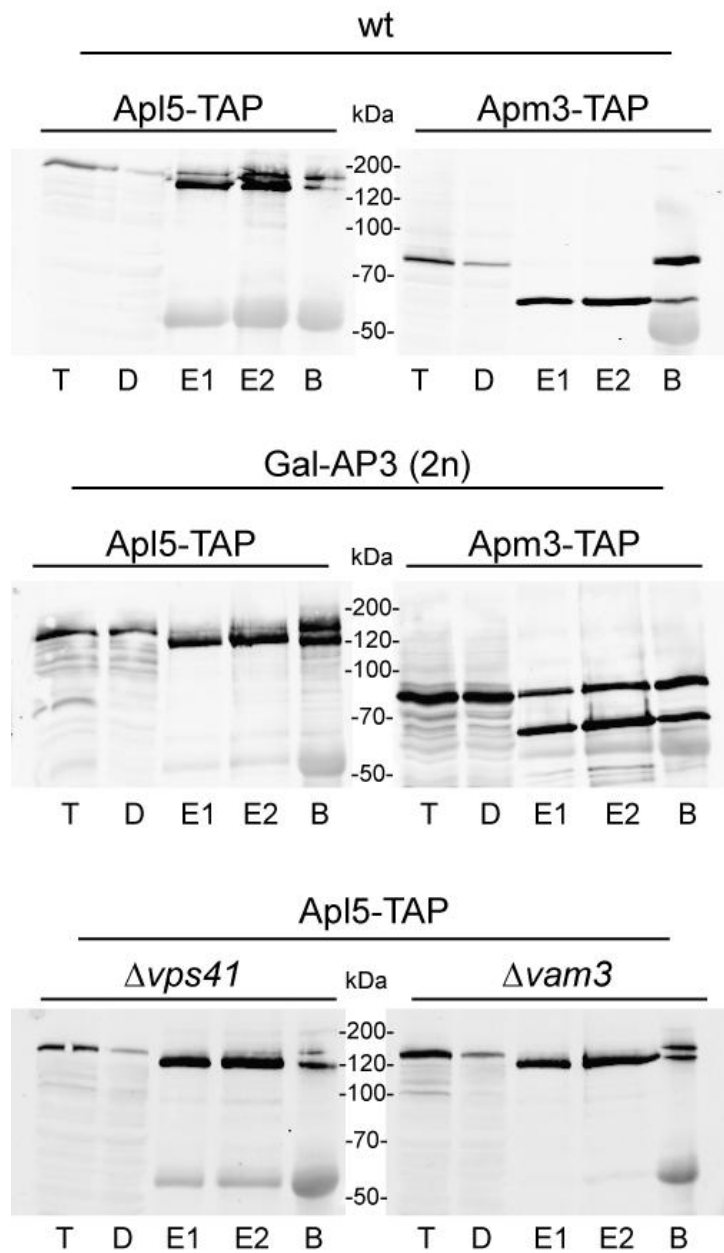
Die Aufreinigung aus dem  $\Delta vps41$  und  $\Delta vam3$  Stamm über Apl5-TAP zeigte in beiden Fällen eine gute Bindung an die IgG-Sepharose und auch in der Elution nach

---

Inkubation mit der TEV-Protease wurde nur proteolytisch geschnittenes Protein detektiert. Lediglich ein geringer Teil des Proteins, sowohl geschnittenes als auch ungeschnittenes, verblieb auf der Säule und eluierte erst unter denaturierenden Bedingungen.

Die Aufreinigung des AP-3-Komplexes aus allen Stämmen war nicht sehr effizient. Besonders fraglich blieb, warum in den beiden getesteten AP-3-Überproduktionsstämmen nur eine schlechte Bindung an die Aufreinigungsmatrix erreicht werden konnte und ein großer Teil des Proteins nicht durch die Restriktion mit der TEV-Protease eluiert werden konnte.





**Abb. 3.28: Aufreinigung des AP-3 Komplex durch Co-Immunopräzipitation**

Aufreinigung des AP-3 Komplexes durch Co-Immunopräzipitation mit Apl5- oder Apm3-TAP an IgG-Sepharose aus Wildtyp (wt) oder diploiden AP-3 Überproduktionsstämmen (Gal-AP3), sowie Apl5-TAP aus  $\Delta vps41$  oder  $\Delta vam3$  Stämmen.

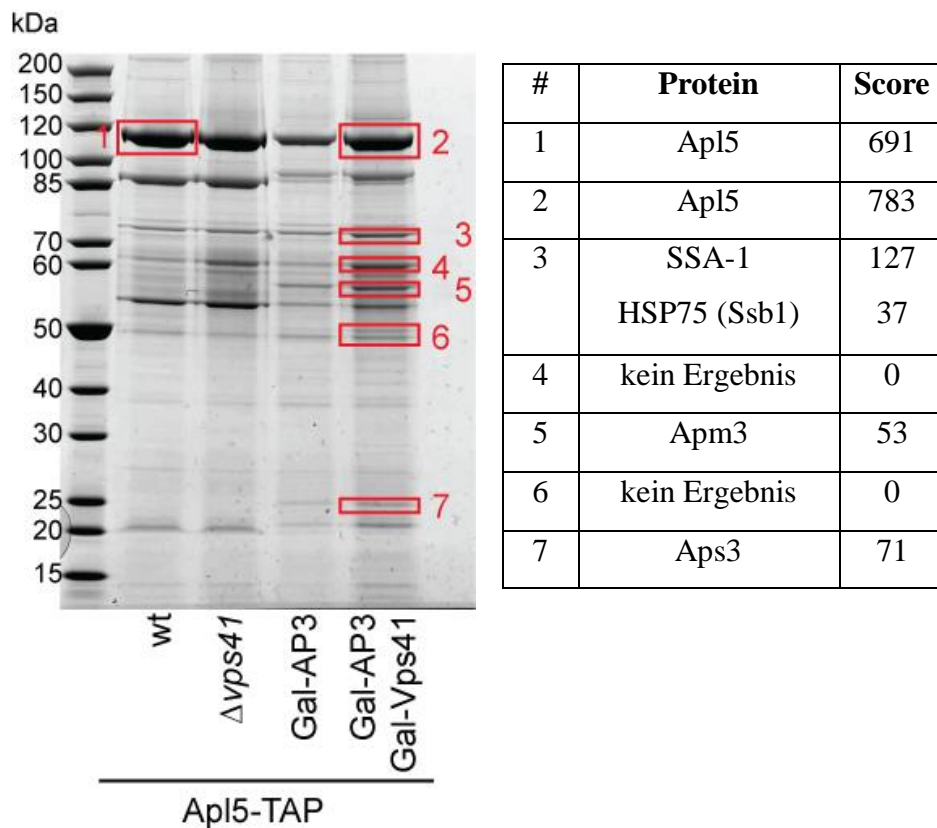
T - 0,5% des eingesetzten Hefelysats; D - 0,5% des Durchlaufs der IgG-Säule; E1/E2 - 25% bzw. 50% des Eluates von der IgG-Säule durch Schnitt des TAP-tags mit der TEV-Protease; B - 25% des nicht per TEV-Schnitt von der IgG-Säule eluierten Materials, das anschließend durch Inkubation mit SDS-Ladepuffer für 5 min eluiert wurde.

---

#### 3.8.4 Co-Immunopräzipitation mit dem AP-3 Komplex

Zur Bestimmung der Proteine, welche mit Apl5-TAP interagieren, wurde eine Co-Immunopräzipitation aus Hefelysaten eines Wildtyp, eines  $\Delta vps41$  und von Gal-AP3 Stämmen mit Vps41 unter Standard- oder Überexpressionsbedingungen durchgeführt. Die mit Hilfe der TEV-Protease von der IgG-Sepharose eluierten Proteinkomplexe wurden weiter über Calmodulin-Sepharose aufgereinigt, eluiert und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Anfärben der Proteine durch Coomassie-Blau wurden Banden, die nicht Untereinheiten des AP-3 Komplexes zugeordnet werden konnten aus dem Gel ausgeschnitten (Abb. 3.29). Anschließend wurden die Proteine durch eine massenspektrometrische Analyse identifiziert. Die Bande (1) wurde hierbei als Kontrolle genommen, da es sich hierbei sicher um Apl5-TAP handelte. Bande (2) wurde überprüft, da hier Apl5-TAP erwartet wurde, aber auch Vps41 in derselben Bande hätte vorhanden sein können, da dieses Protein etwa auf gleicher Höhe im Gel laufen sollte.

Die aus dem Gel ausgeschnittenen Banden konnten den in der Tabelle in Abbildung 3.29 aufgelisteten Proteinen zugeordnet werden, der Score gibt an, wie wahrscheinlich es sich hierbei um das angegebene Protein handelt, je höher die Zahl desto wahrscheinlicher das Ergebnis. Neben den Untereinheiten des AP-3 Komplexes (Banden #1, #2, #5, #7) und dem Chaperonen (Bande #3) konnte kein weiteres Protein identifiziert werden, das mit dem AP-3 Komplex interagiert.

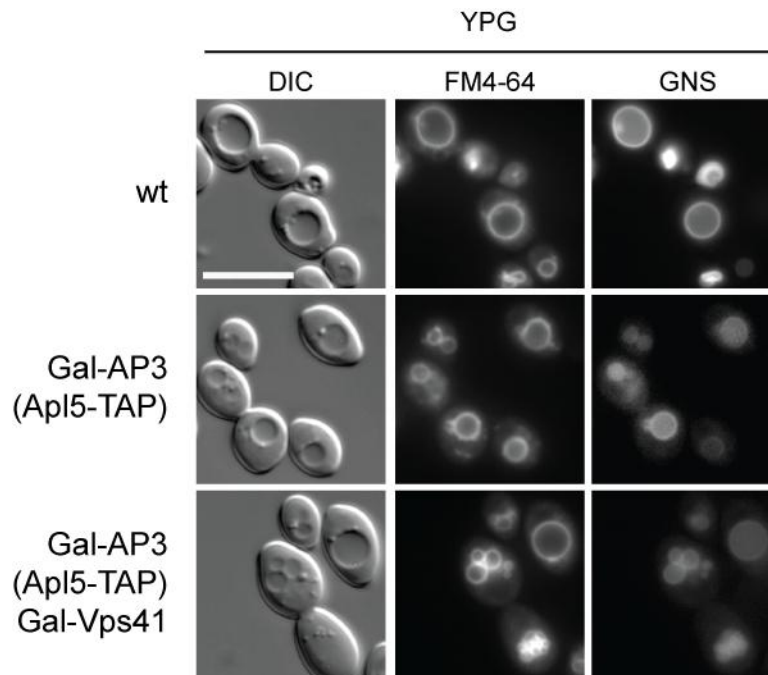


**Abb. 3.29: Co-Immunopräzipitation des AP-3 Komplex und massenspektrometrische Analyse.**

Die vollständige TAP-Aufreinigung aus Hefelysate, entsprechend einem Äquivalent von ungefähr 16000 OD<sub>600</sub> Zellen, wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Gezeigt ist das mit Coomassie-Blau gefärbte Gel mit den Eluaten (85%) der Calmodulin-Säule, aus dem die Proteinbanden für die Massenspektrometrische Analyse ausgeschnitten wurden (rote Kästen). Die Nummern neben den Kästen entsprechen der Zuordnung in Tabelle.

### 3.8.5 Funktionalität des überproduzierten AP-3-Komplexes

Die gleichzeitige Überproduktion der vier Untereinheiten des AP-3 Komplexes führte zu mehreren kleinen Vakuolen in jeder Zelle (*multilobed vacuoles*), anders als im Wildtyp, in dem nur eine große Vakuole zu sehen war. Die Vakuolen wurden durch den lipophilen Farbstoff FM4-64 im Mikroskop sichtbar gemacht, der sich in die Plasmamembran einlagert und über endocytotische Transportwege zur Vakuole transportiert wird. Das GFP-Signal des Reporterproteins GNS war auf der Membran der Vakuole zu sehen, was auf einen funktionalen ALP-Weg hindeutet (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30: Vakuolenmorphologie und Funktionalität des ALP-Weges in Gal-AP3 (Apl5-TAP) und Gal-AP3 (Apl5-TAP) Gal-Vps41**

Die angegebenen Stämme wurden mit dem Reporterprotein GFP-Nyv1-Snc1TMD (GNS) transformiert und mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 inkubiert. Die Anregungszeit für FM4-64 betrug 250ms, für GFP 500ms.

Größenbalken = 10µm

### 3.8.6 Rettung der Vakuolenmorphologie in Gal-AP3 durch Vps41-Überproduktion

Der Gal-5T-AP3 Stamm wurde als Hintergrundstamm genutzt, um zusätzlich zum AP-3 Komplex auch Vps41 unter der Kontrolle eines Gal1-Promotors zu exprimieren. Durch diese Überproduktion sollte die Vakuolenmorphologie des Gal-5T-AP3 Stammes gerettet werden, da die Menge dieses Proteins nicht ausreichend sein könnte, um unter AP-3 Überproduktionsbedingungen die Funktion im ALP-Weg (Darsow *et al.*, 2001) und in der homotypischen Vakuolenfusion als Untereinheit des HOPS-*Tethering*-Komplexes aufrecht zu erhalten. Die Anzahl der Vakuolen und deren Größe war aber nicht durch eine gleichzeitige Überproduktion von Vps41 zu retten (siehe Abb. 3.30).

In den diploiden Gal-AP3-Stämmen schien es bei Wachstum in YPG also keine Beeinträchtigung des ALP-Weges zu geben, wohl aber einen leichten Defekt in der

---

homotypischen Vakuolenfusion, der auch durch die gleichzeitige Überproduktion von Vps41 nicht behebbar war.

### 3.8.7 Subzelluläre Lokalisation des überproduzierten AP-3 Komplexes

Durch differentielle Zentrifugation von Lysaten aus BY Wildtyp, BY Gal-AP3 (Apl5-TAP) und BY Gal-AP3 (Apl5-TAP) Gal-Vps41 Zellen wurde die Lokalisation der Untereinheiten des AP-3 Komplexes bestimmt, um zu überprüfen, ob die Überproduktion und die TAP- und 3x HA-tags zu einer Veränderung der Lokalisation innerhalb der Zelle führten.

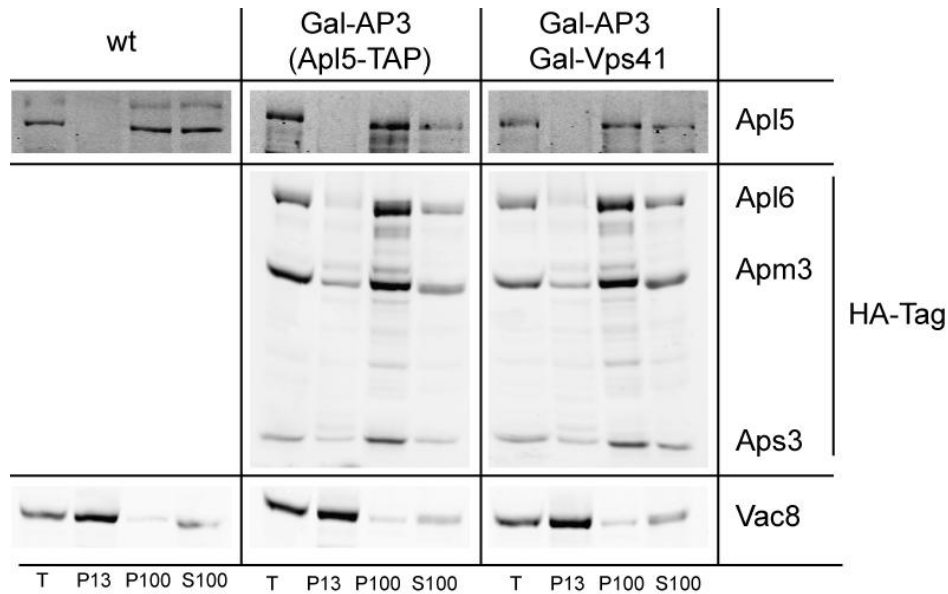
Abbildung 3.31 zeigt einen Western-Blot auf dem die Pelletfraktion (P13) nach einer 13.000x g Zentrifugation und die Pellet- (P100) und Überstandfraktion (S100) nach einer 100.000x g Zentrifugation von Lysaten aus den oben genannten Hefestämmen aufgetragen wurden. Auf dem Western-Blot sind die Proteine Apl5, und die HA-tags an den restlichen Untereinheiten des AP-3 Komplexes mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen worden. Als Kontrolle für die richtige Auftrennung der Fraktionen dient Vac8, das als vakuoläres Protein in der P13 Fraktion zu finden sein sollte.

Im Wildtyp war Apl5 in der P100- und S100-Fraktion zu gleichen Teilen zu finden. In den beiden Überproduktionsstämmen Gal-AP3 (Apl5-TAP) und Gal-AP3 (Apl5-TAP) Gal-Vps41 verschob sich die intrazelluläre Lokalisation von Apl5-TAP und auch der anderen AP-3 Untereinheiten in die P100-Fraktion. Ein geringer Anteil an Apm3 und Aps3, allerdings nicht Apl5 und Apl6, war in der P13-Fraktion zu finden.

Das Markerprotein für Vakuolen Vac8 befand sich hauptsächlich in der P13-Fraktion. Ein geringer Teil war in der P100-, was auf die geringe Größe der Vakuolen zurück zu führen sein könnte, und in der S100-Fraktion zu finden. Dieser lösliche Teil lässt sich durch das Fehlen des Lipidankers am Vac8 in einem Teil der Proteinpopulation erklären.

Die Verschiebung der Lokalisation der AP-3-Untereinheiten ist entweder auf eine Erhöhung des an Vesikelmembranen gebundenen AP-3-Komplexes oder auf eine Aggregation des AP-3-Komplexes in den Zellen zurück zu führen. Eine Aggregation

des Komplexes würde ebenfalls die Effekte bei der Aufreinigung des AP-3-Komplexes erklären (siehe Kap. 3.8.3)



**Abb. 3.31: Subzelluläre Fraktionierung des Gal-AP 3 Stammes**

Sphäroplasten aus den angegebenen Hefestämmen wurden lysiert und bei 13.000x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine erneute Zentrifugation bei 100.000x g für 1h eingesetzt. Die P13-, P100- und S100-Fractionen wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot weiter prozessiert. Die Untereinheiten des AP-3 Komplexes und Vac8 als Markerprotein wurden immunologisch nachgewiesen.

### 3.8.8 Vakuolenmorphologie und Funktionalität des ALP-Weges in Gal-HA-AP3

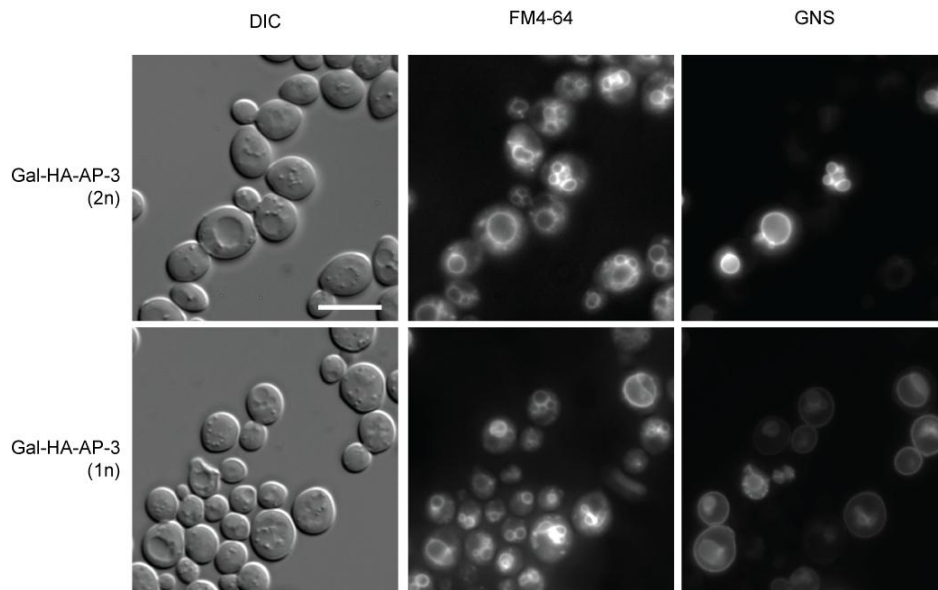
#### Stämmen

Bei gleichzeitiger Überproduktion aller vier Untereinheiten des AP-3 Komplexes kam es auch ohne TAP-tag am Apl5 zu einer leichten Fragmentierung der Vakuole, wie im Fluoreszenzmikroskop nach Färbung mit FM 4-64 zu erkennen war. Während im diploiden Stamm der ALP-Weg noch funktional war und das Reporterprotein GNS direkt zur Vakuole transportiert wurde, ging diese Funktionalität im haploiden Stamm verloren, GNS lokalisierte auf der Plasma- und der Vakuolenmembran (siehe Abb. 3.32).

Die Funktionalität des ALP-Weges geht also in den diploiden Stämmen auf die weitere, unveränderte Kopie der AP-3-Untereinheiten zurück. Sowohl geänderte

---

Vakuolenmorphologie als auch der Defekt im ALP-Weg muß also durch die Überproduktion oder durch die N-terminale Fusion mit den 3x HA-tags bedingt sein.



**Abb. 3.32: Vakuolenmorphologie und Funktionalität des ALP-Weges**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des haploiden (1n) und diploiden (2n) Gal-HA-AP 3 Stammes. Die Zellen wurden mit dem Plasmid transformiert, welches das Reporterprotein GFP-Nyv11-Snc1TMD (GNS) kodiert, und mit dem lipophilen Farbstoff FM 4-64 angefärbt, um die Vakuole sichtbar zu machen. Die Belichtungszeiten betragen für FM 4-64 250 ms, für das GFP 500 ms.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

### 3.8.9 Funktionalität des ALP-Weges bei Überproduktion der AP-3 Untereinheiten

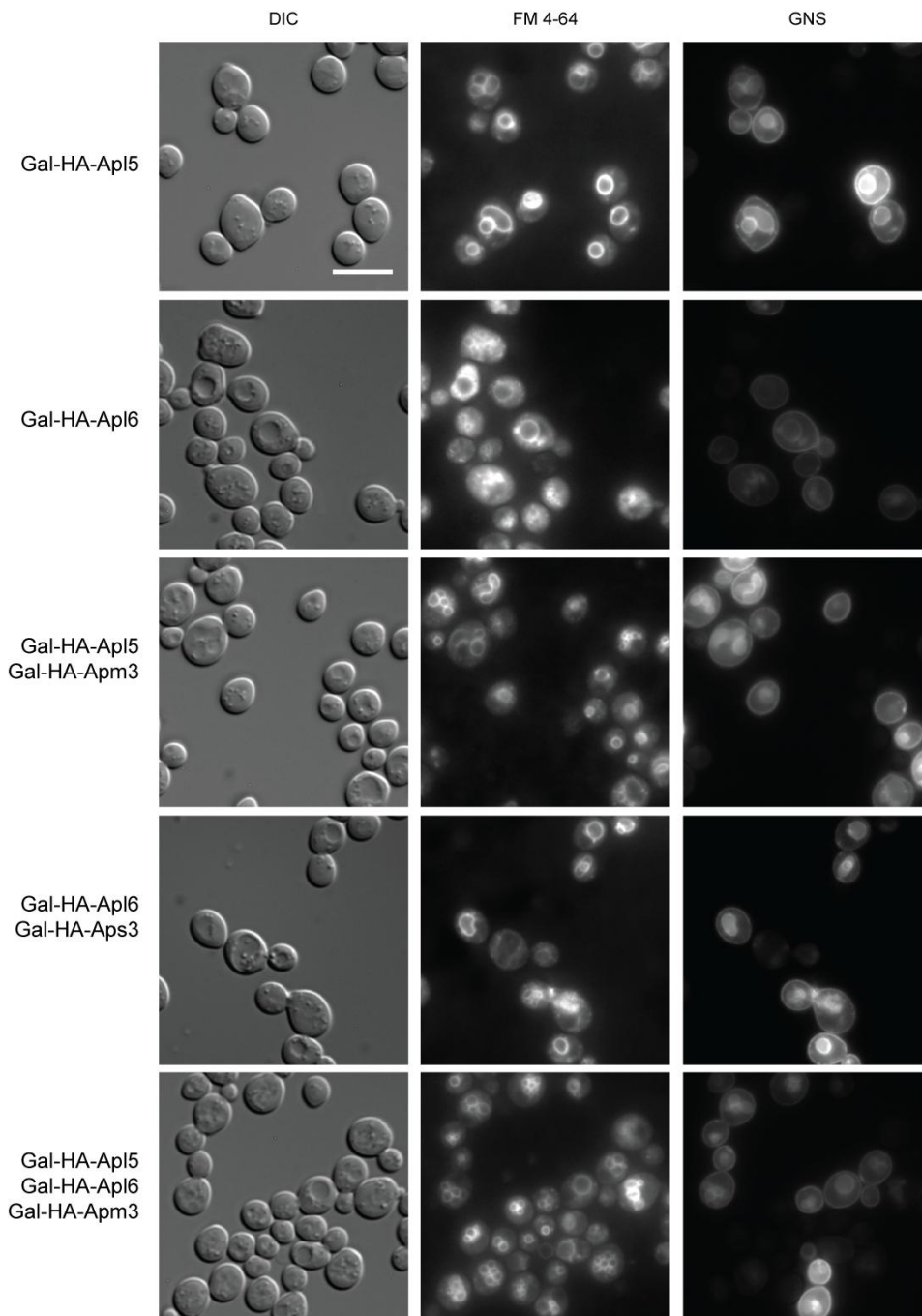
Zur Überprüfung, ob die Überproduktion und Fusion mit einem HA-tag einzelner Untereinheiten des AP-3 Komplexes zum Verlust der Funktionalität des ALP-Weges führte, wurden die einzelnen Vorläuferstämme des diploiden und des haploiden Gal-HA-AP3 Stammes mit dem für das Reporterprotein GFP-Nyv1-Snc1TMD kodierenden Plasmids transformiert und die Lokalisation unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Zusätzlich wurde durch Färbung mit FM 4-64 die Vakuolenmorphologie bestimmt, um festzustellen, welche Kombination von Überproduktionen der AP-3 Untereinheiten zu dieser Vakuolenmorphologie führt.

Die Überproduktion einer der beiden großen Untereinheiten Apl5 oder Apl6 führte bereits zur für die Gal-AP3 Stämme beschriebenen Vakuolenmorphologie. Auch der Defekt im ALP-Weg trat bereits hier auf, das GNS Konstrukt lokalisierte an der

---

Plasmamembran und der Vakuole (siehe Abb. 3.33). Auch die Kombination mit einer kleinen Untereinheit (Apl5/Apm3 bzw. Apl6/Aps3; Abb. 3.33) oder die Überproduktion beider großen Untereinheit mit einer (Apl5-Apl6-Aps3; Abb. 3.33) bzw. beiden kleinen Untereinheiten (Gal-HA-AP3 (1n), siehe Abb. 3.32) retteten die Vakuolenmorphologie oder die Sortierung des AP-3-Reporterproteins GNS nicht.





**Abb. 3.33: Vakuolenmorphologie und Funktionalität des ALP-Weges**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der angegebenen Stämme. Die FM 4-64 Färbung wurde wie im Methoden Teil beschrieben durchgeführt, die Belichtungszeit betrug 250 ms. Das GFP wurde für 500 ms angeregt.

Größenbalken = 10  $\mu$ m

---

## **4. Diskussion**

### **4.1 Modelle zur Funktion von Vps41 im ALP-Weg**

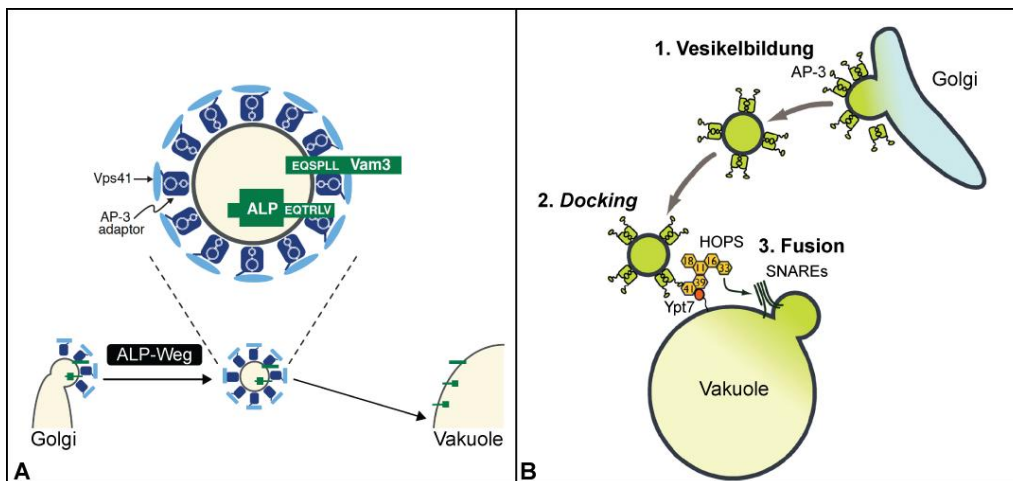
Die Funktion des Proteins Vps41 im ALP-Weg der Hefe *S. cerevisiae* ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Zwei verschiedene Modelle beschreiben, welche Aufgabe dieses Protein im ALP-Weg übernehmen könnte.

Das ältere der beiden Modelle (Abb. 4.1A) wurde 1999 von Rehling *et al.* vorgeschlagen. In diesem Modell übernimmt Vps41 die Rolle des Clathrins als Hüllprotein im ALP-Weg. In dieser Veröffentlichung konnte erstmals die Interaktion von Vps41 mit der C-terminalen *ear*-Domäne von Apl5 nachgewiesen werden. Basierend auf der Position einer Punktmutation I832T in Vps41 (Cowles *et al.*, 1997), die zu einer temperaturempfindlichen Mutante im ALP-Weg führt, wurde eine so genannte CHCR-Domäne (*Clathrin Heavy Chain Repeat*) identifiziert (Darsow *et al.*, 2001). Es wurde vorgeschlagen, dass Vps41, homolog zum Clathrin, oligomerisieren kann und so durch die Interaktion mit der *ear*-Domäne von Apl5 eine Hülle um die AP-3 Vesikel bildet. Vps41 erfüllt seine Funktion im ALP-Weg in diesem Modell also in der Bildung der Vesikel.

Eine andere Funktion übernimmt Vps41 im kürzlich vorgeschlagenem Modell von Angers *et al.* aus dem Jahr 2009 (Abb. 4.1B). Hier spielt Vps41 im Zusammenhang mit dem HOPS-Komplex eine Rolle im *Docking* der AP-3-Vesikel an die Vakuole. Die Hülle um die Vesikel wird in diesem Modell vom AP-3-Komplex gebildet, es gibt keinen Ersatz für Clathrin. An der Vakuole leitet dann die Interaktion zwischen Apl5 und Vps41 die Fusion der Vesikel mit der Vakuole ein. Es wurde durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt, dass Vps41 und auch andere HOPS-Untereinheiten *in vivo* nicht am Golgi zu finden sind, was eine grundlegende Bedingung für eine mögliche Funktion von Vps41 in der Biogenese der AP-3-Vesikel darstellt. Allerdings war eine gemeinsame Lokalisation zwischen Vps41 und auch anderen HOPS-Untereinheiten zusammen mit AP-3-Untereinheiten an der Vakuole zu beobachten, was für eine Funktion bei der Aufnahme der Vesikel spricht. Weiterhin deuten die gezeigten Ergebnisse auf eine Akkumulation von AP-3-Vesikeln im Cytosol von Zellen der

Stämme mit nicht funktionalem HOPS-Komplex hin (Angers *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion von Vps41 als Untereinheit des HOPS-Komplexes in der Aufnahme der AP-3-Vesikel an der Vakuole hin.

In beiden Modellen wird die Interaktion von Vps41 mit der *ear*-Domäne von Apl5 als Untereinheit des AP-3 Komplexes beschrieben und konnte auch in beiden Veröffentlichungen nachgewiesen werden. Leider konnte bislang der in der Sequenz von Vps41 benötigte Bereich nicht weiter eingegrenzt werden, lediglich eine Punktmutation G171R deutet die Notwendigkeit des N-terminalen Bereiches von Vps41 an, der für die Wechselwirkung notwendig sein könnte (Darsow *et al.*, 2001).



**Abb. 4.1: Modelle zur Funktion von Vps41 im ALP-Weg**

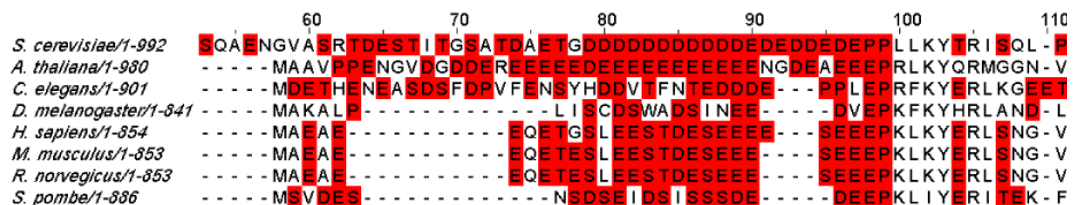
**(A) Rehling-Modell:** Modell der Funktion von Vps41 als Hüllprotein für die AP-3 Vesikel. In diesem Modell ist Vps41 als Ersatz für Clathrin in der Bildung der AP-3 Vesikel am Golgi zu verstehen. Vps41 interagiert mit der *ear*-Domäne der Apl5-Untereinheit des AP-3 Komplexes. (Abbildung geändert nach Rehling *et al.*, 1999)

**(B) Angers-Modell:** Modell der Funktion von Vps41 im Andocken der AP-3 Vesikel an der Vakuole. In diesem Modell ist Vps41 als Untereinheit des HOPS-*Tethering*-Komplexes an der Vakuolenmembran lokalisiert und vermittelt durch die Wechselwirkung mit der Apl5-*ear*-Domäne das *Docking* der AP-3 Vesikel an der Vakuole. (Abbildung geändert nach Angers *et al.*, 2009)

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Abhängigkeit der Interaktion zwischen Apl5 und der PEST-Domäne im Vps41 unterstützen das von Angers *et al.* (2009) vorgeschlagene Modell.

Zum ersten Mal konnte eine für die Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 notwendige Domäne innerhalb von Vps41 identifiziert und näher eingegrenzt werden. Die Deletion der zwischen den Aminosäuren 62-102 vorhergesagten PEST-Domäne (Vps41 $\Delta$ PEST) führt zu einem Defekt im ALP-Weg der Hefe *S. cerevisiae*, während die Deletion der Aminosäuren 1-47 noch keinen Effekt auf den ALP-Weg hat (siehe Abb. 3.2).

Betrachtet man die zum Vps41 aus *S. cerevisiae* homologen Proteine aus anderen Organismen, so fällt die Häufung der für eine PEST-Domäne typischen Reste Prolin, Glutamat, Aspartat, Serin und Threonin in den N-terminalen Bereichen aller Proteine auf (Abb. 4.2). Das PESTfind-Programm mit dem die PEST-Domäne in Vps41 identifiziert wurde, zeigt auch für das humane Vps41 eine solche im N-terminalen Bereich. Die Funktion dieses Bereiches in der Vorbereitung der Fusion von Vesikeln mit dem Zielorganell könnte also in anderen Organismen konserviert sein.



**Abb. 4.2: Konservierung der PEST-Domäne in Vps41**

Die in PEST-Domänen häufig vorkommenden Aminosäurereste Prolin, Glutamat, Aspartat, Serin und Threonin sind in den Sequenzen der homologen Proteine in anderen Organismen konserviert (rot unterlegt). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 erstellt. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

---

## **4.2 Effekte der PEST-Deletion beeinträchtigen nur den ALP-Weg**

### 4.2.1 PEST-Deletion zeigt keinen Einfluss auf CPY-Weg

Um die Spezifität des Effekts der PEST-Deletion auf den ALP-Weg zu prüfen, wurde im Fluoreszenzmikroskop die Sortierung von GFP-Cps1 als Fracht- und Reporterprotein für den CPY-Weg betrachtet. Anders als in der Kontrolle nach Deletion von *vps4*, welche zu einem Defekt des CPY-Weges führt und damit zu einer Fehlsortierung von GFP-Cps1 in die Membran der Vakuole, wird im *Vps41ΔPEST*-, wie auch im Wildtypstamm, GFP-Cps1 in das Lumen der Vakuole sortiert (siehe Abb. 3.3). Auch der Test auf Sekretion der Carboxypeptidase Y (CPY), einem weiteren Frachtprotein des CPY-Weges, das bei einem Defekt in diesem Weg statt zur Vakuole transportiert zu werden, durch Exocytose in das Medium sezerniert wird, zeigt keine Beeinflussung in *Vps41ΔPEST* Zellen. Das Protein CPY wird nicht wie in der Kontrolle, einer Deletion von *vps8*, die zu einem Defekt des betrachteten Weges führt, in das Medium sezerniert (Abb. 3.4).

### 4.2.2 Funktion des HOPS-Komplex mit *Vps41ΔPEST* ist nicht beeinflusst

Eine weitere Funktion von *Vps41* ist die als Effektorprotein der GTPase *Ypt7* als Untereinheit des HOPS-*Tethering*-Komplexes. Um einen möglichen Einfluss der Deletion der PEST-Domäne zu testen, wurde zunächst überprüft, ob andere Untereinheiten des HOPS-Komplexes in *Vps41ΔPEST*-Zellen richtig lokalisiert sind. Hierzu wurde *Vps39* als andere HOPS-spezifische Untereinheit mit GFP fusioniert und die Lokalisation in Wildtyp- und *Vps41ΔPEST*-Zellen geprüft (Abb. 3.5). Wie in den Wildtypzellen, so ist das GFP-*Vps39*-Signal auch in *Vps41ΔPEST*-Zellen auf der Membran der Vakuole zu finden, allerdings fehlen in der Deletionsmutante die im Wildtyp zu sehenden Signale für das GFP-*Vps39* auf den endosomalen Bindestellen, welche direkt an der Vakuole als stärker leuchtender Punkt zu erkennen sind. Dies lässt sich vermutlich auf die geringere Menge von *Vps41* an der Vakuole zurückführen (siehe Abb. 3.8). Trotz dieser Einschränkung ist die Vakuolenmorphologie der *Vps41ΔPEST*-Zellen vergleichbar mit der des Wildtyps, wie am Signal von GFP-*Vps39* zu erkennen. Eine fehlende Funktionalität von *Vps41* in der homotypischen

---

Vakuolenfunktion würde zu einer Fragmentierung der Vakuole führen (Raymond *et al.*, 1992).

In Wildtyp- und in Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen ließ sich Vps33 nach Co-Immunopräzipitation mit Vps41 nachweisen (Abb. 3.6). In der Kontrolle mit einer Deletion des Gens der HOPS-Untereinheit Vps11 (*vps11* $\Delta$ ), in der kein vollständiger HOPS-Komplex vorhanden ist (Ostrowicz, eingereicht 2010), war Vps33 wie erwartet nicht zu detektieren. Die Deletion der PEST-Domäne im Vps41 scheint also die Assemblierung des HOPS-Komplexes nicht zu beeinträchtigen, ob die Menge an HOPS-Komplex beeinflusst ist, lässt sich hier nicht bestimmen, hierzu wären Methoden notwendig, die eine Quantifizierung der freien und der zum HOPS-Komplex assemblierten Untereinheiten zulassen.

Anders sieht dies bei der Interaktion von Vps41 mit Ypt7 nach Deletion der PEST-Domäne aus. Hier ist ein Effekt zu beobachten, wenn gleichzeitig die Funktion von Ypt7 durch eine Fusion von GFP vor den N-Terminus der GTPase beeinträchtigt wird. Dieses GFP-Ypt7-Konstrukt dient nicht zur Lokalisation von GFP-Ypt7 im Fluoreszenzmikroskop. Lediglich die Vakuolenmorphologie der Zellen ist ausschlaggebend und kann genutzt werden, um eine Aussage über die Wechselwirkung zwischen der GTPase Ypt7 und ihrem Effektorprotein Vps41 zu treffen. Die N-terminale GFP-Fusion beeinträchtigt anscheinend die Funktion des Ypt7. Allerdings ist dieser Effekt so schwach, dass eine Fragmentierung der Vakuolen erst auftritt, wenn noch eine zweite Beeinträchtigung der Wechselwirkung zwischen diesen beiden Proteinen hinzukommt (Cabrera *et al.*, 2009). Die nur in Vps41 $\Delta$ PEST- und nicht in Wildtypzellen zu beobachtende Fragmentierung der Vakuole spricht also für eine Schwächung der Interaktion zwischen Vps41 $\Delta$ PEST und Ypt7. Der Bereich der Wechselwirkung mit Ypt7 ist auf die N-terminale Hälfte von Vps41 eingeschränkt worden (Abb. 4.6) (Brett *et al.*, 2008; Ostrowicz, eingereicht 2010). Dieser Effekt könnte auf eine Beeinträchtigung der Faltung von Vps41 $\Delta$ PEST durch die Deletion der PEST-Domäne zurückzuführen sein. Allerdings lässt sich an den anderen, nicht beeinflussten Funktionen von Vps41 $\Delta$ PEST kein weiterer Hinweis auf eine Fehlfaltung des Proteins ableiten.

---

Diese geschwächte Wechselwirkung zwischen Ypt7 und Vps41 $\Delta$ PEST kann erklären, warum Vps41 $\Delta$ PEST in größeren Mengen im Cytosol statt an der Vakuolenmembran zu finden ist, wenn man die Lokalisation von Vps41 $\Delta$ PEST-GFP mit Vps41-GFP vergleicht (Abb. 3.8). Dieser Effekt ist dominant gegenüber dem Effekt auf die Lokalisation von Vps41-GFP in nicht-phosphorylierbarem Vps41 S367, 368, 371, 372A (Vps41 S-A) und verstärkt den Effekt der phosphomimetischen Mutante Vps41 S367, 368, 371, 372D (Vps41 S-D) (Cabrera *et al.*, 2009). Die Vps41 S-A Mutante akkumuliert in Kombination mit der PEST-Deletion nicht mehr an endosomalen Strukturen, die als stark leuchtende Punkte neben der Vakuole im Vps41 S-A zu erkennen sind. Der Anteil an cytosolischem Vps41 $\Delta$ PEST S-A ist erhöht. Die Kombination der PEST-Deletion mit der phosphomimetischen Mutante Vps41 S-D erhöht die Menge an cytosolischem Vps41 gegenüber den beiden einzelnen Mutationen. Die vakuoläre Lokalisation von Vps41 scheint von zwei Faktoren abzuhängen. Zum einen von der bereits beschriebenen Phosphorylierung der Aminosäurereste S367, 368, 371, 372 (Cabrera *et al.*, 2009) die im Falle einer fehlenden Phosphorylierungsstelle (Vps41 S-A) zu einer Akkumulation von Vps41 am Endosom führt und im Falle einer phosphomimetischen Mutation (Vps41 S-D) zu einer cytosolischen Lokalisation von Vps41 führt (Abb. 3.8). Zum anderen die Interaktion mit der Rab-GTPase Ypt7, deren Wechselwirkung mit Vps41 $\Delta$ PEST schwächer zu sein scheint als mit Vps41 (siehe oben). Der Effekt der geschwächten Wechselwirkung mit Ypt7 scheint hierbei stärker zu sein, da die Lokalisation von Vps41 $\Delta$ PEST durch eine Kombination mit der S-A Mutation nicht wieder hergestellt wird (Abb. 3.8).

Eine Erhöhung der Menge der GTPase Ypt7, die erreicht wurde, indem das Gen YPT7 unter die Kontrolle des stärkeren TEF1-Promotors gestellt wurde (Janke *et al.*, 2004), brachte nur eine leichte Erhöhung der Menge an Vps41 an der Membran der Vakuole (Abb. 3.9). Entweder die Menge an Ypt7 ist trotz stärkerem Promotor nicht hoch genug, um den Effekt durch die Deletion der PEST-Domäne im Vps41 auszugleichen, oder aber die gestörte Wechselwirkung zwischen GTPase Ypt7 und Effektorprotein Vps41 kann nicht durch eine erhöhte Menge ausgeglichen werden. Interessanterweise ist die Menge an vakuolärem Vps41 ausreichend, um die homotypische Vakuolenfusion, die abhängig vom HOPS-Komplex ist, aufrecht zu erhalten.

---

### **4.3 Einfluss der Phosphorylierung von Vps41 auf seine Funktion**

Bei einem Defekt des ALP-Weges, wie er hier nach Deletion der PEST-Domäne auftritt, wird die Caseinkinase 3 (Yck3), die Vps41 phosphoryliert und ein Frachtprotein des ALP-Weges ist, zur Plasmamembran und von dort aus über den endocytotischen Weg in des Lumen der Vakuole sortiert (Abb. 3.10). Sowohl ein Defekt des ALP-Weges als auch eine falsche intrazelluläre Lokalisation von Vps41 treten allerdings auf, wenn die von Yck3 abhängige Phosphorylierung von Vps41 verändert ist (Cabrera *et al.*, 2009). Diese Fehlsortierung von Yck3 und die daraus resultierende fehlende Phosphorylierung könnte also Grund für die Effekte in den Vps41 $\Delta$ PEST Zellen sein.

Das Laufverhalten von Vps41 $\Delta$ PEST im SDS-Gel deutet darauf hin, dass dieses nicht durch Yck3 phosphoryliert wird (Abb 3.11). Dieser Effekt lässt sich auf den ersten Blick auf das Fehlen der Caseinkinase 3 auf der Membran der Vakuole in diesen Präparationen zurückführen. Allerdings lässt sich auch bei Inkubation von Vakuolen aus Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen gemeinsam mit Vakuolen aus Vps41-Zellen keine Phosphorylierung beobachten (Abb. 3.12, linke Spalte). Die Kontrolle mit Vakuolen aus Wildtypzellen gemeinsam mit Vakuolen aus Vps41-TAP-Zellen mit einer *yck3* Deletion zeigen eine Phosphorylierung von Vps41-TAP (Abb. 3.12, rechte Spalte). Das prinzipielle Vorgehen in diesem Versuchsansatz funktioniert also. Die fehlende Phosphorylierung von Vps41 $\Delta$ PEST lässt sich also nicht durch die Fehlsortierung von Yck3 erklären wie zuerst angenommen. Eine mögliche Erklärung könnte eine fehlende Wechselwirkung bzw. fehlende Erkennung des Substrats Vps41 durch die Kinase Yck3 nach Deletion der PEST-Domäne sein. Hierfür spricht, dass auch die Inkubation mit Yck3 aus anderer Quelle, nämlich den Wildtyp-Vakuolen keine Phosphorylierung ermöglichte. Leider führten Untersuchungen zur möglichen Wechselwirkung von Vps41 und Yck3 bislang zu keinem Ergebnis. Sowohl in Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen, als auch durch den Versuch, die Interaktion durch die Bindung von Vps41 aus Hefelysat an immobilisiertes Yck3 zu zeigen, führten nicht zu einem Erfolg (Daten nicht gezeigt). Um den möglichen Verlust der Wechselwirkung zwischen Yck3 und Vps41 $\Delta$ PEST nachzuweisen muss allerdings erst eine Möglichkeit gefunden werden, die Wechselwirkung der beiden nativen Proteine zu zeigen. Es gibt Hinweise darauf, dass Caseinkinasen mit geladenen Bereichen von Proteinen, wie es die PEST-



---

Domäne im Vps41 ist, wechselwirken (Schafmeier *et al.*, 2006; Bonifacino und Traub, 2003). Um diesen Aspekt zu klären sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

Um die nicht nachweisbare Phosphorylierung von Vps41 $\Delta$ PEST als Grund für den Defekt im ALP-Weg auszuschließen, wurden Stämmen mit Kombination von PEST-Deletion und Mutation der Phosphorylierungsstellen (Vps41 $\Delta$ PEST S-A und Vps41 $\Delta$ PEST S-D) auf eine Wiederherstellung der Funktion des ALP-Weges getestet (Abb. 3.13). Wie zu erwarten, ist der ALP-Weg in Vps41 $\Delta$ PEST S-A Zellen defekt, da auch schon die beiden einzelnen Änderungen im Protein zu einem Defekt führen. In Vps41 $\Delta$ PEST S-D-Zellen ist ebenfalls der ALP-Weg defekt, obwohl die phosphomimetische Vps41 S-D-Mutation keinen Defekt zeigt (Cabrera *et al.*, 2009). Die Deletion der PEST-Domäne ist also auch hier, wie auch bei der Lokalisation von Vps41, die dominante Mutation. Interessanterweise führt die phosphomimetische Mutante Vps41 S-D auch in Kombination mit der PEST-Deletion zu einer Erhöhung der Anzahl an kleineren Vakuolen in den Zellen.

Ein Einfluss der Mutationen in den Phosphorylierungsstellen von Vps41 (Vps41 S-A/Vps41 S-D) auf die Wechselwirkung mit der *ear*-Domäne von Apl5 konnte nicht gezeigt werden (Abb. 3.14). Der Grund für den Defekt des ALP-Weges in Vps41 S-A Zellen kann also nicht auf eine fehlende Wechselwirkung mit Apl5 zurück zu führen sein. Das *Docking* der AP-3-Vesikel an die Vakuole *in vivo* muss hier also auf einer anderen Ebene, z.B. der regulatorischen, beeinträchtigt sein.

#### **4.4 Verlust der Interaktion von Apl5 und Vps41 führt zu Defekt im ALP-Weg**

Betrachtet man die Lokalisation von Apl5-GFP in einem Vps41 $\Delta$ PEST-Stamm so ist eine deutliche Veränderung der Lokalisation im Vergleich zu Apl5-GFP in Wildtyp-Zellen zu erkennen. Während Apl5-GFP in Wildtyp-Zellen in einzelnen Punkten zu finden ist, die zum Teil an der Membran der Vakuole liegen, ist das Signal von Apl5-GFP in Kombination mit Vps41 $\Delta$ PEST diffus in der Zelle verteilt (Abb. 3.15). Diese Signale lassen sich nicht mit Markerproteinen von ER (Sec63), Golgi (Mnn9) oder Endosomen (Snx41), die mit RFP (*red fluorescent protein*) markiert wurden zusammen an einer Stelle beobachten (Daten nicht gezeigt). Diese Verteilung von

---

Apl5-GFP-Signale lässt sich als eine Akkumulation von AP-3-Vesikeln interpretieren, die vom Golgi abgeschnürt wurden, aber dann nicht mit der Vakuole fusionieren können. Eine ähnliche Beobachtung zeigen Angers *et al.* (2009) für einen Stamm mit einer Deletion von *vps41*.

Die Vermutung, dass die Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 nach Deletion der PEST-Domäne verloren geht, scheint sich auch in Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen zu bestätigen (Abb. 3.16).

Auch *in vivo* scheint keine Wechselwirkung von Vps41 und Apl5 nach Deletion der PEST-Domäne mehr möglich zu sein. Bei einer Co-Immunopräzipitation durch Apl5-GFP aus Wildtyp- und Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen lässt sich nur Vps41-Wildtyp gemeinsam mit Apl5-GFP aufreinigen, im Falle der Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen ist kein Vps41 $\Delta$ PEST durch Immunodetektion nachweisbar (Abb. 3.17). Leider sind die Expressionslevel von Apl5-GFP in den verschiedenen Stämmen unterschiedlich. Da in allen Ansätzen eine gleiche Menge an Zellen anhand der gemessenen optischen Dichte eingesetzt wurde, ist die Menge an aufgereinigtem Apl5-GFP unterschiedlich. Um diesen Umstand zu umgehen, wurde eine Untersuchung der Wechselwirkung durchgeführt, indem die *ear*-Domäne von Apl5 heterolog in *Escherichia coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert wurde und als Matrix zur Aufreinigung von Vps41 aus Hefelysaten verwendet wurde (Abb. 3.20). Hierbei kann bei gleicher Menge an GST-Apl5-*ear* die Bindung von Vps41 aus Lysaten von Wildtyp- aber nicht von Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen gezeigt werden. Die PEST-Domäne scheint also essentiell für die Wechselwirkung mit Apl5 zu sein.

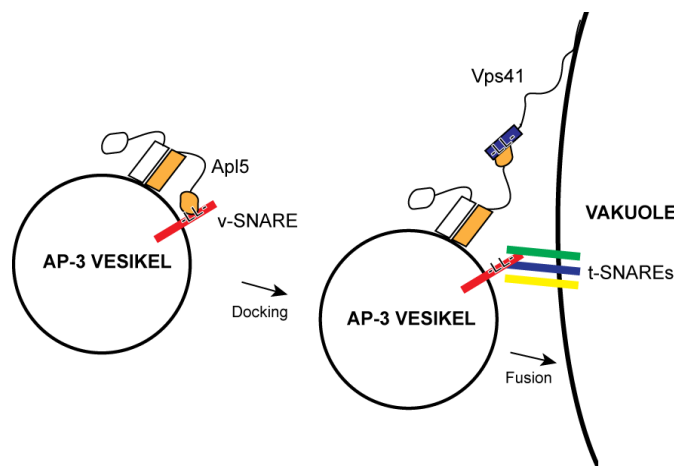
Um zu prüfen ob es sich hierbei um die minimale Domäne handelt oder der Bereich noch weiter eingegrenzt werden kann, sollten kleinere Bereiche der PEST-Domäne deletiert werden. Bei der Festlegung der Grenzen der Deletionen fiel auf, dass der letzte Teil der PEST-Domäne, nämlich die Aminosäuren 95-102 eine Ähnlichkeit zu den Di-Leucin-Sortierungssignalen aufweist, wie sie für die Erkennung durch den AP-3-Komplex typisch sind (Bonifacino und Traub 2003). Daraus folgend wurde eine Deletion des ersten, geladenen Teiles (Aminosäurereste 62-94) und des zweiten, Sortierungssignal-ähnlichen Teiles (Aminosäurereste 95-102) der PEST-Domäne in *VPS41* eingeführt. Während die Deletion des geladenen Bereiches keinerlei Einfluss

---

auf die Verteilung von Vps41-GFP und Apl5-GFP in der Zelle hat und auch der ALP-Weg nicht beeinträchtigt zu sein scheint, führt die Deletion der Reste 95-102 zum gleichen Phänotyp wie die Deletion der gesamten PEST-Domäne (Abb. 3.18). Interessanterweise geht die Bindung im Interaktionstest *in vitro* zwischen GST-Apl5-*ear* und den einzelnen verkürzten Deletionen bereits verloren, wenn auch das geladene Stück der PEST-Domäne (Aminosäurereste 62-94) fehlt (Abb. 3.20). Dies könnte daran liegen, dass neben dem Di-Leucin-Motiv auch der geladene Teil der PEST-Domäne für die Wechselwirkung mit Apl5 benötigt wird, dieser Effekt aber *in vivo* durch einen anderen Faktor, evtl. eine zweite Bindestelle innerhalb des HOPS-Komplexes ausgeglichen werden kann. So ist es zum Beispiel auch nicht ausreichend, ein Fusionsprotein aus verschiedenen langen N-terminalen Stücken von Vps41 und Vps39 *in vivo* zu exprimieren, um den Effekt der Deletion der PEST-Domäne auszugleichen (Abb. 3.23 und Abb. 3.24). Weder die Funktionalität des ALP-Weges, noch die Lokalisation von Apl5-GFP ließ sich durch die Substitution der PEST-Domäne an anderer Stelle im HOPS-Komplex wieder herstellen, was auf eine strikte Positionierung dieser Domäne hindeutet. Grund hierfür könnte eine Wechselwirkung mit anderen bislang nicht identifizierten Proteinen, z.B. anderen HOPS-Untereinheiten sein.

Für den Nachweis, dass es sich bei der Sequenz zwischen Aminosäurerest 95-102 im Vps41 um ein Sortierungssignal handelt, wurden die beiden für ein typisches Di-Leucin-Sortierungssignal essentiellen Leucine (Bonifacino und Traub, 2003) an den Positionen 100 und 101 im Vps41 durch Punktmutationen im Gen *VPS41* durch Alanine ausgetauscht. Erwartet wurde, dass diese Mutation zu einem Defekt ähnlich der Deletion der PEST-Domäne führt. Allerdings ist in dieser Mutante ein völlig anderer Phänotyp zu beobachten. Während die Lokalisation von Vps41-L100,101A-GFP ebenfalls cytosolisch ist (Abb. 3.19) akkumuliert Apl5-GFP anders als in den bisher beschriebenen Mutanten an genau einem Punkt an der Membran der Vakuole. Der ALP-Weg scheint in dieser Mutante nicht beeinflusst zu sein, da das GNS-Reporterprotein nicht an die Plasmamembran transportiert wird. Die starke Akkumulation von Apl5-GFP an einem Punkt an der Vakuole deutet auf eine Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 durch den Austausch von

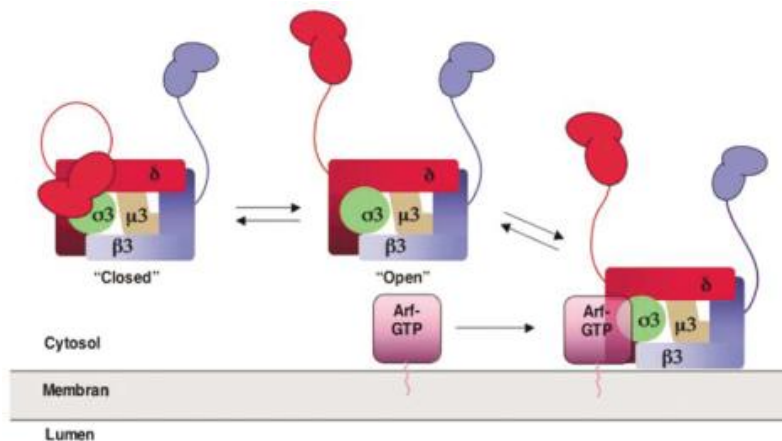
Leucin zu Alanin hin. Das Recycling des AP-3-Komplexes von der Vakuole zurück in den cytosolischen Pool scheint gestört zu sein, die Verweildauer an der Vakuole ist verlängert. Vorstellbar wäre, dass Vps41 nicht alleine eine Rolle im *Docking* der AP-3-Vesikel, sondern auch beim *Uncoating* der AP-3-Vesikel übernimmt. Im Modell nach Angers *et al.* (2009) bleibt die Hülle, gebildet durch den AP-3-Komplex, bis zum Andocken der Vesikel an der Vakuole bestehen. Sollte die Apl5-*ear*-Domäne in der Lage sein, Di-Leucin Sortierungssignale zu erkennen und an sie zu binden, wie hier am Beispiel von Vps41 vermutet, könnte dies für eine Stabilisierung der Proteinhülle um die Vesikel notwendig sein. In räumlicher Nähe zur Vakuole würde Vps41 mit seinem Di-Leucin ähnlichem Signal als Untereinheit des HOPS-Komplex erreichbar sein. Sollte dieses Signal mit einer höheren Affinität von der Apl5-*ear*-Domäne gebunden werden, könnte die Hülle um die AP-3 Vesikel destabilisiert und abgeworfen werden und die Vesikel wäre bereit für die Fusion mit der Vakuole (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Modell zur Rolle von Vps41 in der Destabilisierung der Vesikelhülle**

Die Apl5-*ear*-Domäne kann an Di-Leucin-Sortierungssignale binden, die in einigen Frachtproteinen des ALP-Weges vorhanden sind, und so die Hülle um die AP-3-Vesikel stabilisieren. In der Nähe der Vakuole wird Vps41 als Untereinheit des HOPS-Komplexes mit seinem Di-Leucin-Motiv erreichbar. Bedingt durch eine möglicherweise höhere Affinität bindet die Apl5-*ear*-Domäne an Vps41. Dies destabilisiert die Hülle der Vesikel, diese fällt ab und die Vesikel kann mit der Vakuole fusionieren. Ein Beispiel für ein Frachtprotein mit Di-Leucin-Motiv ist Vam3 (rot). Durch das Ablösen der Apl5-*ear*-Domäne von diesem SNARE würde also nicht nur die Hülle destabilisiert, sondern das SNARE ebenfalls für das *Docking* und die Fusion verfügbar gemacht. Allerdings handelt es sich hierbei um ein Q-SNARE, die normalerweise als t-SNARE, also eher auf der Vakuole arbeiten (Ostrowicz *et al.*, 2008).

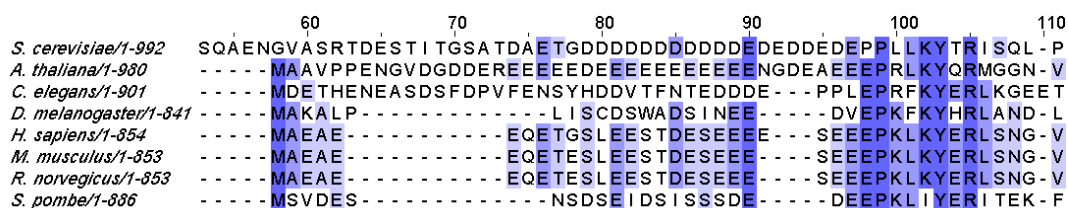
Warum bindet dann aber nicht cytosolisches Apl5 im Zusammenhang mit dem AP-3-Komplex an vakuoläres Vps41? Dies lässt sich durch die Ergebnisse der Veröffentlichung von Lefrancois (2004) erklären. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die *ear*-Domäne der  $\delta$ - Untereinheit aus Säugerzellen mit der  $\sigma$ -Untereinheit wechselwirkt, diese beiden sind homolog zum Apl5 bzw. Aps3 in *S. cerevisiae*. Diese Wechselwirkung konkurriert mit der Wechselwirkung des AP-3-Komplexes mit der GTPase Arf1, welche für die Membranrekrutierung des AP-3-Komplexes notwendig ist (Ooi *et al.*, 1998). Die gezeigten Ergebnisse erlauben auch die Interpretationsweise, dass die Rekrutierung an die Membran durch die Sortierungssignale und die Wechselwirkung mit Arf1 die *ear*-Domäne der  $\delta$ -Untereinheit vom Rumpf des Komplexes freigibt und damit erst eine Wechselwirkung mit Frachtproteinen und später mit Vps41 ermöglicht. Dieses Modell ist mit den gezeigten Daten und dem präsentierten Modell (Lefrancois *et al.*, 2004, siehe Abb. 4.4) vereinbar und würde erklären, warum Apl5 an der Vakuole mit dem Di-Leucin-Motiv von Vps41 nur interagieren kann, wenn es an die Vesikelmembran assoziiert ist und nicht wenn sich der AP-3-Komplex frei im Cytosol befindet.



**Abb. 4.4: Membranrekrutierung ändert die Konformation des AP-3 Komplexes**

In Säugerzellen konkurriert die  $\delta$ -*ear*-Domäne (*S.c.* Apl5) des AP-3 Komplexes mit Arf1 um die Bindung an die  $\sigma$ -Untereinheit (*S.c.* Aps3) des AP-3 Komplexes (Lefrancois *et al.*, 2004). Dies bedeutet auch, dass in *S. cerevisiae* die Apl5-*ear*-Domäne erst für eine Bindung an Vps41 verfügbar wäre, wenn der AP-3 Komplex über Arf1 an die Vesikelmembran gebunden ist. Dies würde eine Bindung von cytosolischem AP-3 Komplex an vakuoläres Vps41 verhindern.

Eine Voraussetzung für die Gültigkeit des gerade präsentierten Modells ist, das in Säugerzellen, in denen die Konkurrenz zwischen Arf1 und  $\delta$ -ear-Domäne gezeigt wurde, nicht nur die Homologie zwischen den ear-Domänen der  $\delta$ -Untereinheit und Apl5 besteht, sondern auch die Bindestelle im Vps41 in beiden Organismen konserviert ist. Hierzu wurden die Sequenzen von zum Vps41 homologen Proteinen aus verschiedenen Organismen im ClustalW2 Programm (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) miteinander verglichen (Abb. 4.5). Außer in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* scheint das Di-Leucin-ähnliche Motiv konserviert zu sein, in einigen Fällen ist das erste der beiden Leucine in Lysin geändert, aber das wichtige zweite Leucin und auch das Glutamat an Position -4 vor dem zweiten Leucin (Bonifacino und Traub, 2003) bleibt in allen anderen Fällen erhalten.



**Abb. 4.5: Das identifizierte Bindemotiv für Apl5 in Vps41 ist konserviert**

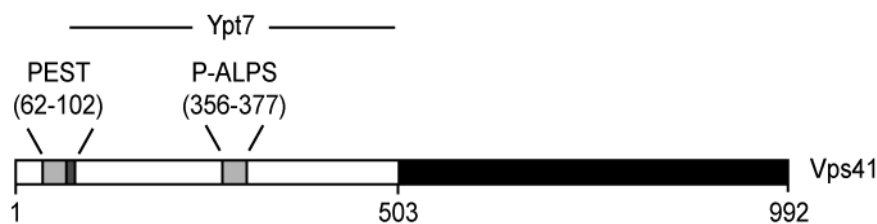
Ein Sequenzvergleich von homologen Proteinen zu Vps41 aus *S. cerevisiae* zeigt, dass der Bereich, der als Bindestelle für Apl5 identifiziert wurde (*S. cerevisiae*, Aminosäurereste 95-102) auch in anderen Organismen konserviert ist. Die Konservierung geht über den identifizierten Bereich hinaus bis zum Aminosäurerest I106. (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

Auffällig ist, dass der konservierte Bereich in dieser Region der zu Vps41 homologen Proteine noch weit über die hier als notwendig identifizierte PEST-Domäne hinaus geht. Inwieweit diese konservierten Reste auch an der Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 beteiligt sind, soll in Zukunft durch das Einfügen von Punktmutationen und weiterer Deletionen in diesem Bereich herausgefunden werden. So konnte zum Beispiel bereits durch den Austausch der beiden Leucin- durch Aspartat-, statt Alaninreste an den Positionen 100 und 101, eine Schwächung der Wechselwirkung zwischen Apl5 und Vps41 und damit ein Phänotyp wie in der Vps41 $\Delta$ 95-102 Mutante (Abb. 3.18) erreicht werden (Ralf Rethmeier, persönliche Mitteilung)

---

Wie genau läuft die Bindung von Apl5 als Bestandteil der Hülle um AP-3-Vesikel und Vps41 ab? Zur Beantwortung dieser Frage müssen Daten von Dr. Margarita Cabrera mit in Betracht gezogen werden, die zusammen mit den von mir präsentierten Daten zur Veröffentlichung eingereicht wurden.

Neben der Bindestelle für Apl5 innerhalb der PEST-Domäne wurde ein ALPS (*amphipathic lipid packing sensor*)-Motiv zwischen den Aminosäuren 356 und 377 identifiziert (Drin *et al.*, 2007), das eine Bindung an stark gekrümmte Membranen ermöglicht (Abb. 4.6). Innerhalb dieser amphipatischen Helix befinden sich die schon früher identifizierten Phosphorylierungsstellen (S367, 368, 371,372) durch die Caseinkinase 3 (Yck3), weshalb diese spezielle Form des Motivs als P (*phospho*)-ALPS bezeichnet wird (Cabrera, Langemeyer *et al.*, eingereicht 2010). Ein Austausch dieser Aminosäurereste zu nicht phosphorylierbaren Alaninen führt zu einem Defekt im ALP-Weg, während eine phosphomimetische Mutation (S-D) keinen Defekt aufweist (Cabrera *et al.*, 2009).



**Abb. 4.6: Binde- und Interaktionsstellen im N-terminalen Bereich von Vps41**

Die PEST-Domäne liegt zwischen den Aminosäureresten 62 und 102 und besteht aus einem stark geladenen Teil, den Aminosäureresten 62 bis 94 und der neu identifizierten Bindestelle zu Apl5 zwischen den Resten 95 und 102. Das P-ALPS Motiv dient der Wechselwirkung mit Membranen und ist ein Membrankrümmungssensor (Drin *et al.*, 2007). Diese amphipatische Helix wird aus den Aminosäuren 356-377 gebildet und beinhaltet die Phosphorylierungsstellen S367,368,371, 372, welche Ziel von Yck3 sind. Der Bereich, welcher die Interaktionsstelle zu Ypt7 bildet, wurde auf den N-terminalen Bereich eingeschränkt (Brett, 2008, Ostrowicz eingereicht 2010). Der C-terminalen Hälfte von Vps41 konnte bislang lediglich die Interaktion zu den anderen HOPS-Untereinheiten zugeordnet werden (Cabrera, Langemeyer, eingereicht 2010)

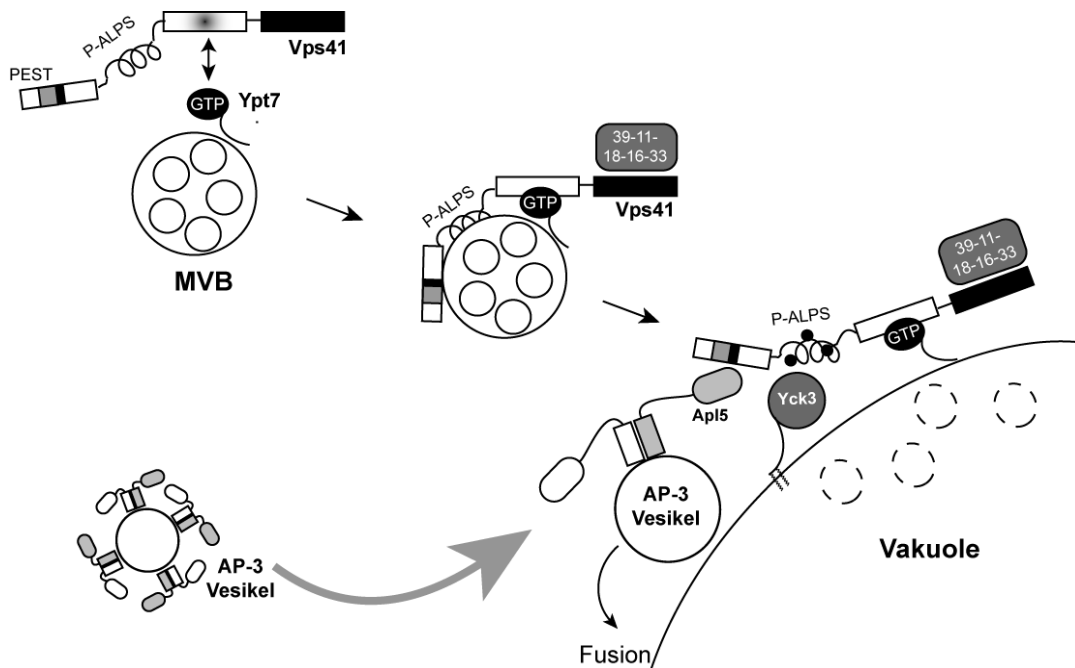
Die Funktion des ALPS-Motivs in Vps41 $\Delta$ PEST ist nicht beeinträchtigt und zeigt dieselbe krümmungsabhängige Bindung an Liposomen wie Vps41 (Abb. 3.21).

---

Allerdings lässt sich das ALPS-Motiv in Vps41 durch die vorherige Inkubation mit heterolog exprimierter Apl5-*ear*-Domäne blockieren. Wird Vps41 allerdings erst mit Liposomen und anschließend mit der Apl5-*ear*-Domäne inkubiert, findet eine normale Bindung an die Liposomen mit kleinem Durchmesser statt (Abb. 3.22). Betrachtet man die *in vivo* Situation, so entsprechen die kleinen Liposomen den späten Endosomen. Vps41, das über Ypt7 an die späten Endosomen rekrutiert wird, wird zusätzlich über das ALPS-Motiv an die Membran der Endosomen gebunden. Dadurch wird der N-terminale Bereich mit dem Apl5-Bindemotiv an die Oberfläche der Membran gezogen, so wie auch im Experiment *in vitro* an die Oberfläche der Liposomen. Damit ist die PEST-Domäne und damit die Bindestelle für Apl5 nicht zugänglich. Erst wenn Vps41 die Vakuole erreicht, kann das ALPS-Motiv aufgrund der anderen Membrankrümmung nicht mehr in die Membran der Vakuole eintauchen und wird zusätzlich noch durch das an der Vakuolenmembran sitzende Yck3 phosphoryliert. Hierdurch wird die PEST-Domäne und das Apl5-Bindemotiv verfügbar und die AP-3-Vesikel können an die Vakuole andocken und fusionieren (Abb. 4.7).

Zu prüfen ist, ob der geladene erste Teil der PEST-Domäne (Aminosäuren 62-94) notwendig ist, um eine elektrostatische Abstoßung von der ebenfalls negativ geladenen Membran zu erreichen. Dies würde dafür sorgen, dass die Apl5-Bindestelle innerhalb der PEST-Domäne immer den größtmöglichen Abstand von der Vakuolenmembran einhält, wenn sie nicht aktiv durch das P-ALPS-Motiv an die Membran gezogen wird. Eine Bedingung hierfür wäre allerdings, dass die elektrostatische Kraft, die für die Abstoßung von der Membran sorgt, kleiner ist als die Kraft der hydrophoben Wechselwirkung der nicht phosphorylierten amphipathischen  $\alpha$ -Helix des ALPS-Motivs, die in die Membran der späten Endosomen eintaucht.





**Abb. 4.7: Modell zur Funktion von Vps41**

Das Protein Vps41 wird von der aktiven Form der GTPase Ypt7 an die Membran der späten Endosomen (*multi vesicular body*; MVB) rekrutiert. An deren stark gekrümmte Membran bindet das P-ALPS Motiv und zieht dadurch den gesamten N-terminalen Bereich mit der Bindedomäne für Apl5 an die Oberfläche der Membran, so dass diese nicht zugänglich ist. Durch die Fusion mit der Vakuole ändert sich die Membrankrümmung, das P-ALPS Motiv kann nicht mehr an die Membran binden und wird zudem noch durch die an der Vakuole sitzende Caseinkinase 3 (Yck3) phosphoryliert. Hierdurch wird die Bindestelle für Apl5 zugänglich, was das Docking der AP-3-Vesikel an die Vakuole ermöglicht und letztlich zur Fusion führt.

---

#### **4.5 Auswirkungen der Überproduktion des AP-3 Komplexes**

Eine Überproduktion des AP-3-Komplexes in der Hefe *S. cerevisiae* wurde erreicht, indem die Expression aller vier Untereinheiten unter die Kontrolle des durch Galaktose induzierbaren Gal1-Promotors gestellt wurde. Zum Nachweis der Expression wurde je noch ein 3x HA-tag vor den N-Terminus der AP-3-Untereinheiten fusioniert. Diese Überexpression führt in diploiden Zellen zu keinem offensichtlichem Phänotyp im ALP-Weg, wie am GFP-Nyv1-Snc1TMD zu erkennen ist, das nur an der Vakuole lokalisierte (Abb. 3.32 oben).

Auch im Falle eines im Vergleich zum 3x HA-tags größeren TAP-tags am Apl5 blieb der ALP-Weg bei Überexpression im diploiden Stammhintergrund funktional (siehe Abb. 3.30). In beiden Fällen scheint die homotypische Vakuolenfusion beeinträchtigt zu sein, da in den Zellen mehrere kleine Vakuolen durch den lipophilen Farbstoff FM 4-64 anfärbbar sind (Abb. 3.30 und Abb. 3.32). Diese Vakuolenmorphologie könnte auf eine verminderte Menge an frei verfügbarem Vps41 an der Vakuole zurückzuführen sein, da dieses Protein sowohl eine Funktion im ALP-Weg (Rehling *et al.*, 1999, Angers *et al.*, 2009), als auch in der homotypischen Vakuolenfunktion, als HOPS-Untereinheit und Ypt7-Effektorprotein hat (Price *et al.*, 2000). Um dies zu testen wurde *in vivo* die Menge an Vps41 erhöht, indem auch dessen Expression unter die Kontrolle des stärkeren Gal1-Promotors gestellt wurde. Allerdings entsprach auch die Vakuolenmorphologie im Gal-5T-AP3 Gal-Vps41-Stamm nicht der im Wildtyp (Abb. 3.30). Die Menge des verfügbaren Vps41 scheint also als Grund für die ungewöhnliche Vakuolenmorphologie nicht in Frage zu kommen. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Menge an Vps41 selbst bei Überproduktion nicht ausreicht, um beide Funktionen des Proteins, sowohl im hochregulierten ALP-Weg, als auch in der homotypischen Vakuolenfusion aufrecht zu erhalten. Die Verteilung von GFP-Vps41 in der Zelle scheint allerdings von der Überproduktion des AP-3-Komplexes nicht beeinflusst zu sein. Die größere Menge an AP-3-Komplex rekrutiert Vps41 also nicht zum Golgi oder auf die Membran von Vesikeln, wie man es nach dem Modell nach Rehling *et al.* (1999) erwarten würde (siehe Kap. 4.1).

---

Eine Co-Immunopräzipitation aus Lysaten von Vps41-TAP-Zellen führt nicht zu einer Aufreinigung des überproduzierten AP-3-Komplexes, wohl aber des HOPS-Komplexes (Abb. 3.27). Nach Immunodetektion des 3x HA-Epitops an den Untereinheiten des AP-3-Komplexes erkennt man auf dem Western-Blot, dass der gesamte AP-3-Komplex noch im ersten Eluat der TAP-Aufreinigung zu finden ist. Sollte es sich hierbei nicht um unspezifische Wechselwirkung des Komplexes mit der Matrix handeln, so ist die Wechselwirkung zwischen AP-3-Komplex und Vps41 nur schwach. Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass sich die größte Menge an AP-3-Untereinheiten im Durchlauf (D1) befinden. Diese wechselwirken also nicht mit Vps41. Diese Art der schwachen Wechselwirkung lässt sich eher mit dem Modell nach Angers *et al.* (siehe Kap. 4.1) vereinbaren, da hier nur eine kurzzeitige Wechselwirkung während des *Docking* der Vesikel an der Vakuole stattfindet. Im Modell nach Rehling *et al.* würde man eine stabilere und langlebigere Wechselwirkung erwarten, da Vps41 als Clathrinersatz stark an die Proteinhülle binden müsste.

In der subzellulären Fraktionierung von Zellen der Stämme Gal-5T-AP3 und Gal-5T-AP3 Gal-Vps41, wie in der Abbildung 3.31 zu sehen, fällt eine Verschiebung der Signale für Apl5 und auch für die anderen AP-3-Untereinheiten von der S100- in die P100-Fraktion auf. Dies könnte auf AP-3-Vesikel hindeuten, die an der Vakuole nicht konsumiert werden. Der Grund hierfür könnte in der Menge an verfügbarem Vps41 an der Vakuole liegen, da dies Protein als Faktor für das Andocken der AP-3-Vesikel an der Vakuole notwendig ist (Angers *et al.*, 2009). Allerdings könnte diese Verschiebung in die Membranfraktion ebenso auf eine Aggregation falsch gefalteter AP-3-Untereinheiten in der Zelle hindeuten.

#### **4.6 Affinitätsaufreinigung des AP-3-Komplexes**

Zur Aufreinigung des AP-3-Komplexes für Untersuchungen *in vitro* wurden in diploiden Stämmen entweder Apl5 oder Apm3 mit einem TAP-tag fusioniert. Zur Aufreinigung wurden Stämme mit und ohne Überproduktion des AP-3-Komplexes genutzt. Weiterhin wurden Stämme mit Deletionen der Gene für das Protein Vps41 oder das Protein Vam3 genutzt. Durch beide Deletionen soll es zu einer Akkumulation

---

von AP-3-Komplex in der Zelle kommen. Die Deletion von *vps41* führt nach dem Modell nach Rehling *et al.* (1999) zu einer Akkumulation von freiem AP-3-Komplex im Cytosol, da die Vesikelbildung beeinträchtigt ist. Die Deletion von *vam3* führt nach diesem Modell zu einer Ansammlung von AP-3-Vesikeln, die nicht mit der Vakuole fusionieren können. Betrachtet man die Situation nach dem Modell von Angers *et al.* (2009) führen beide Deletionen zu einer Ansammlung von an Vesikelmembranen gebundenen AP-3-Komplexen, da hier die Fusion der Vesikel mit der Vakuole nicht möglich ist.

Durch eine Affinitätsaufreinigung an IgG-Sepharose durch den Protein-A-Teil des TAP-tags (Puig *et al.*, 2001) wurde der gesamte AP-3-Komplex aus den angegebenen Stämmen aufgereinigt (Abb. 3.28), als Nachweis wurde auf dem Western-Blot die mit einem TAP-tag versehene Untereinheit immunodetektiert. Anhand des Laufverhaltens dieser Untereinheit kann man, aufgrund des Größenunterschieds nach Restriktion mit der TEV-Protease, auch zwischen Proteinen unterscheiden, die spezifisch durch den Schnitt mit der TEV-Protease eluiert wurden oder unspezifisch eluierten. Im Wildtyp- und auch im *vps41Δ*- und *vam3Δ*-Stamm, also ohne Überproduktion des AP-3-Komplexes, band ein Großteil von Apl5-TAP und auch Apm3-TAP an die Säule, während in den Überproduktionsstämmen, nur wenig Protein band, der Hauptteil befand sich in der nicht gebundenen Fraktion. Durch die Überproduktion scheint es also zu einer Umfaltung des Komplexes zu kommen, der die Zugänglichkeit des TAP-tags sowohl am Apl5 als auch am Apm3 vermindert. Diese Beobachtung in Zusammenhang mit der Interpretation der subzellulären Fraktionierung, dass es anscheinend zu einer Aggregation des AP-3-Komplexes kommt (siehe Kap. 3.8.7), deutet auf eine Fehlfaltung der Untereinheiten des AP-3-Komplexes hin. In allen Stämmen, aber vor allem in den Überproduktionsstämmen, bleibt auf der IgG-Sepharose nach Elution durch die TEV-Protease sowohl geschnittenes als auch ungeschnittenes Protein zurück, das durch eine denaturierende Elution von der IgG-Sepharose gewaschen wird. Die Proteine scheinen also noch über eine weitere unspezifische Wechselwirkung an die Affinitätsmatrix zu binden, vorstellbar wäre hier eine Bindung der 3xHA-tags an den anderen AP-3-Untereinheiten. Auch eine Denaturierung und anschließende Präzipitation während der Aufreinigung käme in Frage. In jedem Fall scheint eine Aufreinigung über den TAP-tag an einer der hier

---

getesteten Untereinheiten des AP-3-Komplexes nicht sinnvoll für eine weitere Verwendung in Untersuchungen *in vitro* zu sein, da die Funktionalität des aufgereinigten Komplexes fraglich ist.

Auch die Suche nach Interaktionspartnern des AP-3-Komplexes durch die Affinitätsaufreinigung an Apl5-TAP mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der aufgereinigten Proteine (Abb. 3.29) lieferte keine neuen Erkenntnisse über Interaktionspartner, lediglich die anderen Untereinheiten des AP-3 Komplexes und ein Chaperon wurden identifiziert. Das im untersuchten Fall ebenfalls in größeren Mengen exprimierte Vps41 wurde in dieser Analyse nicht gefunden. Dies spricht für eine schwache Wechselwirkung von Vps41 mit Apl5. Ein Problem könnte auch in diesem Fall die bereits in anderen Experimenten vermutete Aggregation des AP-3-Komplexes sein, die durch die Fusion mit dem HA-Epitop bzw. dem TAP-tag und durch die Überexpression der Proteine zu Stande kommen könnte.

Die Vermutung, dass die Funktionalität des ALP-Weges in den diploiden Gal-AP-3-Stämmen auf die Funktion der durch den endogenen Promotor regulierte Expression der nativen AP-3-Untereinheiten zurückzuführen sein könnte, wurde bestätigt. Diese verdecken einen Defekt im ALP-Weg, was durch die Betrachtung der Funktionalität des ALP-Weges in einem haploiden AP-3-Überproduktionsstamm bestätigt wurde. Die Überproduktion oder die Fusion der einzelnen Untereinheiten mit einem 3x HA-Epitop führt zu einem Defekt im ALP-Weg (Abb 3.32 unten). Die Lage der 3x HA-Epitope vor dem N-Terminus der einzelnen AP-3-Untereinheiten könnte zu einer Fehlfaltung der einzelnen Untereinheiten oder zu einer falschen Assemblierung des AP-3-Komplexes führen. Die N-Termini der großen Untereinheiten liegen im Rumpf der Adaptorprotein-Komplexe, wie an AP-1 und AP-2 gezeigt wurde (Hirst *et al.*, 1998), so dass die N-terminale Fusion die Interaktion von Apl5 und Apl6 mit den beiden anderen Untereinheiten Apm3 und Aps3 stören könnte. So führt bereits eine Überproduktion und das Fusionieren von 3x HA an eine der beiden großen Untereinheiten zu einem Defekt im ALP-Weg (Abb. 3.33). Ein zuerst vermutetes Ungleichgewicht der Menge an einzelnen Untereinheiten durch die Überproduktion

---

nur einer großen Untereinheit konnte auch als Grund für den Defekt im ALP-Weg ausgeschlossen werden, da auch in Stämmen in denen sowohl eine große als auch eine kleine Untereinheit (Apl5/Apm3 bzw. Apl6/Aps3) überexprimiert wurden, einen Defekt zeigten. Ob die Überproduktion des Komplexes oder das gleichzeitig durchgeführte fusionieren der 3xHA-*tags* an den N-Terminus der AP-3-Untereinheiten zur Funktionsunfähigkeit führten, konnte nicht geklärt werden.

Die Aufreinigung eines funktionalen AP-3-Komplexes ist also unter den getesteten Bedingungen und aus den hier hergestellten Hefestämmen nicht möglich.

---

## **5. Ausblick**

Die von mir präsentierten Ergebnisse erweitern das Modell nach Angers *et al.* (2009). Hierbei ist Vps41 im ALP-Weg notwendig, um das *Docking* der AP-3-Vesikel an der Vakuole zu vermitteln. Für diese Aufgabe spricht vor allem das hier präsentierte Modell, das Vps41 über die PEST-Domäne mit der Apl5-*ear*-Domäne wechselwirken kann. Dies geschieht aber nicht schon am späten Endosom sondern erst und ausschließlich an der Vakuole, wenn das ALPS-Motiv von Vps41 nicht in die Membran eintauchen kann, weil die Membrankrümmung nicht passend ist und es zusätzlich durch Yck3 phosphoryliert wird (Cabrera, Langemeyer, eingereicht 2010). Diese Notwendigkeit der Phosphorylierung und die kompetitive Bindung von Apl5 oder Liposomen an Vps41 (Abb. 3.22) lässt sich nicht mit dem Modell nach Rehling *et al.* in Verbindung bringen. In diesem Modell wäre eine Regulation der Apl5-Bindung über die Membrankrümmung, je nachdem ob Vps41 am Endosom oder an der Vakuole lokalisiert ist, nicht notwendig. Hier würde Vps41 einfach an den durch die GTPase Arf1 an die Golgi-Membran rekrutierten AP-3-Komplex binden.

Auch die diffuse Verteilung von Apl5-GFP in Vps41 $\Delta$ PEST-Zellen lässt eher auf eine Akkumulation von Vesikeln als eine von AP-3-Komplex an Golgi-Membranen schließen (Abb. 3.15). Dieser Stamm könnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen näher betrachtet werden, um zu klären, ob dieses diffuse Signal wirklich auf akkumulierte Vesikel zurückgeht, die nicht mit der Vakuole fusionieren können. Ebenso könnte man klären, ob die an der Vakuole auftretende Akkumulation von Apl5-GFP in Vps41-L100,101A-Zellen (Abb. 3.19) eine Ansammlung von Vesikeln oder nicht membrangebundenem AP-3-Komplex ist.

Zu klären ist noch, ob es sich bei der PEST-Domäne nur um einen notwendigen Teil zur Wechselwirkung mit Vps41 handelt oder ob dieser auch ausreichend ist um die Wechselwirkung mit Apl5 zu vermitteln. Die bisherigen Ergebnisse deuten nicht darauf hin, dass diese Domäne ausreichend ist, da die Fusion der N-terminalen Hälfte von Vps41 vor Vps39, die andere HOPS-spezifische Untereinheit, zu keiner Rettung des Vps41 $\Delta$ PEST-Phänotyps führte (Abb. 3.18 und 3.19). Auch die Funktion der konservierten, geladenen ersten Hälfte der PEST-Domäne (Abb. 4.2) muss aufgeklärt werden und ebenfalls ob es sich bei dem hier identifizierten Di-Leucin-ähnlichem

---

Motiv, dem zweiten Teil der PEST-Domäne, wirklich um die gesamte Erkennungs- und Bindesequenz handelt oder noch über diesen Bereich hinaus geht (Abb. 4.5). Eventuell haben die nach dem Ende der PEST-Domäne folgenden Aminosäurereste, die ebenfalls hoch konserviert sind, ebenso eine Funktion in der Apl5-Bindung.

Das präsentierte Modell gibt einen Einblick, wie die Bindung von Apl5 an Vps41 an der Vakuole stattfinden und wie diese reguliert sein könnte. Eine weitere Untersuchung und Einschränkung der für die Bindung notwendigen Bereiche ist sinnvoll und kann weitere Einblicke in die Prozesse und die Regulation der Vesikelfusion mit Zielorganellen ermöglichen.



---

## **6. Material und Methoden**

### **6.1 Medien**

Für die Anzucht von Hefen wurden die folgenden Medien verwendet:

#### **6.1.1 Vollmedien**

Die Anzucht von Hefestämmen erfolgte in YP-Medium (*yeast extract peptone*), das sich aus 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton (pH = 5,5) zusammensetzte. Diese wurden in 1 l H<sub>2</sub>O gelöst. Je nach gewünschter Kohlenstoffquelle wurden 20 g D-Glukose (YPD) oder 20 g Galaktose (YPG) zugegeben.

#### **6.1.2 Synthetische Medien**

Die Anzucht in synthetischen Medien erfolgte, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, falls nicht integrative Plasmide transformiert wurden. Die synthetischen Medien setzten sich aus 6,75 g *Difco Yeast Nitrogen base w/o aminoacids* (BD-Diagnostic Systems; Heidelberg), 20 g D-Glukose und 0,75 g CSM-X (definierte Aminosäurezusammensetzung; MP-Biomedicals; Eschwege) auf 1 l H<sub>2</sub>O (pH = 5,5) zusammen.

Als Medium zur Anzucht von *E. coli* wurde LB-Medium verwendet, das aus 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton und 10 g NaCl pro 1 l H<sub>2</sub>O (pH = 7,2) bestand. Zur Selektion wurde dem Medium vor der Verwendung das benötigte Antibiotikum (Tab. 6.1) frisch zugegeben.

Alle Medien wurden nach der Herstellung für 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 20 g Agar pro Liter zugegeben.

---

### 6.1.3 Verwendete Antibiotika

Die folgenden Antibiotika wurden den Medien bei Bedarf vor der Benutzung frisch zugegeben.

**Tab. 6.1: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg/ml
Geneticin	200 µg/ml
Hygromycin	300 µg/ml
Kanamycin	35 µg/ml
Nourseothricin (ClonNat)	100 µg/ml

### 6.2 Verwendete Stämme und Vektoren

#### 6.2.1 *E. coli* DH5α

Der *E. coli* Stamm DH5α wurde für alle Klonierungsarbeiten verwendet. Kompetente Zellen dieses Stammes wurden von der Firma Invitrogen bezogen bzw. von A. Perz oder K. Auffarth (Abteilung Biochemie, Universität Osnabrück) kompetent gemacht.

Genotyp: F<sup>-</sup> Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1*  
*hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*<sup>-</sup>

#### 6.2.2 *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) Rosetta wurde zur heterologen Expression von eukaryotischen Proteinen verwendet. Dieser Stamm trägt ein Plasmid, das zusätzliche, von *E. coli* nur selten genutzte tRNAs verfügbar macht. Diese werden in eukaryotischen Proteinen häufiger verwendet und würden somit einen limitierenden Faktor in der Proteinbiosynthese darstellen.

Genotyp: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3) pRARE (Cam<sup>R</sup>)

---

### **6.3 Hefestämme**

Die genutzten Hefestämme sind in Tabelle 12.1 im Anhang aufgelistet.

### **6.4 Zellanzucht**

Die Zellanzucht erfolgte in antibiotikahaltigem LB-Medium im Falle von *E. coli* und in glukose- oder galaktosehaltigem YP-Medium bei *S. cerevisiae*-Kulturen. Das Animpfen erfolgte mit Zellen einer Einzelkolonie von Festmedium oder alternativ aus einer Stammkultur. Alle Arbeiten an sterilem Medium erfolgten in unmittelbarer Nähe einer Bunsenbrennerflamme. Das Wachstum erfolgte bei 37°C über Nacht in einem Schüttelinkubator.

### **6.5 Stammkulturen**

Von allen relevanten Hefe- oder Bakterienkulturen wurden Stammkulturen angelegt. Diese wurden in 15% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

### **6.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

Verwendete Restriktionsenzyme und andere für die Molekularbiologie verwendete Enzyme oder Reagenzien wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen, soweit nicht anders angegeben.

Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurde steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verwendet.

#### **6.6.1 Plasmid-Isolierung**

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ (Fermentas, St. Leon-Roth) nach Anleitung des Herstellers. Als Ausgangsmaterial dienten 5 ml einer Übernachtskultur, aus der Plasmid-DNA in 35 µl Elutionspuffer isoliert wurde.

---

### 6.6.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgrades

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und des Reinheitsgrades von Plasmidlösungen wurde am NanoDrop®-ND1000-Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen) ein Spektrum der Lösung in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 400 nm nach Angaben des Geräteherstellers gemessen. Der Reinheitsgrad wurde aus dem Quotienten der gemessenen Wellenlängen bei 260 und 280 nm berechnet. Hierbei ist eine ausreichende Reinheit der Lösung bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 gegeben.

### 6.6.3 Transformation mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurde 1 µl einer Plasmidlösung zu 50 µl einer Lösung kompetenter Zellen gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz auf einer vorgewärmten (37°C), antibiotikahaltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 6.6.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Methode der PCR (*polymerase chain reaction*) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Durch eine wiederholte Abfolge von drei Reaktionsschritten bei verschiedenen Temperaturen wird die Ausgangs-DNA vervielfältigt. Hierzu wird eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet.

Mit Hilfe der PCR und der *Pfu*-DNA-Polymerase (rekombinant) der Firma Fermentas wurden Genabschnitte amplifiziert, um diese dann später in andere Vektoren zu klonieren. Um Mutationen in Plasmide einzuführen wurde eine spezielle Mutagenese-PCR (siehe Kap. 6.6.6) durchgeführt. Ein weiteres spezielles PCR-Programm (Knop-PCR; (siehe Kap. 6.6.9) wurde verwendet, um DNA-Fragmente herzustellen, die nach Transformation in Hefezellen über homologe Rekombination in deren Genom inserierten.

---

### 6.6.5 Standard-PCR zur Amplifizierung von Teilen genomischer DNA

Zur Klonierung von DNA aus Hefezellen wurde das entsprechende Fragment des jeweiligen Gens durch eine PCR mit einer Pfu-Polymerase amplifiziert. Hierbei diente aus Hefen isolierte genomische DNA als Template, die Primer wurden so gewählt das sie vor und nach der codierenden Sequenz eine Restriktionsschnittstelle trugen, die ein Ausschneiden der DNA mit anschließender Ligation mit einem ebenso geschnittenem Überexpressionsplasmid ermöglichten.

**Tab. 6.2: PCR-Cycler Programm für Standard-PCR**

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Primäre Denaturierung	95 °C	2 min	1x
Hybridisierung	50 °C	30 sec.	35x
Elongation	70 °C	1 min/0,5 kb	
Denaturierung	95 °C	30 sec.	
Terminale Elongation	70 °C	10 min	1x
Lagerung	4 °C	bis zur weiteren Verwendung	

**Tab. 6.3: Pipettierschema für Standard-PCR**

Komponente	Volumen
Template – DNA	1 µl
Puffer (10x)	5 µl
Primer I (10 pmol)	1,25 µl
Primer II (10 pmol)	1,25 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
DMSO	3,5 µl
MgSO <sub>4</sub>	7 µl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,8 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (steril)	ad 50 µl

---

### 6.6.6 Mutagenese durch PCR

In das Ausgangsplasmid wurde die gewünschten Mutationen mit Hilfe einer Mutagenese-PCR eingeführt (basierend auf dem QuickChange® site directed Mutagenesis Kit, Stratagene).

Hierbei wird in einen Vektor eine Punktmutation eingeführt, indem zwei entgegengesetzt gerichtete, etwa 30 Basen lange Oligonukleotid-Primer verwendet werden, die etwa mittig die Mutation tragen. Durch die PCR entsteht ein Überschuss an Plasmiden, welche die Mutation enthalten.

**Tab. 6.4: PCR-Cycler Programm für Mutagenese-PCR**

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Primäre Denaturierung	95 °C	1 min	1x
Hybridisierung	60 °C	50 sec.	18x
Elongation	68 °C	1 min/1 kb	
Denaturierung	95 °C	50 sec.	
Terminale Elongation	68 °C	7 min	1x
Lagerung	4 °C	bis zur weiteren Verwendung	

In die Mutagenese-PCR wurde als Template-DNA das Plasmid pRS406-NOP1pr-Vps41 und die beiden Oligonukleotide (Vps41 L100,101A-Primer I und II) mit der entsprechenden Mutationsstelle eingesetzt (Tab. 6.6).

**Tab. 6.5: Pipettierschema für Mutagenese-PCR**

Komponente	Volumen
Template – DNA (1:100)	2,5 µl (=10 ng)
Puffer (10x)	5 µl
Primer I (125 ng)	0,9 µl
Primer II (125 ng)	0,9 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
<i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl) (Stratagene)	1 µl
QuikSolution (Stratagene)	3 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (steril)	ad 50 µl

Die Sequenz der Primer wurde anhand der gewünschten Bindestelle festgelegt. Das Basentriplett an der Mutationsstelle, wurde so gewählt, dass es für die gewünschte Aminosäure codiert.

**Tab. 6.6: Zur Einführung von Mutationen genutzte Primer.**

Mutationsstellen sind unterstrichen.

Name	Nucleotidsequenz
5'-Vps41 L100,101A	5'-GATGAGCCCCCGCAGCGAAGTACACACGAATTAGTCAACTC
3'-Vps41 L100,101A	5'-GTGTGTA <u>CTTCGCTGCGGGGGG</u> GCTCATCTTCGTCATCC

### 6.6.7 Dpn I -Verdau

Um die Template-DNA abzubauen und somit die Rate an falsch positiven Klonen zu reduzieren, wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut. Dieses Enzym baut spezifisch methylierte DNA ab. Da die bei der PCR entstandenen Plasmide aus unmethylierter DNA bestehen, wird bei diesem Verdau nur das Ausgangsmaterial, also die methylierte DNA ohne Mutation, fragmentiert.

---

Zum Verdau wurde dem PCR-Ansatz 1 µl des FastDigest-Enzyms *DpnI* (Fermentas) zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss konnten kompetente *E.coli* DH5a mit dem PCR-Produkt transformiert werden.

#### 6.6.8 Sequenzierung von Plasmiden

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte durch die Firma GATC (Konstanz, Deutschland) nach deren Angaben.

#### 6.6.9 Knop-PCR

Die sogenannte Knop-PCR dient zur Amplifizierung von DNA-Modulen aus den pYM-Plasmiden (Janke *et al.*, 2004). Diese inserieren nach der Transformation von Hefezellen mit dem PCR-Produkt durch homologe Rekombination in das Genom der Hefe. Dieses Baukastenprinzip ermöglicht es, Proteine mit einer Auswahl an *tags* zu versehen oder ihre Expression unter die Kontrolle verschieden starker Promotoren zu bringen. Die Template-DNA enthält bei diesem System die Gensequenz für den *tag* oder den Promotor, die Oligonucleotide lagern sich an diese DNA an, enthalten aber auch jeweils zum Zielprotein homologe Bereiche und wurden nach den Vorgaben in der oben angegebenen Quelle entworfen.



**Tab. 6.7: PCR-Cycler Programm für Knop-PCR**

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Primäre Denaturierung	95 °C	4 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 sec.	10x
Hybridisierung	54 °C	30 sec.	
Elongation	68 °C	2 min 40 sec	
Denaturierung	95 °C	30 sec.	20x
Hybridisierung	54 °C	30 sec.	
Elongation	68 °C	2 min 40 sec +20 sec/Wdh.	
Lagerung	4 °C	bis zur weiteren Verwendung	

**Tab. 6.8: Pipettierschema für Mutagenese-PCR**

Komponente	Volumen
Template – DNA	1 µl
Knop-PCR-Puffer (10x)	5 µl
Primer I (10 pmol/l)	3,2 µl
Primer II (10 pmol/l)	3,2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,75 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl) (Fermentas)	0,4 µl
<i>Vent</i> -DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,2µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (steril)	ad 50 µl

---

## 6.6.10 Restriktionsschnitte von Plasmid-DNA

### 6.6.10.1 Analytische Schnitte

Zur Analyse von aus *E. coli* isolierter DNA, wurde ein Aliquot der Plasmidlösung mit Restriktionsenzym und dem entsprechendem Puffer zusammengegeben (Tab. 6.9) und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

**Tab. 6.9: Pipettierschema Analytischer Restriktionsschnitt**

Komponente	Volumen
DNA	3 µl
Puffer (10x)	1 µl
Restriktionsenzym (10 u/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 10 µl

### 6.6.10.2 Präparative Schnitte

Zu Klonierungszwecken wurden für einen 50 µl Ansatz 1,5 µg an Plasmid-DNA oder 25 µl eines PCR-Produktes eingesetzt und mit je 1 µl der benötigten Restriktionsenzyme für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der 2-stündigen Inkubation wurden die Enzyme falls möglich durch Erhitzen inaktiviert (20 min; 65°C bzw. 80°C je nach Enzym). Anschließend wurden die Ansätze auf ein präparatives Agarosegel gebracht.

---

**Tab. 6.10: Pipettierschema präparativer Restriktionsschnitt**

Komponente	Volumen
FastDigest®-Puffer (10x)	5 µl
FastDigest®-Restriktionsenzym (Fermentas)	1 µl
DNA	1,5 µg (Plasmid) bzw. 25 µl PCR-Produkt
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### 6.6.12 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten aus präparativen und analytischen Schnitten erfolgte durch Elektrophorese in einem 1 % (w/v) Agarosegel. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, pH = 8,3; 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) unter mehrmaligem Aufkochen gelöst und anschließend mit 4 µl Ethidiumbromid (1% (w/v) Lösung, AppliChem, Darmstadt) pro 50 ml Agaroselösung versetzt. Die Auftrennung von DNA erfolgte bei 120 V.

Die Isolierung der DNA aus den ausgeschnittenen Gelstücken erfolgte mit dem „Nucleospin Extract II“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Vorschrift des Herstellers.

#### 6.6.13 Ligation

Für einen 20 µl Ligationsansatz (Tab. 6.11) wurden 50 ng des Vektors und die 5-fache Molmenge des Inserts in die Reaktion eingesetzt. Die Ligation der DNA-Strangbrüche erfolgte über Nacht bei 4°C durch eine T4-DNA-Ligase (Fermentas) aus *E. coli*. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz inkubiert der nur 50 ng Vektor und kein Insert enthielt (Blindprobe).

---

**Tab. 6.11: Pipettierschema für Ligationsansätze und Blindproben**

	Ligationsansatz	Blindprobe
Vektor-DNA	50 ng	50 ng
Insert-DNA	5x Molmenge des Vektors	-
T4-Ligase-Puffer (10x)	2 µl	2 µl
T4-Ligase (5 u/µl)	0,5 µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 µl	ad 20 µl

#### 6.6.14 Transformation von DNA aus PCR- und Ligationsreaktionen in *E. coli*

Um Plasmide, die bei PCR- oder Ligationsreaktionen entstanden sind, zu vervielfältigen wurden diese in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Hierzu wurden 50 µl einer Suspension kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$  - Zellen auf Eis aufgetaut. Diesen wurden 10 µl der Produkte aus Mutagenese-PCR- bzw. Ligationsreaktion zugegeben und der Ansatz dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss bekamen die Zellen bei 42°C einen Hitzeschock. Danach wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, mit 450 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) versetzt und die Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden 250 µl des Transformationsansatzes auf einer antibiotikahaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und zum Wachstum über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 6.6.15 Transformation von Plasmiden oder PCR-Fragmenten in *S. cerevisiae*

Zur Transformation von *S. cerevisiae* mit DNA aus einer Knop-PCR oder mit Plasmid-DNA wurde eine Übernacht-Kultur des benötigten Hefestammes angesetzt und am nächsten Morgen auf eine 20 ml Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 ml<sup>-1</sup> verdünnt. Diese wurde für 3-5 Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die

---

Zellen durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge (Centrifuge-5810-R) geerntet, einmal mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 1 ml 0,1 M LiAc gewaschen. Das Pellet wurde in 350 µl 0,1 M LiAc aufgenommen. Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl dieser Suspension verwendet und mit 240 µl 50 % PEG4000, 36 µl 1M LiAc und 25 µl Carrier-DNA (vor der ersten Benutzung 5 min aufgeköcht) vermischt. Alle verwendeten Lösungen waren steril. Zum Schluß wurden zu den Zellen 25 µl Produkt einer Knop-PCR, 1,5 µg integrative Plasmid-DNA (vorher durch Restriktionsverdau linearisiert) oder 5 µl nicht integrativer Plasmid-DNA gegeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit H<sub>2</sub>O transformiert. Die Ansätze wurden für 30 min bei 30°C inkubiert, anschließend wurde jeder Ansatz mit 36 µl DMSO versetzt und für 10 min bei 42°C weiter inkubiert. Um die Zellen auf Selektionsmedium auszuplattieren, wurden die Ansätze für 5 min bei 4000 Upm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet in 150 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Agarplatten wurden dann für 3 Tage bei 30°C inkubiert, Klone abgenommen und neu auf Selektionsmedium ausgestrichen. Bei der Verwendung von Antibiotikamarkern wurden die Transformationsansätze erst für 24h auf YPD-Vollmedium ausplattiert, bevor sie auf Selektionsplatten replika-plattiert wurden.

#### 6.6.16 Hefe-2-Hybrid Untersuchungen

Zur Untersuchung von Proteinwechselwirkungen wurde eine Kombination von den Plasmiden pFBT9 und pACT2, die jeweils eine DNA-Sequenz, codierend für die zu untersuchenden Proteine, beinhalten in den Hefestamm PJ69-4A gebracht (Shorter *et al.*, 1999). Die Zellen wurden anschließend zur Selektion auf SDC –Leu –Trp-Agarplatten ausgestrichen (DDO-Platten; *double drop out*). Transformanten wurden gepickt und zuerst auf einer SDC Leu –Trp –Ade –Leu-Agarplatte (QDO-Platten; *quadruple drop out*) und anschließend auf einer DDO-Platte ausgestrichen. Für jede Kombination wurden 4 Klone gepickt und auf Wachstum getestet, was auf eine Wechselwirkung der kombinierten Proteine hindeutet.

---

## **6.7 Biochemische Arbeitsmethoden**

Alle verwendeten Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen.

### **6.7.1 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Konzentration an Protein in Lösungen erfolgte durch photometrische Vermessung der Probe nach Bradford (1976). Dazu wurde ein Aliquot der Probe mit 850  $\mu\text{l}$  des Roti-Quant Reagenz (Roth, Karlsruhe) versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption dieser Probe wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen. Zur Kalibrierung wurde eine Messreihe verwendet, welche mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bis 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  angelegt wurde.

### **6.7.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

#### **6.7.2.1 SDS-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine in einer Lösung erfolgte durch eine Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Bei dieser Methode werden Proteine elektrophoretisch, ihrem Molekulargewicht nach, durch eine Gelmatrix aufgetrennt. Das SDS überlagert die Eigenladung der Proteine und sorgt für eine negative Ladung (Laemmli, 1970). Zur Verwendung kamen 7,5 % und 12 % Trenngelle. Der SDS-Laufpuffer setzte sich aus 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS zusammen. Proben wurden in SDS-Ladepuffer (Laemmli-Puffer) aufgenommen (2 % (w/v) SDS, 62,5 mM Tris, pH = 8,0; 10 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau).

Die Proben wurden bei einer Spannung von 200 V aufgetrennt. Das Gel mit den aufgetrennten Proben konnte nun in den Western Blot eingesetzt oder mit Coomassie-Blau G-250 gefärbt werden.

---

### 6.7.2.2 Western Blot

Bei der Technik des *Western Blots* werden Proteine von einer Trägermatrix, in diesem Fall das Polyacrylamidgel, elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Proteine können anschließend immunologisch durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Die Proteine wandern während des Transfers, aufgrund der Ladung durch das SDS, in Richtung Anode. Die Blotkammer wurde mit Western-Transfer-Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,025 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol) gefüllt. Der Blot erfolgte für 1,5 Stunden bei 17 V und 400 mA.

Nach dem Beenden des Transfers wurde die Nitrocellulose-Membran in 5 % (w/v) Milchpulver-PBS bei Raumtemperatur für eine Stunde geschüttelt und anschließend unter Schütteln mit dem gewünschten primären Antikörper, in 5 % (w/v) Milchpulver-PBS, inkubiert.

Zum Waschen der Membran wurde die Nitrocellulose-Membran fünfmal für 5 Minuten mit TBST-Puffer (10 mM Tris, pH = 7,4; 155 mM NaCl; 0,5 % (v/v) Tween 20) unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurde der Blot mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Hierbei handelte es sich um 1:10000 verdünntes Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-IgG, an das ein Fluoreszenzfarbstoff (Alexa-Fluor680, Invitrogen oder Dylight™800, Pierce) konjugiert ist. Die Inkubation erfolgte unter Schwenken für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation folgten wieder drei Waschschritte mit TBST-Puffer für jeweils 5 Minuten und zum Abschluß zwei Waschschritte mit PBS (1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 mM KCl; 140 mM NaCl) ebenfalls für 5 Minuten. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte durch den Odyssey-Scanner (LI-COR Biosciences, Bad Homburg).

### 6.7.3 Affinitätsaufreinigung heterolog exprimierter Proteine aus *E. coli*

Die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* BL21 Rosetta erfolgte nach Induktion durch Zugabe von 1mM IPTG bei einer Dichte der Kultur von OD<sub>600</sub> ≈ 0,4 und einer Inkubation der Zellen bei 16°C über Nacht im Schüttelinkubator. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 8000 Upm in der

---

Zentrifuge Avanti J26 XP (Beckman-Coulter; Krefeld) mit dem Rotor JLA 8.1000 geerntet. Die Zellen aus 1 Liter Medium wurden in 20 ml Puffer (50 mM Tris, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 1mM PMSF; 0,05x PIC) aufgenommen. Der Aufschluß erfolgte in zwei Durchgängen im Multifluidizer M-110L der Firma Microfluidics (Lampertheim). Das Lysat wurde für 20 min bei 25.000 Upm im Rotor JA 25-50 abzentrifugiert, so daß der Überstand klar war. Dieser Überstand wurde auf vorher mit dem oben genannten Puffer gewaschene Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) oder Glutathion-Sepharose (GE-Healthcare, Freiburg) gegeben und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Das Waschen der Säule mit dem an die Matrix gebundenem Protein erfolgte mit 25 ml des oben angegebenen Puffers, im Fall einer Ni-NTA-Aufreinigung wurden 70 mM Imidazol zugegeben. Die Elution des Proteins erfolgte von der Ni-NTA-Agarose durch Puffer mit einem Zusatz an 300 mM Imidazol, von der Glutathion-Sepharose durch den Puffer mit einer Zugabe von 20 mM reduziertem Glutathion. Die Fraktionen, welche Protein enthalten wurden vereint und anschließend wurde durch eine Gelfiltration über eine PD-10 Säule (GE-Healthcare, Freiburg) das Imidazol beziehungsweise Glutathion entfernt und die Proteine gegebenenfalls umgepuffert.

#### 6.7.4 Ganzzellhomogenisate von *S. cerevisiae*

Zum Nachweis des Expressionslevels von Proteinen in Hefe wurden Ganzzellhomogenisate hergestellt. Hierfür wurde eine Zellmenge äquivalent einer Dichte OD<sub>600</sub>=1 abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 75 µl Alkalische-Lyse-Puffer (1,85 M NaOH, 1 M β-Mercaptoethanol; 1mM PMSF) und anschließender Inkubation für 10 min auf Eis aufgeschlossen. Die Proteine in der Lösung wurden durch eine anschließende TCA-Fällung ankonzentriert. Soweit nicht anders angegeben, wurden 50% (entsprechend 0,5 OD<sub>600</sub>) in eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot eingesetzt.

#### 6.7.5 GST-Interaktionsstudien mit Apl-ear-Domänen

Die Fusionsproteine GST-Apl5-ear und GST-Apl4-ear wurden wie oben beschrieben in *E. coli* exprimiert und an GST-Sepharose gebunden und gewaschen. Allerdings



---

wurden sie nicht eluiert, sondern auf der Matrix belassen. Zur Lagerung wurden 2 ml PBS zugegeben. Durch das Abkochen eines definierten Volumens des immobilisierten Proteins wurde auf einem SDS-Gel die Konzentration des anhand eines ebenfalls aufgetragenen BSA-Standards (1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg) abgeschätzt.

Um die Wechselwirkung zu Vps41 zu untersuchen wurden 200 µg immobilisiertes GST-Apl-*ear* mit Hefelysat aus den zu untersuchenden Stämmen für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Menge an Lysat entsprach einem Äquivalent von 100 OD<sub>600</sub>-Zellen. Anschließend wurde die Säule dreimal mit je 1 ml Lyse-Puffer (20 mM Tris, pH = 6,8; 120 mM Kalium-Acetat) gewaschen und die gebundenen Proteine nach Zugabe von SDS-Ladepuffer durch aufkochen für 5 min bei 95°C eluiert. Die eluierten Proteine wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot konnte Vps41 immunodetektiert werden.

Das Hefelysat wurde nach der Vorschrift von Darsow *et al.* (2001) hergestellt, indem 1 Liter Hefekultur mit einer OD<sub>600</sub> = 1 durch Zentrifugation geerntet wurde und das Pellet mit 2 ml Lyse-Puffer (20 mM Tris, pH = 6,8; 120 mM Kalium-Acetat; 1 mM FY; 1 mM PMSF; 1 mM DTT) resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu 750 µl aufgeteilt und mit der gleichen Menge an Glaskügelchen vermischt. Der Zellaufschluss erfolgte dann für 3x 10 min im Disruptor-Genie (Scientific Industries, Bohemia, NY, U.S.A.) mit jeweils 5 min Pause. Das Lysat wurde in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand der einzelnen Aliquots vereint und durch Zugabe einer 25 % (v/v) Triton X-100 Lösung auf eine Konzentration von 1 % (v/v) gebracht. Es folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 13.000x g für 10 min. Der Überstand wurde in den GST-Wechselwirkungsstudien als „Hefelysat“ verwendet.

#### 6.7.6 Tandem-Affinity-Purification

Die Aufreinigung über den TAP-*tag* wurde nach der Vorschrift nach Puig *et al.* (2001) durchgeführt. Hierzu wurden 3 l Hefekultur des Stammes mit dem Protein, welches einen TAP-*tag* trägt, durch Zentrifugation bei 5000 Upm für 5 min in der Zentrifuge Avanti J26 XP (Beckman-Coulter; Krefeld) mit dem Rotor JLA 8.1000 geerntet. Das Zellpellet wurde mit 25 ml H<sub>2</sub>O und anschließend mit 25 ml kaltem TAP-Lyse-Puffer

---

(50 mM HEPES, pH = 7,5; 300 mM NaCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,15 IGEPAL C-630) mit 0,5 mM PMSF und 1x FY Protease Inhibitor Mix (Serva, Heidelberg) gewaschen. Das Zellpellet nach dem letzten Waschschrift wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Das Zellpellet wurde aufgetaut und das Volumen mit TAP-Lyse-Puffer (+ 1 mM PMSF; 1x FY Protease Inhibitor Mix; 1 mM DTT) auf 25 ml eingestellt. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen an Glaskügelchen (Durchmesser 0,4 - 0,8 mm) vermischt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Pulverisette-Planetenmühle (Fritsch, Idar-Oberstein) bei 500 Upm für 4 min und 2 Wiederholungen mit einer Pause von 2 min. Das Lysat wurde von den Glaskügelchen getrennt, indem es durch eine Omnifix 50 ml Spritze (B. Braun, Melsungen) gegeben wurde, in der die Kügelchen zurück blieben. Diese wurden mit 10 ml des Puffers gewaschen. Das Lysat wurde für 10 min, 4000x g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in eine Ultrazentrifugation bei 100000x g für 1 h bei 4°C eingesetzt. Der Überstand wurde, nachdem die obere Lipidphase abgenommen wurde, auf 5% (v/v) Glycerin eingestellt und auf 400 µl, vorher dreimal mit TAP-Lyse-Puffer gewaschene, IgG-Sepharose (GE Healthcare, Freiburg) gegeben. Dies wurde unter Schwenken für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde in MoBiCol-Säulen (MoBiTec, Göttingen) überführt und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde anschließend mit 15 ml TAP-Lyse-Puffer (+0,5 mM DTT) gewaschen.

Eine Elution unter nativen Bedingungen dagegen wurde erreicht, indem die IgG-Sepharose in 150 µl TAP-Lyse-Puffer aufgenommen und mit 4 µl TEV-Protease (1 mg/ml) für 1 h bei 16°C inkubiert wurde. Durch kurze Zentrifugation der MoBiCol-Säulen wurden die Proteine eluiert.

In einigen Fällen, vor allem bei nachfolgender massenspektrometrischer Untersuchung sollte eine höhere Reinheit der Proteine durch einen zweiten Aufreinigungsschritt erreicht werden. Hierzu wurde das TEV-Eluat mit dem gleichen Volumen an TAP-Lyse-Puffer (+4 mM CaCl<sub>2</sub>) versetzt und auf vorher äquilibrierte Calmodulin-Sepharose gegeben und bei 4°C für 1 h inkubiert. Die Säule wurde anschließend mit 10 ml TAP-Lyse-Puffer (+1 mM DTT; +2 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen. Die Elution erfolgte

---

durch die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  TAP-Lyse-Puffer (+5 mM EGTA) und Inkubation für 20 min bei 30°C.

#### 6.7.8 Mini-TAP

Eine Mini-TAP wurde durchgeführt wie eine Standard-TAP (Kap. 6.7.6). Als Ausgangsmaterial diente hier eine Kultur von 250 ml die bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 2 \text{ ml}^{-1}$  gewachsen war. Das Zellpellet wurde in 750  $\mu\text{l}$  TAP-Lyse-Puffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 750  $\mu\text{l}$  Glaskügelchen und dreimal 10 min Schütteln auf dem Disruptor-Genie bei 4°C mit je 5 min Pause zwischen den Durchgängen. Alle anderen Schritte erfolgten wie im Standardprotokoll, die Volumina der Puffer wurden entsprechend der Zellmenge angepaßt. Statt der MoBiCol-Säulen wurden alle Schritte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Säule wurde mit dreimal 1 ml des oben angegebenen Puffers gewaschen. Die Elution erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach dem IgG-Aufreinigungsschritt durch Zugabe von SDS-Ladepuffer und Inkubation von 5 min bei 95°C.

#### 6.7.9 (Co-) Immunopräzipitation von GFP-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von GFP-Fusionsprotein folgte dem TAP-Protokoll (Kap. 6.7.6) bis auf die verwendete Affinitätsmatrix, in diesem Fall wurde von Henning Kleiner-Balderhaar (Universität Osnabrück, Abteilung Biochemie) hergestellte anti-GFP-Sepharose (an Protein A-Sepharose (GE Healthcare, Freiburg) gekoppelte GFP-Antikörper) verwendet. Zur Verwendung kam ebenfalls der TAP-Lyse-Puffer allerdings mit 150 mM NaCl. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von zweimal 300  $\mu\text{l}$  0,1 M Glycin, pH = 2,6.

#### 6.7.10 Subzelluläre Fraktionierung von Hefezellen

Die milde Zellyse wurde wie beschrieben durchgeführt (LaGrassa *et al.*, 2005), anschließend wurde das Lysat erst in eine Zentrifugation bei 13.000x g bei 4°C für 15 min eingesetzt. Das resultierende Pellet wurde hier als P13-Fraktion bezeichnet, der Überstand wurde in eine weitere Zentrifugation bei 100000x g bei 4°C für 1 h

---

eingesetzt. Der Überstand wurde als S100-, das Pellet als P100-Fraktion bezeichnet. In der P13-Fraktion befinden sich schnell sedimentierende Organellen, wie z.B. die Vakuole, in der P100-Fraktion langsam sedimentierende Organellen, wie das ER oder der Golgi, sowie Transportvesikel. In der S100-Fraktion sind lösliche Proteine und größere Proteinaggregate zu finden.

#### 6.7.11 Untersuchung des Vps41-Phosphorylierungsstatus

Um festzustellen, ob die Phosphorylierung von Vps41 durch Yck3 möglich ist, wurde wie bei der Subzellulären Fraktionierung (Kap. 6.7.10) beschrieben, eine P13-Fraktion hergestellt. Diese wurde, wie in Cabrera *et al.* (2009) beschrieben, mit ATP-regenerierendem System bei 26°C für 45 min inkubiert. Anschließend konnte man durch das Laufverhalten des Proteins in einem 7,5 % SDS-Gel auf die Phosphorylierung von Vps41 rückschließen. Phosphoryliertes Vps41 wandert langsamer im Gel als nicht phosphoryliertes.

#### 6.7.12 CPY-Sekretionstest

Der Test auf Sekretion der Carboxypeptidase Y (CPY) wurde wie beschrieben durchgeführt (Raymond *et al.*, 1991). Eine Kultur des zu untersuchenden Stammes wurde über Nacht bei 30°C inkubiert und auf eine  $OD_{600} = 1 \text{ ml}^{-1}$  verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden sequentielle 1:10 Verdünnung bis zu einer Endverdünnung von  $OD_{600} = 0,001 \text{ ml}^{-1}$  hergestellt. Je 5  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnungen wurden auf eine YPD-Platte getropft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Platte auf eine neue YPD-Platte, auf der eine Nitrocellulose-Membran lag, überstempelt. Diese wurde für 24 h bis 48 h bei 30°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend abgenommen, mit PBS (pH = 7,4) gewaschen und mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS für 1 h geblockt. Anschließend erfolgte die Immunodetektion von sekretiertem CPY mit einem Antikörper gegen dieses Protein ( $\alpha$ -CPY-Serum; Verdünnung: 1:4000 in 5 % (w/v) Milchpulver-PBS) und sekundärem, fluoreszenzgekoppeltem Antikörper.

---

### 6.7.13 Liposomen-Herstellung

Alle für die Herstellung von Liposomen benötigten Lipide wurden von der Firma Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, U.S.A.) bezogen. Die Herstellung der Liposomen erfolgte durch das Zusammengeben der einzelnen Lipide in 200 µl Chloroform-Methanol-Gemisch (1:1). Nach dem Verdampfen des Gemisches wurden die Lipide in 1 ml HK-Puffer (50 mM HEPES/KOH, pH = 7,2; 120 mM KOAc) resuspendiert, so daß sich eine Endkonzentration von 2 mM ergibt. Die Zusammensetzung der Liposomen war in mol%: DOPC 46,8 %; DOPE 18 %; Soy PI 18 %; DOPS 4,4 %; DOPA 2 %; CL 1,6 %; Ergosterol 8 %; DAG 1 % und NBD-PE 0,2 %. Die resuspendierten Liposomen wurden vier Frier-Tau-Zyklen unterzogen und anschließend sequentiell durch verschiedene Filtermembranen mit abnehmendem Porengrößen (400 nm, 200 nm, 100 nm, 50 nm und 30 nm) extrudiert. Die Liposomen mit den Größen 200 nm, 100 nm und 30 nm wurden für die Bestimmung der krümmungsabhängigen Bindung von Proteinen im Liposomen-Flotationstest (Kap. 6.7.14) genutzt. Die Größe der Liposomen wurde durch *Dynamic-Light-Scattering*-Messungen (DynaPro; Wyatt Technology, Dernbach) verifiziert. Die Lagerung der Liposomen erfolgte nach Überschichten mit Stickstoff bei -20°C.

### 6.7.14 Liposomen-Flotationstest

Zur Bestimmung der krümmungsabhängigen Bindung von Proteinen an Liposomen mit definierten Radien (Kap. 6.7.13) wurden 0,75 mM Lipide zusammen mit 0,75 µM Protein in 150 µl HKM-Puffer (50 mM HEPES/KOH, pH = 7,2; 120 mM KOAc; 1 mM MgCl<sub>2</sub>) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Protein wurde vor der Zugabe bei 100000x g, 4°C für 30 min abzentrifugiert. Nach Zugabe von 100 µl 75 % (w/v) Saccharose-HKM folgte das Überschichten mit 200 µl 25 % (w/v) Saccharose-HKM und letztlich 50 µl HKM-Puffer. Dieser Gradient wurde für 1 h bei 4°C und 50000 Upm im MLA-50 Rotor in der Ultrazentrifuge Optima™-MAX (Beckman-Coulter; Krefeld) zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient von unten beginnend abgenommen. Die *Bottom*-Fraktion entsprach hierbei den untersten 250 µl, die *Middle*-Fraktion (120 µl) wurde verworfen und die oberste *Top*-Fraktion (80 µl) enthielt die an

---

die Liposomen gebundenen Proteine. Nach TCA-Fällung wurden die Proben über ein SDS-Gel aufgetrennt.

## **6.8 Mikroskopie**

Mikroskopische Aufnahmen von Hefezellen wurden mit einem Leica DM5500 Mikroskop (Leica, Wetzlar) und einer SPOT Pursuit-XS Kamera (Visitron, Puchheim) aufgenommen. Zur Betrachtung der Signale von GFP-, RFP- und MARS-Fusionsproteinen, sowie FM4-64, wurden entsprechende Filter verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte durch die Software Adobe Photoshop CS3.

Die Anzucht von Hefezellen für die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte in 3 ml YPD- oder YPG-Medium, das aus einer Übernachtskultur morgens auf eine  $OD_{600} = 0,3 \text{ ml}^{-1}$  angeimpft wurde. Diese Kultur wurde für 3-5 h bei 30°C inkubiert und in einer Zentrifugation bei 3000x g, 4°C für 3 min geerntet. Die Zellen wurden einmal in 1 ml sterilem PBS-Puffer gewaschen und dann in 20 µl sterilem PBS aufgenommen. Zur Untersuchung der Vakuolenmorphologie wurden die Zellen vorher mit FM4-64 gefärbt.

### **6.8.1 FM4-64-Färbung der Vakuole**

Nach der Inkubation der Hefekultur für 3-5 h (siehe oben) wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 3000x g, 4°C für 3 min geerntet und in 50 µl frischem Medium aufgenommen. Hierzu wurden 3 µl 0,3 mM FM4-64 (N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide; Invitrogen, Karlsruhe) gegeben. Nach einer Inkubation für 30 min bei 30°C im Dunkeln, in der das FM4-64 sich in die Plasmamembran der Zellen einlagerte und schließlich über den endocytotischen Weg die Vakuole erreichte, wurden die Zellen mit 1 ml Medium gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 3000x g, 4°C für 3 min werden die Zellen in 500 µl frischen Medium aufgenommen und für bis zu 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben mit PBS gewaschen und für die Mikroskopie vorbereitet.

---

## **7. Literaturverzeichnis I**

- Anand, V. C., L. Daboussi, T. C. Lorenz and G. S. Payne (2009). "Genome-wide analysis of AP-3-dependent protein transport in yeast." Mol Biol Cell **20**(5): 1592-604.
- Angers, C. G. and A. J. Merz (2009). "HOPS interacts with Apl5 at the vacuole membrane and is required for consumption of AP-3 transport vesicles." Mol Biol Cell **20**(21): 4563-74.
- Antony, B., J. Bigay, J.-F. Casella, G. Drin, B. Mesmin and P. Gounon (2005). "Membrane curvature and the control of GTP hydrolysis in Arf1 during COPI vesicle formation." Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 619-22.
- Béthune, J., F. Wieland and J. Moelleken (2006). "COPI-mediated transport." J Membr Biol **211**(2): 65-79.
- Bonifacino, J. S. and B. S. Glick (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." Cell **116**(2): 153-66.
- Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu Rev Biochem **72**: 395-447.
- Bowers, K. and T. H. Stevens (2005). "Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1744**(3): 438-54.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Braulke, T. and J. S. Bonifacino (2009). "Sorting of lysosomal proteins." Biochim Biophys Acta **1793**(4): 605-14.
- Brett, C. L., R. L. Plemel, B. T. Lobinger, M. Vignali, S. Fields and A. J. Merz (2008). "Efficient termination of vacuolar Rab GTPase signaling requires coordinated action by a GAP and a protein kinase." The Journal of Cell Biology **182**(6): 1141-51.
- Cabrera, M., C. W. Ostrowicz, M. Mari, T. J. LaGrassa, F. Reggiori and C. Ungermann (2009). "Vps41 phosphorylation and the Rab Ypt7 control the targeting of the

- 
- HOPS complex to endosome-vacuole fusion sites." Mol Biol Cell **20**(7): 1937-48.
- Cowles, C. R., W. B. Snyder, C. G. Burd and S. D. Emr (1997). "Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component." EMBO J **16**(10): 2769-82.
- Darsow, T., C. Burd and S. Emr (1998). "Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional ...." Journal of Cell Biology.
- Darsow, T., D. J. Katzmann, C. R. Cowles and S. D. Emr (2001). "Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains." Mol Biol Cell **12**(1): 37-51.
- Darsow, T., S. E. Rieder and S. D. Emr (1997). "A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole." The Journal of Cell Biology **138**(3): 517-29.
- Dell'Angelica, E. C., C. Mullins and J. S. Bonifacino (1999). "AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors." J Biol Chem **274**(11): 7278-85.
- Dell'Angelica, E. C., C. E. Ooi and J. S. Bonifacino (1997). "Beta3A-adaptin, a subunit of the adaptor-like complex AP-3." J Biol Chem **272**(24): 15078-84.
- Dilcher, M., B. Köhler and G. F. von Mollard (2001). "Genetic interactions with the yeast Q-SNARE VTI1 reveal novel functions for the R-SNARE YKT6." J Biol Chem **276**(37): 34537-44.
- Drin, G., J.-F. Casella, R. Gautier, T. Boehmer, T. U. Schwartz and B. Antonny (2007). "A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature." Nat Struct Mol Biol **14**(2): 138-46.
- Fischer von Mollard, G. and T. H. Stevens (1999). "The *Saccharomyces cerevisiae* v-SNARE Vti1p is required for multiple membrane transport pathways to the vacuole." Mol Biol Cell **10**(6): 1719-32.
- Grosshans, B. L., D. Ortiz and P. Novick (2006). "Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic." Proc Natl Acad Sci USA **103**(32): 11821-7.
- Haas, A., B. Conradt and W. Wickner (1994). "G-protein ligands inhibit in vitro reactions of vacuole inheritance." J Cell Biol **126**(1): 87-97.
- Hirst, J. and M. S. Robinson (1998). "Clathrin and adaptors." Biochim Biophys Acta **1404**(1-2): 173-93.



- 
- Jahn, R. and R. H. Scheller (2006). "SNAREs--engines for membrane fusion." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 631-43.
- Janke, C., M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel and M. Knop (2004). "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." Yeast **21**(11): 947-62.
- Janvier, K., Y. Kato, M. Boehm, J. R. Rose, J. A. Martina, B.-Y. Kim, S. Venkatesan and J. S. Bonifacino (2003). "Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes." The Journal of Cell Biology **163**(6): 1281-90.
- Kelly, B., A. McCoy, K. Späte, S. Miller, P. Evans, S. Höning and D. Owen (2008). "A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex." Nature **456**(7224): 976-979.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- LaGrassa, T. J. and C. Ungermann (2005). "The vacuolar kinase Yck3 maintains organelle fragmentation by regulating the HOPS tethering complex." The Journal of Cell Biology **168**(3): 401-14.
- Langer, J. D., E. H. Stoops, J. Béthune and F. T. Wieland (2007). "Conformational changes of coat proteins during vesicle formation." FEBS Letters **581**(11): 2083-8.
- Langosch, D., M. Hofmann and C. Ungermann (2007). "The role of transmembrane domains in membrane fusion." Cell Mol Life Sci **64**(7-8): 850-64.
- Lefrançois, S., K. Janvier, M. Boehm, C. E. Ooi and J. S. Bonifacino (2004). "An ear-core interaction regulates the recruitment of the AP-3 complex to membranes." Developmental Cell **7**(4): 619-25.
- McMahon, H. T. and I. G. Mills (2004). "COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches." Current Opinion in Cell Biology **16**(4): 379-91.
- Mettlen, M., T. Pucadyil, R. Ramachandran and S. L. Schmid (2009). "Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 1022-6.

- 
- Meyer, D. M., P. Crottet, B. Maco, E. Degtyar, D. Cassel and M. Spiess (2005). "Oligomerization and dissociation of AP-1 adaptors are regulated by cargo signals and by ArfGAP1-induced GTP hydrolysis." Mol Biol Cell **16**(10): 4745-54.
- Nickerson, D. P., C. L. Brett and A. J. Merz (2009). "Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic." Current Opinion in Cell Biology **21**(4): 543-51.
- Nie, Z., M. Boehm, E. S. Boja, W. C. Vass, J. S. Bonifacino, H. M. Fales and P. A. Randazzo (2003). "Specific regulation of the adaptor protein complex AP-3 by the Arf GAP AGAP1." Developmental Cell **5**(3): 513-21.
- Nothwehr, S. F., E. Conibear and T. H. Stevens (1995). "Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in vps1 mutant yeast cells via the plasma membrane." J Cell Biol **129**(1): 35-46.
- Ooi, C. E., E. C. Dell'Angelica and J. S. Bonifacino (1998). "ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes." The Journal of Cell Biology **142**(2): 391-402.
- Ostrowicz, C. W., C. T. A. Meiringer and C. Ungermann (2008). "Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics." Autophagy **4**(1): 5-19.
- Pfeffer, S. R. (2001). "Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function." Trends in Cell Biology **11**(12): 487-91.
- Price, A., W. Wickner and C. Ungermann (2000). "Proteins needed for vesicle budding from the Golgi complex are also required for the docking step of homotypic vacuole fusion." The Journal of Cell Biology **148**(6): 1223-29.
- Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm and B. Séraphin (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." Methods **24**(3): 218-29.
- Rapoport, I., Y. C. Chen, P. Cupers, S. E. Shoelson and T. Kirchhausen (1998). "Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site." EMBO J **17**(8): 2148-55.
- Raymond, C., C. Yamashiro and T. Stevens (1991). "Methods for studying the yeast vacuole." Methods ....

- 
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, C. A. Vater and T. H. Stevens (1992). "Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants." Mol Biol Cell **3**(12): 1389-402.
- Reggiori, F., M. W. Black and H. R. Pelham (2000). "Polar transmembrane domains target proteins to the interior of the yeast vacuole." Mol Biol Cell **11**(11): 3737-49.
- Rehling, P., T. Darsow, D. J. Katzmann and S. D. Emr (1999). "Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function." Nat Cell Biol **1**(6): 346-53.
- Rogers, S., R. Wells and M. Rechsteiner (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." Science **234**(4774): 364-8.
- Sato, T. K., T. Darsow and S. D. Emr (1998). "Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking." Mol Cell Biol **18**(9): 5308-19.
- Schafmeier, T., K. Káldi, A. Diernfellner, C. Mohr and M. Brunner (2006). "Phosphorylation-dependent maturation of Neurospora circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator." Genes Dev **20**(3): 297-306.
- Shorter, J., R. Watson, M. E. Giannakou, M. Clarke, G. Warren and F. A. Barr (1999). "GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system." EMBO J **18**(18): 4949-60.
- Simpson, F., A. A. Peden, L. Christopoulou and M. S. Robinson (1997). "Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3." The Journal of Cell Biology **137**(4): 835-45.
- Starai, V. J., C. M. Hickey and W. Wickner (2008). "HOPS proofreads the trans-SNARE complex for yeast vacuole fusion." Mol Biol Cell **19**(6): 2500-8.
- Stein, A., G. Weber, M. C. Wahl and R. Jahn (2009). "Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane." Nature **460**(7254): 525-8.
- Sun, B., L. Chen, W. Cao, A. F. Roth and N. G. Davis (2004). "The yeast casein kinase Yck3p is palmitoylated, then sorted to the vacuolar membrane with AP-3-dependent recognition of a YXXPhi adaptin sorting signal." Mol Biol Cell **15**(3): 1397-406.

---

Whyte, J. R. C. and S. Munro (2002). "Vesicle tethering complexes in membrane traffic." J Cell Sci **115**(Pt 13): 2627-37.

Wurmser, A. E., T. K. Sato and S. D. Emr (2000). "New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion." The Journal of Cell Biology **151**(3): 551-62.

---

---

---

## **8. Einleitung**

Lebende Systeme sind offen, das heißt auf die ständige Zufuhr freier Energie angewiesen, um endergone Reaktionen unter physiologischen Bedingungen zu ermöglichen. Die zelluläre Energiewährung ist das Adenosintriphosphat (ATP). Die Kopplung an die exergone ATP Hydrolyse ( $\Delta G_0' = -30,5 \text{ kJ/mol}$ ) ermöglicht den Ablauf endergoner Reaktionen, wobei Adenosindiphosphat (ADP) entsteht (Abb.8.1). Das dabei ebenfalls entstehende Phosphat wird entweder auf das Substrat übertragen oder frei gesetzt. Ein Beispiel für die Übertragung des Phosphats auf das Substrat ist in der Glykolyse zu finden. Hier katalysiert die Hexokinase im ersten Schritt die Reaktion von Glukose zu Glukose-6-Phosphat unter ATP-Hydrolyse. Eine Beispiel für die Entstehung von freiem Phosphat ist die Hydrolyse von ATP durch das Motorprotein Myosin, bei der ADP und freies Phosphat nach der Reaktion aus dem Reaktionszentrum dissoziieren.



Die ATP-Hydrolyse ermöglicht so die Synthese von Makromolekülen, aktive Transport-prozesse oder die mechanische Bewegung zellulärer Motorproteine. Allerdings dient das ATP in der Zelle nicht als langfristiger Energiespeicher, sondern besitzt nur eine geringe Lebensdauer. Aus diesem Grund ist die ständige Regeneration des ATP zwingend notwendig. Die dafür erforderliche Energie kann entweder über die sogenannte Substratkettenphosphorylierung oder durch oxidative beziehungsweise Photophosphorylierung aufgebracht werden.

### **8.1 Substratkettenphosphorylierung und oxidative Phosphorylierung**

Ein geringer Anteil der ATP-Synthese erfolgt durch Substratkettenphosphorylierung. Dabei werden exergone Teilschritte von Stoffwechselprozessen an die ADP-Phosphorylierung gekoppelt. Beispiele für diese Art der Regeneration von ATP finden sich in der Glykolyse (Phosphoenolpyruvat  $\rightarrow$  Pyruvat ) und im Citratzyklus

---

(Succinyl-CoA → Succinat). In letzterem Fall wird das Phosphat zuerst auf GDP übertragen, so dass GTP entsteht. Die Nucleosiddiphosphat-Kinase katalysiert dann den energieneutralen Austausch zwischen GTP und ADP. Allerdings erfordert diese Reaktionsfolge insgesamt eine Reaktion mit noch höherer freier Enthalpie als der der ATP-Synthese direkt aus ADP und Pi.

Es ist daher effizienter, ATP mittels oxidativer Phosphorylierung oder Photophosphorylierung zu regenerieren. Als Quelle freier Energie dient hierbei eine ionenmotorische Kraft über die sogenannte Kopplungsmembran. Diese wird in der Photosynthese durch lichtgetriebene Ladungstrennung, in der oxidativen Phosphorylierung durch NADH-Oxidation erzeugt und durch die ATP-Synthase über eine mechanische Zwischenstufe zur Freisetzung von synthetisiertem ATP verwendet. Den Zusammenhang beschreibt der chemiosmotische Mechanismus von Peter Mitchell (Mitchell, 1961).

## **8.2 Der chemiosmotische Mechanismus**

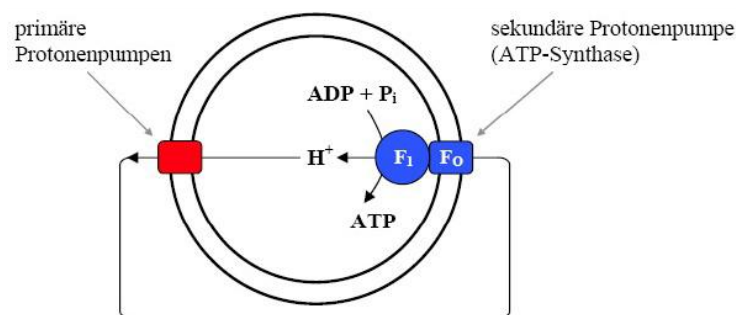
Mitchell schlug 1961 eine indirekte Kopplung zwischen dem Aufbau eines elektrochemischen Membranpotentials über eine ionenundurchlässige Membran durch primäre Ionenpumpen und der ATP-Synthese durch eine sekundäre Ionenpumpe, der ATP-Synthase, vor (Mitchell, 1961). Zu den primären Ionenpumpen zählen in der oxidativen Phosphorylierung die Komplexe I bis IV der Atmungskette. In den Thylakoidmembranen der Chloroplasten führt der lichtinduzierte Elektronentransport durch die Photosysteme I und II zum Transfer von Protonen durch den Cytochrom-Komplex, der damit zu den primären Protonenpumpen gehört. Weiterhin trägt auch die Wasserspaltung im Photosystem II zum Aufbau der ionenmotorischen Kraft bei, auch wenn es sich hierbei nicht um eine primäre Protonenpumpe im eigentlichen Sinn handelt.

In den meisten Fällen sind Protonen die Kopplungionen, aber auch Natriumionen werden in einigen bakteriellen Systemen verwendet.

In der oxidativen Phosphorylierung wird letztlich durch die Komplexe der Atmungskette molekularer Sauerstoff durch Elektronen aus der NADH- und FADH<sub>2</sub>-



Oxidation zu Wasser reduziert. Dabei werden Protonen über die Kopplungsmembran gepumpt. So wird eine protonenmotorische Kraft aufgebaut, die ihrerseits eine chemische Konzentrationsdifferenz ( $\Delta\text{pH}$ ) und ein elektrisches Potenzial ( $\Delta\psi$ ) beinhaltet. Die protonenmotorische Kraft (*proton motif force, pmf*) treibt Protonen zurück durch die Kopplungsmembran. Diese an sich Protonen-impermeable Membran enthält Protonen-Durchtrittsstellen in Form des  $F_o$ -Teils der ATP-Synthase, der in *Escherichia coli* aus drei Untereinheiten **a**, **b** und **c** im stöchiometrischen Verhältnis 1:2:10 besteht. Die zehn **c**-Untereinheiten bilden einen Ring, die **a**- und die beiden **b**-Untereinheiten sind peripher angeordnet. Die wärmebedingte, stochastische Rotationsdiffusion des ringförmigen  $c_{10}$ -Komplexes wird durch die transiente Protonierung Membran-exponierter Aspartatreste in eine gleichgerichtete Drehung umgesetzt. Diese mechanische Rotation wird in den  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase übertragen und dort zur Freisetzung von bereits gebildetem ATP verwendet. Das Holoenzym besteht somit aus einem gekoppelten Motor/Generator, es wandelt elektrochemische Energie in Form eines Membranpotentials zunächst in eine mechanische Rotation und diese in die chemische Energie von ATP um. Der Prozeß ist vollständig reversibel, die ATP-Hydrolyse im  $F_1$ -Teil der ATP-Synthase versetzt die Rotoruntereinheiten des Holoenzym in eine (der Drehbewegung bei der Synthese entgegengesetzte) Rotation und pumpt so Protonen über die Kopplungsmembran.



**Abb. 8.2: Modell zur chemiosmotischen Theorie**

Primäre Protonenpumpen befördern Protonen über eine Kopplungsmembran. Die so entstandene protonenmotorische Kraft wird anschließend zur ATP-Synthese verwendet. (nach Junge *et al.*, 1999)

---

### 8.3 Die Struktur von EF<sub>0</sub>EF<sub>1</sub>

Das in dieser Arbeit untersuchte EF<sub>0</sub>EF<sub>1</sub> aus *Escherichia coli* repräsentiert eine der am einfachsten aufgebauten ATP-Synthasen und kann daher als Modell für Struktur und Funktion des Enzyms dienen. Die ATP-Synthasen in Mitochondrien und Chloroplasten eukaryotischer Zellen bestehen aus einer größeren Anzahl an Untereinheiten (Collinson *et al.*, 1994, Devenish *et al.*, 2000), folgen aber dem gleichen Mechanismus wie das bakterielle Enzym. Im Weiteren soll nur auf EF<sub>0</sub>EF<sub>1</sub> eingegangen werden.

Die ATP-Synthase aus *E. coli*, auch F-ATPase oder, unter Anspielung auf die beiden konstituierenden Teile, EF<sub>0</sub>EF<sub>1</sub> genannt, ist ein Komplex aus 8 unterschiedlichen Polypeptidketten, die in stark variierenden stöchiometrischen Verhältnissen vorliegen. Die Stöchiometrie der einzelnen Untereinheiten im *E. coli* Enzym ist  $\alpha$ :  $\beta$ :  $\gamma$ :  $\delta$ :  $\epsilon$ : **a**: **b**: **c** wie 3: 3: 1: 1: 1: 1: 2: 10. Die Anzahl an **c**-Untereinheiten variiert von Organismus zu Organismus zwischen 10 in *E. coli* (Jiang *et al.*, 2001), 11 in *Propionigenium modestum* (Pogoryelov *et al.*, 2005), 14 in Chloroplasten (Seelert *et al.*, 2000) und 15 in *Spirulina platensis* (Pogoryelov *et al.*, 2009).

Strukturell besteht das Holoenzym aus zwei Teilen, dem löslichen F<sub>1</sub>-Teil und dem in die Membran eingebetteten F<sub>0</sub>-Teil. Ersterer besteht aus den Untereinheiten ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> $\gamma\delta\epsilon$ , letzterer aus den Untereinheiten **a****b**<sub>2</sub>**c**<sub>10</sub>. Die drei  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten sind alternierend hexagonal angeordnet, mit der  $\gamma$ -Untereinheit in der Mitte. Diese bildet zusammen mit der  $\epsilon$ -Untereinheit die Verbindung zum in der Membran liegenden F<sub>0</sub>-Teil. Oberhalb des ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>-Hexagons ist die  $\delta$ -Untereinheit lokalisiert, die in Verbindung mit dem **b**-Dimer steht (Weber und Senior, 2003, Junge *et al.*, 2009). Bis auf die C-terminale Hälfte der  $\delta$ -Untereinheit und ihre genaue Anordnung relativ zu den anderen Untereinheiten liegt die 3d-Struktur des F<sub>1</sub>-Teils vor (Rees *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2010). An der prinzipiellen Gültigkeit der für F<sub>1</sub> (oder Untereinheiten davon) aus unterschiedlichen Organismen gewonnenen hochaufgelösten Strukturen kann kein Zweifel bestehen.

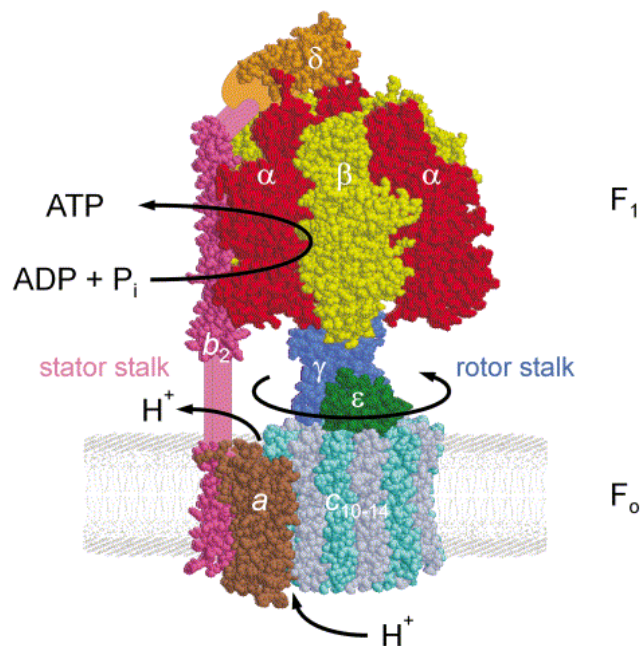
Der F<sub>0</sub>-Teil des Enzyms ist weitestgehend in die Kopplungsmembran integriert, im Falle von *E. coli* also in die Plasmamembran. Lediglich die stark elongierten, weitgehend  $\alpha$ -helikalen **b**-Untereinheiten, die über eine transmembrane Helix in der

---

Membran verankert sind, ragen weit aus dieser heraus und kontaktieren die  $\delta$ -Untereinheit. Die beiden transmembranen Helices der beiden **b**-Untereinheiten kontaktieren zum einen die fünf Transmembranhelices der **a**-Untereinheit, zum anderen und ebenso wie letztere das **c**-Dekamer. Die **c**-Untereinheit besteht aus zwei haarnadelförmig angeordneten hydrophoben  $\alpha$ -Helices, von denen die eine etwa in der Mitte, und somit auch mitten im hydrophoben Bereich der Membran, einen sauren Rest enthält. In *E. coli* ist dies Aspartat. Die beiden Helices sind über eine kurze, hydrophile und geladene Sequenz miteinander verbunden. Dieser Abschnitt vermittelt die Kontakte zur  $\gamma$ - und  $\varepsilon$ -Untereinheit des  $F_1$ -Teils. Die **c**-Untereinheiten sind ringförmig angeordnet, die N-terminale Helix ist dem Mittelpunkt, die C-terminale Helix mit dem bereits erwähnten Aspartat in der Mitte der Peripherie zugewandt. Aus energetischen Gründen ist das Einbringen der deprotonierten Aspartatreste in den hydrophoben Bereich der Membran sehr ungünstig, also dort, wo das **c**-Dekamer (auch Proteolipidring genannt) nicht durch die transmembranen Helices der **a**- und **b**-Untereinheiten abgeschirmt wird.

Die **a**-Untereinheit enthält sehr wahrscheinlich den Protonenzutrittskanal und den lateral dagegen versetzten Protonenaustrittskanal. Der Lückenschluß erfolgt durch die Aspartatreste des Proteolipidringes. Somit sind nur diese beiden Untereinheiten an der Protonentranslokation beteiligt (Weber und Senior, 2003). Außer den für die Protonentranslokation zwingend erforderlichen Aspartatresten des Proteolipidringes enthält die Untereinheit **a** an Position 210 einen ebenfalls essentiellen Argininrest ( $\mathbf{a}_{R210}$ ), der für die koordinierte Protonierung/Deprotonierung der jeweils in der Nähe befindlichen Aspartatreste wesentlich ist. Beide Reste,  $\mathbf{c}_{D61}$  und  $\mathbf{a}_{R210}$  sind somit direkt am gerichteten Transport der Protonen durch die Membran beteiligt. Auf ihre exakte Funktion wird in Kapitel 8.3.2.1 näher eingegangen.

Infolge des rotatorischen Mechanismus der ATP-Synthase ist es sinnvoll, statt der strukturellen Untergliederung in  $F_o$  und  $F_1$  eine mechanistische in Rotor und Stator vorzunehmen. Demnach ist der  $(\alpha\beta)_3\delta\mathbf{ab}_2$ -Komplex der Stator und  $\mathbf{c}_{10}\gamma\varepsilon$  der Rotor.



**Abb. 8.3: Strukturmodell der  $F_0F_1$ -ATP-Synthase aus *E. coli***

Der  $F_1$ -Teil besteht aus den Untereinheiten  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ , der  $F_0$ -Teil aus  $\mathbf{a}b_2c_{10}$ . Bis auf die Untereinheiten **a** und **b** sowie die C-terminale Hälfte von  $\delta$  wurden die Strukturen der Untereinheiten durch Röntgenstrukturanalyse bzw. NMR-Spektroskopie geklärt. Die exakte Orientierung und Lokalisation der drei nicht bzw. unvollständig strukturbestimmten Untereinheiten ist somit nicht bekannt. (Weber und Senior, 2003)

#### **8.4 Funktionsweise von $EF_0EF_1$**

Die ATP-Synthase wandelt durch rotatorische Bewegung der Rotor- relativ zu den Statoruntereinheiten die protonenmotorische Kraft in die chemische Energie des ATP um. Das membranständige Proteolipid-Oligomer führt in der hydrophoben Umgebung, durch Brownsche Molekularbewegung getrieben, ungerichtete Rotationsbewegungen aus. Diese wird durch die Anordnung der Protoneneintritts- und austrittskanäle und dem Wechselspiel der beiden essentiellen Aminosäuren ( $\mathbf{a}_{R210}$  und  $\mathbf{c}_{D61}$ ) mit den transportierten Protonen in eine gerichtete Rotation umgewandelt. Die Rotation des Proteolipid-Oligomers versetzt auch die darauf befindliche  $\gamma$ -Untereinheit in Drehung. Die schrittweise Rotation der gekrümmten *coiled coil* Region von  $\gamma$  schaltet das  $(\alpha\beta)_3$ -Hexagon durch eine zyklische Abfolge von Konformationsänderungen, die sequentiell ATP aus den drei Bindestellen des  $F_1$ -Teils freisetzen. Die eigentliche Synthese von ATP aus ADP und  $P_i$  in den drei katalytisch aktiven Zentren des  $F_1$  erfolgt somit ohne

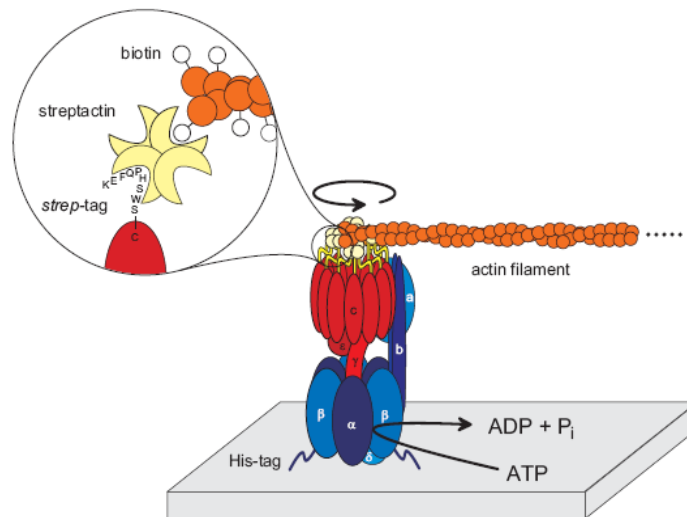
---

Energiezufuhr, begünstigt durch die sterisch komplementäre Beladung mit den beiden Substraten und durch die Kooperativität des Enzyms. Dies läuft darauf hinaus, daß die bereits erwähnten drei katalytischen Bindestellen an der Grenzfläche zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zu jedem Zeitpunkt und in geordneter Abfolge jeweils einen unterschiedlichen Zustand einnehmen: eine „offene“ Bindestelle mit schnellem Wechsel zwischen Substratbindung und Wiederfreisetzung, eine zumindest teilweise geschlossene Bindestelle, aus der die beiden Substrate nicht mehr heraus können, und eine Bindestelle, die fertig synthetisiertes ATP fest gebunden enthält. Letztere wird durch die Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit geöffnet, das ATP wird freigesetzt und die Bindestelle geht über in die „offene“ Konformation. Zeitgleich geht die „offene“ Bindestelle in die teilgeschlossene Konformation über, die vormals teilgeschlossene Bindestelle in die geschlossene, ATP enthaltende. Pro 360°-Rotation von  $\gamma$  werden somit jeweils drei ATP-Moleküle freigesetzt. Diese Vorgänge im  $F_1$ -Teil werden im sogenannten *binding change* Mechanismus von Paul Boyer (1993) beschrieben. Einige Details, wie die Reihenfolge und der genaue Zeitpunkt der Bindung der beiden Substrate, ADP und  $P_i$  und die Anzahl der am eigentlichen katalytischen Schritt (der ATP-Synthese) kooperierenden Bindestellen - zwei oder alle drei - sind noch strittig (Weber und Senior, 2003; Boyer *et al.*, 1997; Junge *et al.*, 2009)

Der  $F_1$ -Teil kann durch EDTA-Behandlung einer Membranpräparation vom  $F_0$ -Teil getrennt und in guter Ausbeute rein präpariert werden. Infolge des fehlenden Protonentranslokators und ohne protonenmotorische Kraft kann der  $F_1$ -Teil jedoch kein ATP mehr synthetisieren, wohl aber hydrolysieren.

Die unidirektionale Vollrotation von  $\gamma$  relativ zu  $(\alpha\beta)_3$  konnte zuerst zweifelsfrei mit dem bakteriellen  $(\alpha\beta)_3 \gamma$  aus dem thermophilen Bakterium *PS3* (Noji *et al.*, 1997) gezeigt werden, später auch mit dem Holoenzym (Sambongi *et al.*, 1999, Pänke *et al.*, 2000, Tanabe *et al.*, 2001). Dazu wird an ein geeignetes Rotorelement (die  $\gamma$  Untereinheit bzw. im Holoenzym die **c**-Untereinheiten) ein fluoreszenzmarkiertes Aktinfilament gekoppelt, welches im Fluoreszenzmikroskop direkt beobachtbar ist. Unter ATP-Hydrolysebedingungen kann dann nach Immobilisierung des Enzyms über Teile des Stators die Rotationsbewegung direkt visualisiert werden. Die bei der ATP-Synthese in die entgegengesetzte Richtung erfolgende Rotation wird durch ein Experiment bestätigt, bei dem an die  $\gamma$ -Untereinheit des isolierten  $F_1$  eine

Magnetpartikel gekoppelt und diese anschließend durch rotierbare Magneten entgegen der Rotationsrichtung unter Hydrolysebedingungen gedreht wird. Das dabei synthetisierte ATP läßt sich im Versuchsansatz durch Chemilumineszenz enzymologisch nachweisen (Itoh *et al.*, 2004).

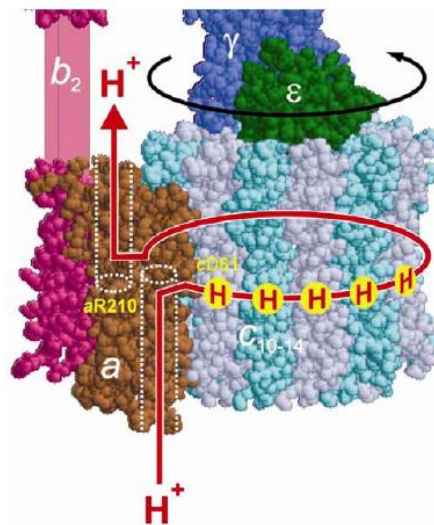


**Abb. 8.4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung der Rotation mit EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>.**

Ein F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-Komplex ist über Histidin-Tags an den drei β-Untereinheiten auf einer funktionalisierten Glasoberfläche immobilisiert. An den c-Ring ist ein fluoreszenzmarkiertes Aktinfilament gekoppelt. Bei ATP-Hydrolyse zeigt der c-Ring eine unidirektionale Rotation. (Pänke *et al.*, 2000)

#### 8.4.1 Funktion des F<sub>0</sub>-Komplexes

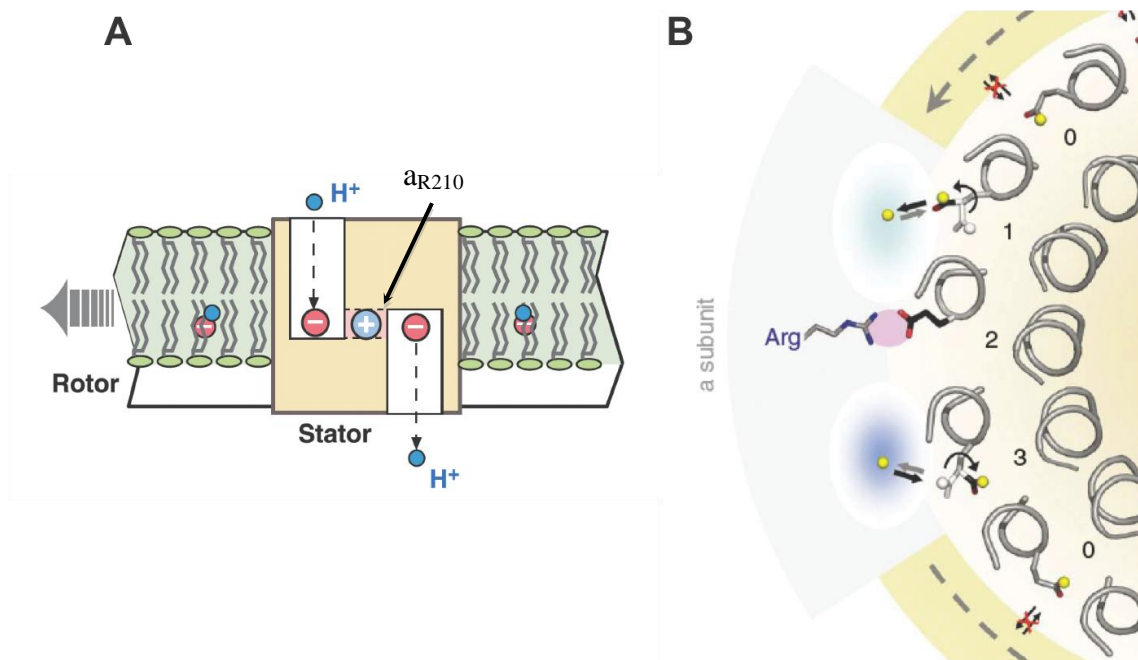
Die Funktionsweise des membranständigen protonentranslozierenden F<sub>0</sub>-Komplexes ist schematisch in Abb. 8.5 dargestellt. In der Untereinheit **a**, bzw. an der Schnittfläche zwischen den Untereinheiten **a** und **c**, befinden sich zwei Protonenzu- bzw. austrittskanäle, die versetzt zueinander angeordnet sind und von denen aus jeweils einer der für die Protonentranslokation essentiellen Reste Aspartat 61 im Proteolipidoligomer zugänglich ist.



**Abb. 8.5: Struktur des F<sub>0</sub>-Komplexes**

Die Protonenzu- und austrittskanäle sind versetzt zueinander angeordnet und reichen jeweils etwa bis zur Membranmitte. Die beiden essentiellen Aminosäurereste  $c_{D61}$  und  $a_{R210}$  sind direkt an der Protonentranslokation beteiligt. Die Rotation des  $c$ -Oligomers wird durch die gebundenen  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Untereinheiten auf den F<sub>1</sub>-Komplex übertragen. (Weber und Senior, 2003)

Das Proteolipidoligomer ähnelt, aus der Membranebene betrachtet, einer Sanduhr. Mitten in der Membran befindet sich das essentielle Aspartat61, welches nur dann protoniert oder deprotoniert werden kann, wenn es mit einem der beiden Zutrittskanäle in Kontakt steht. Nur ein protoniertes, also ungeladenes Aspartat kann in die Lipidphase eintauchen. Somit wandelt die durch den Zutrittskanal erfolgende Protonierung des Aspartats und die am Austrittskanal stattfindende, durch  $a_{R210}$  begünstigte Deprotonierung die thermisch bedingte, zufällige Rotation des  $c$ -Ringes in der Membranebene in eine unidirektionale Rotation um. Gebundene Protonen werden jetzt wie in einem Karussell über einen Winkel von fast 360° durch die Membran zum Protonenaustrittskanal transportiert. Hier findet eine Deprotonierung des Aspartats statt, begünstigt durch die positive Ladung des essentiellen Restes  $a_{R210}$  (Dimroth *et al.*, 1999). Ein Kurzschluss der beiden Protonenzutrittskanäle wird durch das  $a_{R210}$  verhindert, da ein im Zutrittskanal protoniertes Aspartat durch die positive Ladung des Arginins daran gehindert wird, den Austrittskanal zu erreichen.



**Abb. 8.6: Funktion der Aminosäure a<sub>R210</sub> zur Gleichrichtung der Rotation des c-Ringes**

(A) Modell des F<sub>0</sub>-Komplexes in der Seitenansicht. Das Arginin 210 in der a-Untereinheit sorgt für eine gerichtete Rotation des Rotors. (nach Dimroth *et al.*, 1999).

(B) Aufsicht auf einen Ausschnitt des F<sub>0</sub>-Komplexes. Die Protonenkanäle sind blau und hellblau unterlegt. Die Protonen (gelb) binden an das Aspartat 61 (Pos.1). Das Arginin verhindert einen Kurzschluss der Protonenkanäle und sorgt für eine unidirektionale Rotation des c-Ringes. (nach Pogoryelov *et al.*, 2009).



---

## **9. Aufgabenstellung**

In dieser Arbeit sollte eine nähere Charakterisierung der Eigenschaften der  $EF_o$ -*Shift*-Mutanten stattfinden. In diesen Mutanten wurde je einer oder beide für die Protonentranslokation essentiellen Reste  $a_{R210}$  und  $c_{D61}$  an ihrer ursprünglichen Position entfernt. Diese wurden dann beide zusammen oder entsprechend einzeln um eine Helixwindung hin zum oder weg vom  $F_1$ -Teil verschoben.

Es sollte die Fähigkeit der *Shift*-Mutanten untersucht werden, passiv Protonen zu leiten und ATP zu synthetisieren. Dies soll einen Rückschluss auf die räumliche Anordnung im  $F_o$ -Komplex, hinsichtlich der Positionierung der beiden essentiellen Reste zueinander und im Zusammenhang mit dem Holoenzym ermöglichen.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Biochimica et Biophysica Acta 1767 (2007) 998–1005



[www.elsevier.com/locate/bbatio](http://www.elsevier.com/locate/bbatio)

## Essential arginine in subunit a and aspartate in subunit c of $F_0F_1$ ATP synthase Effect of repositioning within Helix 4 of subunit a and Helix 2 of subunit c

Lars Langemeyer, Siegfried Engelbrecht \*

Universität Osnabrück, Fachbereich Biologie, Biochemie, Barbarastr. 13, 49076 Osnabrück, Germany

Received 23 March 2007; received in revised form 10 May 2007; accepted 21 May 2007

Available online 26 May 2007

### Abstract

$F_0F_1$  ATP synthase couples proton flow through the integral membrane portion  $F_0$  ( $ab_2c_{10}$ ) to ATP-synthesis in the extrinsic  $F_1$ -part ( $(\alpha\beta)_3\gamma\delta\epsilon$ ) (*Escherichia coli* nomenclature and stoichiometry). Coupling occurs by mechanical rotation of subunits  $c_{10}\gamma\epsilon$  relative to  $(\alpha\beta)_3\delta ab_2$ . Two residues were found to be essential for proton flow through  $ab_2c_{10}$ , namely Arg<sub>210</sub> in subunit a (aR210) and Asp<sub>61</sub> in subunits c (cD61). Their deletion abolishes proton flow, but “horizontal” repositioning, by anchoring them in adjacent transmembrane helices, restores function. Here, we investigated the effects of “vertical” repositioning aR210, cD61, or both by one helical turn towards the N- or C-termini of their original helices. Other than in the horizontal the vertical displacement changes the positions of the side chains within the depth of the membrane. Mutant aR210A/aN214R appeared to be short-circuited in that it supported proton conduction only through  $EF_1$ -depleted  $EF_0$ , but not in  $EF_0EF_1$ , nor ATP-driven proton pumping. Mutant cD61N/cM65D grew on succinate, retained the ability to synthesize ATP and supported passive proton conduction but apparently not ATP hydrolysis-driven proton pumping.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** ATP; Synthesis;  $F_0F_1$  (EC 3.6.3.14); Proton; Translocation

### 1. Introduction

$F_0F_1$  ATP synthase catalyses the synthesis of ATP from ADP and inorganic phosphate in bacteria, mitochondria and chloroplasts. The endergonic reaction ( $\Delta G^\circ$  about +50 kJ/mol) necessitates free energy which is provided by a transmembrane protonmotive and sometimes sodiummotive force [1,2]. Working reversibly, the enzyme also can pump protons upon ATP hydrolysis thereby generating an ion-motive force. In some bacteria this mode occurs more often than its opposite. ATP synthase in its simplest form (*Escherichia coli*) consists of eight different polypeptides. The  $F_1$  portion (subunits  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ ) contains the catalytic nucleotide binding sites and, upon

detachment from its  $F_0$  partner, works as an ATPase. Whereas a great deal of structural and functional data is available for  $F_1$  [3–11], both the structure of  $F_0$  (subunits  $ab_2c_{10}$ ) and the molecular mechanism of proton conduction have been more difficult to evaluate [4,7,9,11–18].

With respect to proton conduction, a number of observations has allowed to draw a rough picture. There is but little doubt about the rotary mechanism by which the electrochemical potential difference across the coupling membrane drives product release, i.e. ATP liberation from the catalytic sites in  $F_1$  [8,19–24].

The “roundabout” mechanism [25,26] envisages a proton access and exit channel, each reaching about halfway into the coupling membrane but staggered with respect to each other. Both channels are in touch with cD61 (*E. coli* numbering), but never with the very same residue at any given instance. Subunit c folds into a hairpin-like structure such that cD61 points into the hydrophobic core of the membrane. Exposure of deprotonated aspartates to this hydrophobic core is electrostatically constrained. A proton entering the access half channel ultimately

**Abbreviations:** ACMA, 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine; DCCD, Dicyclohexylcarbodiimide; LDAO, Lauryldimethylamine oxide; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid

\* Corresponding author. Fachbereich Biologie, Biochemie, Barbarastr. 13, 67-E45, D-49076 Osnabrück, Germany. Tel.: +49 541 9693424; fax: +49 541 96913424.

E-mail address: [engel@uos.de](mailto:engel@uos.de) (S. Engelbrecht).

0005-2728/\$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.bbatio.2007.05.007

protonates residue cD61, travels along the periphery of the rotating  $c_{10}$  oligomer (the “c ring”) until it reaches the exit half channel. There cD61 deprotonates and releases its proton to the opposite side of the coupling membrane. Residue aR210 is essential to prevent short-circuit of proton flow in that only cD61 (COO<sup>-</sup>) can slide along aR210, but not cD61(COOH) [27]. Stochastic rotational diffusion of the c oligomer within the plane of the membrane thus would be rectified into unidirectional rotation and at the same time the proton-motive force would be converted into the torque necessary for ATP release in  $F_1$  via subunit  $\gamma$ .

The absolute requirement for residues aR210 and cD61 has been known for a long time [28–30]. The postulated ring-like structure of the c subunit oligomer [12,31–33] has been shown by X-ray crystallography [34] and atomic force microscopy [35,36]. Recently a structure has been published with the essential acidic side chains of subunits c pointing directly into the hydrophobic core of the membrane [37], thus alleviating or even abolishing the need for “helix swivelling” in subunit c (but not necessarily in subunit a, cf. Discussion). This was proposed to be required for proton conduction by Girvin, Fillingame and coworkers [12,38]. It was based upon the first available structure of subunit c [39].

Despite the controversy with respect to the total number of transmembrane helices of subunit a [40–44] both the close neighborhood between the helix containing arginine 210 of subunit a and the C-terminal helix of subunit c (containing aspartic acid residue 61) and their parallel orientation have been demonstrated by cross-linking studies revealing the neighborhood of residues aN214, cM65 and cD61 [45].

Regardless of their importance, both key residues can be anchored in an adjacent transmembrane helix, presumably as long as the side chains still can take, by and large, their original positions. The option for this “horizontal shift” was revealed by second-site revertants aR210Q/aQ252R [46] and cD61N/cA24D [47]. These findings are fully compatible with the “roundabout” model, even more so since the original position of cD61 in these mutants cannot be taken by any residue but only by such which do not interfere too much with the new side chain positioning of the essential residue [48]. With respect to aR210X/aQ252R the requirements for residue X have not been scrutinized, but it is worth noting that only the substitution aR210A allowed for passive proton conduction and even both with and without attached  $F_1$  whereas other mutants did not [49].

In this work, we engineered subunits a and c from *E. coli*  $F_0$  such as to reposition the essential arginine and aspartate residues within their original transmembrane helices but shifted vertically by one helical turn in either direction, i.e. with respect to their depth in the membrane.

Since residues 206, 210 and 214 of subunit a have been shown to be part of the aqueous proton access channel [50] the introduced mutations were expected to relocate these residues within the normal path of the proton through  $F_0$ . Six mutants were constructed with either aR210 or cD61 or both concomitantly moved into the same direction. Residue cD61 could be shifted away from  $EF_1$  with preservation of ATP

synthesis capability, whereas relocation of residue aR210 into the same direction appeared to short-circuit  $EF_0$ . The other constructs were inactive both in ATP synthesis and passive proton conduction.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and enzymes

All restriction and DNA modifying enzymes were purchased either from New England Biolabs (Frankfurt/Main, Germany) or MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Germany). Oligonucleotide-primers were synthesized by MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). The Lumi-Light Western-Blotting Kit was obtained from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). All other reagents were of the highest grade commercially available.

### 2.2. Strains and plasmids

The plasmid pKH4 [51] was used as starting material for all constructs. It codes for a completely cysteine free  $EF_0EF_1$  and carries a MRGSHHHHHHG MATG... sequence at the N-terminus of subunit  $\beta$ . Strains used were *E. coli* DH5 $\alpha$  for plasmid preparation and *E. coli* DK8 [52] for expression of  $EF_0F_1$ .

### 2.3. Constructions of mutants

Site directed mutagenesis was performed using a method described by Weiner et al. [53] with pBSKa or pBSKc [pBluescript II SK(+)] containing the *HindIII/BamHI* fragment, respectively the *BsrGI/PvuMI* fragment from pKH4] as templates. Corresponding fragments in pKH4 were substituted by restriction and religation. All constructs were verified by sequencing relevant regions.

### 2.4. $EF_0EF_1$ expression

After transforming *E. coli* DK8 with the respective plasmid cells were grown in minimal medium (34 mM  $KH_2PO_4$ , 64 mM  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 20 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 1  $\mu$ M  $FeSO_4$ , 1  $\mu$ M  $ZnCl_2$ , 10  $\mu$ M  $CaCl_2$ , 0.3 mM  $MgSO_4$ , 2  $\mu$ g/ml thiamine, 50  $\mu$ g/ml isoleucine, 50  $\mu$ g/ml valine, 50  $\mu$ g/ml thymine, 50  $\mu$ g/ml asparagine, 0.5% (v/v) glycerol).

### 2.5. Membrane preparations and $EF_1$ isolation

$EF_0EF_1$  containing membrane vesicles, EDTA-treated membrane vesicles containing predominantly  $EF_1$ -depleted  $EF_0$  and purification of EDTA-solubilized  $EF_1$  were all carried out according to published procedures [54]. EDTA-free protease inhibitor mixture was omitted from the buffer used to resuspend cells after harvest.

### 2.6. Biochemical assays

Function of ATP-synthase was tested by growth on minimal medium containing 0.4% succinate instead of glycerol. ATP synthesis was run for up to 3 min at 37 °C with inverted membrane vesicles (30  $\mu$ g protein) in 25 mM Tris/HCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 10% (v/v) glycerol, 5 mM ADP, 5 mM  $K_2HPO_4$ , 2 mM NADH pH 7.5 [55]. After termination of the reactions with 50  $\mu$ l 50% (v/v) trichloroacetic acid, ATP was determined with the Promega Enliten<sup>®</sup> luciferin/firefly luciferase system. Revertants were searched for as described by Miller et al. [47]. Protein determinations were carried out according to Sedmak and Grossberg [56], the ATPase activities of  $EF_0EF_1$  and  $EF_1$  were measured as described [57].

### 2.7. Immunoblots

Cells were grown in LB to  $OD_{600}=1$  and 1 ml of the suspension was centrifuged. The pellet was resuspended in 100  $\mu$ l buffer (50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 2% (w/v) SDS, 2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.1%

Table 1  
Plasmids and corresponding codon and amino acid residue exchanges

Short name	Plasmid	Codon change	Amino acid exchange
a up	pLL15	TCA → CGA/CGA → GCG	aS206R/R210A
a down	pLL16	CGA → GCG/AAC → CGA	aR210A/N214R
c up	pLL13	ATG → GAT/GAT → AAT	cM57D/D61N
c down	pLL14	GAT → AAT/ATG → GAT	cD61N/M65D
double up	pLL10	TCA → CGA/CGA → GCG ATG → GAT/GAT → AAT	aS206R/R210A cM57D/D61N
double down	pLL9	CGA → GCG/AAC → CGA GAT → AAT/ATG → GAT	aR210A/N214R cD61N/M65D

(w/v) bromophenol blue, 2 mM EDTA) and incubated at 100 °C for 10 min followed by separation through SDS gel electrophoresis (12.5% polyacrylamide). After transfer to polyvinylidene fluoride membranes rabbit- (anti- $\gamma$ ) or mouse- (all other subunits) derived polyclonal (subunit a: monoclonal) antisera (a kind gift of Dr. G. Deckers-Hebestreit, University of Osnabrück, Dept. Microbiology) were used to label the respective  $EF_oEF_1$  subunits. Bands were visualized through the ECL System® (Amersham Biosciences, England).

ATP- and NADH-driven fluorescence quenching experiments [48,49] were carried out in HMK-buffer (10 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 5 mM  $MgCl_2$ , 300 mM KCl) using either 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA) or quinacrine. The reaction volume (3 ml) contained 75  $\mu$ g ACMA, 100  $\mu$ g membrane protein and 10 mM ATP or 1.13  $\mu$ g quinacrine, 450  $\mu$ g membrane protein and 50  $\mu$ M NADH. Uncoupling was induced by addition of 1 mM  $(NH_4)_2SO_4$ .

### 3. Results

Mutants coding for *E. coli*  $EF_oEF_1$  and used in this work are summarized in Table 1. The expected structural changes are sketched in Fig. 1 and take into consideration available structural information [12,34,39,42,43]. The parallel orientations of transmembrane helix 4 containing residue 210 (subunit a) and transmembrane helix 2 with residue 61 (subunit c) and their close spatial neighborhood have been shown by cross-linking [45]. The designations “up” (pointing towards  $EF_1$ ) and “down” (pointing away from  $EF_1$ ) were chosen arbitrarily.

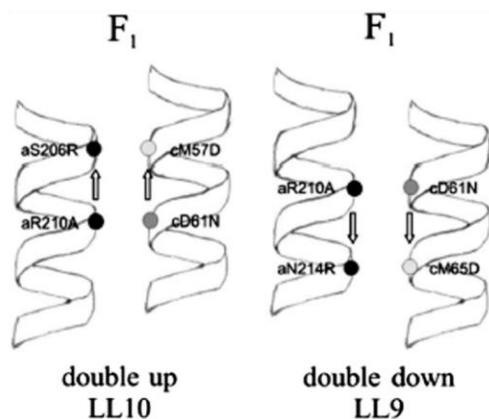


Fig. 1. Schematic depiction of the expected locations of arginine in helix 4 of subunit a and aspartic acid in helix 2 of subunit c in mutants “double up” (LL10) and “double down” (LL9).

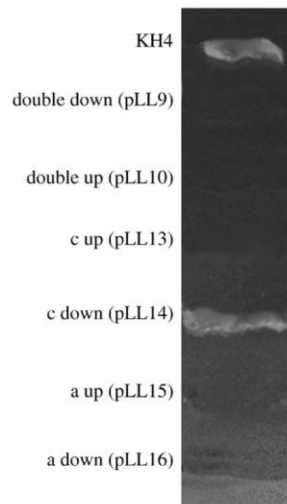


Fig. 2. Succinate growth test. A single colony was picked from a transformation plate and transferred to an agar plate containing minimal medium with 0.4% (w/v) succinate followed by incubation at 37 °C for 4 days. Only cells with functional F-ATPase can grow under these conditions. KH4 served as a positive control.

#### 3.1. Growth on succinate

Fig. 2 summarizes the results of growth experiments on succinate. These provide a rapid check for the presence of functional ATP synthase [58,59], which is required to maintain a certain ATP/ADP ratio within the cell [60]. Below a threshold of the ATP concentration  $C_4$  dicarbonic acid transporter expression is suppressed. This cuts off substrate level phosphorylation [61]. Only mutant “c down” (LL14) grew on succinate and at similar rate as the positive control KH4. All other mutants did not grow under these conditions. Unlike the situation with cD61N [47] the search for second-site revertants in these cases remained unsuccessful. In view of the similarity of the mutants in the present work, the causes for their loss of function were scrutinized.

#### 3.2. Immunological detection of subunits

In order to check whether the mutations in  $EF_o$  interfered with expression and assembly of both  $EF_o$  and  $EF_1$  immunoblots with samples derived from whole cells were carried out. All subunits both of the  $F_o$  (a, b, c) and the  $F_1$  portion ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ ) were detected in all mutants. With respect to the relative amounts of subunits two classes could be discerned: (1) mutants which did not show any significant differences in comparison with the control KH4 (“a up” and “a down”), and (2) mutants which contained slightly lower amounts of subunit a and significantly lower amounts of subunit c (“c up”, “c down”, “double up”, “double down”). Fig. 3 shows one representative of each class along with the control. Point mutations in subunit c seriously compromising assembly of  $EF_o$  can result in complete

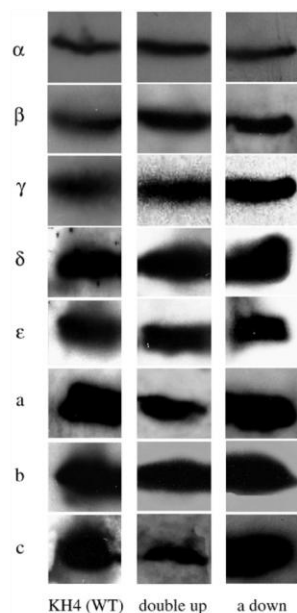


Fig. 3. Western-Blot with whole membrane preparations of the control (KH4) and mutants “double up” and “a down”. 40  $\mu$ g protein were separated per lane.

lack of biochemically detectable subunit c and sometimes also subunits a and b. In such cases where no  $EF_o$  subunits were detectable, fully intact soluble  $EF_1$  turned up in the cytosol (J. Paul and S. Engelbrecht, unpublished). A decreased level of subunit c thus is likely to result in lower total amounts of holoenzyme within the membrane with the “excess” of  $EF_1$  located in the cytosol.

### 3.3. Membrane-bound ATPase activities

ATPase activity of membrane-bound enzyme can be stimulated by treatment with LDAO, thus alleviating, among other, less well characterized effects, the inhibition by subunit  $\epsilon$  [62] and indicating the degree of coupling within the holoenzyme and the total amount of holoenzyme within the coupling membrane. DCCD inhibition is an alternative approach with respect to the degree of coupling, although a prerequisite for DCCD reactivity to be confined to modification of subunit c (and not  $EF_1$ ) is to use fairly small concentrations of DCCD. This in turn requires the binding of DCCD into a “pocket” on subunit c or within the  $ac_{10}$  oligomer, which might be compromised by point mutations in subunit c and/or subunit a. Table 2 summarizes measurements aiming at ATPase activities of membrane-bound  $EF_1$  before and after LDAO activation and DCCD treatment. In accordance with the immunological data presented above and in view of the failure of several mutants to passively translocate protons even after removal of  $EF_1$  (cf. below) the measured activities are interpreted as indicating (a) different total amounts of

Table 2  
Membrane bound  $EF_1$  activity

	ATPase activity with membrane-bound $F_1$ [U/mg]		
	Standard	LDAO-activated	DCCD inhibition (%)
a up (LL15)	1.9 $\pm$ 0.3	8.9 $\pm$ 1.2	46
a down (LL16)	4.5 $\pm$ 1.0	9.9 $\pm$ 2.5	58
c up (LL13)	1.4 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.5	40
c down (LL14)	1.5 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.5	42
double up (LL10)	1.5 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.5	56
double down (LL9)	1.5 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.5	50
KH4	6.0 $\pm$ 1.0	9.2 $\pm$ 1.4	80

ATPase activity measured with membrane vesicles containing  $EF_oEF_1$  (1 mg/ml) before and after treatment with 0.5% (w/v) LDAO. Data are averaged from at least three independent measurements. For inhibition, membranes were incubated 20 min with 80  $\mu$ M DCCD at room temperature.

holoenzyme in the membrane (LDAO-activated, samples “a up”, “a down” and the control KH4 vs. the other four samples) and (b) different responses to LDAO-activation in dependence of the proton translocation capability (LDAO-activated vs. standard samples). The smaller extent of DCCD inhibition of the mutants as compared with the control probably was due to impaired DCCD binding as outlined above. Soluble  $EF_1$  could be isolated from the membranes of all six mutants by EDTA-extraction. Its ATPase activities after purification by Ni-NTA affinity chromatography were indistinguishable from the control, SDS electrophoresis also did not reveal any differences between samples of the mutants and KH4 (data not shown).  $EF_1$  bound to the membrane thus appeared to be assembled into intact, coupled holoenzymes which, however, were non-functional in ATP synthesis. Lack of subunits a and c reduced the total amount of holoenzymes.

### 3.4. Proton pumping driven by ATP hydrolysis

ATP hydrolysis-driven proton pumping by  $EF_oEF_1$  in membrane vesicles was measured via ACMA fluorescence quenching. The extent of the quench depends on both the degree

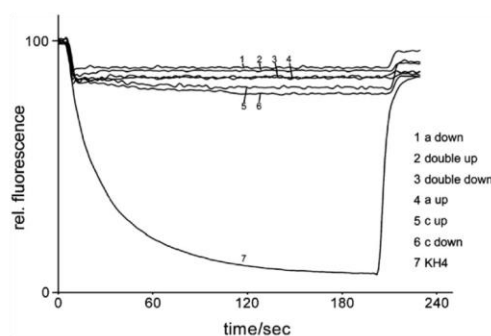


Fig. 4. ATP-driven quenching of ACMA fluorescence by wild-type (KH4) and mutant membrane vesicles. The cuvette contained  $EF_oEF_1$  vesicles in HMK-buffer, ACMA in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added. The final concentration of DMSO was 0.5% (v/v). The drop in the signals on the left was induced by addition of ATP, the rise on the right by addition of ammonium sulfate. Conditions were as given under Materials and methods.

Table 3

ATP-driven quenching of ACMA fluorescence in  $EF_0EF_1$  vesicles and NADH-driven quenching of quinacrine (QA) fluorescence in EDTA-treated  $EF_0$  vesicles

	$EF_0EF_1$ -vesicles ATP/ACMA [%]	$EF_0$ -vesicles NADH/QA [%]
a up (LL15)	4	81
a down (LL16)	0	11
c up (LL13)	6	73
c down (LL14)	10	23
double up (LL10)	1	81
double down (LL9)	2	67
KH4	77	0

Percentages refer to quenching as measured after 3 min. Data are averaged from at least three independent measurements and did not vary by more than 10%. ACMA quenching data are corrected for the quench caused by addition of ATP (11%).

of functionality of the ATP synthase and the intactness of the vesicles containing it. All samples except the control showed fairly similar and significantly decreased levels of ATP-driven fluorescence quenching (Fig. 4 and Table 3) as compared with the control. This behaviour probably was not caused by leaky vesicles, since NADH-driven ACMA quenching always revealed very high levels between 70 and 80%. In view of the effectivity of NADH oxidation-driven proton pumping and the sensitivity of ACMA fluorescence quenching, the less sensitive dye quinacrine was also used. “a down”, “c down”, and the control with quinacrine showed quenching degrees of around 35%, consistent with proton tight vesicles. The failure of “c down” to support ATP hydrolysis-driven ACMA fluorescence quenching also was observed at lower pH of the suspending medium (i.e. pH 7.5 and 7.0, data not shown).

### 3.5. ATP synthesis

The lack of ACMA quenching even with “c down” (the mutant which allowed for growth on succinate) prompted us to

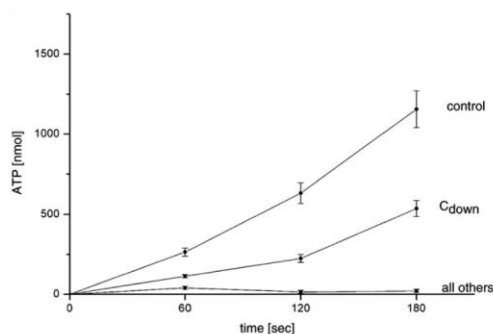


Fig. 5. NADH-driven ATP synthesis in  $EF_0EF_1$  vesicles. 30  $\mu$ g membrane protein (1  $\mu$ l) were incubated for the indicated times with 500  $\mu$ l buffer (2 mM NADH, 5 mM ADP, 5 mM  $K_2HPO_4$  in 25 mM Tris/HCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 10% (v/v) glycerol, pH 7.5). After termination of the reaction with 50  $\mu$ l 500 mM trichloroacetic acid 1  $\mu$ l aliquots of the reaction mixture were diluted 100 fold in 100 mM TRIS/Acetate, 2 mM EDTA, pH 7.8. In 10  $\mu$ l samples of this dilution ATP was determined luminometrically with a luciferin/firefly luciferase system ( $n=6$ ).

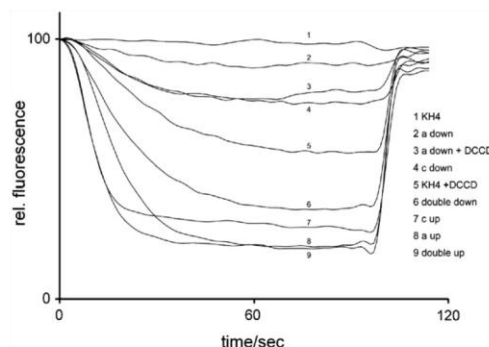


Fig. 6. NADH-driven quenching of quinacrine fluorescence measured with EDTA-treated wild-type (KH4) and mutant membrane vesicles. The cuvette contained  $EF_0$  vesicles in HMK-buffer, quinacrine dissolved in water was added. The drop in the signals on the left was induced by further addition of NADH, the rise on the right by ammonium sulfate addition. Conditions were as given under Materials and methods.

more rigorously assess NADH-driven ATP synthesis activity by direct luminometric determination of ATP. The rate of “c down” was around 38% of the control, the other mutants all were inactive (Fig. 5).

### 3.6. Passive proton conduction

An estimate of the ability of  $EF_1$ -depleted  $EF_0$  to allow for passive proton conduction is the extent of quinacrine fluorescence quenching in NADH-energized  $EF_0$  vesicles. ATP-driven ACMA quenches in these cases all were negligible (data not shown). NADH-driven quinacrine quenches are shown in Fig. 6 and summarized in Table 3. Membranes containing either one of the three “up” mutants and “double down” had lost the capability for passive proton conduction as revealed by the high extent of quenching. Mutant “a down” allowed for significant passive proton conduction and, as expected, “c down” and the control KH4. The relative ineffectiveness of DCCD treatment (80  $\mu$ M, 20 min, r.t.) to make vesicles as proton-tight as mutants “c up”, a “up”, “double up” and “double down” may reflect the extent of non-DCCD sensitive proton leaks in the EDTA-treated vesicles in addition to the previously discussed impaired binding of DCCD to the  $ac_{10}$  heteroligomer.

## 4. Discussion

With respect to function, several categories of mutants of the ATP synthase  $F_0$  portion are distinguishable: (i) those supporting all three, passive proton conduction, ATP hydrolysis-driven proton pumping, and ATP synthesis, (ii) those supporting ATP synthesis but apparently not proton pumping, (iii) those supporting proton pumping but not ATP synthesis, (iiii) those supporting just passive proton flow both through  $EF_0$  and through  $EF_0EF_1$ , (iiib) those supporting passive proton flow only through  $EF_0$ , i.e. after removal of  $EF_1$ , but not through  $EF_0EF_1$ , and (iv) those being nonfunctional in proton transport

and therefore also in ATP synthesis. By relocating two well-known essential residues within the assumed path of the proton through  $EF_o$ , we investigated the effects of a “vertical shift” of the charged residues aR210 and cD61 upon proton conduction. We show mutant “c down” to belong to the second class (iia), mutant “a down” to (iib) and the other four mutants to the last.

“c down” with respect to its growth on succinate was comparable with cD61N/cA24D [47] and aR210Q/aQ252R/aP204 T [46], but just as the latter it apparently did not support ATP hydrolysis-driven proton pumping. “c down” is the first  $F_o$  mutant supporting ATP synthesis where an essential residue has been shifted vertically such that the ratio of the length of the postulated access/exit channels is changed.

Mutants which catalyse proton translocation-driven ATP synthesis but not its reversal are most curious, since they apparently violate the principle of microreversibility. For “c down”, however, in view of the apparent proton-tightness of the membrane vesicles and the reproducibility of the data with pH variation, the conclusion would seem to be firm, unless one assumes some kind of threshold phenomenon with respect to ACMA fluorescence to occur. It is noteworthy that an example for category (iib), ATP hydrolysis-driven proton pumping but no ATP synthesis, also has been described (cI28E/cD61G [63]). Apparently, the direction of proton flux in these mutants becomes crucial. In “c down” and ATP synthesis direction the essential aspartate residue in subunit c is encountered earlier in the access pathway than in the wild-type enzyme, but, along with a reorientation of the rather extended side chain of aR210, proton translocation can proceed and results in generation of sufficient torque for product release in  $EF_1$ . In ATP hydrolysis direction, the aspartate is too far away to be effectively protonated, hence proton pumping fails. The slightly less strict requirements for residue aR210 in this context are underlined by mutant aR210Q/aQ252R/(aP204T) [46], which behaved the same. In mutant cI28E/cD61G [63] the situation is reversed: Now the essential aspartate is shifted towards  $F_1$ , i.e. into the exit pathway and thus fails to support synthesis, but it is well compatible with ATP hydrolysis-driven proton pumping.

The behaviour of mutant “a down” fits well into this scenario, since this mutant appeared to be short-circuited. It was not active in ATP synthesis, but supported fast passive proton conduction, albeit only after removal of  $EF_1$  from  $EF_o$ . This points to at least partial rotation of the c oligomer being required for proton conduction and contrasts with the behaviour of mutant aR210A [49] which was proton conducting also in the presence of  $EF_1$ . Remarkably, this feature of “a down” was not correctable by concomitant relocation of residue cD61 (mutant “double down”).

Relocating either one or both residues at the same time towards  $F_1$  (“up” mutants) in all cases resulted in proton tight  $EF_o$ . Still in the mutant holoenzymes  $EF_1$  appeared to be tightly connected to  $EF_o$  since their ATPase activities all could be stimulated by LDAO. Some mutants appeared to be affected with respect to the expression/posttranslational degradation of subunits a and c, but not with respect to assembly of the remaining available subunits. ATP hydrolysis activities of solubilized purified  $EF_1$  thus were indistinguishable from the

control, but the total number of assembled holoenzymes differed.

Loss of function with some of the point mutations can be caused by detrimental structural alterations within  $EF_o$ . Alternatively the functional position of the side chain of aR210 is predetermined by the structure of subunit a whereas the location of cD61 within the path of the proton is not quite as tied down. The assembled mutant holoenzymes along with their responses to LDAO and DCCD would seem to exclude the former. But if aR210 only plays a predominantly electrostatic role, the vertical shift of this residue within helix 4 of subunit a also would not be expected to matter, the more so in the “double” mutants.

In the context of the “roundabout” model as summarized in the introduction, an explanation of the behaviour of the constructs described here necessitates additional details. The model in its general version does not address the precise localization of the proton access and exit channels, the extent of their staggered array, the relative orientations of cD61 and aR210 and the timing of aR210 action.

The failure of the two “double” mutants along with the still active “c down” is difficult to reconcile with a location of the access and exit channels at the interface of subunit a and the  $c_{10}$  oligomer. Evidence, however, for the existence of aqueous access pathways *within* the bundle of subunit a helices has been presented [50,64–66]. In this context, helix swiveling within subunit a was proposed [67]: The protonmotive force ultimately causes conformational changes of the stator (subunit a) such that the swiveling helices exert torque upon the rotor ( $c_{10}$ ) as in a “meshed gear” [64].

How do the mutants investigated here fit this picture? Along with the former observation that the single mutant aR210A still allows for passive proton conduction [49], all three “up” mutants described here would seem to be non-functional since they had lost this capability, likely caused by blockage of proton exit in “a up” and blockage of cD61 protonation both in “c up” and “double up”. The lack of detailed structural information prevents assignment of this blockage to electrostatic interference, impaired swiveling caused by steric hindrance in the mutants, or both.

Mutant “c down” preserved some essential features of functional  $F_o$ . Possibly due to the prolonged exit channel, passive proton conduction was somewhat impaired. This would not affect, however, ATP synthesis due to the large difference in proton translocation rates between passive and ATP synthesis-related conduction.

In “a down” residue aR210 would seem to be cleared away with respect to passive proton conduction but also with respect to its gating role. Mutant “double down” was nearly as ineffective in passive proton conduction as the three “up” mutants. Proton access to the essential aspartate in subunit c might have been largely blocked in this case by the misplaced arginine side chain in subunit a.

The rather rigid requirements for the aR210 side chain location along with the lack of lysine to substitute functionally for arginine 210 [40] and the data presented here emphasize the importance of the staggered array of the proton access and exit

channels with aR210 in between. The sensitivity of the system against changes caused by even the slightest repositioning of aR210 certainly is in accordance with the proposed helix swiveling in subunit a [64,67] whereas such a swiveling in subunit c as postulated earlier [12,38], in view of a recent high-resolution structure [37], would seem to be obsolete. It will be most interesting to see to what extent the proton-motive force acts through a mechanical intermediate comprising conformational changes of the stator in addition to protonation/deprotonation. Not surprisingly, a high-resolution structure will be the only way to shed more light on these issues even if it yields just a still picture.

### Acknowledgements

We appreciate critical comments on the manuscript by W. Junge (University of Osnabrück, Department of Biophysics) and a generous gift of antisera directed against the eight *E. coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase subunits provided by Dr. Gabriele Deckers-Hebestreit, University of Osnabrück, Department of Microbiology, 49076 Osnabrück.

### References

- [1] P. Mitchell, Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation, *Physiol. Rev.* 41 (1966) 445–502.
- [2] P. Dimroth, Primary sodium ion translocating enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 1318 (1997) 11–51.
- [3] P.D. Boyer, The ATP synthase — a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 717–749.
- [4] D. Stock, C. Gibbons, I. Arechaga, A.G. Leslie, J.E. Walker, The rotary mechanism of ATP synthase, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2000) 672–679.
- [5] Y. Wada, Y. Sambongi, M. Futai, Biological nano motor, ATP synthase F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>: from catalysis to  $\gamma$ cc<sub>10–12</sub> subunit assembly rotation, *Biochim. Biophys. Acta* 1459 (2000) 499–505.
- [6] R.A. Capaldi, R. Aggeler, Mechanism of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-type ATP synthase, a biological rotary motor, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 154–160.
- [7] W. Junge, O. Pänke, D. Cherepanov, K. Gumbiowski, M. Müller, S. Engelbrecht, Inter-subunit rotation and elastic power transmission in F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase, *FEBS Lett.* 504 (2001) 152–160.
- [8] H. Noji, M. Yoshida, The rotary machine in the cell, ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1665–1668.
- [9] R.H. Fillingame, O.Y. Dmitriev, Structural model of the transmembrane F<sub>0</sub> rotary sector of H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking in situ, *Biochim. Biophys. Acta* 1565 (2002) 232–245.
- [10] A.E. Senior, S. Nadanaciva, J. Weber, The molecular mechanism of ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1553 (2002) 188–211.
- [11] J. Weber, A.E. Senior, ATP synthesis driven by proton transport in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, *FEBS Lett.* 545 (2003) 61–70.
- [12] V.K. Rastogi, M.E. Girvin, Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase, *Nature* 402 (1999) 263–268.
- [13] K. Altendorf, W. Stalz, J. Greie, G. Deckers-Hebestreit, Structure and function of the F<sub>0</sub> complex of the ATP synthase from *Escherichia coli*, *J. Exp. Biol.* 203 (Pt. 1) (2000) 19–28.
- [14] R.A. Capaldi, B. Schulenberg, J. Murray, R. Aggeler, Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia coli* ATP synthase, *J. Exp. Biol.* 203 (Pt. 1) (2000) 29–33.
- [15] P. Dimroth, Operation of the F<sub>0</sub> motor of the ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1458 (2000) 374–386.
- [16] P.D. Boyer, A research journey with ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39045–39061.
- [17] D. Zhang, S.B. Vik, Helix packing in subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase as determined by chemical labeling and proteolysis of the cysteine-substituted protein, *Biochemistry* 42 (2003) 331–337.
- [18] O.Y. Dmitriev, K. Altendorf, R.H. Fillingame, Subunit a of the *E. coli* ATP synthase: reconstitution and high resolution NMR with protein purified in a mixed polarity solvent, *FEBS Lett.* 556 (2004) 35–38.
- [19] P.D. Boyer, A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis, *FASEB J.* 3 (1989) 2164–2178.
- [20] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinoshita, Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase, *Nature* 386 (1997) 299–302.
- [21] G. Kaim, M. Prummer, B. Sick, G. Zumofen, A. Renn, U.P. Wild, P. Dimroth, Coupled rotation within single F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> enzyme complexes during ATP synthesis or hydrolysis, *FEBS Lett.* 525 (2002) 156–163.
- [22] K. Kinoshita Jr., K. Adachi, H. Itoh, Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33 (2004) 245–268.
- [23] H. Itoh, A. Takahashi, K. Adachi, H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinoshita, Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase, *Nature* 427 (2004) 465–468.
- [24] M. Diez, B. Zimmermann, M. Börsch, M. König, E. Schweinberger, S. Steigmiller, R. Reuter, S. Felekyan, V. Kudryavtsev, C.A. Seidel, P. Gräber, Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 135–141.
- [25] W. Junge, H. Lill, S. Engelbrecht, ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics, *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997) 420–423.
- [26] S.B. Vik, B.J. Antonio, A mechanism of proton translocation by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 30364–30369.
- [27] W. Junge, ATP synthase and other motor proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 4735–4737.
- [28] J. Hoppe, H.U. Schairer, W. Sebald, The proteolipid of a mutant ATPase from *Escherichia coli* defective in H<sup>+</sup>-conduction contains a glycine instead of the carboximide-reactive aspartyl residue, *FEBS Lett.* 109 (1980) 107–111.
- [29] J. Hoppe, H.U. Schairer, P. Friedl, W. Sebald, An Asp-Asn substitution in the proteolipid subunit of the ATP-synthase from *Escherichia coli* leads to a non-functional proton channel, *FEBS Lett.* 145 (1982) 21–29.
- [30] R.N. Lightowers, S.M. Howitt, L. Hatch, F. Gibson, G.B. Cox, The proton pore in the *Escherichia coli* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase: a requirement for arginine at position 210 of the a-subunit, *Biochim. Biophys. Acta* 894 (1987) 399–406.
- [31] M.E. Girvin, R.H. Fillingame, Helical structure and folding of subunit c of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase: <sup>1</sup>H NMR resonance assignments and NOE analysis, *Biochemistry* 32 (1993) 12167–12177.
- [32] S. Engelbrecht, W. Junge, ATP synthase: a tentative structural model, *FEBS Lett.* 414 (1997) 485–491.
- [33] W. Jiang, J. Hermolin, R.H. Fillingame, The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 4966–4971.
- [34] D. Stock, A.G. Leslie, J.E. Walker, Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase, *Science* 286 (1999) 1700–1705.
- [35] H. Seelert, A. Poetsch, N.A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg, D.J. Mueller, Proton-powered turbine of a plant motor, *Nature* 405 (2000) 418–419.
- [36] H. Stahlberg, D.J. Müller, K. Suda, D. Fotiadis, A. Engel, T. Meier, U. Matthey, P. Dimroth, Bacterial Na<sup>+</sup>-ATP synthase has an undecameric rotor, *EMBO Rep.* 2 (2001) 229–233.
- [37] T. Meier, P. Polzer, K. Diederichs, W. Welte, P. Dimroth, Structure of the rotor ring of F-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*, *Science* 308 (2005) 659–662.
- [38] R.H. Fillingame, W. Jiang, O.Y. Dmitriev, P.C. Jones, Structural interpretations of F<sub>0</sub> rotary function in the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta* 1458 (2000) 387–403.
- [39] M.E. Girvin, V.K. Rastogi, F. Abildgaard, J.L. Markley, R.H. Fillingame, Solution structure of the transmembrane H<sup>+</sup>-transporting subunit c of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase, *Biochemistry* 37 (1998) 8817–8824.
- [40] B.D. Cain, R.D. Simoni, Proton translocation by the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPase of



- Escherichia coli*. Mutagenic analysis of the a subunit, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 3292–3300.
- [41] M.J. Lewis, J.A. Chang, R.D. Simoni, A topological analysis of subunit a from *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase predicts eight transmembrane segments, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 10541–10550.
- [42] J.C. Long, S. Wang, S.B. Vik, Membrane topology of subunit a of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16235–16240.
- [43] F.I. Valiyaveetil, R.H. Fillingame, Transmembrane topography of subunit a in the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16241–16247.
- [44] H. Jäger, R. Birkenhäger, W.D. Stalz, K. Altendorf, G. Deckers-Hebestreit, Topology of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase, *Eur. J. Biochem.* 251 (1998) 122–132.
- [45] W.P. Jiang, R.H. Fillingame, Interacting helical faces of subunits a and c in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 6607–6612.
- [46] L.P. Hatch, G.B. Cox, S.M. Howitt, The essential arginine residue at position 210 in the a subunit of the *Escherichia coli* ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 29407–29412.
- [47] M.J. Miller, M. Oldenburg, R.H. Fillingame, The essential carboxyl group in subunit c of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase can be moved and H<sup>+</sup>-translocating function retained, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 4900–4904.
- [48] Y. Zhang, R.H. Fillingame, Essential aspartate in subunit c of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. Effect of position 61 substitutions in helix-2 on function of Asp24 in helix-1, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5473–5479.
- [49] F.I. Valiyaveetil, R.H. Fillingame, On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the *Escherichia coli* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32635–32641.
- [50] C.M. Angevine, R.H. Fillingame, Aqueous access channels in subunit a of rotary ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 6066–6074.
- [51] H. Noji, K. Häsler, W. Junge, K. Kinoshita, M. Yoshida, S. Engelbrecht, Rotation of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 (1999) 597–599.
- [52] D.J. Klionsky, W.S.A. Brusilow, R.D. Simoni, In vivo evidence for the role of the epsilon subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 160 (1984) 1055–1060.
- [53] M.P. Weiner, G.L. Costa, W. Schoettlin, J. Cline, E. Mathur, J.C. Bauer, Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction, *Gene* 151 (1994) 119–123.
- [54] M. Müller, O. Pänke, W. Junge, S. Engelbrecht, F<sub>1</sub>-ATPase: The C-terminal end of subunit  $\gamma$  is not required for ATP hydrolysis-driven rotation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23308–23313.
- [55] S.P. Tsunoda, R. Aggeler, M. Yoshida, R.A. Capaldi, Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 898–902.
- [56] J.J. Sedmak, S.E. Grossberg, A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250, *Anal. Biochem.* 79 (1977) 544–552.
- [57] M. Müller, K. Gumbiowski, D.A. Cherepanov, S. Winkler, W. Junge, S. Engelbrecht, O. Pänke, Rotary F<sub>1</sub>-ATPase. Is the C-terminus of subunit  $\gamma$  fixed or mobile? *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3914–3922.
- [58] J.D. Butlin, G.B. Cox, F. Gibson, Oxidative phosphorylation in *Escherichia coli* K12. Mutations affecting magnesium ion- or calcium ion-stimulated adenosine triphosphatase, *Biochem. J.* 124 (1971) 75–81.
- [59] J.A. Downie, F. Gibson, G.B. Cox, Membrane adenosine triphosphatases of prokaryotic cells, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 103–131.
- [60] M. van Workum, S.J. van Dooren, N. Oldenburg, D. Molenaar, P.R. Jensen, J.L. Snoep, H.V. Westerhoff, DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 20 (1996) 351–360.
- [61] F.C. Boogerd, L. Boe, O. Michelsen, P.R. Jensen, atp Mutants of *Escherichia coli* fail to grow on succinate due to a transport deficiency, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 5855–5859.
- [62] S.D. Dunn, R.G. Tozer, V.D. Zadorozny, Activation of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase by lauryldimethylamine oxide and ethylene-glycol — relationship of ATPase activity to the interaction of the  $\epsilon$ -subunit and  $\beta$ -subunit, *Biochemistry* 29 (1990) 4335–4340.
- [63] P.C. Jones, Introduction of a carboxyl group in the first transmembrane helix of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase subunit c and cytoplasmic pH regulation, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 1524–1530.
- [64] C.M. Angevine, K.A. Herold, R.H. Fillingame, Aqueous access pathways in subunit a of rotary ATP synthase extend to both sides of the membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 13179–13183.
- [65] B.E. Schwem, R.H. Fillingame, Cross-linking between helices within subunit a of *Escherichia coli* ATP synthase defines the transmembrane packing of a four-helix bundle, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 37861–37867.
- [66] C.M. Angevine, K.A. Herold, O.D. Vincent, R.H. Fillingame, Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a: reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3 and 5, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9001–9007.
- [67] R.H. Fillingame, C.M. Angevine, O.Y. Dmitriev, Coupling proton movements to c-ring rotation in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a–c interface, *Biochim. Biophys. Acta* 1555 (2002) 29–36.

---

## **11. Literaturverzeichnis II**

- Altendorf, K., W. Stalz, J. Greie and G. Deckers-Hebestreit (2000). "Structure and function of the F<sub>o</sub> complex of the ATP synthase from *Escherichia coli*." J.Exp.Biol. **203 Pt 1**: 19-28.
- Angevine, C. M. and R. H. Fillingame (2003). "Aqueous access channels in subunit a of rotary ATP synthase." Journal of Biological Chemistry **278**: 6066-6074.
- Angevine, C. M., K. A. Herold and R. H. Fillingame (2003). "Aqueous access pathways in subunit a of rotary ATP synthase extend to both sides of the membrane." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **100**(23): 13179-13183.
- Angevine, C. M., K. A. Herold, O. D. Vincent and R. H. Fillingame (2007). "Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a. Reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3, and 5." J Biol Chem **282**(12): 9001-7.
- Boogerd, F. C., L. Boe, O. Michelsen and P. R. Jensen (1998). "atp Mutants of *Escherichia coli* fail to grow on succinate due to a transport deficiency." Journal of Bacteriology **180**(22): 5855-5859.
- Boyer, P. D. (1989). "A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis." FASEB J. **3**: 2164-2178.
- Boyer, P. D. (1993). "The binding change mechanism for ATP synthase - Some probabilities and possibilities." Biochimica et Biophysica Acta **1140**: 215-250.
- Boyer, P. D. (1997). "The ATP synthase - a splendid molecular machine." Annu.Rev.Biochem. **66**: 717-749.
- Boyer, P. D. (1997). "The ATP synthase--a splendid molecular machine." Annu.Rev.Biochem. **66**: 717-749.
- Boyer, P. D. (2002). "A research journey with ATP synthase." Journal of Biological Chemistry **277**(42): 39045-39061.
- Butlin, J. D., G. B. Cox and F. Gibson (1971). "Oxidative phosphorylation in *Escherichia coli* K12. Mutations affecting magnesium ion- or calcium ion-stimulated adenosine triphosphatase." Biochemical Journal **124**(1): 75-81.
- Cain, B. D. and R. D. Simoni (1989). "Proton translocation by the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase of *Escherichia coli*. Mutagenic analysis of the alpha subunit." Journal of Biological Chemistry **264**: 3292-3300.

- 
- Capaldi, R. A. and R. Aggeler (2002). "Mechanism of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-type ATP synthase, a biological rotary motor." Trends in Biochemical Sciences **27**(3): 154-160.
- Capaldi, R. A., B. Schulenberg, J. Murray and R. Aggeler (2000). "Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the Escherichia coli ATP synthase." J.Exp.Biol. **203 Pt 1**: 29-33.
- Collinson, I. R., M. J. Runswick, S. K. Buchanan, I. M. Fearnley, J. M. Skehel, M. J. Vanjaaij, D. E. Griffiths and J. E. Walker (1994). "F<sub>0</sub> membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria - purification, subunit composition, and reconstitution with F<sub>1</sub> ATPase." Biochemistry **33**(25): 7971-7978.
- Devenish, R. J., M. Prescott, X. Roucou and P. Nagley (2000). "Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex." Biochim Biophys Acta **1458**(2-3): 428-42.
- Diez, M., B. Zimmermann, M. Borsch, M. Konig, E. Schweinberger, S. Steigmiller, R. Reuter, S. Felekyan, V. Kudryavtsev, C. A. Seidel and P. Graber (2004). "Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase." Nat.Struct.Mol.Biol **11**(2): 135-141.
- Dimroth, P. (1997). "Primary sodium ion translocating enzymes." Biochimica et Biophysica Acta **1318**(1-2): 11-51.
- Dimroth, P. (2000). "Operation of the F<sub>0</sub> motor of the ATP synthase." Biochimica et Biophysica Acta **1458**(2-3): 374-386.
- Dimroth, P., H. Wang, M. Grabe and G. Oster (1999). "Energy transduction in the sodium F-ATPase of *Propionigenium modestum* " Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 4924-4928.
- Dmitriev, O. Y., K. Altendorf and R. H. Fillingame (2004). "Subunit a of the E. coli ATP synthase: reconstitution and high resolution NMR with protein purified in a mixed polarity solvent." FEBS Letters **556**(1-3): 35-38.
- Downie, J. A., F. Gibson and G. B. Cox (1979). "Membrane adenosine triphosphatases of prokaryotic cells." Annu.Rev.Biochem. **48**: 103-131.
- Dunn, S. D., R. G. Tozer and V. D. Zadorozny (1990). "Activation of Escherichia-Coli F<sub>1</sub>-Atpase by Lauryldimethylamine Oxide and Ethylene-Glycol - Relationship

- 
- of Atpase Activity to the Interaction of the Epsilon-Subunit and Beta-Subunit." Biochemistry **29**(18): 4335-4340.
- Engelbrecht, S. and W. Junge (1997). "ATP synthase: a tentative structural model." FEBS Letters **414**: 485-491.
- Fillingame, R. H., C. M. Angevine and O. Y. Dmitriev (2002). "Coupling proton movements to c-ring rotation in F(1)F(o) ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface." Biochimica et Biophysica Acta **1555**(1-3): 29-36.
- Fillingame, R. H. and O. Y. Dmitriev (2002). "Structural model of the transmembrane Fo rotary sector of H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking in situ." Biochimica et Biophysica Acta **1565**(2): 232-245.
- Fillingame, R. H., W. Jiang, O. Y. Dmitriev and P. C. Jones (2000). "Structural interpretations of F(0) rotary function in the Escherichia coli F(1)F(0) ATP synthase." Biochimica et Biophysica Acta **1458**(2-3): 387-403.
- Fillingame, R. H., P. C. Jones, W. Jiang, F. I. Valiyaveetil and O. Y. Dmitriev (1998). "Subunit organization and structure in the F<sub>0</sub> sector of Escherichia coli F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase." Biochimica et Biophysica Acta **1365**(1-2): 135-142.
- Girvin, M. E. and R. H. Fillingame (1993). "Helical structure and folding of subunit c of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase: <sup>1</sup>H NMR resonance assignments and NOE analysis." Biochemistry **32**: 12167-12177.
- Girvin, M. E., V. K. Rastogi, F. Abildgaard, J. L. Markley and R. H. Fillingame (1998). "Solution structure of the transmembrane H<sup>+</sup>-transporting subunit c of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase." Biochemistry **37**(25): 8817-8824.
- Hatch, L. P., G. B. Cox and S. M. Howitt (1995). "The essential arginine residue at position 210 in the alpha subunit of the Escherichia coli ATP synthase can be transferred to position 252 with partial retention of activity." Journal of Biological Chemistry **270**(49): 29407-29412.
- Hoppe, J., H. U. Schairer, P. Friedl and W. Sebald (1982). "An Asp-Asn substitution in the proteolipid subunit of the ATP-synthase from Escherichia coli leads to a non-functional proton channel." FEBS Letters **145**(1): 21-29.

- 
- Hoppe, J., H. U. Schairer and W. Sebald (1980). "The Proteolipid of a mutant ATPase from *Escherichia coli* defective in H<sup>+</sup>-conduction contains a Glycine instead of the Carbodiimide-reactive Aspartyl Residue." FEBS Letters **109**: 107-111.
- Itoh, H., A. Takahashi, K. Adachi, H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinoshita (2004). "Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase." Nature **427**(6973): 465-468.
- Jager, H., R. Birkenhäger, W. D. Stalz, K. Altendorf and G. Deckers-Hebestreit (1998). "Topology of subunit alpha of the *Escherichia coli* atp synthase." European Journal of Biochemistry **251**(1-2): 122-132.
- Jiang, W., J. Hermolin and R. H. Fillingame (2001). "The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(9): 4966-4971.
- Jiang, W. P. and R. H. Fillingame (1998). "Interacting helical faces of subunits a and c in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(12): 6607-6612.
- Jones, P. C. (2001). "Introduction of a carboxyl group in the first transmembrane helix of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATPase subunit c and cytoplasmic pH regulation." Journal of Bacteriology **183**(5): 1524-1530.
- Junge, W. (1999). "ATP synthase and other motor proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 4735-4737.
- Junge, W. and D. P. Häder (1999). ATP-Synthase (Photophosphorylierung). Photosynthese. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 132-145.
- Junge, W., H. Lill and S. Engelbrecht (1997). "ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics." Trends in Biochemical Sciences **22**: 420-423.
- Junge, W., O. Pänke, D. Cherepanov, K. Gumbiowski, M. Müller and S. Engelbrecht (2001). "Inter-subunit rotation and elastic power transmission in F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATPase." FEBS Letters **504**(3): 152-160.
- Junge, W., H. Sielaff and S. Engelbrecht (2009). "Torque generation and elastic power transmission in the rotary F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATPase." Nature **459**(7245): 364-70.

- 
- Kaim, G., M. Prummer, B. Sick, G. Zumofen, A. Renn, U. P. Wild and P. Dimroth (2002). "Coupled rotation within single F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> enzyme complexes during ATP synthesis or hydrolysis." FEBS Letters **525**(1-3): 156-163.
- Kinosita, K., Jr., K. Adachi and H. Itoh (2004). "Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **33**: 245-268.
- Klionsky, D. J., W. S. A. Brusilow and R. D. Simoni (1984). "In vivo evidence for the role of the epsilon subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli* " Journal of Bacteriology **160**: 1055-1060.
- Lee, L. K., A. G. Stewart, M. Donohoe, R. A. Bernal and D. Stock "The structure of the peripheral stalk of *Thermus thermophilus* H<sup>+</sup>-ATPase/synthase." Nat Struct Mol Biol **17**(3): 373-8.
- Lewis, M. J., J. A. Chang and R. D. Simoni (1990). "A topological analysis of subunit alpha from *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase predicts eight transmembrane segments." Journal of Biological Chemistry **265**: 10541-10550.
- Lightowlers, R. N., S. M. Howitt, L. Hatch, F. Gibson and G. B. Cox (1987). "The proton pore in the *Escherichia coli* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase: a requirement for arginine at position 210 of the  $\alpha$ -subunit." Biochimica et Biophysica Acta **894**: 399-406.
- Long, J. C., S. Wang and S. B. Vik (1998). "Membrane topology of subunit a of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues." Journal of Biological Chemistry **273**(26): 16235-16240.
- Meier, T., P. Polzer, K. Diederichs, W. Welte and P. Dimroth (2005). "Structure of the rotor ring of F-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*." Science **308**(5722): 659-662.
- Miller, M. J., M. Oldenburg and R. H. Fillingame (1990). "The essential carboxyl group in subunit c of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase can be moved and H<sup>+</sup>-translocating function retained." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**: 4900-4904.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of photophosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.

- 
- Müller, M., K. Gumbiowski, D. A. Cherepanov, S. Winkler, W. Junge, S. Engelbrecht and O. Pänke (2004). "Rotary F<sub>1</sub>-ATPase. Is the C-terminus of subunit gamma fixed or mobile?" European Journal of Biochemistry **271**(19): 3914-3922.
- Müller, M., O. Pänke, W. Junge and S. Engelbrecht (2002). "F<sub>1</sub>-ATPase: The C-terminal end of subunit gamma is not required for ATP hydrolysis-driven rotation." Journal of Biological Chemistry **277**(June 28): 23308-23313.
- Noji, H., K. Häsler, W. Junge, K. Kinosita, M. Yoshida and S. Engelbrecht (1999). "Rotation of Escherichia coli F(1)-ATPase." Biochem.Biophys.Res.Comm. **260**(3): 597-599.
- Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinosita (1997). "Direct observation of the rotation of F-ATPase." Nature **386**: 299-302.
- Noji, H. and M. Yoshida (2001). "The rotary machine in the cell, ATP synthase." Journal of Biological Chemistry **276**(3): 1665-1668.
- Pänke, O., K. Gumbiowski, W. Junge and S. Engelbrecht (2000). "F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of F<sub>1</sub>O F<sub>1</sub>" FEBS Letters **472**: 34-38.
- Pogoryelov, D., O. Yildiz, J. D. Faraldo-Gomez and T. Meier (2009). "High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase." Nat Struct Mol Biol **16**(10): 1068-73.
- Pogoryelov, D., J. Yu, T. Meier, J. Vonck, P. Dimroth and D. J. Muller (2005). "The c<sub>15</sub> ring of the Spirulina platensis F-ATP synthase: F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> symmetry mismatch is not obligatory." EMBO Rep **6**(11): 1040-4.
- Rastogi, V. K. and M. E. Girvin (1999). "Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase." Nature **402**: 263-268.
- Rees, D. M., A. G. Leslie and J. E. Walker (2009). "The structure of the membrane extrinsic region of bovine ATP synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21597-601.
- Sambongi, Y., Y. Iko, M. Tanabe, H. Omote, A. Iwamoto-Kihara, I. Ueda, T. Yanagida, Y. Wada and M. Futai (1999). "Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (FoF<sub>1</sub>): direct observation." Science **286**: 1722-1724.

- 
- Schwem, B. E. and R. H. Fillingame (2006). "Cross-linking between helices within subunit a of Escherichia coli ATP synthase defines the transmembrane packing of a four-helix bundle." Journal of Biological Chemistry **281**(49): 37861-37867.
- Sedmak, J. J. and S. E. Grossberg (1977). "A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250." Anal. Biochem. **79**(1-2): 544-552.
- Seelert, H., A. Pötsch, N. A. Dencher, A. Engel, H. Stahlberg and D. J. Müller (2000). "Proton-powered turbine of a plant motor." Nature **405**(6785): 418-419.
- Senior, A. E., S. Nadanaciva and J. Weber (2002). "The molecular mechanism of ATP synthesis by F(1)F(0)-ATP synthase." Biochimica et Biophysica Acta **1553**(3): 188-211.
- Stahlberg, H., D. J. Muller, K. Suda, D. Fotiadis, A. Engel, T. Meier, U. Matthey and P. Dimroth (2001). "Bacterial Na(+)-ATP synthase has an undecameric rotor." EMBO Rep. **2**(3): 229-233.
- Stock, D., C. Gibbons, I. Arechaga, A. G. Leslie and J. E. Walker (2000). "The rotary mechanism of ATP synthase." Curr. Opin. Chem. Biol. **10**(6): 672-679.
- Stock, D., A. G. Leslie and J. E. Walker (1999). "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase." Science **286**(5445): 1700-1705.
- Tanabe, M., K. Nishio, Y. Iko, Y. Sambongi, A. Iwamoto-Kihara, Y. Wada and M. Futai (2001). "Rotation of a complex of the gamma subunit and c ring of Escherichia coli ATP synthase. The rotor and stator are interchangeable." Journal of Biological Chemistry **276**(18): 15269-15274.
- Tsunoda, S. P., R. Aggeler, M. Yoshida and R. A. Capaldi (2001). "Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F1Fo ATP synthase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(3): 898-902.
- Valiyaveetil, F. I. and R. H. Fillingame (1997). "On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the Escherichia coli F0F1-ATP synthase." Journal of Biological Chemistry **272**(51): 32635-32641.
- Valiyaveetil, F. I. and R. H. Fillingame (1998). "Transmembrane topography of subunit a in the Escherichia coli F1F0 ATP synthase." Journal of Biological Chemistry **273**(26): 16241-16247.



- 
- van Workum, M., S. J. van Dooren, N. Oldenburg, D. Molenaar, P. R. Jensen, J. L. Snoep and H. V. Westerhoff (1996). "DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*." Mol.Microbiol. **20**(2): 351-360.
- Vik, S. B. and B. J. Antonio (1994). "A mechanism of proton translocation by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases suggested by double mutants of the  $\delta$  subunit." Journal of Biological Chemistry **269**(48): 30364-30369.
- Wada, Y., Y. Sambongi and M. Futai (2000). "Biological nano motor, ATP synthase F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>: from catalysis to gammaepsilon(10-12) subunit assembly rotation." Biochimica et Biophysica Acta **1459**(2-3): 499-505.
- Weber, J. and A. E. Senior (2003). "ATP synthesis driven by proton transport in F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase." FEBS Letters **545**(1): 61-70.
- Weiner, M. P., G. L. Costa, W. Schoettlin, J. Cline, E. Mathur and J. C. Bauer (1994). "Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction." Gene **151**(1-2): 119-123.
- Zhang, D. and S. B. Vik (2003). "Helix Packing in Subunit a of the *Escherichia coli* ATP Synthase as Determined by Chemical Labeling and Proteolysis of the Cysteine-Substituted Protein." Biochemistry **42**(2): 331-337.
- Zhang, Y. and R. H. Fillingame (1994). "Essential aspartate in subunit c of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. Effect of position 61 substitutions in helix-2 on function of Asp24 in helix-1." Journal of Biological Chemistry **269**(7): 5473-5479.

---

---

## **12. Anhang**

### **12.1 Verwendete Hefestämme**

Stamm	Genotyp	Quelle
BJ3505	MATa <i>pep4Δ::HIS3 prb1-Δ1.6R lys2-208 trp1Δ101 ura3-52 gal2</i>	Haas <i>et al.</i> , 1994
CUY399	BJ3505 <i>vps41Δ::kanMX</i>	Cabrera <i>et al.</i> , 2009
CUY638	CUY399 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41 62-102Δ</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY1924	CUY399 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41</i>	Cabrera <i>et al.</i> , 2009
CUY2226	CUY1906 <i>VPS41::TAP-kanMX</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY2339	BY4741 <i>vam2Δ::kanMX APL5::TAP-URA3</i>	Diese Arbeit
CUY2432	CUY1924 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41::eGFP-TRP1</i>	Cabrera <i>et al.</i> , 2009
CUY2435	CUY1924 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41::TAP-TRP1</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY2516	CUY399 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41 (S367, 368,371,372A)</i>	Cabrera <i>et al.</i> , 2009
CUY2517	CUY399 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41 (S367, 368,371,372D)</i>	Cabrera <i>et al.</i> , 2009
CUY2575	BY4727 <i>APL5::TAP-KanMX</i>	Diese Arbeit
CUY2666	CUY2575 <i>vam3Δ::TRP</i>	Diese Arbeit
CUY2667	BY4732 <i>APL6::KanMX-GAL1pr-3HA</i>	Diese Arbeit
CUY2668	CUY2575 <i>APL5-TAP::His3MX-GAL1pr</i>	Diese Arbeit
CUY2680	CUY2667 <i>APS3::TRP-Gal1pr-3HA</i>	Diese Arbeit
CUY2691	CUY2668 <i>APM3::TRP1-GAL1pr-3HA</i>	Cabrera <i>et al.</i> , 2009
CUY2708	<i>Mat Alpha/a his3Δ200/his3Δ200 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0/met15Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 ura3Δ0/ura3Δ0 APL5::TAP-kanMX APL5-TAP::His3MX-GAL1pr APM3::TRP1-GAL1-3HA APL6::KanMX-Gal1pr-3HA APS3::TRP-Gal1pr-3HA</i>	Diese Arbeit
CUY2819	CUY1924 <i>YPT7::TRP1-PHO5pr-GFP-myc</i>	Cabrera <i>et al.</i> , 2009
CUY2910	CUY2708 <i>VAM2::Gal1pr-NatNT2</i>	Diese Arbeit
CUY3044	BY4727 <i>APL5::HIS3MX6-GAL1pr-3HA</i>	Diese Arbeit
CUY3096	CUY3044 <i>APM3::TRP1-GAL1pr-3HA</i>	Diese Arbeit
CUY3193	CUY2668 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3194	CUY2691 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3195	CUY2910 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3196	CUY2708 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3197	CUY485 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3198	CUY2680 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3199	CUY2667 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
CUY3214	CUY1924 <i>TRP1::pRS414-TD1pr-GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Cabrera et al., 2009
CUY3215	CUY2516 <i>TRP1::pRS414-TD1pr-GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Cabrera et al., 2009
CUY3216	CUY2517 <i>TRP1::pRS414-TD1pr-GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Cabrera et al., 2009
CUY3329	BJ3505 <i>VPS39::TRP1-PHO5pr-GFP</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY3322	CUY3096 <i>APL6::natNT2-Gal1pr-3HA</i>	Diese Arbeit
CUY3365	<i>MATalpha/a his3Δ200/his3Δ200 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0</i>	Diese Arbeit
CUY3366	<i>met15Δ0/met15Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 ura3Δ0/ura3Δ0 APL5::HIS3MX6-CUY3322 APS3::kanMX-GAL1pr-3HA</i>	Diese Arbeit
CUY3412	CUY1924 <i>APL5::GFP-TRP1</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY3511	CUY3068 <i>APM3-TAP::TRP1-GAL1pr</i>	
CUY3525	<i>MATa/alpha his3Δ200/his3Δ200 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0</i>	Diese Arbeit
CUY3586	<i>met15Δ0/met15Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 ura3Δ0/ura3Δ0 APL6::KanMX-BY4741 APM3::TAP-kanMX</i>	Diese Arbeit
CUY3597	CUY2516 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41 (S367, 368,371,372A)::GFP-hphNT1</i>	Cabrera et al., 2009
CUY3598	CUY2517 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41 (S367, 368,371,372D)::GFP-hphNT1</i>	Cabrera et al., 2009
CUY3710	BJ <i>vam2Δ::kanMX VPS39::PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3712	CUY638 <i>VPS39::TRP1-PHO5pr-GFP</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY3713	<i>MATalpha/a his3Δ200/his3Δ200 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0</i>	Diese Arbeit
CUY 3807	<i>met15Δ0/met15Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 ura3Δ0/ura3Δ0 APL5::HIS3MX6-MATa/alpha his3Δ200/his3Δ200 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0</i>	Diese Arbeit
	<i>met15Δ0/met15Δ0 trp1Δ63/trp1Δ63 ura3Δ0/ura3Δ0 APL6::KanMX-GAL1pr-3HA APS3::TRP-GAL1pr-3HA vam2Δ::URA APL5::HIS3MX6-GAL1pr-3HA APM3::TRP1-GAL1pr-3HA</i>	
CUY3808	CUY3044 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3809	CUY3096 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3810	CUY3322 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3811	CUY3366 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3812	CUY3365 <i>URA::pGNS416-GFP-Nyv1-Snc1</i>	Diese Arbeit
CUY3813	CUY399 <i>CPS1::URA-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3815	CUY638 <i>CPS1::URA-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3816	BJ3505 <i>YPT7::NatNT2-TEFpr</i>	Diese Arbeit
CUY3817	CUY399 <i>YPT7::natNT2-TEFpr</i>	Diese Arbeit
CUY3820	CUY638 <i>YPT7::natNT2-TEFpr</i>	Diese Arbeit
CUY3823	CUY638 <i>URA3::pRS406-NOP1pr-VPS41 62-102Δ::TAP-TRP</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY3824	CUY485 <i>VAM2::URA-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3825	CUY3366 <i>VAM2::URA-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3826	CUY3365 <i>VAM2::URA-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
CUY3827	CUY2708 <i>VAM2::URA-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3865	BJ3505 <i>YCK3::TRP-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3866	BJ3505 <i>APL5::GFP-TRP</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY3867	CUY638 <i>YCK3::TRP-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3868	CUY638 <i>APL5::GFP-TRP</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY3869	CUY638 <i>YPT7::TRP-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3870	CUY399 <i>APL5::GFP-TRP</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY3873	CUY399 <i>YCK3::TRP-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY3876	CUY399 <i>YPT7::TRP-PHO5pr-GFP</i>	Diese Arbeit
CUY4170	CUY399 <i>URA::pRS406-NOP1pr-VPS41 62-102Δ (S367,368,371,372A)</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4171	CUY399 <i>URA::pRS406-NOP1pr-VPS41 62-102Δ (S367,368,371,372D)</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4556	BJ3505 <i>YPT7::TRP1-PHO5pr-GFP</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4613	BJ3505 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-102</i>	Diese Arbeit
CUY4614	CUY638 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-102</i>	Diese Arbeit
CUY4615	CUY4170 <i>URA::pRS406 NOP1pr-VPS41 Δ62-102 (S367,368,371,372A)::yeGFP-hphNt1</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4616	CUY4171 <i>URA::pRS406 NOP1pr-VPS41 Δ62-102 (S367,368,371,372D)::yeGFP-hphNt1</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4617	CUY638 <i>URA::pRS406 Nop1pr-VPS41 Δ62-102::yeGFP-hphNt1</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4618	BJ3505 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-184</i>	Diese Arbeit
CUY4619	BJ3505 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-485</i>	Diese Arbeit
CUY4620	CUY3866 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-184</i>	Diese Arbeit
CUY4621	CUY3866 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-485</i>	Diese Arbeit
CUY4622	CUY638 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-184</i>	Diese Arbeit
CUY4623	CUY638 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-485</i>	Diese Arbeit
CUY4624	CUY3868 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-184</i>	Diese Arbeit
CUY4625	CUY3868 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-485</i>	Diese Arbeit
CUY4759	CUY638 <i>TRP1::pRS414-TPIpr-GFP-NYV1-SNC1TMD</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4760	CUY4170 <i>TRP1::pRS414-TPIpr-GFP-NYV1-SNC1TMD</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4761	CUY4171 <i>TRP1::pRS414-TPIpr-GFP-NYV1-SNC1TMD</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4762	CUY399 <i>URA::pRS406-NOP1pr-VPS41 62-94Δ</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4763	CUY399 <i>URA::pRS406-NOP1pr-VPS41 95-102Δ</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4764	CUY4762 <i>URA::pRS406-NOP1pr-VPS41 62-94Δ::GFP-hphNt1</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4765	CUY4763 <i>URA::pRS406-NOP1pr-VPS41 95-102Δ::GFP-hphNt1</i>	Cabrera, Langemeyer 2010

---

Stamm	Genotyp	Quelle
CUY4766	CUY3870 <i>URA::pRS406-NOP1pr-VPS41 62-94Δ</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4767	CUY3870 <i>URA::pRS406-NOP1pr-VPS41 95-102Δ</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4768	CUY4762 <i>TRP1::pRS414-TPIpr-GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4769	CUY4763 <i>TRP1::pRS414-TPIpr-GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Cabrera, Langemeyer 2010
CUY4786	CUY3868 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-102</i>	Diese Arbeit
CUY4787	CUY3866 <i>VPS39::natNT2-NOP1pr-VPS41aa1-184</i>	Diese Arbeit
CUY4788	CUY4613 <i>TRP::GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Diese Arbeit
CUY4789	CUY4614 <i>TRP::GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Diese Arbeit
CUY4790	CUY4618 <i>TRP::GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Diese Arbeit
CUY4791	CUY4619 <i>TRP::GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Diese Arbeit
CUY4792	CUY4622 <i>TRP::GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Diese Arbeit
CUY4793	CUY4623 <i>TRP::GFP-NYV1-SNCITMD</i>	Diese Arbeit

---

## **12.2 Eidesstattliche Erklärung**

### Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

- 1 Bei der Herstellung der Stämme für die hier präsentierten Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen (Abb. 3.16) und die Etablierung der GST-Ap15 Interaktionsstudien (Abb. 3.14) hat mir Markus Abeln im Rahmen der Anfertigung seiner Bachelorarbeit geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
(Ort, Datum)

.....  
(Unterschrift)

---

## **Publikationsliste**

- 1) Essential arginine in subunit a and aspartate in subunit c of FoF1 ATP-synthase  
Effect of repositioning within Helix 4 of subunit a and Helix 2 of subunit c  
Langemeyer and Engelbrecht; BBA Vol. 1767 (2007) p998-1005
  
- 2) Functional switching in transport vesicle tethering by phosphorylation of a membrane curvature-sensing motif  
Margarita Cabrera\*, Lars Langemeyer\*, Muriel Mari, Ioan Orban, Angela Perz, Cornelia Bröcker, Janice Griffith, Daniel Klose, Heinz-Jürgen Steinhoff, Fulvio Reggiori, Siegfried Engelbrecht, and Christian Ungermann  
Submitted to JBC, 2010





Conny

Jens

Thomas

Mirjana

Clemens

Marga

Prof. Christian Ungermann

Dr. Hans-Peter Schmitz

DANKKE !!!

Henning B.

Franzi

Lukas

André

Ralf

apl. Prof Siegfried Engelbrecht-Vandré

Hella

Markus

Prof. Wolfgang Junge

Angela

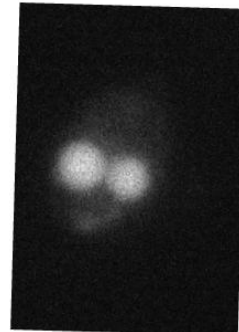
Katrin K.

Kathrin A.

Frank

Gaby

Nicole



...und natürlich allen übrigen Mitgliedern der Biochemie und jedem, den ich vergessen haben sollte;-)