

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Rolle des kleinen GTP-bindenden Proteins Arf1
bei der Biogenese von Transport-Vesikeln

vorgelegt von
Kathrin Höhner

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Zusammenfassung

Die minimale Maschinerie von COPI-Vesikeln besteht aus dem kleinen Guaninnukleotid-bindende Protein (GNBP) Arf1, dem Hüllproteinkomplex Coatomer und Proteinen der p24-Familie. Trotz umfassender biochemischer Studien sind bis heute die Schritte der COPI-Vesikelbiogenese nicht im Detail aufgeklärt.

So ist für das kleine GNBP Arf1 bekannt, dass nach GEF-vermitteltem Nukleotidaustausch an Membranen Konformationsänderungen auftreten, die unter anderem das Ausklappen der amphiphilen N-terminalen α -Helix mit ihrem Myristoyl-Anker bewirken, die in die Membran inserieren (Antonny *et al.*, 1997; Franco *et al.*, 1996). Hier dimerisiert Arf1wt, die Mutante Arf1Y35A jedoch nicht. Diese Mutante ist zudem nicht in der Lage, freie COPI-Vesikel zu generieren (Beck *et al.*, 2008). Es ist bisher noch nicht bekannt, wann die Dimerisierung erfolgt und wie die Dimer-Interaktionsfläche aussieht.

In dieser Arbeit wurden die Rolle der Dimerisierung und die mögliche Dimerinteraktionsfläche von Arf1 untersucht. Dazu wurde zum einen die Mutante Arf1Y35F generiert und ihre Eigenschaften im Vergleich zum Arf1 Wildtyp untersucht. Die biochemische Analyse ergab, dass sich Arf1Y35F in den biochemischen Eigenschaften nicht vom Wildtyp-Arf1 unterscheidet, sodass angenommen werden kann, dass der große hydrophobe Rest in die Dimerisierung involviert ist.

Zum anderen wurde eine N-terminal verkürzte Arf1-Variante – Arf1N Δ 17 – als His-*getaggt*es Konstrukt in seiner GTP-gebundenen Form chemisch quervernetzt und kristallisiert. Aus der Kristallstruktur, die eine antiparallele Doppelhelix darstellt, ist zu schließen, dass die chemisch quervernetzte Form von His₆-Arf1N Δ 17 jedoch nicht das aktive Arf1-Dimer darstellt.

Da die Orientierung der amphiphilen N-terminalen α -Helix mit ihrem Myristoyl-Anker in der Membran möglicherweise eine Rolle für die Dimerisierung spielt, wurde versucht, myristoyliertes Vollängen-Arf1 in der GTP-gebundenen Form in Anwesenheit von Detergentien zu kristallisieren, was jedoch bisher erfolglos blieb. Hierzu konnte der Nukleotidaustausch an Mizellen aus Detergentien anstelle von liposomalen Membranen etabliert werden.

Abstract

Despite extensive biochemical analysis of the formation of COPI coated vesicles, which revealed amongst other things the minimal machinery of COPI-vesicles (the small GTPase nucleotide binding protein (GNBP) Arf1, the coat complex component and proteins of the p24-family) the mechanism of COPI-vesicle biogenesis is yet not fully understood.

The small GNBP Arf1 in its GDP-bound form binds to membranes via dimeric p24-proteins (Gommel *et al.*, 2001), where the GEF-mediated nucleotide exchange to GTP occurs. Exchanging GDP to GTP leads to conformational changes in Arf1, resulting in the exposure of its amphiphilic N-terminal α -helix with its myristoyl-anchor being inserted into the membrane (Antonny *et al.*, 1997; Franco *et al.*, 1996). Activated membrane-bound Arf1 dimerises, whereas a mutant of Arf1 – Arf1Y35A – is not able to dimerise and fails in generating free COPI vesicles (Beck *et al.*, 2008). However, it is still unknown, at which step dimerisation occurs and how the dimer-interface looks like.

The aim of this work was to elucidate the dimer-interface. First, a mutant with an aminoacid mutation in the putative dimer interface – Arf1Y35F – was generated and biochemically analysed. As it behaves like Arf1wt one can speculate that the bulky hydrophobic residue rather than the hydroxyl-group of Y35 is important for dimerisation. Secondly, to get insights into the dimer-interface, an N-terminal truncated version of Arf1 – Arf1N Δ 17 – was purified in its GTP-bound form, chemically dimerised and crystallised. Analysis of the crystal structure, which describes an antiparallel double-helix, revealed, that chemically crosslinked Arf1 does not reflect the active Arf1-dimer found on membranes.

As the N-terminus might play a role in dimerisation a third approach aimed at crystallising full length Arf1wt in its GTP-bound form in the presence of micelles, which did not succeed so far. The nucleotide exchange of GDP to GTP in Arf1 in the presence of micelles instead of membranes could be established.

Inhalt

1.	Einleitung	
1.1	Der sekretorische Weg	1
1.2	Der vesikuläre Transport	3
1.2.1	COPII-Vesikel	4
1.2.2	Clathrin-Vesikel	5
1.2.3	COPI-Vesikel	6
1.3	Komponenten und Biogenese von COPI-Vesikeln	7
1.3.1	Der Hüllprotein-Komplex Coatomer	7
1.3.2	Proteine der p24-Familie	8
1.3.3	ArfGAPs	8
1.3.4	ArfGEFs	9
1.3.5	Das kleine GNBPs Arf1	9
1.3.5.1	Die Familie der Arf-Proteine	10
1.3.5.2	Struktur von Arf1	11
1.3.5.3	Dimerisierung von Arf1	15
1.3.6	Biogenese von COPI-Vesikeln	17
1.4	Ziel der Arbeit	19
2.	Ergebnisse	21
2.1	Biochemische Charakterisierung der Arf1Y35F-Mutante	
2.1.1	Bindung an Membranen und Dimerisierung	23
2.1.2	Biogenese von COPI-Vesikeln	24
2.1.3	ArfGAP1-katalysierte GTP-Hydrolyse und Rekrutierung des Coatomer-komplexes	26
2.2	Einfluss der Myristoylierung und Dimerisierung von Arf1 auf die COPI-Vesikel-Biogenese	
2.2.1	Einfluss der Myristoylierung auf die COPI-Vesikelbiogenese	28
2.2.2	Rescue der COPI-Vesikelabschnürung durch chemische Quervernetzung von Arf1Y35A	29
2.3	Reinigung, Kristallisation und biochemische Charakterisierung von His ₆ -Arf1NΔ17	32

2.3.1	Reinigung und Kristallisation von His ₆ -Arf1NΔ17	32
2.3.2	Biochemische Charakterisierung von His ₆ -Arf1NΔ17	
2.3.2.1	Bindung an Membranen	40
2.3.2.2	Membranoberflächenaktivität	41
2.3.2.3	COPI-Vesikelbildung und Rekrutierung des Coatomerkomplexes	42
2.3.2.4	Coatomerrekrutierung und Thermolysinverdau	45
2.4	Reinigung von Vollängen-Arf1wt zur Kristallisation in Anwesenheit von Mizellen	47
3.	Diskussion	52
3.1	Bedeutung der Aminosäure Tyrosin35 für Arf1	52
3.2	Struktur des quervernetzten Arf1NΔ17	53
3.3	Einfluss des Myristoyl-Ankers und der Dimerisierung auf die Membranbindung von Arf1	59
3.4	Einfluss der Dimerisierung und der N-terminalen α-Helix auf die Membranoberflächenaktivität von Arf1	60
3.5	Bedeutung der Dimerisierung und der N-terminalen α-Helix von Arf1 für die Biogenese von COPI-Vesikeln	62
3.6	Bedeutung der N-terminalen α-Helix von Arf1 für die Rekrutierung des Coatomerkomplexes	63
3.7	Reinigung von Vollängen-Arf1wt zur Kristallisation in Anwesenheit von Mizellen	65
4.	Material und Methoden	
4.1	Material	69
4.1.1	Puffer, Lösungen und Medien	69
4.1.2	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	75
4.1.3	Enzyme, Protein- und DNA-Standards	76
4.1.4	Antikörper	76
4.1.5	Lipide	77

4.1.6	Nukleotide	77
4.2	Molekularbiologische Methoden	
4.2.1	Agarosegelelektrophorese	78
4.2.2	Polymerasekettenreaktion	78
4.2.3	Ortsspezifische Mutagenese	79
4.2.4	Restriktion und Ligation von DNA	80
4.2.5	Transformation von DNA	80
4.2.6	DNA-Sequenzierung	81
4.2.7	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien	81
4.3	Biochemische Methoden	
4.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassiefärbung	81
4.3.2	Western-Blot	82
4.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	83
4.3.4	Isolation des Coatomer-Komplexes aus Kaninchenleber	83
4.3.5	Reinigung von rekombinantem Coatomer	84
4.3.6	Expression und Reinigung von humanem, myristoylierten Arf1	
4.3.6.1	Expression von humanem, myristoylierten Arf1	85
4.3.6.2	Reinigung von humanem, myristoylierten Arf1	85
4.3.7	Expression und Reinigung von His ₆ -Arf1NΔ17	
4.3.7.1	Expression von His ₆ -Arf1NΔ17	87
4.3.7.2	Reinigung von His ₆ -Arf1NΔ17	88
4.3.7.3	Nukleotidaustausch	89
4.3.7.4	Analyse der Nukleotidbeladung von Arf1 mittels HPLC	89
4.3.7.5	Konzentrationsbestimmung mittels HPLC	90
4.3.7.6	Kristallisationsansätze	90
4.3.8	Synthese von p23-Lipopeptid	91
4.3.9	Herstellung von Liposomen	92
4.3.10	Analyse der Bindung und Dimerisierung von Arf1 an Membranen	
4.3.10.1	Analyse der Bindung an Membranen	93
4.3.10.2	Analyse der Dimerisierung von Arf1 an Membranen	93
4.3.11	Analyse der Membranoberflächenaktivität von Arf1	93
4.3.12	Anreicherung von COPI-Vesikeln	94
4.3.13	Limitierte Proteolyse	95

4.3.14	Elektronenmikroskopie	
4.3.14.1	Negativkontrastierung	95
4.3.14.2	Harzeinbettungs-Schnitte	96
4.3.15	Fluorimetrische Bestimmung des Nukleotidaustauschs von Arf1	96
4.3.16	Analyse der Coatomerrekrutierung mittels Lichtbrechung (SLS)	98
5.	Anhang	
5.1	Literatur	I
5.2	Abkürzungen	VII
5.3	Kristallisations- <i>Screens</i>	XI
5.4	Publikationen	LIV
	Danksagung	LIVI

1. Einleitung

1.1 Der sekretorische Weg

Eukaryontische Zellen besitzen neben der die Zelle umschließenden Plasmamembran intrazelluläre Membransysteme, die eine Kompartimentierung der Zelle bewirken. Die einzelnen Kompartimente zeichnen sich durch eine spezifische Lipid- und Proteinzusammensetzung aus, die es ihnen ermöglicht, ihre jeweiligen zellulären Aufgaben zu erfüllen. Zwischen den einzelnen Kompartimenten findet gerichteter regulierter Transport von Proteinen und Lipiden statt, der i. d. R. über vesikuläre Strukturen erfolgt.

Proteine, die über den sekretorischen Weg transportiert werden, besitzen N-terminal eine hydrophobe Signalsequenz, die vom cytosolischen *signal recognition particle* (SRP) gebunden wird, sobald die Aminosäurekette das Ribosom verlässt. Die Translation wird unterbrochen, und das SRP bindet an den ER-membranständigen SRP-Rezeptor, wodurch ein Kontakt zwischen Ribosom und dem Translokationskanalprotein, der ER-Translokase, vermittelt wird (Walter and Blobel, 1981). Nach GTP-Hydrolyse dissoziieren SRP und SRP-Rezeptor. Die Aminosäurekette wird co-translational ins ER-Lumen transloziert, wenn es sich um luminaire, für die Sekretion bestimmte oder lösliche Proteine, deren Zielorte andere Organellen sind, handelt oder in die Membran inseriert, wenn es sich um Transmembranproteine handelt (Deshaies *et al.*, 1991; Deshaies and Schekman, 1989). Im ER finden verschiedene post-translationale Modifikationen statt wie z. B. die N-Glykosylierung (Kornfeld und Kornfeld, 1985).

Außerdem dient das ER als Station der Qualitätskontrolle. So werden unvollständig gefaltete Proteine im ER-Lumen festgehalten, bis die korrekte Faltung, die von Chaperonen unterstützt wird, erreicht ist. Fehlgefaltete Proteine können von zwei voneinander unabhängigen Systemen, dem UPR- (*unfolded protein response*) oder dem ERAD-System (*ER associated degradation*) erkannt und über Translokatoren aus dem ER ausgeschleust werden (Friedlander *et al.*, 2000; Travers *et al.*, 2000). Im Cytosol werden sie dann nach Ubiquitinierung durch das Proteasom abgebaut.

Korrekt gefaltete Proteine werden durch Protein-ummantelte Vesikel (Barlowe *et al.*, 1994) in das ER-Golgi intermediäre Kompartiment (ERGIC: *ER Golgi intermediate compartment*) transportiert. Das ERGIC, das als eigenständiges Kompartiment angesehen wird, definiert sich durch das Vorhandensein bestimmter Markerproteine wie z. B. ERGIC53 (Hauri *et al.*, 2000). Es stellt eine Schnittstelle zwischen dem anterograden Transport sekretorischer Proteine zum Golgi-Apparat und dem retrograden Transport ER-residenter Proteine dar. So sind im ERGIC sowohl Proteine aus COPII-Vesikeln, die den anterograden Transport zum Golgi vermitteln, als auch Proteine der COPI-Vesikel, die unter anderem Proteine zurück zum ER transportieren (Letourneur *et al.*, 1994), nachzuweisen. Noch ungeklärt ist, ob das ERGIC durch Homofusion von COPII-Vesikeln oder durch Heterofusion von Vesikeln mit einem bestehenden Kompartiment entsteht (Bannykh und Balch, 1998; Martinez-Menarguez *et al.*, 1999).

Im folgenden Kompartiment, dem Golgi-Apparat, findet die Sortierung von Proteinen statt (Rothman, 1981). Er besteht aus Stapeln von Membransegmenten, die als Zisternen bezeichnet werden und in Subkompartimente unterteilt werden können. So erreichen sekretorische und Membranproteine den Golgi über das *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN) von wo aus sie über die *cis*-Golgi-Zisternen, die medialen und die *trans*-Golgi-Zisternen zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert werden (Rothman und Wieland, 1996). Die einzelnen Subkompartimente weisen eine charakteristische Protein- und Lipidzusammensetzung auf, wodurch die post-translationalen Modifikationen wie z. B. Glykosylierungen räumlich reguliert werden (Rothman und Wieland, 1996).

Der Transport innerhalb des Golgi-Apparates ist noch nicht geklärt; bisher gibt es mit dem Modell der Zisternen-Reifung, dem Modell des vesikulären Transports und dem Zisternen-Vorläufer-Modell drei Modelle, wobei das dritte Modell die ersten beiden zu kombinieren versucht.

Bei dem Modell der Zisternen-Reifung wird angenommen, dass die Zisternen des Golgi im *cis*-Golgi *de novo* aus ERGIC-Clustern und COPI-Vesikeln gebildet werden (Glick und Malhotra, 1998). Dabei bleiben die Cargo-Proteine im Lumen der Zisternen, während Golgi-residente Proteine retrograd vesikulär transportiert werden (Glick und Malhotra, 1998).

Das Vesikel-Modell dagegen beschreibt den retrograden und anterograden Transport innerhalb des Golgi-Apparates durch die koordinierte Abschnürung und Fusion von

COPI-Vesikeln mit stabilen Zisternen, wobei die Cargo-Proteine vesikulär transportiert werden (Rothman and Wieland, 1996).

Hier würden mindestens zwei Populationen von COPI-Vesikeln notwendig sein, um zwischen retrogradem und anterogradem Transport unterscheiden zu können. Da sowohl Golgi-residente als auch sekretorische Cargo-Proteine in COPI-Vesikeln gefunden wurden (Lanoix *et al.*, 1999; Orci *et al.*, 2000), ist bis heute nicht eindeutig geklärt, welches Modell zutreffend ist.

Das dritte Modell, das Modell des "Zisternen-Vorläufers", versucht, die anderen beiden Modelle zu kombinieren, indem zwar von stabilen Zisternen und Membranstapeln ausgegangen wird, deren Teilbereiche jedoch innerhalb eines Subkompartiments miteinander fusionieren und voneinander abgeschnürt werden können; beide Prozesse werden von Rab-Proteinen reguliert (Pfeffer, 2010). Der Transport vom TGN zu den Zielorten der verschiedenen Proteine erfolgt vesikulär.

1.2 Der vesikuläre Transport

Der Transport von Proteinen entlang des sekretorischen Weges erfolgt über vesikuläre Strukturen. Allen Vesikeln gemein ist, dass es sich um proteinumhüllte Membranstrukturen eines Durchmessers von 60 – 100 nm handelt, wobei die Art des Proteinmantels den Vesikeltyp definiert. In Abb. 1.1 ist der sekretorische Weg mit den spezifischen Aufgaben der einzelnen Vesikeltypen dargestellt.

Reguliert wird die Vesikelbiogenese durch kleine Guaninnukleotid-bindende Proteine (GNBP) der Ras-Superfamilie, die als molekulare Schalter dienen und als solche in einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vorliegen können. Vesikelknospen bilden sich durch die Polymerisation der für den jeweiligen Vesikeltyp spezifischen Hüllproteine. Nach Abschnüren der Vesikel von der Donormembran und Transport zur Zielmembran muss die Proteinhülle dissoziieren. Daraufhin kann die SNARE-*(soluble NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) attachment protein receptors)* vermittelte Fusion der Vesikel mit der Zielmembran erfolgen (Rothman and Warren, 1994). Hierbei wird die Membranfusion durch Bildung eines Bündels aus vier α -Helices der SNARE-Proteine (eine α -Helix aus dem vesikulären v-SNARE, die anderen drei aus den t-SNAREs der Zielmembran) erleichtert (Rothman and Warren, 1994; Sollner *et al.*, 1993). Zudem

wird die Membranfusion zum einen durch Proteine der Rab-Familie und zum anderen durch sog. *tether*-Proteine, zu denen am Golgi-Apparat die Golgine gehören, reguliert (Cai *et al.*, 2007).

Bisher sind drei Vesikeltypen biochemisch charakterisiert, die im Folgenden beschrieben werden: COPI-, COPII- und Clathrin-Vesikel.

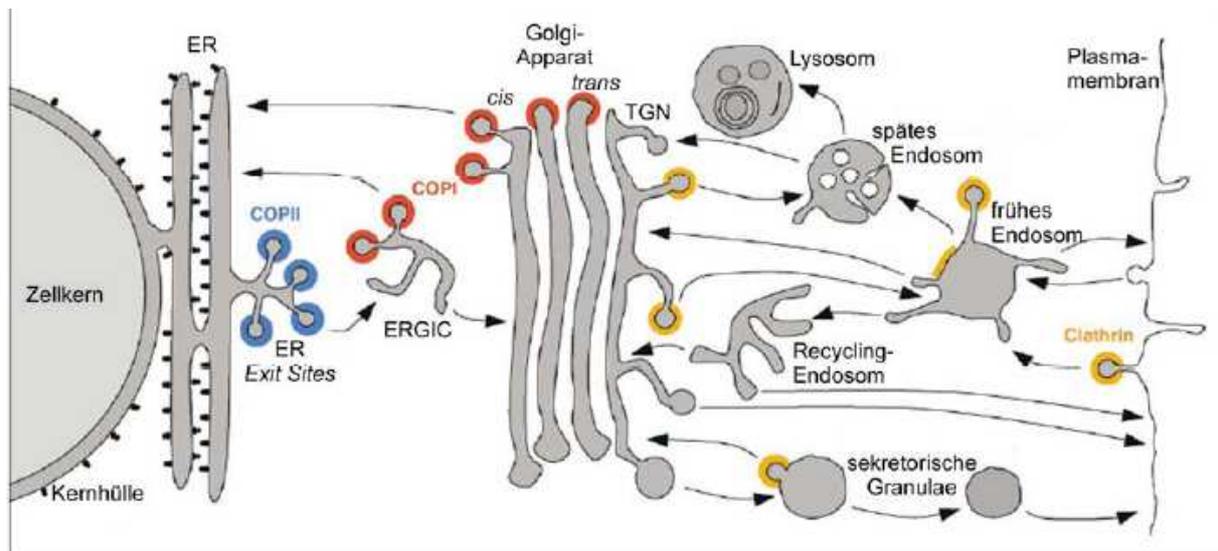


Abb. 1.1: Schematische Übersicht der sekretorischen, lysosomalen und endocytotischen Transportwege

Der COPII-vermittelte Transport ist in blau, der COPI-vermittelte Transport in rot und der Clathrin-vermittelte Transport in gelb dargestellt. Die Pfeile geben die Richtung des Transports an. mod. nach: Bonifacino und Glick, 2004

1.2.1 COPII-Vesikel

COPII-Vesikel vermitteln den anterograden Transport vom ER zum ERGIC oder CGN (Barlowe *et al.*, 1994). Dabei bilden sich COPII-Vesikel an bestimmten Stellen des ER, den sog. ER *exit sites*. Die Proteinhülle von COPII-Vesikeln besteht aus dem kleinen GNBP Sar1, das zur Familie der Arf-Proteine gehört, dem dimeren Sec23/Sec24-Komplex und dem als Heterotetramer vorliegenden Sec13/Sec31-Komplex.

Aktiviert wird Sar1 durch den an der ER-Membran lokalisierten Austauschfaktor Sec12 (Barlowe and Schekman, 1993). Der Nukleotidaustausch von GDP zu GTP an Sar1 führt zum Ausklappen von dessen 23 Aminosäuren langer N-terminaler amphiphiler α -Helix, was zur Membranverankerung von Sar1 führt (Barlowe *et al.*, 1993). Aktiviertes Sar1 rekrutiert die Proteine der inneren Hülle, Sec23 und Sec24,

die als heterodimerer Komplex in der Zelle vorliegen, über eine direkte Interaktion mit Sec23 (Matsuoka *et al.*, 1998).

Sec24 erkennt und bindet Cargo-Proteine über spezifische ER-Export-Signale, zu denen neben einem diacidischen (D/ExD/E) auch hydrophobe Motive (FF, YY) gehören, wie sie in den cytoplasmatischen Domänen der p24-Proteine zu finden sind (Fiedler *et al.*, 1996). Außerdem können Cargo-Moleküle über die Interaktion mit bestimmten in der Membran verankerten Cargo-Rezeptoren in COPII-Vesikel inkorporiert werden (Belden and Barlowe, 2001).

In einem weiteren Schritt werden dann die Proteine der äußeren Hülle, Sec13 und Sec31 als Heterotetramer rekrutiert, wobei Sec31 direkt mit Sec23 und Sar1 interagiert (Bi *et al.*, 2007). Die Polymerisation von Sec13/Sec31 führt dann zur Bildung und Ablösung eines COPII-Vesikels. Die GTP-Hydrolyse, die zur Ablösung des Proteinmantels notwendig ist, wird durch Sec23, das als GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Sar1 dient, stimuliert. Die vollständige GAP-Aktivität erreicht Sec23 erst nach Binden des Sec13/Sec31-Komplexes (Antonny *et al.*, 2001).

Neben der Membranoberflächenaktivität von Sar1 tragen auch die Hüllproteine zur Deformation der Membran und damit der Bildung einer Vesikelknospe bei (Lee *et al.*, 2005).

1.2.2 Clathrin-Vesikel

Clathrin-Vesikel vermitteln neben der Endocytose den Transport zwischen TGN, Lysosomen, Endosomen und der Plasmamembran (Pearse and Robinson, 1990). Die äußere Hülle der Clathrin-Vesikel besteht aus Clathrin, das ein Triskelion aus je drei schweren (190 kDa) und drei leichten (25 kDa) Ketten bildet (zusammengefasst in (Kirchhausen, 2000)). Aufgrund der Polymerisation der Clathrin-Triskelia entsteht eine käfigartige Struktur, die an einen Fußball erinnert (Kirchhausen, 2000). Diese Struktur kann Clathrin auch ohne Beteiligung der inneren Hüllkomponenten bilden (Crowther and Pearse, 1981).

Die innere Hülle wird durch die Adaptorproteinkomplexe (AP) gebildet, welche die Cargo-Erkennung und -Rekrutierung vermitteln. AP liegen als Heterotetramere aus zwei großen Untereinheiten (je ca. 110-130 kDa), einer mittleren (ca. 50 kDa) und einer kleinen Untereinheit (15-20 kDa) vor. Neben der Rekrutierung von Cargo-Molekülen dienen sie als Adaptoren der Membranassoziation von Clathrin, indem sie

gleichzeitig mit Clathrin und den Phospholipiden der Membran interagieren (zusammengefasst in (Owen *et al.*, 2004)).

Es existieren vier verschiedene Adaptorkomplexe (AP1-4), die in unterschiedliche Transportwege involviert sind. So vermitteln Clathrin-Vesikel, die AP1 enthalten, den Transport vom TGN zu Endosomen, während AP3-Vesikel den Transport zu Lysosomen vermitteln (zusammengefasst in (Spang, 2008)). AP4 scheint am basolateralen Transport in Epithelzellen beteiligt zu sein (Simmen *et al.*, 2002). Das für die Vesikelbildung mit den Adaptorkomplexen AP1, AP3 und AP4 notwendige kleine GNBPs ist Arf1 (zusammengefasst in (Spang, 2008)).

AP2-Vesikel, in denen Arf6 als kleines GNBPs involviert ist, vermitteln die Endocytose an der Plasmamembran (Boehm and Bonifacino, 2001).

1.2.3 COPI-Vesikel

COPI-Vesikel sind in den retrograden Transport vom CGN zum ER (Nickel *et al.*, 1998; Orci *et al.*, 1986) und den bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparats involviert (Orci *et al.*, 1997).

In vitro können COPI-Vesikel aus Golgi-Membranen, dem kleinen GNBPs Arf1 und dem Hüllproteinkomplex Coatomer unter GTP γ S-Bedingungen rekonstituiert werden (Ostermann *et al.*, 1993). Werden statt Golgi-Membranen Liposomen verwendet, müssen diese negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin oder Phosphatidsäure in nicht-physiologischen Konzentrationen (15 mol%) enthalten, um die Bildung von COPI-Vesikeln zu ermöglichen (Spang *et al.*, 1998). Dagegen ist die COPI-Vesikelbiogenese in einem liposomalen System unabhängig von der Lipidzusammensetzung, wenn den Liposomen ein Lipopeptid, das die cytosolische Domäne des p23-Proteins enthält, zugesetzt wurde (Bremser *et al.*, 1999).

Der Coatomerkomplex wird im Gegensatz zu den Hüllproteinen der COPII- und Clathrin-Vesikel *en bloc* rekrutiert (Hara-Kuge *et al.*, 1994). *In vitro* ist es möglich, Coatomer in einen trimeren (α -, β' -, ϵ -COP) und einen tetrameren (β -, γ -, δ -, ζ -COP) Subkomplex zu dissoziieren (Sahlmüller *et al.*, 2011), wobei der tetramere Subkomplex strukturell den AP-Komplexen im Clathrin-System ähnlich sein könnte, wie Sequenz- und Strukturvergleiche zeigten (Serafini *et al.*, 1991b; Watson *et al.*, 2004). Strukturdaten von Teilen des trimeren Subkomplexes legen eine strukturelle

Verwandtschaft zu Clathrin und dem Sec13/31-Komplex nahe (Lee and Goldberg, 2010).

Die Aktivierung und Inaktivierung von Arf1 erfolgt durch den Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) GBF1 (*Golgi-specific Brefeldin A-resistant Factor 1*) (Claude *et al.*, 1999) bzw. ArfGAPs (Randazzo and Hirsch, 2004).

In den folgenden Abschnitten werden die beteiligten Komponenten und der Prozess der COPI-Vesikelbiogenese beschrieben.

1.3. Komponenten und Biogenese von COPI-Vesikeln

1.3.1 Der Hüllprotein-Komplex Coatomer

Coatomer ist ein heptamerer Proteinkomplex einer Größe von ca. 550 kDa, der sich aus folgenden Untereinheiten zusammensetzt: α -COP (140 kDa), β -COP (107 kDa), β' -COP (102 kDa), γ -COP (97 kDa), δ -COP (57 kDa), ϵ -COP (35 kDa) und ζ -COP (24 kDa bzw. 20 kDa). γ -COP und ζ -COP existieren in je zwei Isoformen (γ_1 , γ_2 , ζ_1 , ζ_2), sodass sich vier verschiedene Isotypen von COPI-Vesikeln bilden können.

γ_1 -COP und γ_2 -COP sind zu 80 % identisch; der Unterschied zwischen ζ_1 -COP und ζ_2 -COP, die zu 75 % identisch sind, liegt vor allem im N-Terminus, der bei ζ_2 um ca. 30 Aminosäuren länger ist (Wegmann *et al.*, 2004).

Die vier verschiedenen Isoformen sind in Abb. 1.2 schematisch dargestellt.

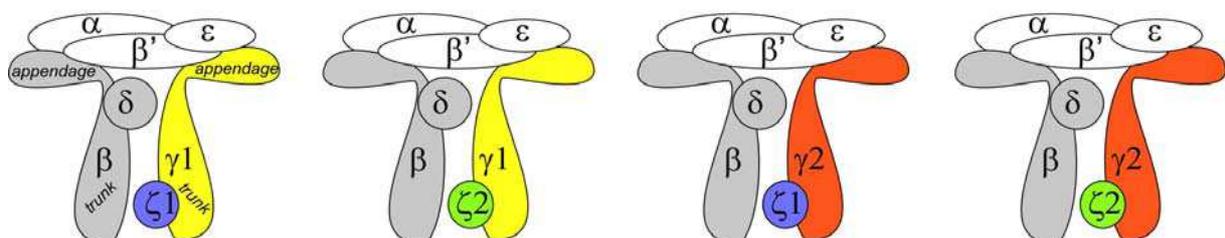


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der vier Isoformen von Coatomer

Zwei der sieben Untereinheiten des Coatomerkomplexes existieren als zwei verschiedene Isoformen: γ_1 und γ_2 sowie ζ_1 und ζ_2 . Damit ergeben sich vier verschiedene Isoformen von Coatomer
Abb.: C. Weimer; mod. nach Dissertation J. Mölleken

Die Analyse der Verteilung der Isoformen *in vivo* ergab, dass die $\gamma_1\zeta_1$ -Isoform mit 55 % den größten Anteil darstellt, gefolgt von der $\gamma_2\zeta_1$ -Isoform mit 25 % und der $\gamma_1\zeta_2$ -

Isoform mit 15 % (Moelleken *et al.*, 2007). Die $\gamma_2\zeta_2$ -Isoform ist mit 5 % am geringsten in der Zelle vertreten. Während γ_1 -COP und ζ_2 -COP hauptsächlich am *cis*-Golgi lokalisiert sind, ist γ_2 -COP vor allem am *trans*-Golgi zu finden (Moelleken *et al.*, 2007). Die divergierende quantitative und räumliche Verteilung der Coatomer-Isoformen legt distinkte Funktionen unterschiedlicher COPI-Vesikel ähnlich denen der Adaptorkomplexe im Clathrin-System nahe. Bisher konnten jedoch keine Spezifitäten einzelner COPI-Vesikel für bestimmte Transportwege oder Cargo-Moleküle ermittelt werden.

In vitro können COPI-Vesikel mit jeder der vier Isoformen generiert werden (Sahlmuller *et al.*, 2011).

1.3.2 Proteine der p24-Familie

Proteine der p24-Familie gehören zu den Typ1-Transmembranproteinen. In Säugern wurden sechs p24-Proteine identifiziert: p23, p24, p25, p26, p27 und tp24. Sie sind sowohl Bestandteile der COPI- als auch der COPII-Vesikel (Sohn *et al.*, 1996; Stamnes *et al.*, 1995) und zirkulieren im frühen sekretorischen Weg (Nickel *et al.*, 1997). Ihr Aufbau gliedert sich in eine große N-terminale luminaire Domäne mit einer konservierten *coiled-coil*-Region, die wahrscheinlich die Oligomerisierung dieser Proteine vermittelt, eine Transmembrandomäne und eine kurze C-terminale cytosolische Domäne, die ein di-Phenylalanin-Motiv und ein dibasisches Motiv besitzt (Bethune *et al.*, 2006; Sohn *et al.*, 1996). In dimerer Form binden sie Arf1 (Gommel *et al.*, 2001) und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der COPI-Vesikelbildung. Außerdem interagieren p23 und p24 als Dimere mit Coatomer (Bethune *et al.*, 2006), was zu einer Konformationsänderung von γ -COP führt, die spezifisch für die Interaktion von Coatomer mit Proteinen der p24-Familie ist (Reinhard *et al.*, 1999).

1.3.3 ArfGAPs

In *homo sapiens* wurden bisher 31 ArfGAPs identifiziert, die sich in neun Gruppen unterteilen lassen, wovon nur die ArfGAPs 1-3 am Golgi lokalisiert sind (Donaldson and Jackson, 2011).

Konserviert ist in allen ArfGAPs die ca. 130 Aminosäuren umfassende katalytische GAP-Domäne, die ein Zinkfingermotiv beinhaltet (Cukierman *et al.*, 1995; Donaldson

and Jackson, 2011), das jedoch eher eine strukturelle als katalytische Rolle spielt (Goldberg, 1999).

ArfGAP1 besitzt zwei in Lösung unstrukturierte ALPS-Motive (*ArfGAP1 lipid packing sensor*), die gekrümmte Membranen erkennen und an diese binden können, wobei sie amphiphile α -Helices ausbilden (Bigay *et al.*, 2005; Bigay *et al.*, 2003). Die Aktivität von ArfGAP1 ist an gekrümmten Membranen deutlich höher als an flachen Membranen (Bigay *et al.*, 2005)

Die beiden ArfGAPs 2 und 3 interagieren nicht direkt mit Membranen, sondern werden indirekt über ihre Interaktion mit Coatomer zur Membran rekrutiert (Frigerio *et al.*, 2007). In Anwesenheit von Coatomer weisen ArfGAP2 und ArfGAP3 eine deutlich höhere GAP-Aktivität auf als ArfGAP1 (Weimer *et al.*, 2008).

Eine weitere wichtige Rolle spielen die ArfGAPs bei der Aufnahme von Cargo-Molekülen in COPI-Vesikel (Malsam *et al.*, 1999; Nickel *et al.*, 1998)

1.3.4 ArfGEFs

In Säugern sind 15 ArfGEFs bekannt, welche nur die ca. 200 Aminosäuren umfassende katalytische Domäne, die Sec7-Domäne, gemeinsam haben (Jackson and Casanova, 2000). Einige, wie z. B. das Cytohesin ARNO, besitzen eine PH-Domäne, die in einer autoinhibierten Konformation vorliegt (DiNitto *et al.*, 2007). Die Interaktion der PH-Domäne mit den Membranlipiden PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ und gleichzeitig mit aktiviertem Arf6 oder Arl4 an der Plasmamembran führen zur Aufhebung der Autoinhibition. Membrangebundenes ARNO kann dann den Nukleotid austausch an Arf6*GDP oder Arf1*GDP vermitteln (Stalder *et al.*, 2011). Dies ist ein Beispiel für die räumlich sehr präzise regulierte ArfGEF-Aktivität.

Die Aktivierung von Arf1 am Golgi erfolgt durch GBF1, das wahrscheinlich durch eine Interaktion mit Rab1 am *cis*-Golgi lokalisiert ist (Zhao *et al.*, 2002), (Monetta *et al.*, 2007). GBF1 interagiert ebenfalls mit Arf4 (Szul *et al.*, 2007).

1.3.5 Das kleine GNBPs Arf1

Das an der Biogenese von COPI-Vesikeln beteiligte kleine GNBPs ist Arf1 (Serafini *et al.*, 1991a).

Arf-Proteine gehören zur Superfamilie der Ras-Proteine, die sich in die Familien der Ras-, Rho-, Arf-, Rab-, Ran-, Rit-, Rad- und Rag-Proteine unterteilt (Boguski and McCormick, 1993). Allen gemeinsam ist, dass sie in der Zelle als molekulare Schalter

dienen. Das bedeutet, dass die Proteine zwischen zwei verschiedenen Konformationen wechseln können, die einer aktiven – der GTP-gebundenen – und einer inaktiven – der GDP-gebundenen Form – entsprechen (Vetter and Wittinghofer, 2001; Wittinghofer et al., 1993).

1.3.5.1 Die Familie der Arf-Proteine

Neben den Arf-Proteinen, von denen in Säugern sechs bekannt sind, gehören zur Familie der Arf-Proteine auch die Arl-(*Arf-like*)-Proteine und Sar (*secretion associated Ras related*)-Proteine. Während Sar1 das kleine GNBPs der COPII-Vesikel ist (Barlowe et al., 1993), sind die Funktionen der Arl-Proteine noch nicht vollständig geklärt.

Arf-Proteine sind hochkonserviert. Allen gemein ist die amphiphile N-terminale α -Helix, die posttranslational myristoyliert wird (Antonny et al., 1997).

Damit unterscheiden sie sich von den anderen kleinen GNBPs der Ras-Superfamilie, die in der Regel C-terminale Lipidmodifikationen tragen. Sar1 und die meisten Arl-Proteine werden dagegen nicht myristoyliert (Donaldson and Jackson, 2011).

Die sechs Arf-Proteine werden basierend auf ihrer sequentiellen Identität in drei Klassen unterteilt: Zur Klasse I gehören die Proteine Arf1-Arf3, zur Klasse II Arf4 und Arf5 und Arf6 bildet allein die Klasse III (Donaldson and Jackson, 2011). Die Proteine der Klasse I in *homo sapiens* (Arf1, Arf3) bestehen aus 181 Aminosäuren und sind bis auf sieben Aminosäuren identisch. Sie aktivieren lipidmodifizierende Enzyme wie z. B. die Phospholipase D und sind in den vesikulären Transport involviert (Donaldson and Honda, 2005).

Die Funktionen von Arf4 und Arf5 sind noch nicht umfassend analysiert; es ist jedoch anzunehmen, dass Arf5 am Transport innerhalb des Golgi-Apparats zum TGN beteiligt ist (Claude et al., 1999). Arf4, das ebenso wie Arf1 am *cis*-Golgi lokalisiert ist, kann bei *knockdown* von Arf1 dessen Funktionen übernehmen (Volpicelli-Daley et al., 2005). Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen Arf1 und Arf4 finden sich vor allem in der α 3-Helix. Über diese wird Arf4 in den Stäbchen-Zellen der Retina von Rhodopsin rekrutiert (Mazelova et al., 2009).

Arf6, das mit 175 Aminosäuren etwas kürzer ist als die anderen Arf-Proteine, ist primär an der Plasmamembran lokalisiert und reguliert als kleines GNBPs der AP2-Vesikel die Endocytose sowie die Actinpolymerisation über die Rekrutierung von Proteinen der Rho-Familie (Donaldson and Honda, 2005). Außerdem ist es in den

Transport von der Plasmamembran zu den Endosomen involviert (Donaldson, 2003). Neue Studien zeigen, dass Arf6 in seiner aktivierten Form mit dem Arf-GEF ARNO (*Arf nucleotide binding site opener*) interagiert, welches nach Bindung von Arf6*GTP deutlich effizienter den Austausch von GDP zu GTP an Arf1 katalysiert (Stalder *et al.*, 2011).

1.3.5.2 Struktur von Arf1

Strukturell charakteristisch für die kleinen GNBPs ist die G-Domäne, die in Abhängigkeit von der Präsenz von Magnesium-Ionen Guaninnukleotide bindet und GTP hydrolysieren kann. Sie besteht aus sechs β -Strängen und fünf α -Helices, die fünf konservierte Bereiche, die als G1-G5 bezeichnet werden, enthalten. Die Konformationsänderungen bei Umschaltung vom inaktivierten in den aktivierten Zustand oder umgekehrt treten v. a. in drei konservierten Bereichen auf:

1. dem G1-Motiv – auch P-Schleife genannt – mit der Konsensussequenz GxxxGKS/T, das mit der α - und der β -Phosphatgruppe interagiert und das im aktiven Zentrum lokalisierte Magnesium-Ion koordiniert,
2. dem sog. *switch* I (G2-Motiv), in dem ein T-Rest konserviert ist,
3. dem als *switch* II bezeichneten G3-Motiv mit dem Konsensusmotiv DxxG.

Die Kristallstruktur von aktivem Volllängen-Arf1 konnte bisher nicht aufgeklärt werden, weil Arf-Proteine in GTP-gebundener Form nicht löslich sind.

Die Kristallstruktur von Volllängen-Arf1 in der GDP-gebundenen Form (Amor *et al.*, 1994) unterscheidet sich deutlich von der GDP-gebundenen Struktur von Ras (Goldberg, 1998). So bilden die Aminosäuren 41 bis 47 in Arf-Proteinen in der GDP-gebundenen Form einen siebten β -Strang (Amor *et al.*, 1994), der in anderen GNBPs der Ras-Superfamilie nicht zu finden ist (Amor *et al.*, 1994), (Goldberg, 1998).

Die Kristallstruktur einer N-Terminal verkürzten Variante des aktiven Arf1 (Arf1N Δ 17), die 1998 von J. Goldberg gelöst wurde, zeigt dagegen eine hohe Ähnlichkeit mit der Struktur von GTP-gebundenem Ras, wie Abb. 1.3 zu entnehmen ist (Goldberg, 1998).

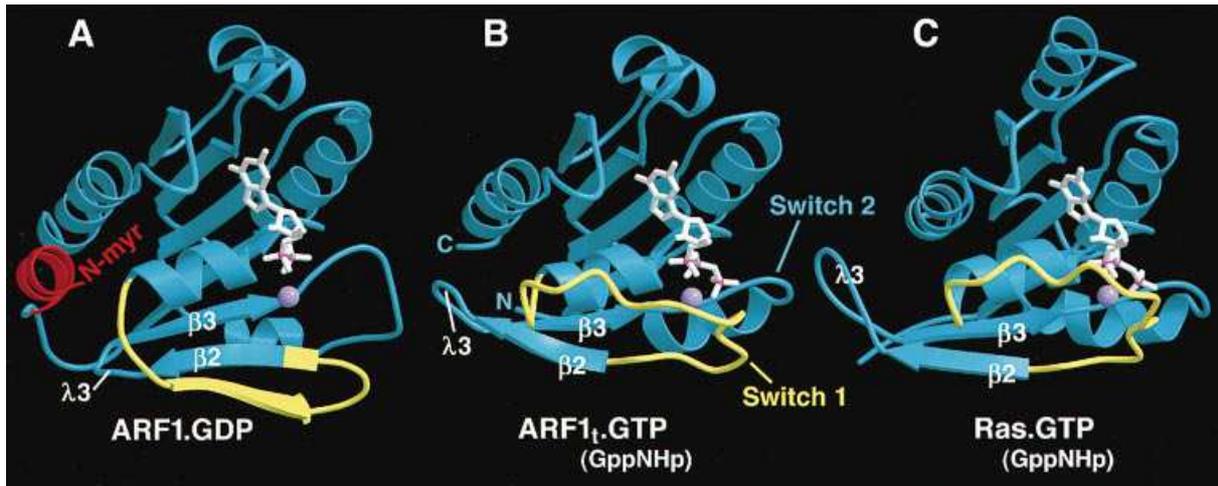


Abb. 1.3: Struktur von Arf1

A: Volllängen-Arf1*GDP (Amor *et al.*, 1994)

B: Arf1NΔ17*GppNHp (Goldberg, 1998)

C: H-Ras*GppNHp (Pai *et al.*, 1989)

rot: N-terminale α -Helix von Arf1; weiß: Nukleotid; grau: Mg^{2+} ; gelb: Region, die im GppNHp-gebundenen Zustand zwischen Arf1 und H-Ras sehr ähnlich ist und eine Schleife bildet. Diese Region (Aminosäuren 37 – 53 in Arf1 und 23 – 39 in H-Ras) schließt den *switch* I ein. In der GDP-gebundenen Form von Arf1 bildet dieser Bereich einen β -Strang, der einzigartig für Proteine der Arf-Familie ist

Abb. aus: (Goldberg, 1998)

Im GTP-gebundenen Zustand koordinieren sowohl in Ras als auch in Arf1 *switch* I und II die γ -Phosphatgruppe des GTP-Moleküls vor allem über Wasserstoffbrücken zwischen dem in *switch* I konservierten Threonin (T35 in Ras, T48 in Arf1) und dem in *switch* II konservierten Glycin (G60 in Ras, G70 in Arf1) (Vetter and Wittinghofer, 2001), (Goldberg, 1998). Ein sich direkt neben dem konservierten Glycin befindendes Glutamin (Q61 in Ras, Q71 in Arf1) ist ebenfalls hochkonserviert und koordiniert zusammen mit einem konservierten Aspartat (D57 in Ras, D67 in Arf1) das bei der Hydrolyse nukleophil angreifende Wassermolekül (Vetter and Wittinghofer, 2001), (Goldberg, 1998). Damit nimmt die Struktur des GppNHp-gebundenen Arf1 die Topologie des aktiven Ras ein (Goldberg, 1998).

Der Vergleich der GDP- und GppNHp-gebundenen Struktur von Arf1 zeigt auch, dass der Nukleotidaustausch nur zu marginalen strukturellen Veränderungen in der P-Schleife, welche die α - und β -Phosphatgruppe koordiniert, führt.

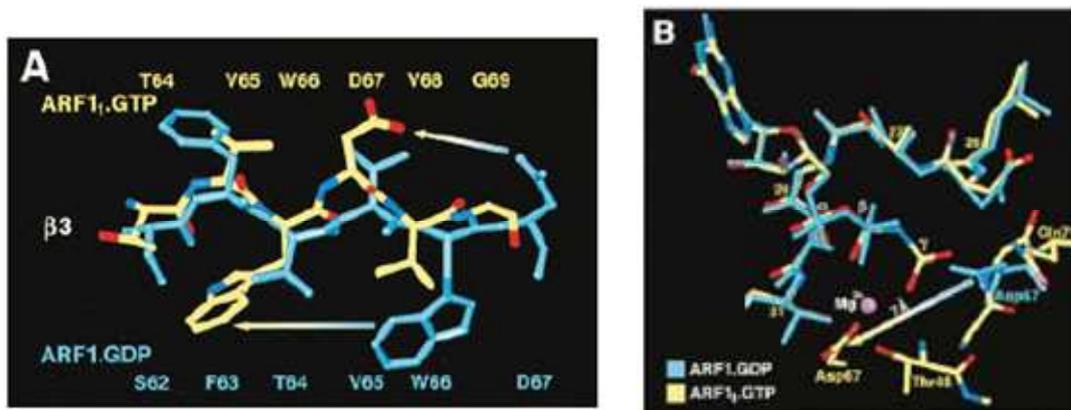


Abb. 1.4: Struktur von Arf1

A: Überlagerung der Strukturen von Arf1*GDP (blau) und Arf1*GppNHp (gelb; hier als Arf*GTP bezeichnet) im Bereich des β 3-Strangs, der zum *Interswitch*-Bereich gehört. Die Pfeile zeigen die Verschiebung um zwei Aminosäuren bei Austausch zu GTP.

B: Überlagerung der Strukturen des aktiven Zentrums von Arf1*GDP (blau) und Arf1*GppNHp.

Während die Aminosäuren der P-Schleife (hier gezeigt: L25-T31) in beiden Strukturen eine sehr ähnliche Konformation aufweisen, sind die Aminosäuren des β 3-Strangs um zwei Aminosäuren verschoben (s. auch A).

Abb. aus: (Goldberg, 1998)

Doch tritt bei Proteinen der Arf-Familie neben diesen innerhalb der Ras-Superfamilie konservierten Konformationsänderungen noch eine weitere auf, die auf den im Vergleich zu anderen Proteinen der Ras-Superfamilie um drei bis fünf Aminosäuren kürzeren *Interswitch*-Bereich zurückzuführen ist (Pasqualato *et al.*, 2002). Dieser setzt sich aus β 2, einer Schleife und β 3 zusammen.

Im GDP-gebundenen Zustand dient das konservierte W78 als aromatischer Keil, der die *Interswitch*-Region und den *switch* II in einer Konformation hält, welche die Koordination von GTP durch G70 und D67 verhindert (Pasqualato *et al.*, 2002). Dies ermöglicht, dass sich die N-terminale α -Helix wie eine Art Überwurf über den Kern des Proteins legen kann. Hierbei interagieren wahrscheinlich die Aminosäuren Y58, N60, I61 und F63 aus Schleife 3 mit der N-terminalen α -Helix (Amor *et al.*, 1994), was zur Bildung einer hydrophoben Tasche für den Myristoyl-Rest führt (Goldberg, 1998), (Pasqualato *et al.*, 2002).

Der Nukleotidaustausch zu GTP bewirkt, dass der *Interswitch*-Bereich um zwei Aminosäuren (7-8 Å) nach oben geschoben wird (Goldberg, 1998), wobei er *switch* I und *switch* II "mitzieht" (Pasqualato *et al.*, 2002). Das hat zur Folge, dass die N-terminale α -Helix von Arf1 ausgeklappt werden muss, was zur Exposition des Myristoyl-Ankers führt. Diese Konformationsänderung, die mit der N-terminalen α -Helix einen Bereich involviert, der deutlich entfernt ist von der Nukleotidbindestelle,

ist spezifisch für Arf-Proteine und in Abb. 1.5 am Beispiel von Arf6 gezeigt (Pasqualato *et al.*, 2002). Da die Solvens-Exposition der amphiphilen N-terminalen α -Helix mit ihrem Myristoyl-Rest energetisch ungünstig ist, tritt der Austausch von GDP zu GTP an Arf-Proteinen nur an Membranen auf. So kann eine "Fehlaktivierung" von cytosolischem Arf verhindert werden.

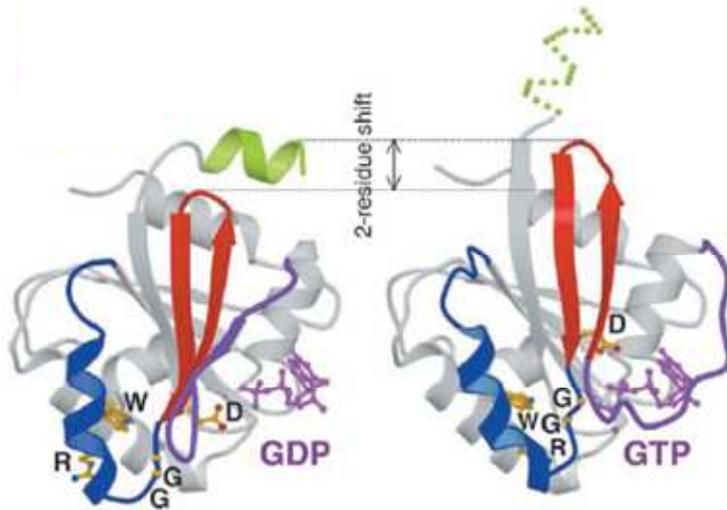


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Arf-spezifischen Konformationsänderungen im Interswitch-Bereich

Austausch von GDP zu GTP führt in Arf-Proteinen nicht nur zu den konservierten Konformationsänderungen in *switch I* (Aminosäuren 45-54; violett) und *switch II* (Aminosäuren 71-80; blau), sondern auch zu einer Arf-spezifischen Konformationsänderung im *Interswitch*-Bereich (rot), der Auswirkungen auf die N-terminale α -Helix hat. Der *Interswitch*-Bereich wird um 2 Aminosäuren nach oben geschoben. Das hat zur Folge, dass die amphiphile N-terminale α -Helix (grün) ausgeklappt werden muss, weil es sonst zu sterischen Kollisionen mit dem *Interswitch* käme. Damit wird auch der kovalent an Glycin2 gebundene Myristoyl-Anker Solvens exponiert.

Abb. aus Pasqualato *et al.*, EMBO reports, 2002

Die Kristallstruktur der N-terminal verkürzten Arf1-Variante ArfN Δ 17 kann jedoch keine Informationen über die Orientierung des N-Terminus mit seinem Myristoyl-Anker liefern, was für den Mechanismus der Membranassoziation sehr wertvoll wäre. Aus Studien zur Interaktion der amphiphilen N-terminalen α -Helix mit Membranen ist bekannt, dass sie über ihre hydrophoben Reste (Ile4, Phe5, Leu8, Phe9) mit Membranlipiden interagiert (Antonny *et al.*, 1997; Krauss *et al.*, 2008). Daher wurde angenommen, dass sie parallel zur Membran orientiert ist, während der an G2 gebundene Myristoyl-Anker orthogonal zur Helix in die Membran inseriert (Harroun *et al.*, 2005).

Liu *et al.* konnten 2010 Arf1*GTP aus Hefe an Bizellen mittels NMR (*nuclear magnetic resonance*) strukturell untersuchen (Liu *et al.*, 2010). Die Auswertung der

NMR-Signale ergab, dass der Myristoyl-Anker weniger mit Membranlipiden, sondern eher mit Aminosäuren des N-Terminus interagiert. Darauf postulierten Liu *et al.*, dass der Myristoyl-Rest partiell rückfaltet und damit parallel zur N-terminalen α -Helix auf der Membran liegt (Liu *et al.*, 2010). Dieses Modell würde jedoch kaum die Membranoberflächenaktivität von Arf1 (Beck *et al.*, 2008) erklären. Möglicherweise ist diese "rückgefaltete" Position des Myristoyl-Restes aber auch auf die hohe Membrankurvatur der Bizellen zurückzuführen, die bewirkt, dass die äußere Lipidschicht nicht so dicht gepackt ist wie die innere, was durch den Myristoyl-Anker ausgefüllt wird. *In vivo* ist solch eine starke Krümmung der Membran nicht vorzufinden, sodass es sich um eine artifizielle Konformation von Arf1 handeln könnte.

1.3.5.3 Dimerisierung von Arf1

Studien von Dr. Zhe Sun und Dr. Rainer Beck, in denen membrangebundenes Arf mit einem homobifunktionalen thiol-spezifischen Quervernetzer kovalent verknüpft werden konnte, lieferten den Hinweis, dass aktives Arf1 an der Membran als Dimer vorliegt (Beck *et al.*, 2008). Dabei konnte durch Verwendung von Quervernetzern unterschiedlicher Länge gezeigt werden, dass der Abstand der Cystein-Reste im membrangebundenem Arf1-Dimer ca. 16 Å beträgt. Aus tryptischem Verdau und massenspektrometrischer Analyse der Peptide sowie der Information über den Abstand der Cystein-Reste konnte ein Modell des putativen Dimers generiert werden (Abb. 1.6 (Beck *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2008)).

Hier ist zu sehen, dass die N- und C-Termini zur Membran zeigen. Die amphiphile N-terminale α -Helix ist nicht gezeigt, da diese im GTP-gebundenen Zustand membrangebunden ist. Über die Struktur von Vollängen-Arf1*GTP war zur Zeit der Generierung des Modells noch nichts bekannt. Die Peptide, die nur nach tryptischem Verdau von monomerem Arf1 mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten, sind in gelb und orange dargestellt.

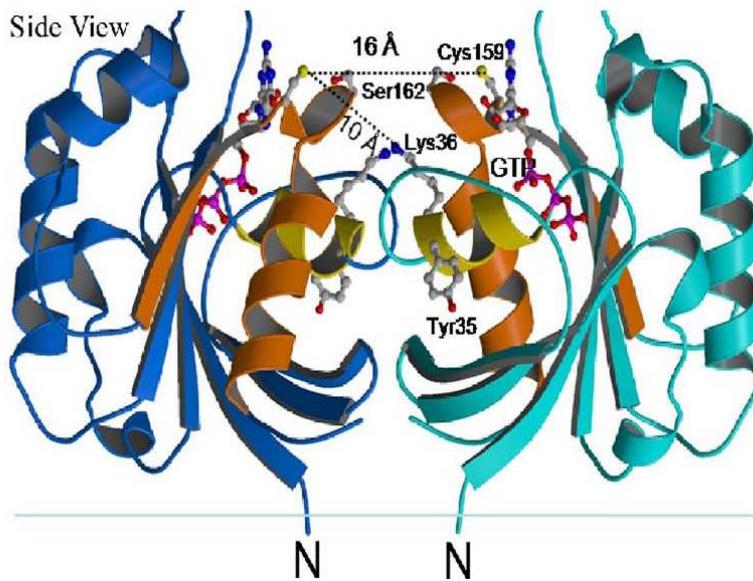


Abb. 1.6: Modell des aktiven Arf1-Dimers

Das Modell wurde generiert unter Berücksichtigung des aus biochemischen Analysen ermittelten Abstands der Cys-Reste, massenspektrometrischer Peptidanalyse und den bekannten Interaktionsflächen von Arf1 mit ArfGAPs und Coatomer.

gelb, orange: Aminosäuresequenzen, die bei der massenspektrometrischen Analyse nur nach Proteolyse des Arf1-Monomers detektiert wurden

Abb. aus: Beck *et al.*, 2008

Anhand des Modells wurden verschiedene Aminosäuren, die sich im Bereich der potentiellen Dimer-Kontaktfläche befinden, zu Alanin mutiert und untersucht, ob weiterhin eine Dimerisierung nach Bindung an die Membran erfolgt. Im Falle der Mutation Y35A tritt keine Dimerisierung mehr auf. Die biochemische Charakterisierung der Mutante ergab, dass Arf1Y35A in der Lage ist, in Anwesenheit von Coatomer an Membranen zu binden, nicht jedoch freie COPI-Vesikel zu bilden (Beck *et al.*, 2008).

Mittels cryo-elektronenmikroskopischer Analyse wurden anstelle von freien COPI-Vesikeln, wie sie nach der Inkubation von Liposomen mit rekombinantem Coatomer, GTPγS und Arf1wt zu finden sind (s. Abb. 1.7 a,b), in der Knospung arretierte Vesikel (im folgenden als Rosetten bezeichnet) gefunden (s. Abb. 1.7 c,d) (Beck *et al.*, 2011).

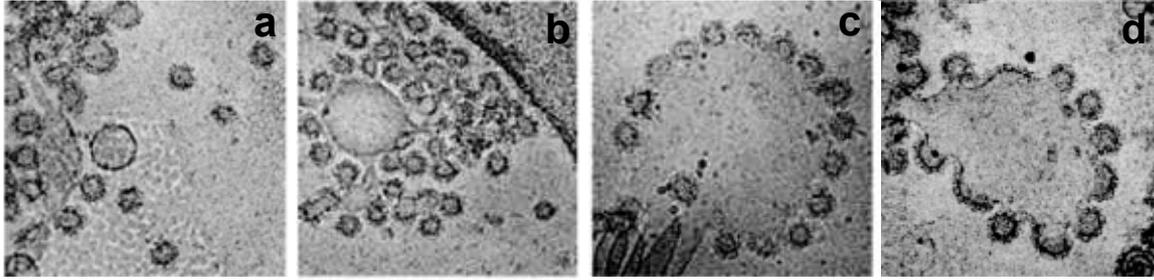


Abb. 1.7: Cryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen von COPI-Vesikeln und Rosetten

a,b: Liposomen inkubiert mit rekombinantem Coatomer, Arf1wt und GTP γ S

c,d: Liposomen inkubiert mit rekombinantem Coatomer, Arf1Y35A und GTP γ S

Abb. modifiziert nach: Beck *et al.*, JCB, 2011

Daraus ergibt sich, dass für die Abschnürung eines COPI-Vesikels Arf1 als Dimer vorliegen muss.

Mit der nicht dimerisierenden Mutante besteht nun die Möglichkeit, die Rolle von Arf1 bei der COPI-Vesikelbiogenese schrittweise zu untersuchen.

1.3.6 Biogenese von COPI-Vesikeln

COPI-Vesikel werden am Golgi-Apparat gebildet. Die einzelnen Schritte sind in Abb. 1.8 schematisch dargestellt und werden im Folgenden beschrieben.

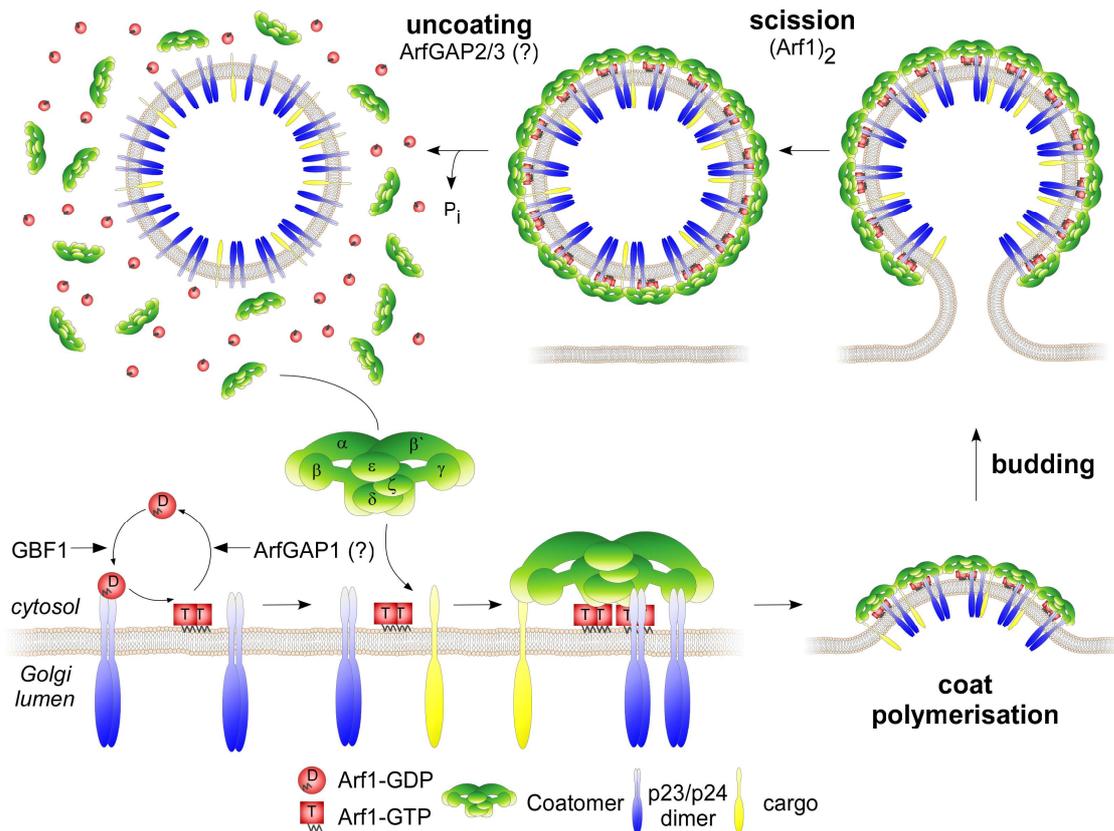


Abb. 1.8: COPI-Vesikel-Biogenese

Beschreibung: s. Text; Abbildung: Frank Adolf, AG Wieland

Initiiert wird die COPI-Vesikelbildung durch Rekrutierung des kleinen GNBPs Arf1 an die Golgi-Membran, was über die Bindung von Arf1*GDP an das v-SNARE Membran (Honda *et al.*, 2005) oder die Bindung an die cytosolische Domäne der Typl-Transmembranproteine p23 oder p24 erfolgt (Gommel *et al.*, 2001; Majoul *et al.*, 2001). Die Aktivierung von Arf1 erfolgt durch den GBF1-katalysierten Austausch zu GTP, was zu den oben beschriebenen Konformationsänderungen und damit zur stabilen Membranverankerung von Arf1 führt (Antonny *et al.*, 1997). Arf1*GTP dimerisiert an der Membran (Beck *et al.*, 2008) und kann nun zusammen mit Homodimeren der p24-Familie (Bethune *et al.*, 2006) den heptameren Coatomer-Komplex rekrutieren. Dabei interagiert Arf1 mit den COP-Untereinheiten β - und γ -COP (Zhao *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1999), ϵ -COP (Eugster *et al.*, 2000) sowie β' - und δ -COP (Sun *et al.*, 2007). Die Interaktion von Coatomer mit p24-Dimeren erfolgt über zwei unabhängige Bindestellen in γ -COP mit dem konservierten FFXBB(X)_n-Motiv der p24-Dimere. Hierbei steht F für Phenylalanin und B für eine basische Aminosäure, also Lysin oder Arginin (Bethune *et al.*, 2006). Diese Interaktion bewirkt eine Konformationsänderung im Coatomerkomplex (Reinhard *et al.*, 1999), die

wahrscheinlich die Polymerisierung des Komplexes initiiert (Langer *et al.*, 2008). Die für die Bildung einer Vesikelknospe notwendige Krümmung der Membran wird wahrscheinlich durch zwei Mechanismen hervorgerufen. Zum einen interagiert die amphiphile N-terminale α -Helix von Arf1 mit der Membran und inseriert ihren Myristoyl-Anker in die Lipidschicht (Harroun *et al.*, 2005), was zu Veränderungen der Membranstruktur führt und als Membranoberflächenaktivität bezeichnet wird (Beck *et al.*, 2008). Zum anderen bewirken die konformationellen Änderungen in Coatomer und dessen Polymerisation wahrscheinlich die Krümmung der Membran, welche die Vesikelknospe formt.

Der nächste Schritt ist die Ablösung des COPI-Vesikels, für den die Dimerisierung von Arf1 absolut notwendig ist (Beck *et al.*, 2008).

Damit das Vesikel mit der Ziellmembran fusionieren kann, muss die Proteinhülle abgelöst werden; ein Prozess, der als *uncoating* bezeichnet wird. Dieser wird initiiert durch die ArfGAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von Arf1 (Cukierman *et al.*, 1995). Durch *in vitro*-Experimente, in denen gereinigtes ArfGAP zu COPI-Vesikeln gegeben wurde, konnte gezeigt werden, dass keine weiteren Faktoren oder Prozesse für das *uncoating* erforderlich sind (Reinhard *et al.*, 2003).

Anschließend erfolgt die SNARE-vermittelte Fusion mit der Ziellmembran.

Die Rolle von Arf1 bei der COPI-Vesikelbiogenese wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.4 Ziel der Arbeit

Bisher sind zwar die Komponenten und die einzelnen Schritte der COPI-Vesikelbiogenese bekannt, nicht jedoch alle molekularen Details der Interaktionen der beteiligten Komponenten. So wurde gezeigt, dass Arf1 als Dimer vorliegen muss (Beck *et al.*, 2008), die Interaktionsfläche der beiden Monomere ist dagegen nicht bekannt. Außerdem gab es bisher nur wenige Studien zur Rolle der amphiphilen N-terminalen α -Helix. Diese hatten ergeben, dass Mutationen der hydrophoben Aminosäuren I4 und F5 die Membranbindung von Arf1 deutlich verschlechterten oder sogar eliminierten (Krauss *et al.*, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der Dimerisierung von Arf1 untersucht werden. Da die Mutante Arf1Y35A nicht dimerisiert und statt freier COPI-Vesikel in

der Knospung arretierte Vesikel bildet, sollte die Bedeutung der Aminosäure Tyrosin 35 für die Dimerisierung und die COPI-Vesikelbiogenese untersucht werden. Da Tyrosin mit dem Phenylring und der Hydroxylgruppe zwei Motive besitzt, die eine Rolle spielen könnten, sollte Y35 zu Phenylalanin mutiert werden, um zwischen dem Einfluss der Hydroxylgruppe und des Phenylrings unterscheiden zu können.

Zur Analyse der Interaktionsflächen der beiden Arf1-Monomere im Dimer sollte aktives Arf1 in chemisch dimerisierter Form kristallisiert werden. Da GTP-gebundenes Arf1 nicht löslich ist, wurde hierzu die N-terminal verkürzte Mutante von Arf1 – Arf1N Δ 17 – als His-*getaggt*es Konstrukt verwendet. Die Mutante sollte nach chemischer Dimerisierung kristallisiert werden. Außerdem sollte His₆Arf1N Δ 17 biochemisch charakterisiert werden, um die Rolle der amphiphilen N-terminalen α -Helix bei dessen Membranoberflächenaktivität und der COPI-Vesikelbiogenese zu untersuchen.

2. Ergebnisse

2.1 Biochemische Charakterisierung der Arf1Y35F-Mutante

2.1.1 Membranbindung und Dimerisierung an Membranen

Proteine der Arf-Familie besitzen eine amphiphile N-terminale α -Helix, die im Falle der Arf-Proteine myristoyliert ist, während Sar1 und einige Arl-Proteine keinen Myristoyl-Rest tragen (Donaldson and Jackson, 2011). Diese Helix wird bei Aktivierung der Arf-Proteine durch den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP ausgeklappt, was zur Assoziation des Proteins mit der Membran führt (Antonny *et al.*, 1997; Franco *et al.*, 1995). Arbeiten von R. Beck und Z. Sun haben gezeigt, dass Arf1 nach Rekrutierung zur Membran und GEF-vermitteltem Nukleotidaustausch zu GTP dimerisiert (Beck *et al.*, 2008). Zudem wurde eine Mutante (Arf1Y35A) gefunden, die nicht in der Lage ist, in Abwesenheit des Coatomer-Komplexes an Membranen zu binden und dort zu dimerisieren. Ist Coatomer vorhanden, kann Arf1Y35A an Membranen binden, dimerisiert jedoch nicht. Arf1Y35A ist fähig, nach Rekrutierung von Coatomer Vesikelknospen zu formen (Beck *et al.*, 2008).

Da Tyrosin 35 in allen Arf- und Arl-Proteinen konserviert und zudem notwendig für die Dimerisierung ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch ortsspezifische Mutagenese die Mutante Arf1Y35F hergestellt und biochemisch charakterisiert. So kann unterschieden werden, ob bei der Dimerisierung und Vesikelabschnürung eher die Hydroxygruppe oder der Phenylring von Tyrosin eine Rolle spielt.

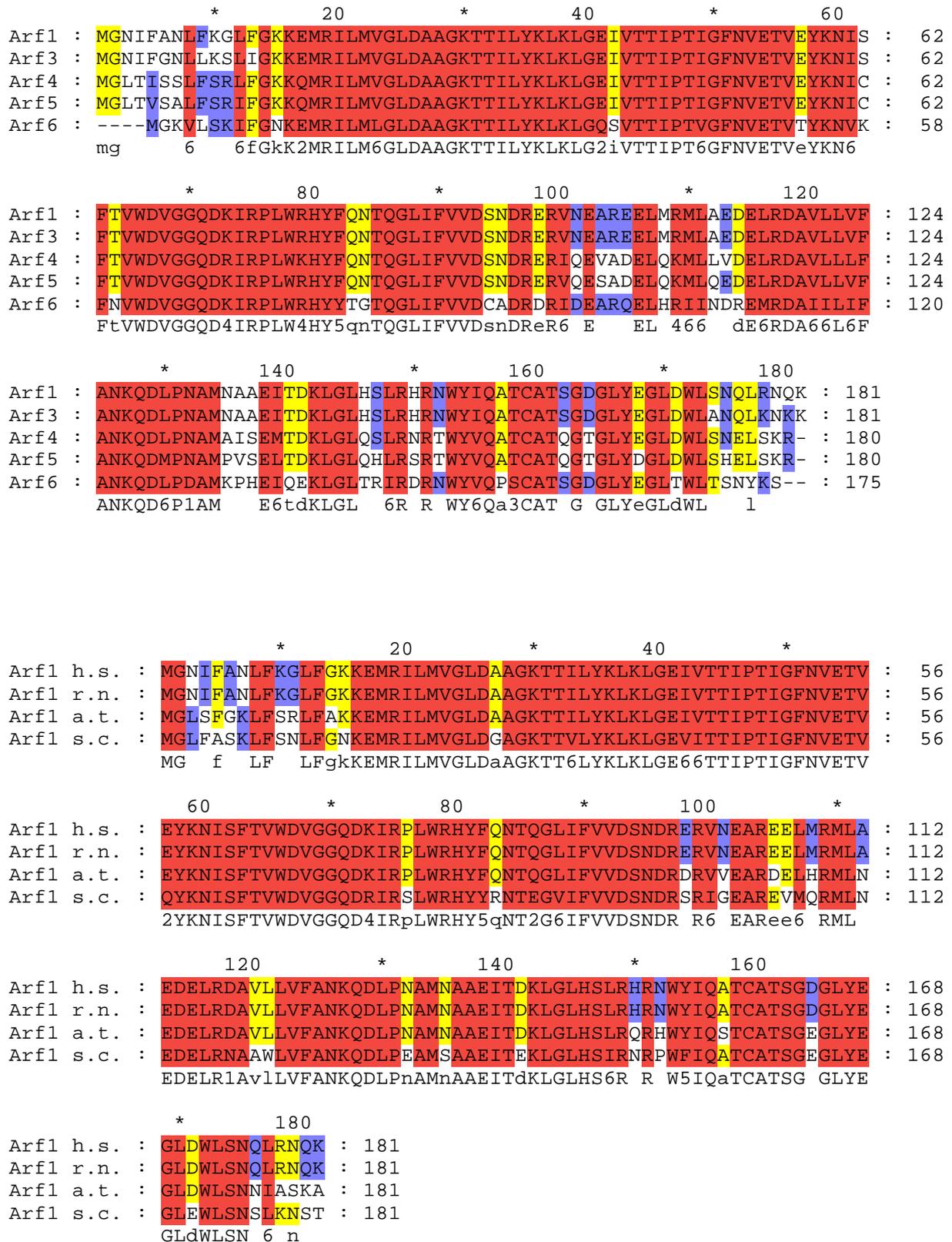


Abb.2.1: Sequenzvergleich von humanem Arf1 – 6 (oben) und Arf1 verschiedener Organismen (unten)

h.s.: homo sapiens; r.n.: rattus norvegicus; a.t.: arabidopsis thaliana; s.c.: saccharomyces cerevisiae

100 % Identität: rot

80 % Identität: gelb

60 % Identität: blau

2.1.1 Bindung an Membranen und Dimerisierung

Zuerst wurde untersucht, ob Arf1Y35A Coatomer-unabhängig an Membranen binden und dort dimerisieren kann. Dazu wurden Liposomen in einer der Golgi-Membran ähnlichen Lipidzusammensetzung (im Folgenden: Golgi-like-Mix), die zudem 1 mol% PI(4,5)P₂ und 3 mol% p23-Lipopeptid enthielten, mit Arf1wt oder Arf1Y35F, dem Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) ARNO in An- oder Abwesenheit von GTP inkubiert und mittels einer Sucroседichtegradientenzentrifugation lipidgebundenes Protein von nicht lipidgebundenem Protein getrennt. PI(4,5)P₂ wird zugesetzt, um das GEF ARNO über dessen PH-Domäne zur Membran zu rekrutieren. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot.

Wie aus Abb. 2.1 ersichtlich, ist die Mutante Arf1Y35F in der Lage, Nukleotid-abhängig und Coatomer-unabhängig an Liposomen zu binden. Damit verhält sie sich wie der Arf1-Wildtyp (vgl. Spur 6 und Spur 8 in Abb. 2.1.) und anders als die Mutante Arf1Y35A, die für die Bindung an Membranen den Coatomerkomplex benötigt (Beck *et al.*, 2008).

Es stellte sich als nächstes die Frage, ob die Mutante Arf1Y35F in der Lage ist, an der Membran auch zu dimerisieren. Da Arf1 ein einzelnes Cystein besitzt, können zwei Arf-Moleküle durch Zugabe eines thiol-spezifischen Quervernetzers kovalent verknüpft werden. Wie in den Arbeiten von R. Beck und Z. Sun wurde auch hier bis-Maleimido-Hexan (BMH), das eine Länge von 16 Å besitzt, verwendet (Beck *et al.*, 2008). Das Experiment – dargestellt in Abb. 2.2 – zeigt, dass die Mutante Arf1Y35F (Spuren 7 und 8) ebenso wie der Wildtyp (Spuren 3 und 4) nach Membranbindung spezifisch durch Zugabe des Quervernetzers BMH dimerisiert.

Die Doppelbande, die in den Proben nach Inkubation mit BMH zu sehen ist, ist darauf zurückzuführen, dass monomeres BMH-gebundenes Arf1 in einem denaturierenden SDS-Gel bei einem größeren Molekulargewicht auftritt.

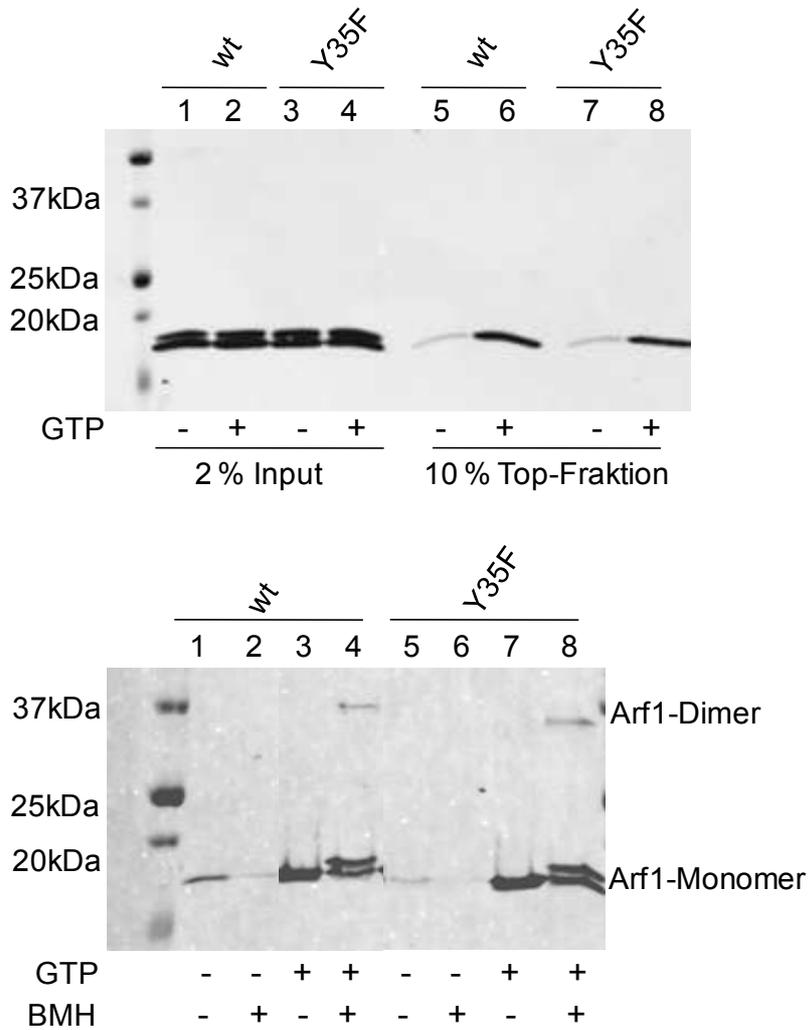


Abb. 2.2: Bindung und Dimerisierung von Arf1Y35F an Membranen

oben: Bindung an Membranen: 2 % des Probenmaterials nach Inkubation für 15 min bei 37°C und 10 % des lipidgebundenen Materials nach Sucroседichtegradientenzentrifugation wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot mit einem Arf-spezifischen Antikörper (Arf1CT-1849) analysiert.

unten: Dimerisierung an Membranen: 10 % des lipidgebundenen Materials (s.o.) wurde mit 0,5 mM BMH versetzt, 1 h bei RT inkubiert und mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit einem Arf1-spezifischen Antikörper (Arf1CT-1849) analysiert.

2.1.2 Biogenese von COPI-Vesikeln

Als nächstes wurde untersucht, ob Arf1Y35F in der Lage ist, COPI-Vesikel von der Donormembran abzuschneiden oder ob es – ähnlich wie die nicht dimerisierende Mutante Arf1Y35A – in der Knospung arretierte Vesikel bildet.

Dazu wurde die von R. Beck etablierte schnelle Methode zur Anreicherung freier COPI-Vesikel an ein liposomales System angepasst (s. 4.3.12). Wie in Abb. 2.3 gezeigt, ist die Y35F-Mutante in der Lage, nukleotidabhängig freie COPI-Vesikel zu

generieren (Spur 8). Die elektronenmikroskopischen Bilder in Abb. 2.4 zeigen deutlich, dass sich die von der Mutante Arf1Y35F erzeugten COPI-Vesikel in ihrem Aussehen nicht von denen des Arf1wt unterscheiden. Außerdem ist kein Unterschied in der Vesikulierungseffizienz zu beobachten. Damit unterscheidet sich die Mutante Arf1Y35F nicht vom Arf1wt.

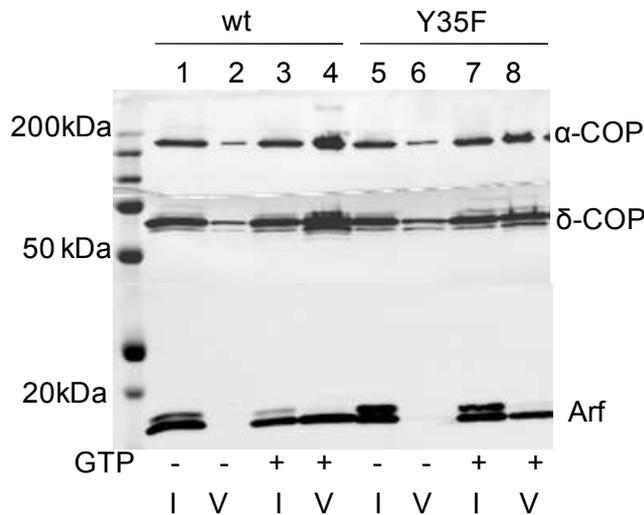
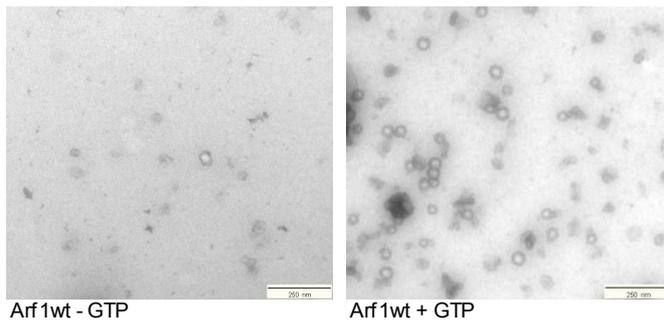


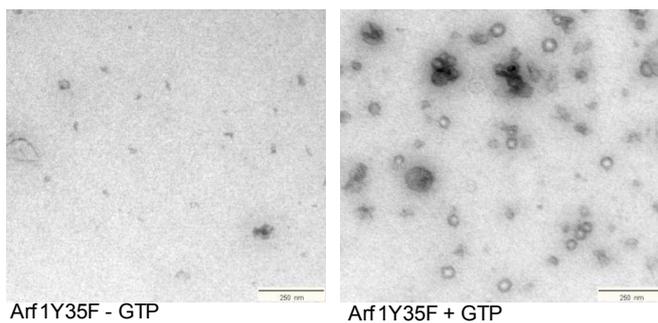
Abb. 2.3: *in-vitro*-Rekonstitution freier COPI-Vesikel

Liposomen wurden mit 50 µg rekombinatem Coatomer-Mix, 5 µg Arf1wt oder Arf1Y35F, ARNO, mit oder ohne GTP für 15 min bei 37°C inkubiert und 1 % des Materials auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Sucrosedichtegradientenzentrifugation wurden 50 % der COPI-Vesikel enthaltenden Fraktion mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot analysiert.



Arf1wt - GTP

Arf1wt + GTP



Arf1Y35F - GTP

Arf1Y35F + GTP

Abb. 2.4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von COPI-Vesikeln

COPI-Vesikel wurden wie unter 4.3.12 beschrieben angereichert und mittels Negativkontrastierung (s. 4.3.14.1) für die elektronenmikroskopische Analyse präpariert.

Maßstab: 250 nm

2.1.3 ArfGAP1-katalysierte GTP-Hydrolyse und Rekrutierung des Coatomer-komplexes

Da jedoch mit keinem der bisher gezeigten Experimente kinetische Unterschiede detektiert werden konnten, wurde sowohl der Nukleotidaustausch von GDP zu GTP an Membranen als auch die Rekrutierung des Coatomer-Komplexes in Echtzeit untersucht.

Da Arf1 einen Tryptophan-Rest in der *switch* II-Region besitzt, dessen Umgebung bei Austausch von GDP zu GTP hydrophober wird, was einen Anstieg des Fluoreszenzsignals zur Folge hat (Antonny *et al.*, 1997; Bigay *et al.*, 2003), kann über die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz der Nukleotidaustausch zu GTP in Echtzeit verfolgt werden.

Zu Liposomen aus dem Golgi-like-Mix, dem 1 mol% PI(4,5)P₂ und 3 mol% p23-Lipopeptid zugesetzt worden waren, wurde Arf1wt oder Arf1Y35F gegeben und der Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von GTP und EDTA beobachtet. Der GTP-gebundene Zustand wurde durch Magnesiumgabe stabilisiert und die ArfGAP1-katalysierte GTP-Hydrolyse, die eine Erniedrigung des Fluoreszenzsignals aufgrund der nukleotidabhängigen Konformationsänderung von Arf1 zur Folge hat, beobachtet.

In Abb. 2.5 ist der Verlauf der Fluoreszenzänderung gezeigt. Das Fluoreszenzsignal bei Zugabe von EDTA wurde auf 0 gesetzt, um für alle Messungen den gleichen Startwert zu haben. Die Zugabe von ArfGAP1 ist durch den Pfeil markiert. Der Austausch zu GTP ist für beide Arf-Proteine gleich schnell (grün/schwarz versus blau/rot). Die ArfGAP1-katalysierte GTP-Hydrolyse erfolgt dagegen schneller für die Mutante Arf1Y35F.

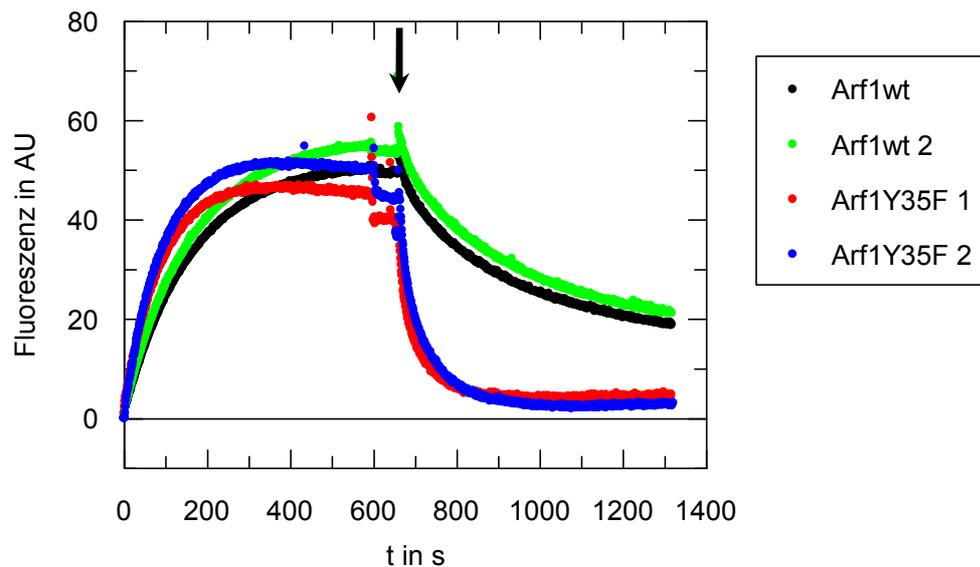


Abb. 2.5: Nukleotidaustausch und ArfGAP1-katalysierte GTP-Hydrolyse

Zu Golgi-like-Mix Liposomen eines Durchmessers von etwa 50 nm wurde 0,1 μ M Arf1wt oder Arf1Y35F, 0,1 mM GTP und 2 mM EDTA gegeben. Der GTP-gebundene Zustand wurde durch Zugabe von Magnesium stabilisiert und danach 50 nM ArfGAP1 zugegeben (Pfeil).

Für die Analyse der Rekrutierung des Coatomer-Komplexes wurde die Methode des *static light scatterings* angewandt. Hierbei wird ausgenutzt, dass Liposomen ohne Proteinmantel Licht weniger stark streuen als proteinummantelte. Somit kann der Prozess der Rekrutierung des Coatomer-Komplexes über die Zunahme der Lichtstreuung gemessen werden. Auch hier wurde das Fluoreszenzsignal nach Zugabe von EDTA auf 0 gesetzt, weil erst dann der Austausch zu GTP an Arf1 und damit dessen effiziente Rekrutierung zur Membran erfolgt. Wie Abb. 2.6 zu entnehmen ist, sind auch für die Rekrutierung des Coatomer-Komplexes keine Unterschiede in der Kinetik zu beobachten. Die durch die ArfGAP1-vermittelte GTP-Hydrolyse initiierte Ablösung des Proteinmantels erfolgt ebenso wie der Nukleotidaustausch gleich schnell für Arf1wt und Arf1Y35F.

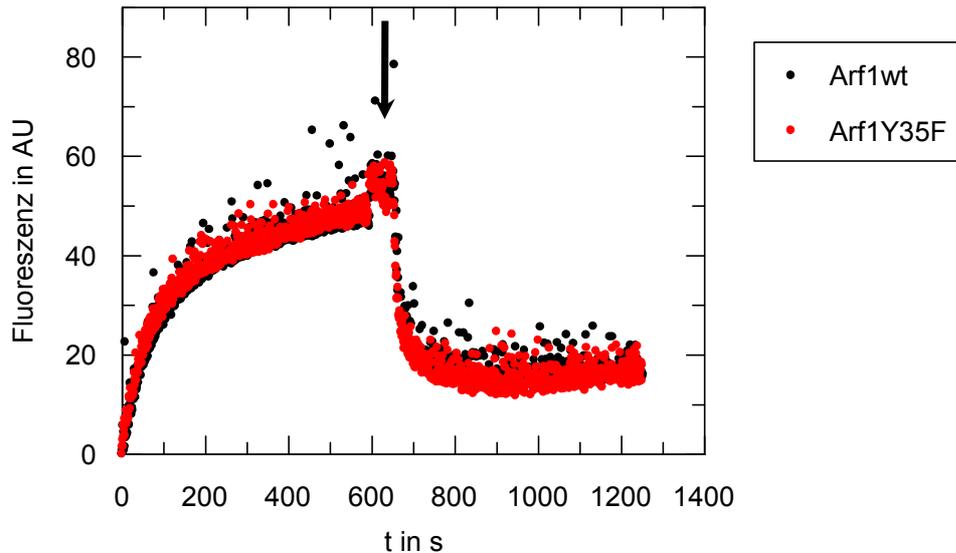


Abb. 2.6: Rekrutierung von Coatomer und ArfGAP1-vermittelte Ablösung des Proteinmantels

Zu 100 μM Liposomen (Golgi-like-Mix mit 1 mol% $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, 3 mol% p23-Lipopeptid) eines Durchmessers von etwa 50 nm wurde 0,1 μM Arf1wt oder Arf1Y35F, 0,02 μM rekombinanter Coatomer, 0,1 mM GTP und 2 mM EDTA gegeben. Der GTP-gebundene Zustand wurde durch Zugabe von Magnesium stabilisiert und danach 50 nM ArfGAP1 zugegeben (Pfeil), um die Ablösung des Proteinmantels verfolgen zu können.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Mutante Arf1Y35F die gleichen Eigenschaften wie Arf1wt zeigt.

2.2: Einfluss der Myristoylierung und Dimerisierung von Arf1 auf die COPI-Vesikel-Biogenese

2.2.1 Einfluss der Myristoylierung auf die COPI-Vesikelbiogenese

Eine weitere Fragestellung zum Mechanismus der COPI-Vesikelbildung betrifft die Notwendigkeit der Myristoylierung. Um diese zu prüfen, wurde Arf1wt ohne Zugabe von Myristat exprimiert und dann nach dem Standard-Protokoll aufgereinigt (s. 4.3.6). Zuerst wurde überprüft, ob nicht-myristoyliertes Arf1 an Membranen binden kann. Wie das in Abb. 2.7 dargestellte Flotationsexperiment zeigt, bindet jedoch nur myristoyliertes Arf an Liposomen. Dabei spielt es keine Rolle, ob Arf1 vorher chemisch dimerisiert wurde oder nicht, wie den Spuren 9 bis 12, in denen jeweils kein Signal zu sehen ist, entnommen werden kann. Da nicht-myristoyliertes Arf1 nicht an Liposomen bindet, kann es auch nicht zur COPI-Vesikel-Biogenese fähig sein.

Daher wurden keine Experimente zur Anreicherung von COPI-Vesikeln mit nicht-myristoyliertem Arf1 durchgeführt.

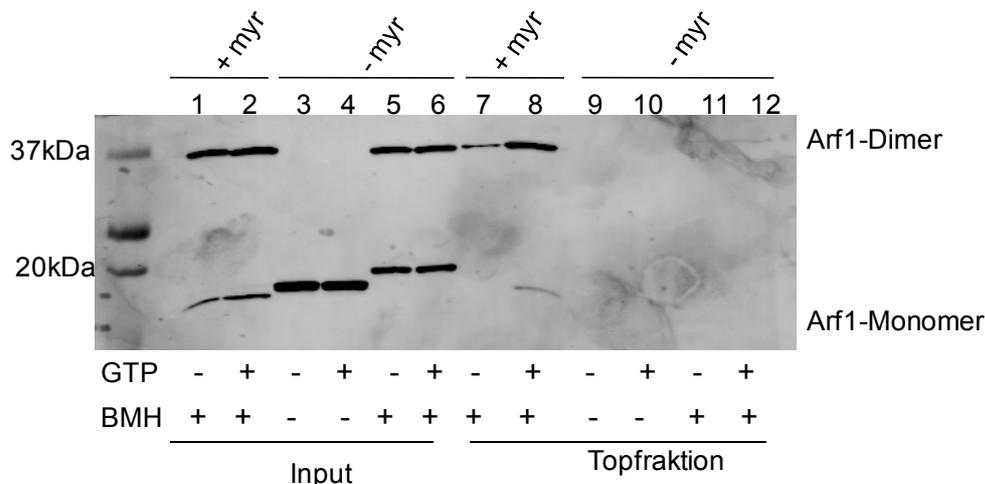


Abb. 2.7: Einfluss des Myristoyl-Ankers auf die Membranbindung von Arf1

2 % des Probenmaterials nach Inkubation für 15 min bei 37°C und 10 % des lipidgebundenen Materials nach Sucroседигтеgradiеntеnzentrifugation wurden auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot mit Arf1-Antikörper (antiArf1-CT 1849) analysiert.

-myr: nicht-myristoyliertes Arf; +myr: myristoyliertes Arf

2.2.2 Rettung der COPI-Vesikelabschnürung durch chemische Quervernetzung von Arf1Y35A

Im Rahmen der von Dr. Rainer Beck begonnenen Arbeit an der nicht dimerisierenden Mutante Arf1Y35A, die zwar in der Knospung arretierte Vesikel bilden kann, nicht jedoch zur Abschnürung der Vesikel fähig ist, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Petra Diestelkötter-Bachert Experimente zur Wiedergewinnung der Funktion der COPI-Vesikel-Abschnürung durchgeführt.

Dazu wurde ausgenutzt, dass nach Mutation des internen Cystein 159 zu Serin und des C-terminalen Lysin 181 zu Cystein zwei Arf1-Moleküle über letzteres mit einem thiol-spezifischen homobifunktionalen Quervernetzer kovalent verknüpft werden können. Als Quervernetzer wurde wieder BMH verwendet.

In Zusammenarbeit mit Dr. Petra Diestelkötter-Bachert wurden Vesikel über die von Dr. Rainer Beck entwickelte Methode angereichert und nach Analyse durch Western-Blotting die Transmissions-elektronenmikroskopische Analyse mittels Negativkontrastierung durchgeführt.

Als Positivkontrolle diente Arf1wt unter GTPyS-Bedingungen. Während Arf1C159SK181C (im Folgenden: Arf1cys) ebenso wie der Wildtyp freie COPI-Vesikel generieren kann, ist die Mutante Arf1Y35AC159SK181C (im Folgenden:

Arf1cysY35A) nicht in der Lage, COPI-Vesikel zu bilden (s. Abb. 2.8 F). Wird die COPI-Vesikel-Biogenese mit der chemisch quervernetzten Mutante durchgeführt, werden freie COPI-Vesikel gebildet (vgl. Bild F und J in Abb. 2.8).

Um die Vesikulierungseffizienz der Mutanten Arf1cys und Arf1cysY35A in monomerer und dimerer Form mit der des Arf1wt zu vergleichen, wurde die Anzahl der gebildeten COPI-Vesikel bestimmt. Dazu wurden $66 \mu\text{m}^2$ pro Vesikelfraktion ausgezählt. In Abb. 2.9 ist das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

Die quantitative Analyse ergab, dass kein Unterschied in der Vesikulierungseffizienz von Arf1wt und Arf1cys besteht. Wurde die Mutante Arf1cysY35A in monomerer Form eingesetzt, waren ca. 8 % freie COPI-Vesikel zu finden. Als Kontrolle wurden Golgi-Membranen ohne Zugabe von Arf1 analysiert, um die Vesikulierungseffizienz des endogenen Arf-Proteins, das bei der Isolierung von Golgi-Membranen an diesen verbleibt, zu bestimmen. Diese beträgt ca. 7 % und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die Vesikelbildung durch Arf1cysY35A. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Anteil freier Vesikel bei Verwendung von Arf1cysY35A auf die Vesikelbildung durch am Golgi verbliebenes endogenes Arf1wt zurückzuführen ist. Die chemisch quervernetzte Mutante Arf1cysY35A weist eine Vesikulierungseffizienz von 70 % im Vergleich zum Wildtyp auf.

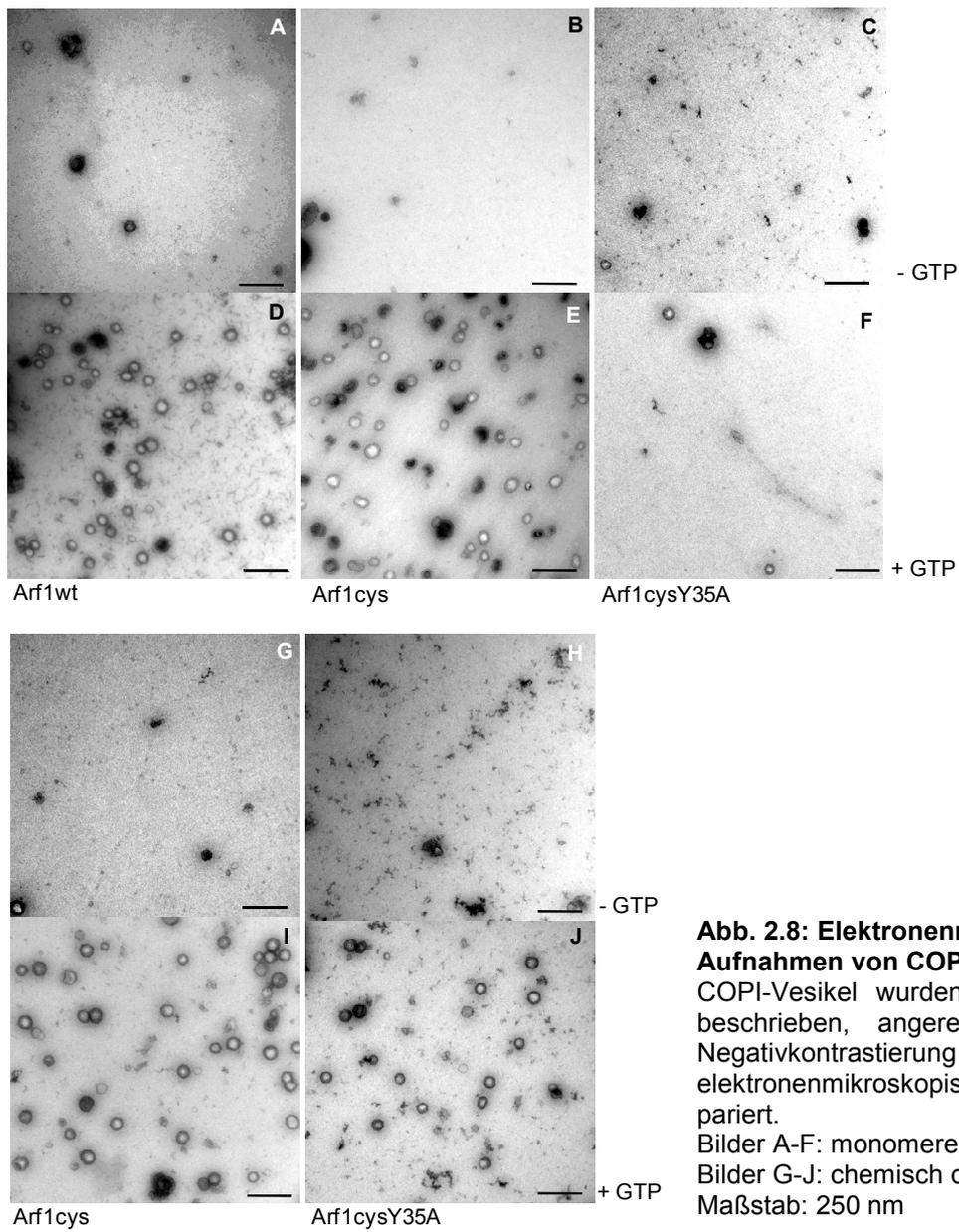


Abb. 2.8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von COPI-Vesikeln

COPI-Vesikel wurden wie unter 4.3.12 beschrieben, angereicht und mittels Negativkontrastierung (s. 4.3.14.1) für die elektronenmikroskopische Analyse präpariert.

Bilder A-F: monomeres Arf

Bilder G-J: chemisch quervernetztes Arf

Maßstab: 250 nm

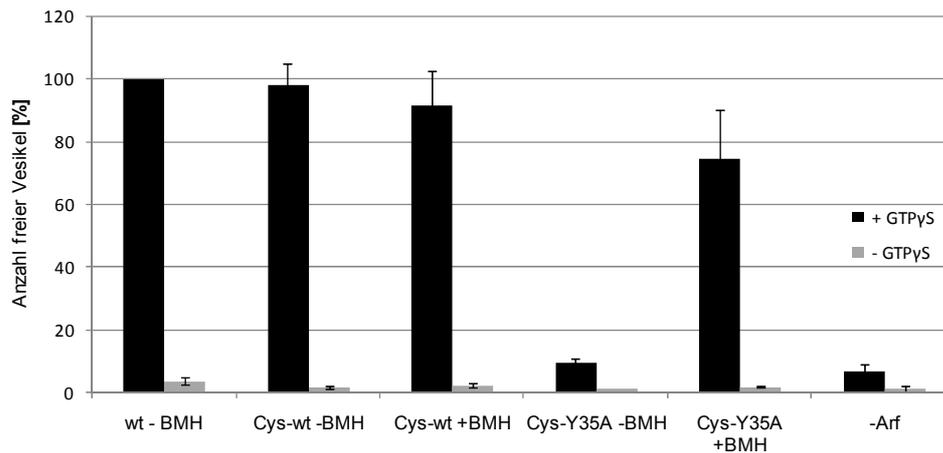


Abb. 2.9: Quantifizierung der Vesikelbildung

Pro Vesikelfraktion wurde die Anzahl an COPI-Vesikeln auf einer Fläche von $66 \mu\text{m}^2$, die zufällig ausgewählt worden war, bestimmt. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt (Fehlerbalken).

2.3. Reinigung, Kristallisation und biochemische Charakterisierung von His₆-Arf1N Δ 17

2.3.1 Reinigung und Kristallisation von His₆-Arf1N Δ 17

Um Einblicke in die Struktur der Kontaktfläche des Arf1-Dimers zu bekommen, sollte chemisch quervernetztes aktives Arf1 kristallisiert werden. Da die aktive GTP-gebundene Form des Vollängenproteins jedoch unlöslich ist, wurde auf eine N-terminal verkürzte Variante, Arf1N Δ 17, zurückgegriffen. Allerdings ließ sich das Wildtyp-Protein über das einzige Cystein159, das Arf besitzt, nicht quervernetzen, sodass das interne Cys159 zu Serin mutiert wurde und das C-terminale Lysin181 zu Cystein (im Folgenden als Arf1N Δ 17cys bezeichnet). Arf1N Δ 17cys wurde als His-getaggetes Protein exprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie wie bereits von S. Hubich beschrieben gereinigt (Dissertation S. Hubich). Da für die Kristallisation sehr reines Protein, das zu 100 % mit dem nicht spaltbaren GTP-Analogon Guanosin-5'($\beta\gamma$ -imido)-triphosphat (GppNHp/GMPPNP) beladen ist, benötigt wurde, erfolgten weitere Reinigungsschritte (s. 4.3.7).

Zuerst wurde versucht, den His-Tag mit der TEV-Protease abzuschneiden, was jedoch erfolglos blieb. Selbst ein 10facher molarer Überschuss an TEV-Protease

zeigte nur einen partiellen Schnitt. Somit ist die TEV-Protease-Schnittstelle nicht zugänglich. Es wurde also mit dem His-*getaggt* Protein weiter gearbeitet.

Um eine homogene Population von His₆-Arf1NΔ17 in der GppNHp-gebundenen Form zu erhalten, wurde ein Nukleotidaustausch mit einem Überschuss an Nukleotid, dem GEF ARNO und alkalischer Phosphatase, die GDP zu GMP oder Guanosin abbaut, durchgeführt (s. 4.3.7.3). Überschüssiges Nukleotid sowie die zugegebenen Proteine wurden über Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde überprüft, ob der Nukleotidaustausch erfolgreich war. Zur Kontrolle, ob das Protein vollständig mit GppNHp beladen war oder z. T. im nukleotidfreien Zustand vorlag, wurde zudem die Konzentration des Nukleotids mittels HPLC bestimmt und mit der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford verglichen. Hierbei ergaben sich Differenzen von maximal 5 µM (2 %), was im Rahmen des experimentellen Fehlers lag. Aus dem HPLC-Chromatogramm (Abb. 2.10) ist ersichtlich, dass die Probe zu 100 % mit demselben Nukleotid beladen ist, das durch Vergleich der Retentionszeiten mit Nukleotidstandards als GppNHp identifiziert werden konnte.

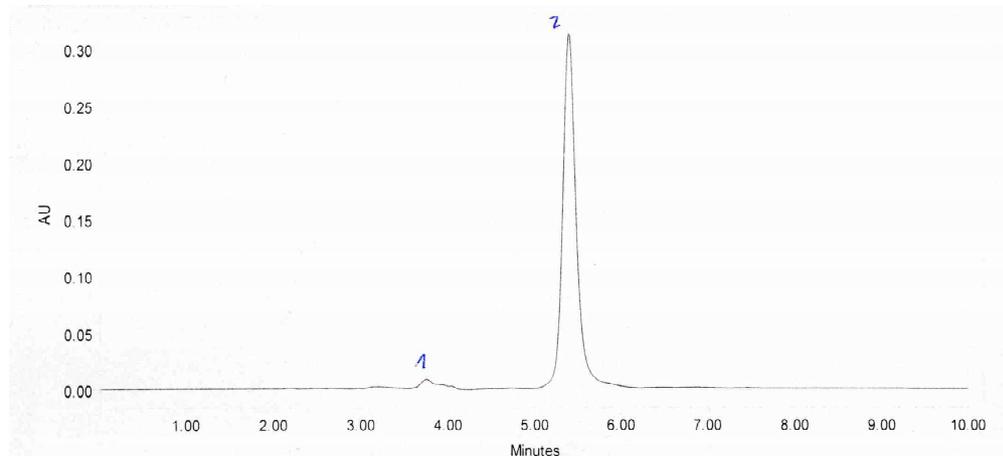


Abb. 2.10: Überprüfung des Nukleotidaustausches mittels HPLC

Proteinlösung einer Konzentration von 50 µM bis 100 µM wurde hitzedenaturiert, das Proteinpräzipitat abgetrennt und der das Nukleotid enthaltende Überstand auf eine *reversed phase*-C18-Säule aufgetragen. Die Absorption bei 254 nm ist auf der y-Achse aufgetragen.

1: Laufmittelfront; 2: Signal, das GppNHp entspricht.

Die chemische Dimerisierung erfolgte durch Zugabe der homobifunktionalen Quervernetzer BMH (16 Å), BMOE (11 Å) oder BM(PEG)₃ (21 Å), die in einem molaren Überschuss von 1/3 im Verhältnis zum Protein eingesetzt wurden. Der Einsatz von größeren Mengen an Quervernetzern führt durch „Blockierung“ der

Cysteine zu einer geringeren Kreuzvernetzungseffizienz. Die Quervernetzungseffizienz betrug unabhängig vom verwendeten Quervernetzer zwischen 50 % und 70 %. Abschließend wurden Monomer und Dimer mittels Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt. In Abb. 2.11 ist beispielhaft das Elutionsprofil sowie das zugehörige SDS-Gel einer Kreuzvernetzungsreaktion gezeigt. Die Signale sind symmetrisch, was auf homogene Proteinpopulationen schließen lässt. Aus Spur 1 des SDS-Gels wird deutlich, dass die Kreuzvernetzungseffizienz bei der hier gezeigten Reinigung ca. 70 % betrug. In den Spuren 2-13 sind Fraktionen des ersten und in Spur 14 eine Fraktion des zweiten Signalgipfels aufgetragen. Es wurde eine große Proteinmenge aufgetragen, um auch geringe Anteile an Monomer in den Dimerfraktionen sowie mögliche Verunreinigungen detektieren zu können. Es ist zu erkennen, dass weniger als 5 % des Proteins in den Dimerfraktionen Monomere sind. Diese Reinheit war für alle verwendeten Quervernetzer gleich.

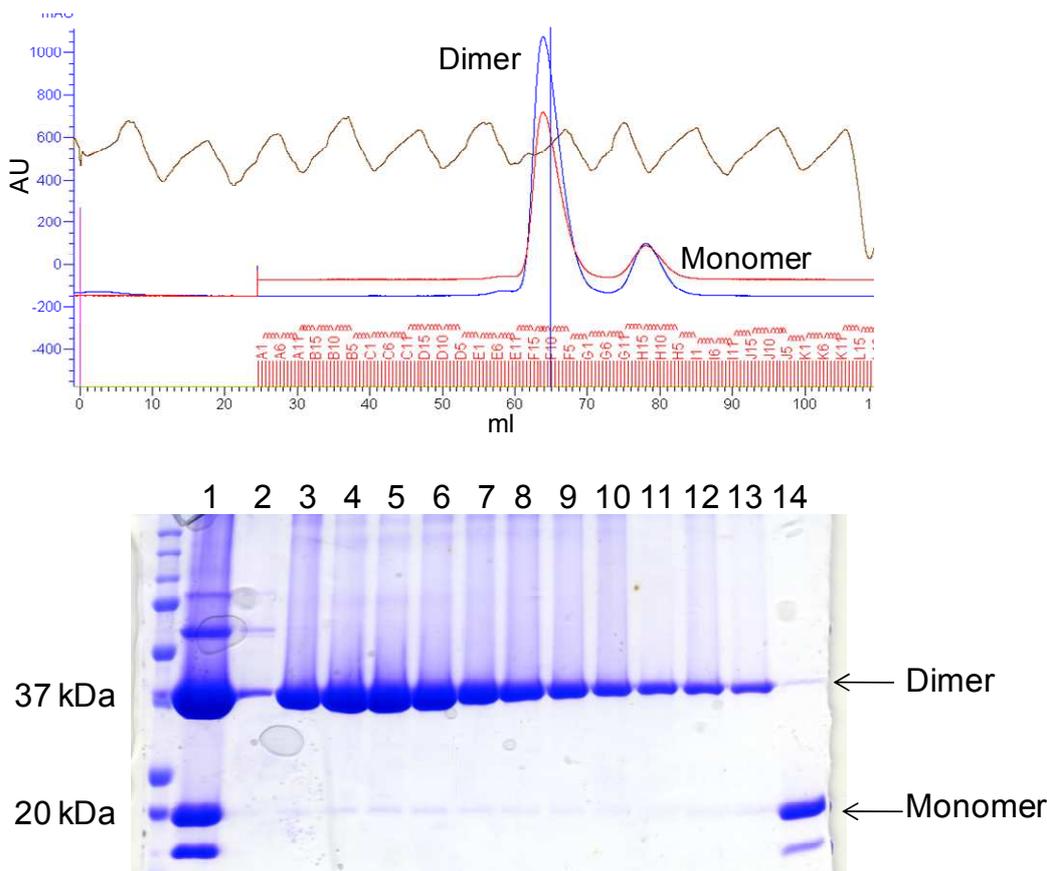


Abb. 2.11: Dimerisierung und Größenausschlusschromatographie von His₆-Arf1NΔ17

Die größenausschlusschromatographische Trennung erfolgte über eine Superdex 75 (16/60)-Säule.

blaue Linie: Absorption bei 280 nm; rote Linie: Absorption bei 260 nm

Für die SDS-PAGE wurden 5 % von jeder Fraktion aufgetragen. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250.

Für die ersten Initial-Screens (JCSG I – IV), die nur mit BMH-quervernetztem His₆-Arf1NΔ17cys angesetzt wurden, wurde das Protein in einer Konzentration von 30 mg/ml eingesetzt. In diesen Ansätzen wurde keine Kristallisation beobachtet.

In einer neuen Reinigung wurden parallel Kreuzvernetzungsreaktionen mit den drei verschiedenen Quervernetzern BMOE, BMH und BM(PEG)₃ durchgeführt, das Protein auf eine Konzentration von 20 mg/ml eingestellt und mit allen ein PEG-Screen angesetzt. Hier wuchsen Kristalle im Falle des mit BMOE und BMH quervernetzten Proteins unter der Bedingung 0,2 M Natriumthiocyanat, 20 % PEG 3350. Diese wiesen jedoch eine hohe Mosaizität auf, sodass die Struktur nicht ermittelt werden konnte

Zur Verbesserung der Kristalle wurden verschiedene Verfeinerungs-Screens (s. Tab. 5.1 im Anhang) mit frisch gereinigtem Protein angesetzt, wobei Kristallwachstum unter den in Tab. 2.1 angegebenen Bedingungen auftrat.

Esther Lenherr (zu dem Zeitpunkt AG Sinning, BZH) hat die Kristalle mit Hilfe einer Öse aus der Lösung isoliert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Drei Kristalle haben am Synchrotron (Grenoble, Frankreich) bis 2,5 Å gestreut. Die Struktur konnte jedoch nur von zwei stäbchenförmigen Kristallen bestimmt werden, die beide aus mit BMOE quervernetztem Protein gewachsen waren. Die Bedingungen, unter denen Kristallwachstum beobachtet wurde, sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

Kristalle, die keinen glatten Rand aufwiesen, wurden nicht isoliert.

Screen	Bedingung	Quervernetzer	Streuung
Optimizer: E11.1; E11.2	0,2 M Natriumthiocyanat 20 % PEG 3350 0,6 M Natriumfluorid	BMOE BMH	2,6 Å 2,5 Å – 3 Å
Optimizer: F11.1; F11.2	0,2 M Natriumthiocyanat 20 % PEG 3350 0,3 M Natriumfluorid	BMOE BMH	ca. 8 Å; Eis ca. 3 Å
sEL16: A8.2	0,15 M Kaliumthiocyanat 21,4 % PEG 3350	nicht isoliert	
sEL16: A9.1; A9.2	0,15 M Kaliumthiocyanat 22,3 % PEG 3350	nicht isoliert	
sEL16: B9.2	0,2 M Kaliumthiocyanat 22,3 % PEG 3350	BMOE	ca. 8 Å; Eis ca. 7 Å
sEL16: C5.2	0,25 M Kaliumthiocyanat 18,6 % PEG 3350	nicht isoliert	
sEL16: D7.2	0,3 M Kaliumthiocyanat 20,5 % PEG 3350	BMOE	2,5 Å; 7 Å
sEL16: E2.1; E2.2	0,2 M Kaliumthiocyanat 15,9 % PEG 3350 0,1 M bis-tris (pH 6,5)	BMH	ca. 4 Å
sEL16: E3.2	0,2 M Kaliumthiocyanat 18,6 % PEG 3350 0,1 M bis-tris (pH 6,5)	BMOE	ca. 9 Å
sEL16: F2.2	0,2 M Kaliumthiocyanat 15,9 % PEG 3350 0,1 M HEPES (pH 7)	nicht isoliert	

Tab. 2.1: Kristallisationsbedingungen und Streuung der Kristalle

Dass es sich um quervernetztes Protein handelt, konnte anhand eines SDS-Gels (vgl. Abb. 2.12) gezeigt werden, auf das ein in Wasser aufgelöstes Kristallstück aufgetragen worden war. Auf dem SDS-Gel ist außerdem deutlich zu sehen, dass die Proteinlösung, mit der die Kristallansätze gemacht wurden und die bei RT gelagert worden war, noch Verunreinigungen enthielt, die auf dem mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Gel (vgl. Abb. 2.11) nicht zu sehen waren. Zudem ist eine starke Bande bei ca. 20 kDa zu sehen, die monomerem His₆-Arf1NΔ17cys entsprechen könnte. Diese Bande ist in der Spur, in der das Kristallstück aufgetragen wurde (Spur

3), nicht zu sehen und bei einem anderen Kristall (Spur 5) nur sehr schwach. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Kristall aus quervernetztem Protein bestand.

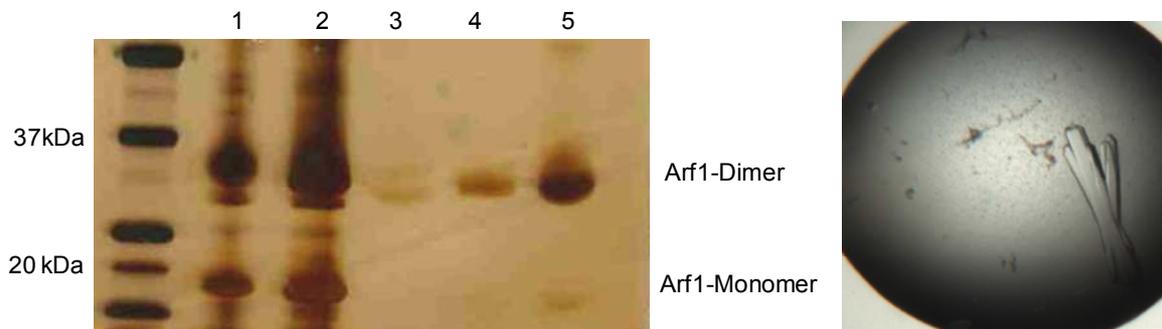


Abb. 2.12: Silbergefärbtes SDS-Gel des quervernetzten bei RT gelagerten His₆-Arf1NΔ17 und der Kristalle und Foto des Kristalls

SDS-Gel: Spur1: mit BMH quervernetztes His₆-Arf1NΔ17; Spur 2: mit BMOE quervernetztes His₆-Arf1NΔ17; Spur 3: Kristallstück der Bed. sEL16 D7.2, Spur 4: Kristall der Bed. sEL16 A9.2; Spur 5: Kristall der Bed. sEL A9.1.

Photo: Kristall der Bed. sEL D7.2

Zusammensetzung der Bedingungen: s. Tab. 2.1

Die Strukturbestimmung des ersten Datensatzes ergab eine orthorhombische Symmetrie der Raumgruppe $P2_12_12_1$, der zweite Datensatz wies eine hexagonale Symmetrie auf und besaß die Raumgruppe $P6_5$ (vgl. Tab. 2.2). Die beiden Raumgruppen sind symmetrieverwandt, sodass die ähnliche Anordnung der Arf-Moleküle im Kristall auf die Kristallsymmetrie zurückzuführen sein könnte.

Die Berechnung der Elektronendichte aus den Daten der Streuung erfolgte mit der Methode des Molekularen Ersatzes. Dabei wird die bekannte Struktur eines nahe verwandten Proteins an die experimentell gemessenen Daten der Streuung angepasst. Hier wurde Arf1NΔ17-Monomer (PDB: 1O3Y) als Modell verwendet. Bei dem Verfeinerungsprozess zur Berechnung der Elektronendichte werden die Abweichungen zwischen den Daten des Modells und den gemessenen Daten minimiert, was durch den Fehler R_{work} charakterisiert wird. Hierbei wird ein Teil der Daten (hier 5 %) nicht berücksichtigt und nach dem Verfeinerungsprozess überprüft, ob auch diese Daten in das berechnete Modell passen. Ein Maß dafür ist R_{free} , dessen Wert in einem ähnlichen Bereich wie R_{work} liegen sollte, was für beide Strukturen der Fall ist. Ein weiteres Maß für die Genauigkeit der Struktur ist der RMSD (*root mean square distance*), der für die Bindungen zwischen Modell und Kristall berechnet wird. Je kleiner dieser Wert, desto geringer ist die Abweichung.

Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P6 ₅
Einheitszelle: a,b,c [Å]	87, 148, 108	86, 86, 108
α,β,γ	90, 90, 90	90, 90, 120
Auflösung [Å]	2,5	2,6
Vollständigkeit	99,4 %	96%
R _{free}	27 %	32 %
R _{work}	30 %	38 %
RMSD _{Bindungen} [Å]	0,066	0,055

Tab. 2.2: Kristallparameter

Da es sich um dimeres Arf handelt, sollte bestimmt werden, welche Moleküle in der Einheitszelle miteinander kovalent verknüpft sind. Da der C-Terminus jedoch ungeordnet ist, ist hier nur wenig Elektronendichte zu finden, sodass der Quervernetzer nicht zugeordnet werden kann. Damit ist nicht bestimmbar, welche Moleküle miteinander kovalent verbunden sind. In Abb. 2.13 sind die sechs Moleküle, die sich in einer Einheitszelle befinden, dargestellt. Ausgehend vom grauen Molekül wäre eine Kreuzvernetzung mit BMOE mit dem türkisfarbenen, dem roten und dem gelben Molekül möglich; die Abstände zum blauen und violetten Monomer sind dagegen zu groß.

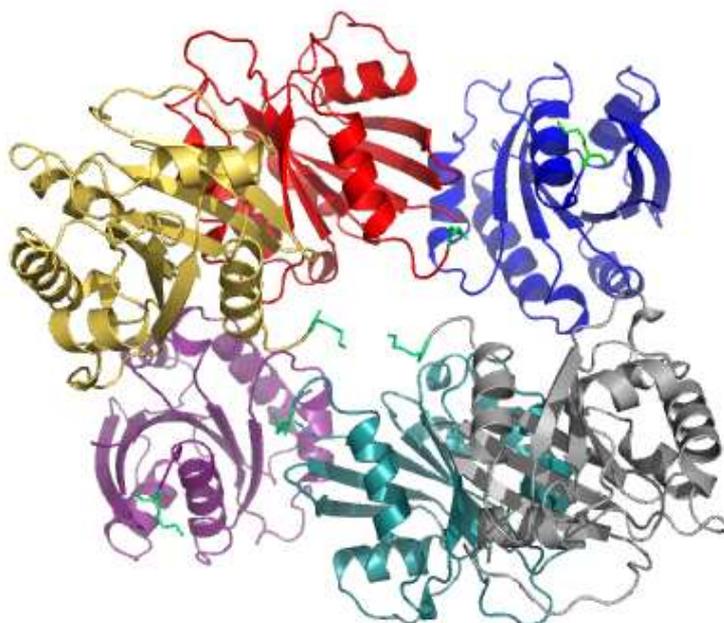


Abb. 2.13: Anordnung der Moleküle im Kristall der Raumgruppe P2₁2₁2₁
grün markiert: C-Termini der einzelnen Monomere

Die Interaktionsflächen zwischen zwei Monomeren sind so angeordnet, dass die Vorderseite des einen mit der Rückseite des anderen Moleküls interagiert. Im Modell des physiologisch aktiven Dimers interagieren die beiden Monomere dagegen über ihre Vorderseiten miteinander. Der Abstand der beiden Serinreste 159 beträgt 33 Å bis 39 Å. Im hexagonalen Kristall der Raumgruppe $P6_5$ betragen die Abstände zwischen den zwei Serin-Resten 38 Å bis 40 Å.

Betrachtet man die weitere Anordnung der Moleküle im Kristall, ergibt sich bedingt durch die Interaktion der Vorder- mit der Rückseite eine endlose spiralförmige Anordnung. Zwei dieser Helices sind so miteinander verwunden, dass sich eine antiparallele Doppelhelix ergibt (s. Abb. 2.14), die einen Durchmesser von ca. 90 Å ($P2_12_12_1$) bzw. 86 Å ($P6_5$) hat. In der Aufsicht auf die Doppelhelix, gezeigt in Abb. 2.14 rechts, ist zu erkennen, dass sämtliche Termini (grün) nach innen zeigen, also dem Solvens abgewandt sind.

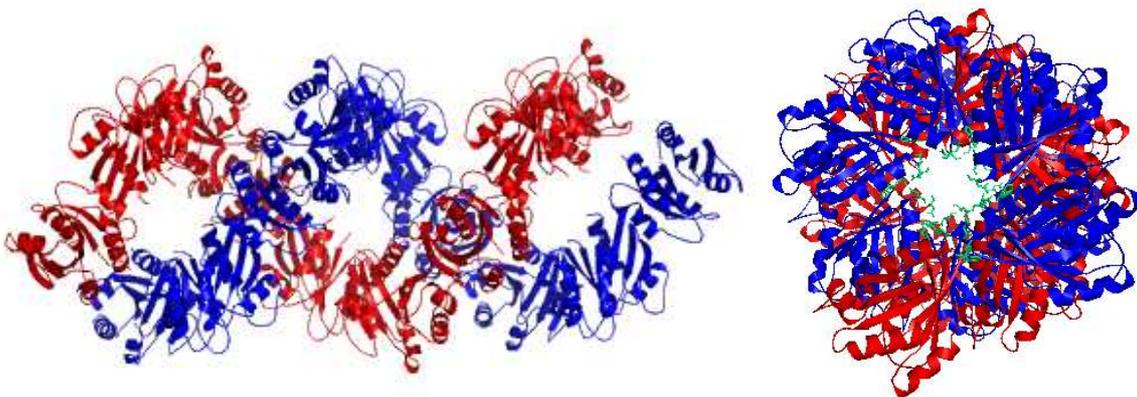


Abb. 2.14: Anordnung der Moleküle im Kristall der Raumgruppe $P2_12_12_1$

links: Seitenansicht der helicalen Struktur

rechts: Aufsicht auf die Doppelhelix mit Darstellung der N- und C-Termini der einzelnen Moleküle in grün

Die in Abb. 2.15 gezeigte Überlagerung der beiden gelösten Kristallstrukturen zeigt deutlich, dass die Anordnung der Moleküle in beiden Kristallen gleich ist. Hier ist auch zu sehen, dass die Elementarzellen der beiden Kristalle symmetrieverwandt sind (blau: $P2_12_12_1$, orthorhombisch; gelb: $P6_5$, hexagonal).

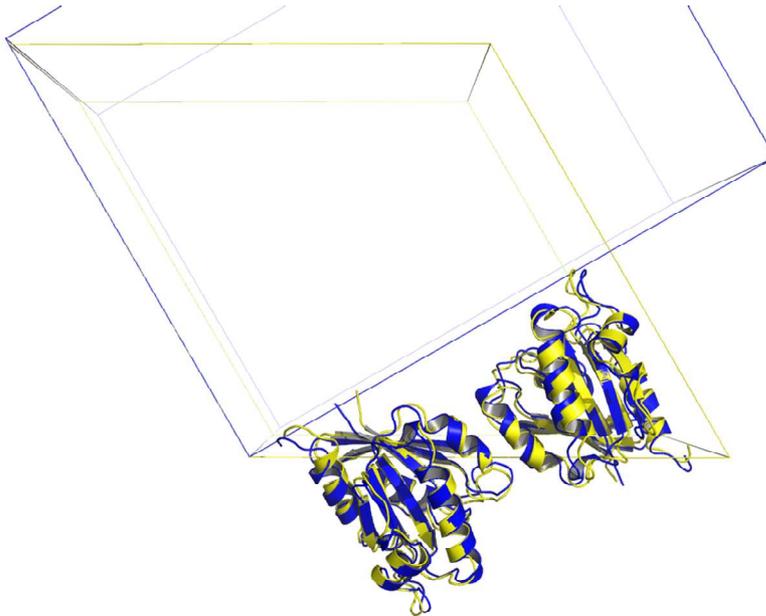


Abb. 2.15: Überlagerung der Elementarzellen beider Kristalle

blau: $P2_12_12_1$, orthorhombisch
gelb: $P6_5$, hexagonal

2.3.2 Biochemische Charakterisierung von His₆-Arf1NΔ17

2.3.2.1 Membranbindung und Dimerisierung an Membranen

Zuerst wurde überprüft, ob His₆-Arf1NΔ17 an Liposomen binden kann. Werden Liposomen einer Golgi-ähnlichen Lipidzusammensetzung (Golgi-like-Mix mit 3 mol% p23-Lipopeptid) verwendet, bindet His₆-Arf1NΔ17 nicht an diese (vgl. Spur 6 und 8 in Abb. 2.16). Zugabe von nickelhaltigen Lipiden zum Golgi-like-Mix (5 mol% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl] (Nickelsalz)) führt jedoch dazu, dass His₆-Arf1NΔ17cys über seinen His-Tag mit den Ni-Lipiden interagieren kann, was zu einer stabilen Membranassoziation führt, wie Flotationsexperimente (s. Spur 10 und 12 in Abb. 2.16) zeigten. Dabei bindet die monomere Form genauso stark wie die dimere Form, wie aus der gleich starken Intensität der Banden in Spur 10 und Spur 12 hervorgeht. Diese Membranassoziation ist unabhängig vom gebundenen Nukleotid, da sie über den His-Tag erfolgt. Das gleiche Ergebnis wurde für His₆-Arf1NΔ17cysY35A erzielt (nicht gezeigt).

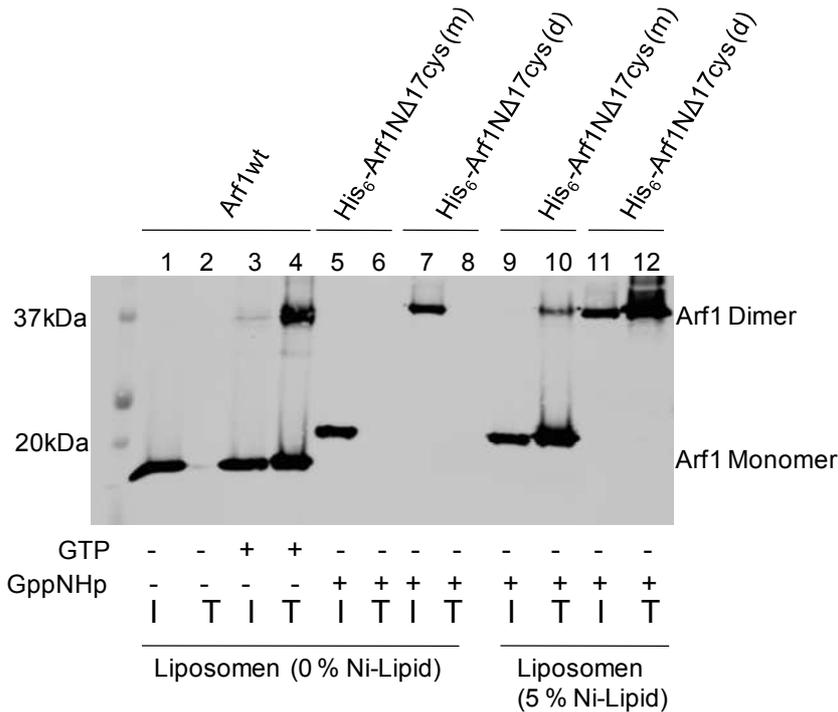


Abb. 2.16: Bindung von His₆-Arf1NΔ17cys an Liposomen

Es wurden Liposomen mit und ohne Nickellipid verwendet (Zusammensetzung s. 4.3.9).

2 % des Probenmaterials nach Inkubation für 15 min bei 37°C (I) und 10 % des lipidgebundenen Materials nach Sucroседichtegradientenzentrifugation (T) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot gegen Arf1-Antikörper (antiArf-CT1849) analysiert.

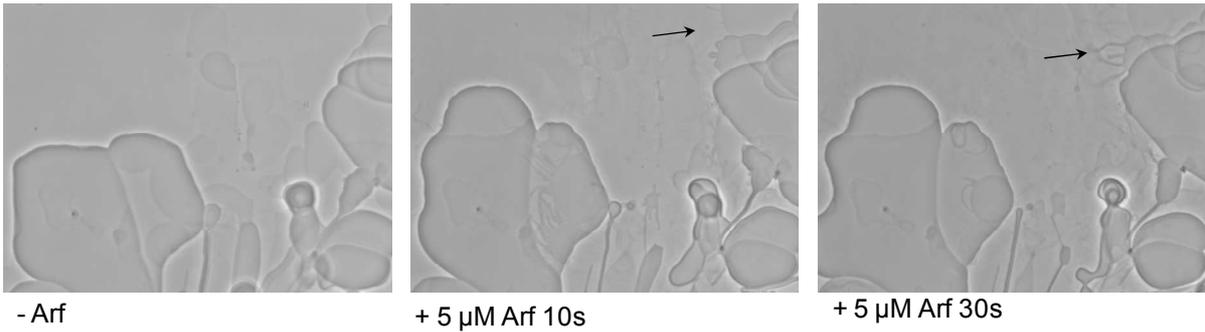
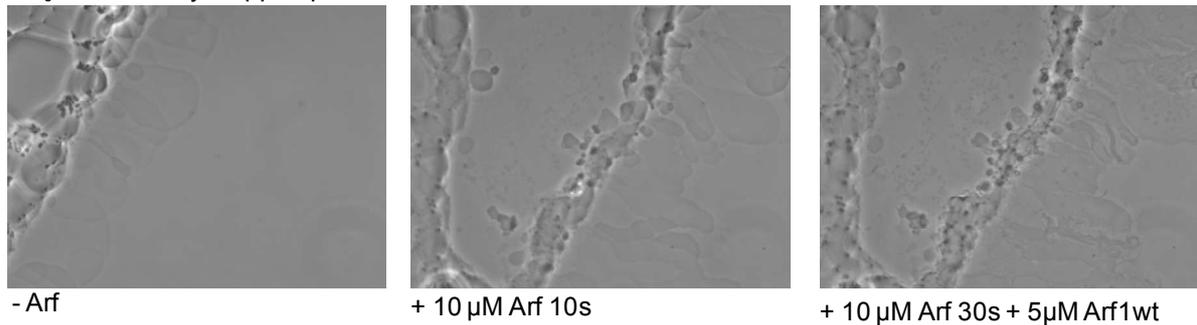
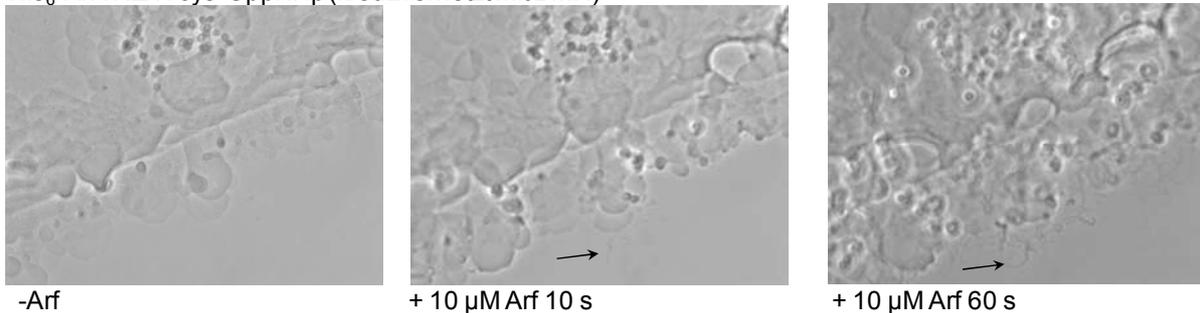
(d): Dimer; (m): Monomer

2.3.2.2 Membranoberflächenaktivität

Es stellte sich die Frage, ob die His₆-Arf1NΔ17-Konstrukte ebenso wie Arf1wt die Fähigkeit besitzen, Membranen zu deformieren. Dazu wurde auf ein System zurückgegriffen, das Dr. Rainer Beck in seiner Dissertation optimiert hat und das unter 4.3.11 beschrieben ist. Hierbei wird ausgenutzt, dass Arf1 unter GTP-Bedingungen bei Vorhandensein des GEFs ARNO Tubuli aus flachen Membranen bilden kann. Diese Membranoberflächenaktivität wird jedoch nicht im Falle der nicht dimerisierenden Mutante Arf1Y35A beobachtet und kann wieder hergestellt werden, wenn diese Mutante chemisch quervernetzt wird (Beck *et al.*, 2011). Damit konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von Arf1 notwendig ist für dessen Membranoberflächenaktivität.

Für monomeres His₆-Arf1NΔ17 wurde ebenfalls keine Membrandeformation beobachtet. Wird jedoch chemisch quervernetztes His₆-Arf1NΔ17cys oder His₆-Arf1NΔ17cysY35A eingesetzt, kann Tubulierung beobachtet werden, wenn die Konzentration doppelt so hoch ist wie beim Vollängen-Arf1wt.

Arf1wt + GppNHp

His₆-Arf1NΔ17cys*GppNHp monomerHis₆-Arf1NΔ17cys*GppNHp (kreuzvernetzt mit BMH)**Abb. 2.17: Membranoberflächenaktivität von Arf1**

Zum Golgi-like-Mix wurden 1 mol% PI(4,5)P₂ und 5 mol% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl] (Nickelsalz) gegeben und die getrocknete Lipidschicht unter dem Mikroskop durch Zugabe von HKM-Puffer, der das GEF ARNO und 1 mM GTP enthielt, hydratisiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Arf1 gestartet. Die Pfeile zeigen auf ausgewählte sich bildende Tubuli.

2.3.2.3 COPI-Vesikelbildung und Rekrutierung des Coatmerkomplexes

Zur weiteren biochemischen Analyse des His₆-Arf1NΔ17-Konstruktes wurde dessen Fähigkeit der COPI-Vesikelbildung untersucht. Dazu wurden COPI-Vesikel über eine Sucrosedichtegradientenzentrifugation angereichert (s. 4.3.13) und mittels Western-Blot und Elektronenmikroskopie (Negativkontrastierung) analysiert. In diesen Experimenten (Western-Blot: s. Abb. 2.18) konnten freie COPI-Vesikel nur mit

Vollängen-Arf1wt, nicht jedoch mit den His₆-Arf1NΔ17cys-Konstrukten angereichert werden (vgl. Spur 4, 6 und 8 in Abb. 2.18). Dabei spielt es keine Rolle, ob His₆-Arf1NΔ17cys in monomerer oder dimerer Form vorliegt, wie aus dem Vergleich der Spuren 6 und 8 in Abb. 2.18 hervorgeht. Als Kontrolle dienten je ein Ansatz ohne Coatomer und ohne Arf1, um zu überprüfen, ob an Liposomen gebundenes His₆-Arf1NΔ17cys oder Coatomer im Sucrosegradienten die gleiche Schwimmdichte hat wie COPI-Vesikel und damit ein falsch positives Signal hervorrufen könnte.

Elektronenmikroskopische Bilder sind nicht gezeigt, da keine COPI-Vesikel zu sehen waren und andere Membranstrukturen über die verwendete Methode nicht angereichert werden.

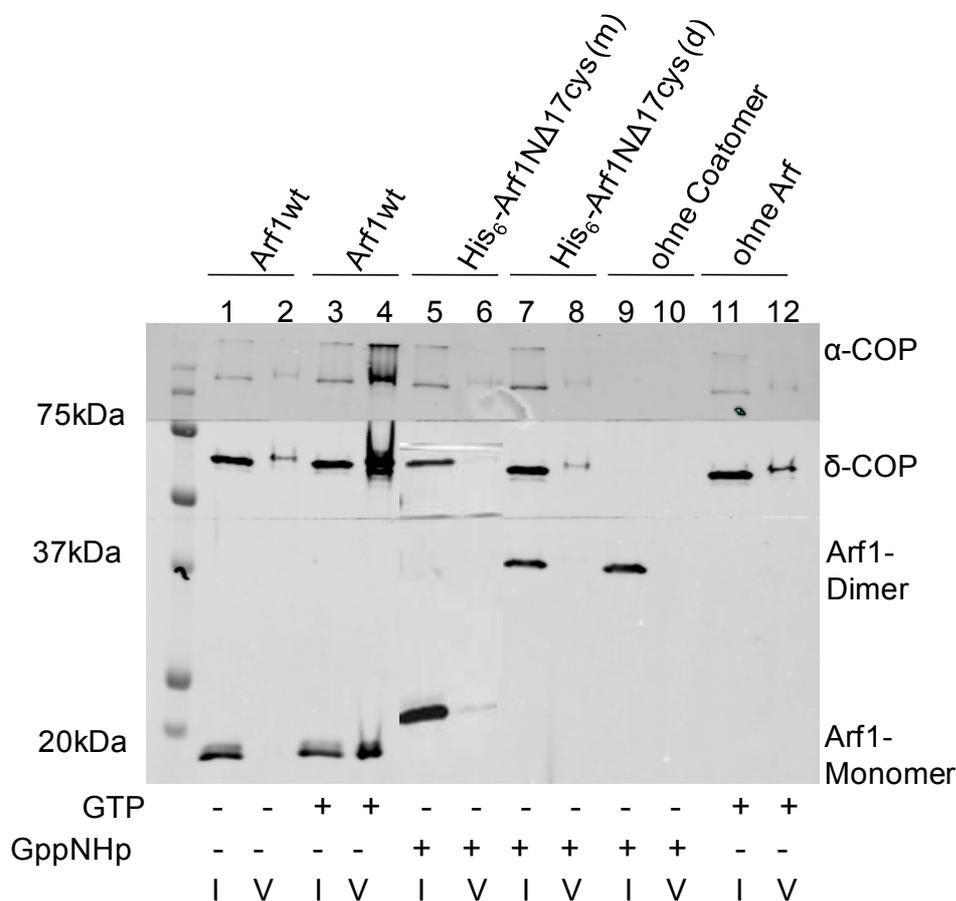


Abb. 2.18: *in-vitro*-Rekonstitution freier COPI-Vesikel

Liposomen (Zusammensetzung s. 4.3.9) wurden mit 50 µg rekombinatem Coatomer, 5 µg Arf1wt oder 10 µg His₆-Arf1NΔ17cys (Monomer oder Dimer), ARNO, mit oder ohne GTP für 15 min bei 37°C inkubiert und 1% des Materials auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Sucrosedichtegradientenzentrifugation wurden 50% der COPI-Vesikel enthaltenden Fraktion mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western-Blot mit Arf- (antiArf-CT1849), δ-COP (antiδ-COP877)- und α-COP (antiαCOP1409) -spezifischen Antikörpern analysiert.

Da die His₆-Arf1NΔ17cys-Konstrukte nicht fähig sind, freie COPI-Vesikel zu bilden, stellte sich die Frage, ob sie Coatomer zur Membran rekrutieren können und ob

Membrandeformationen auftreten. In COPI-Vesikeln wird die Krümmung des Vesikels durch Coatomer bestimmt, welches aber von Arf1 zur Membran rekrutiert werden muss.

Bisher ist noch nicht bekannt, welche Rolle die Dimerisierung und die amphiphile N-terminale α -Helix bei der Rekrutierung des Coatomerkomplexes spielen. Einblicke in die Einflüsse der N-terminalen α -Helix auf die Coatomerrekrutierung könnten durch Versuche mit His₆-Arf1N Δ 17cys gewonnen werden.

Dazu wurden Liposomen mit Kaninchenleber-Coatomer, Volllängen-Arf1wt oder His₆-Arf1N Δ 17cys in monomerer oder dimerer Form inkubiert, zentrifugiert und mittels Harzeinbettung für die elektronenmikroskopische Analyse vorbereitet. Insgesamt wurden ca. 200 μm^2 pro Probe analysiert; ausgewählte Bilder sind in Abb. 2.19 gezeigt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass Arf1wt freie COPI-Vesikel bildet (oben links), die das gleiche Aussehen wie die von C. Reinhard (Reinhard *et al.*, 2003) beobachteten haben.

Unter Verwendung von His₆-Arf1N Δ 17cys-Monomer wurden keine freien COPI-Vesikel gesehen, was das oben beschriebene Ergebnis bestätigt. Im Falle des His₆-Arf1N Δ 17cys-Dimers dagegen wurden vereinzelt COPI-Vesikel beobachtet. Da es sich jedoch um zweidimensionale Schnitte dreidimensionaler Proben handelt, könnte es sein, dass es sich nicht um freie Vesikel, sondern um Abknospungen oder die Spitzen länglicher schmaler Liposomen handelt. Deformationen der Liposomen können im Laufe der Probenprozessierung auftreten. Auffällig in beiden Proben (His₆-Arf1N Δ 17cys-Monomer und -Dimer) sind die unscharfen Ränder der Liposomen, die z. T. deutlich breiter sind als in Abwesenheit von Coatomer (vgl. Abb. 2.19 oben rechts mit unten links und rechts). Außerdem stehen an vielen Stellen kleine Spitzen senkrecht von den proteinummantelten Liposomen ab, die den Spitzen der COPI-Vesikel, die mit Arf1wt gebildet wurden, sehr ähnlich sind (vgl. Pfeile). Die deutlich breiteren Liposomenränder sind in der Probe, die kein Coatomer, sondern nur His₆-Arf1N Δ 17cys enthielt, nicht zu finden, wie der Vergleich der Bilder in Abb. 2.19 (oben rechts ohne Coatomer, unten mit Coatomer) verdeutlicht.

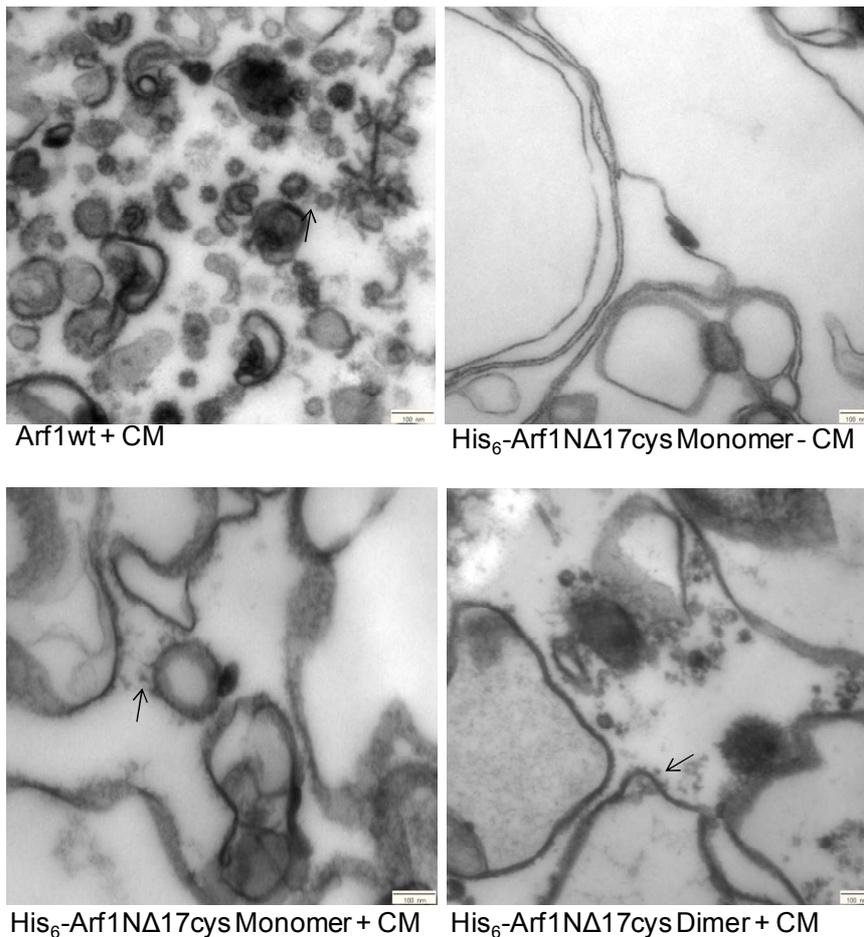


Abb. 2.19: Elektronenmikroskopische Analyse der Rekrutierung des Coatamerkomplexes durch Arf1

Die Arf1-vermittelte Rekrutierung von Coatamer (CM) an Membranen wurde mit Liposomen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Arf1wt, als Negativkontrolle eine Probe, die kein Coatamer enthielt (oben). Ansätze mit monomerem und dimerem His₆-Arf1NΔ17cys sind in der unteren Reihe dargestellt.

Maßstab: 100 nm

2.3.2.4 Coatamerrekrutierung und Thermolysinverdau

Das in 2.3.2.3 beschriebene Ergebnis legt nahe, dass His₆-Arf1NΔ17cys sowohl in monomerer als auch in dimerer Form in der Lage ist, Coatamer an die Membran zu rekrutieren. Da jedoch weder die Bildung freier COPI-Vesikel noch die Bildung von in der Knospung arretierten Vesikeln beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, in welcher Konformation Coatamer an die Membran rekrutiert wird.

Aus Arbeiten von C. Reinhard (Reinhard *et al.*, 1999) ist bekannt, dass Coatamer, wenn es an p23-Dimere bindet, in einer anderen Konformation vorliegt als lösliches Coatamer. Die gleiche Konformation wie p23-gebundenes Coatamer hat auch Coatamer in COPI-Vesikeln. Als Methode wurde der von C. Reinhard etablierte

proteolytische Verdau mit Thermolysin angewandt (s. 4.3.13). Dazu wurden Liposomen, die 3 mol% p23-Lipopeptid und 5 mol% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl](Nickelsalz) enthielten, mit 50 µg Kaninchenlebercoatomer, 5 µg des Arf1-Konstruktes, 0,5 µg ARNO und 1 mM GTP inkubiert und liposomengebundenes Protein von nicht liposomengebundenem Protein mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation abgetrennt.

Damit konnte gezeigt werden, dass His₆-Arf1NΔ17cys in der Lage ist, Coatomer an Membranen zu rekrutieren.

Nach Zugabe von Thermolysin wurde für 30 min und 60 min bei 37°C inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blotting mit γR-Antikörper, da γ-COP die Untereinheit ist, mit der sowohl Arf1 als auch dimeres p23 interagiert. Das in Abb. 2.19 dargestellte Ergebnis zeigt für Arf1wt ein Bandenmuster, das dem von C. Reinhard beobachteten entspricht (vgl. Spur 5 in Abb. 2.20 und (Reinhard *et al.*, 1999)). Die Bandenmuster, die unter Verwendung von His₆-Arf1NΔ17cys erhalten wurden, weichen dagegen etwas ab. So ist die mit * gekennzeichnete Bande bei ca. 50 kDa im Ansatz mit Arf1wt nach 60 min fast vollständig proteolytisch gespalten (vgl. Spuren 5 und 6 in Abb. 2.20), während sie bei den His₆-Arf1NΔ17cys-Konstrukten noch kaum an Intensität verloren hat (vgl. Spuren 8 und 9 bzw. 11 und 12 in Abb. 2.20) Das Verhältnis der beiden mit ♦ gekennzeichneten Banden zwischen 30 kDa und 37 kDa ist ebenfalls unterschiedlich. Während im Ansatz mit Arf1wt nach 30 min die obere Bande deutlich stärker ist und nach 60 min Inkubation das Verhältnis umgekehrt, sind in den Ansätzen mit His₆-Arf1NΔ17cys beide Banden gleich stark. Die Signale beider Banden sind nach 60 min deutlich stärker, wobei sich das Verhältnis der Banden zueinander nicht verändert.

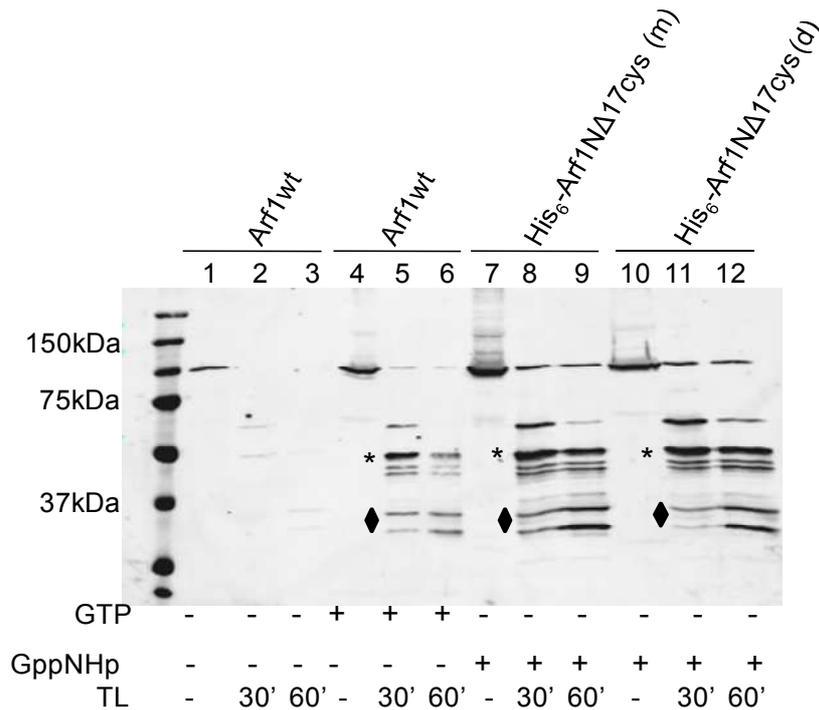


Abb. 2.20: Partieller proteolytischer Verdau von membranrekrutiertem Coatamer

Liposomen wurden mit Kaninchenlebercoatamer, ARNO, GTP und Arf1wt oder His₆-Arf1NΔ17cys inkubiert, liposomengebundenen Material mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation isoliert und mit der Protease Thermolysin partiell proteolytisch verdaut. Die Analyse des Gesamtansatzes (10 μl) erfolgte mittels Gradienten-SDS-PAGE (7,5 % - 15 %) und Western-Blotting mit Antikörper gegen γ-COP (anti-γR-Antikörper).

m: Monomer; d: Dimer

2.4 Reinigung von Vollängen-Arf1wt zur Kristallisation in Anwesenheit von Mizellen

Es wurde außerdem versucht, Vollängen-Arf1wt in der GTP-Form zu kristallisieren. Da die GTP-gebundene Form nicht löslich ist, wurden verschiedene Kombinationen von Detergentien getestet, um Mizellen zu bilden und den Nukleotidaustausch zu ermöglichen. Wie aus Arbeiten von Kahn und Randazzo bekannt, ist der Nukleotidaustausch von GDP zu GTP in Arf1 an Mizellen aus Dimyristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) und Natriumcholat möglich, erfolgt allerdings nicht zu 100 % (Kahn and Gilman, 1986).

Für die Kristallisationsansätze wurde Arf1wt wie unter 4.3.5 beschrieben gereinigt und seine Fähigkeit, in Anwesenheit von Detergenz zu GTP auszutauschen, mittels Tryptophan-Fluoreszenzmessungen untersucht. In Abb. 2.21 ist das *Screening*

verschiedener Detergentien dargestellt, wobei die Konzentration an Natriumcholat mit 0,023 mM konstant gehalten wurde und die anderen Detergentien in Konzentrationen oberhalb ihrer kritischen Mizellenkonzentration (CMC) eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle diente der Nukleotidaustausch an Liposomen einer Golgi-ähnlichen Zusammensetzung. Ein Vergleich des Verlaufs der schwarzen Kurve (Liposomen) mit der türkisfarbenen Kurve (0,3 mM DMPC; 0,23 mM Natriumcholat) zeigt, dass der Nukleotidaustausch an Bizellen vergleichbar dem Austausch an Liposomen ist. Die rote Kurve, die den Nukleotidaustausch an Mizellen aus DDM und Natriumcholat darstellt, erreicht das Fluoreszenzmaximum sogar schneller; d. h. der Nukleotidaustausch an Mizellen aus DDM/Natriumcholat erfolgt schneller als an Bizellen aus DMPC/Natriumcholat oder Liposomen. Außerdem ist in diesem Fall noch eine Aktivität von ArfGAP1 zu beobachten, bei Bizellen aus DMPC/Natriumcholat dagegen nicht.

Werden Mizellen aus LDAO/Natriumcholat, FosCholin/Natriumcholat oder C12E8/Natriumcholat gebildet, findet kein Nukleotidaustausch statt. Diese drei Detergentien bestehen vor allem aus Alkyl-Ketten und besitzen keine Ringstrukturen. Mizellen aus Octylglucosid/Natriumcholat oder C-MAL5/Natriumcholat führen zu einem partiellen Nukleotidaustausch; die Amplitude der Kurve ist nur halb so groß wie diejenige der Positivkontrolle des Nukleotidaustauschs an Liposomen. Wird CHAPS in Kombination mit Natriumcholat verwendet, erreicht die Kurve zwar das gleiche Niveau wie die Positivkontrolle, es dauert allerdings länger, was bedeutet, dass der Nukleotidaustausch langsamer abläuft.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Austausch zu GTP am besten an Mizellen aus DDM/Natriumcholat erfolgt.

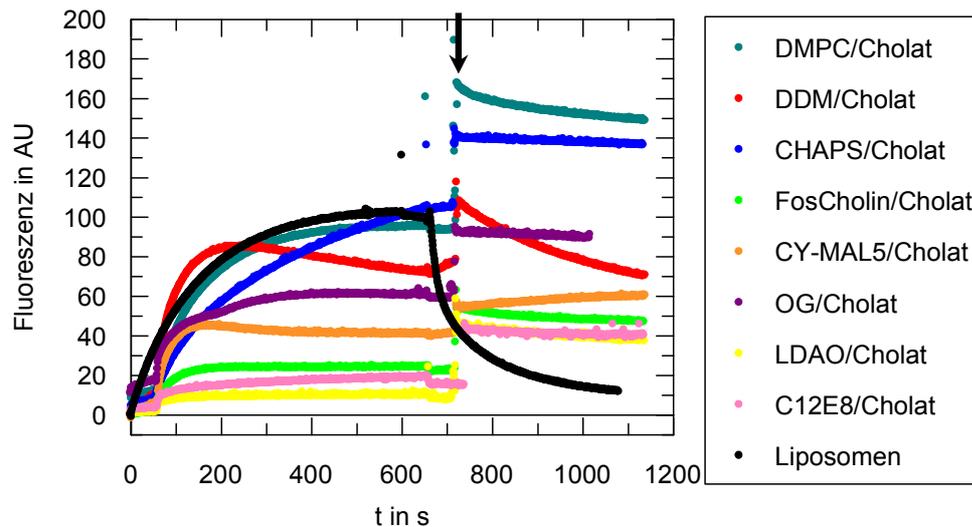


Abb. 2.21: Nukleotidaustausch zu GTP an Mizellen

Verschiedene Detergentien wurden mit Natriumcholat gemischt und in der Küvette vorgelegt. Nach Zugabe von $0,05 \mu\text{M}$ Arf1wt, $0,1 \text{ mM}$ GTP und 2 mM EDTA wurde der GTP-gebundene Zustand durch Zugabe von Magnesium stabilisiert und danach 50 nM ArfGAP1 zugegeben (Pfeil).

Da die Kristallisation in Anwesenheit von Mizellen häufig erfolglos bleibt, wurde der Nukleotidaustausch bei niedrigeren DDM-Konzentrationen untersucht, Dazu wurde die DDM-Konzentration auf $2/3$ ($0,1 \text{ mM}$ DDM) und $3/4$ ($0,112 \text{ mM}$ DDM) der CMC reduziert und der Nukleotidaustausch mittels Tryptophan-Fluoreszenz verfolgt. Die Konzentration an Natriumcholat wurde ebenfalls variiert. Die Variation letzterer hat keinen Einfluss auf den Nukleotidaustausch, wie Abb. 2.22 zu entnehmen ist. Die DDM-Konzentration muss dagegen oberhalb der CMC liegen, um einen vollständigen Nukleotidaustausch zu erzielen, wie der Vergleich der grünen Kurve ($0,5 \text{ mM}$ DDM) mit den blauen ($0,1 \text{ mM}$ DDM) und roten ($0,112 \text{ mM}$ DDM) Kurven zeigt.

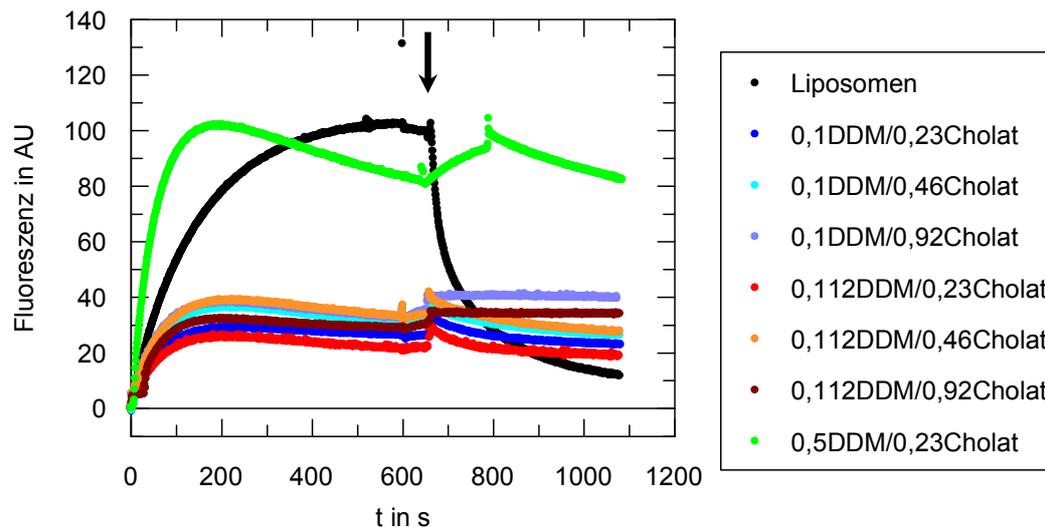


Abb. 2.21: Nukleotidaustausch zu GTP an Mizellen

Verschiedene Konzentrationen an DDM wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Natriumcholat gemischt und in der Küvette in Puffer vorgelegt. Nach Zugabe von 0,05 μ M Arf1wt, 0,1 mM GTP und 2 mM EDTA wurde der GTP-gebundene Zustand durch Zugabe von Magnesium stabilisiert und danach 50 nM ArfGAP1 zugegeben (Pfeil).

Die in der Legende angegebenen Konzentrationen (DDM/Cholat) sind mM.

Da eine DDM-Konzentration, die über der CMC liegt, für den Nukleotidaustausch notwendig ist, wurde der präparative Austausch für Kristallisationsansätze mit 0,5 mM DDM und 0,23 mM Natriumcholat durchgeführt. Als Nukleotid wurde das nicht spaltbare GTP-Analogon GppNHp eingesetzt.

Nach dem Nukleotidaustausch erfolgte eine größenausschlusschromatographische Trennung, um freies GppNHp abzutrennen. Dabei traten im Elutionsprofil (s. Abb. 2.23) zwei Signalgipfel auf, die beide Arf1wt enthielten, wie die Analyse mittels SDS-PAGE (s. Abb. 2.23 unten) ergab. Der sehr hohe Signalgipfel bei 16-22 ml entspricht freiem GppNHp. Die Fraktionen des ersten und zweiten Gipfels wurden getrennt voneinander vereinigt, konzentriert und die Nukleotidbeladung mittels HPLC überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Fraktionen des ersten Gipfels ausschließlich GppNHp enthielten, während die Fraktionen des zweiten Gipfels ausschließlich GDP enthielten.

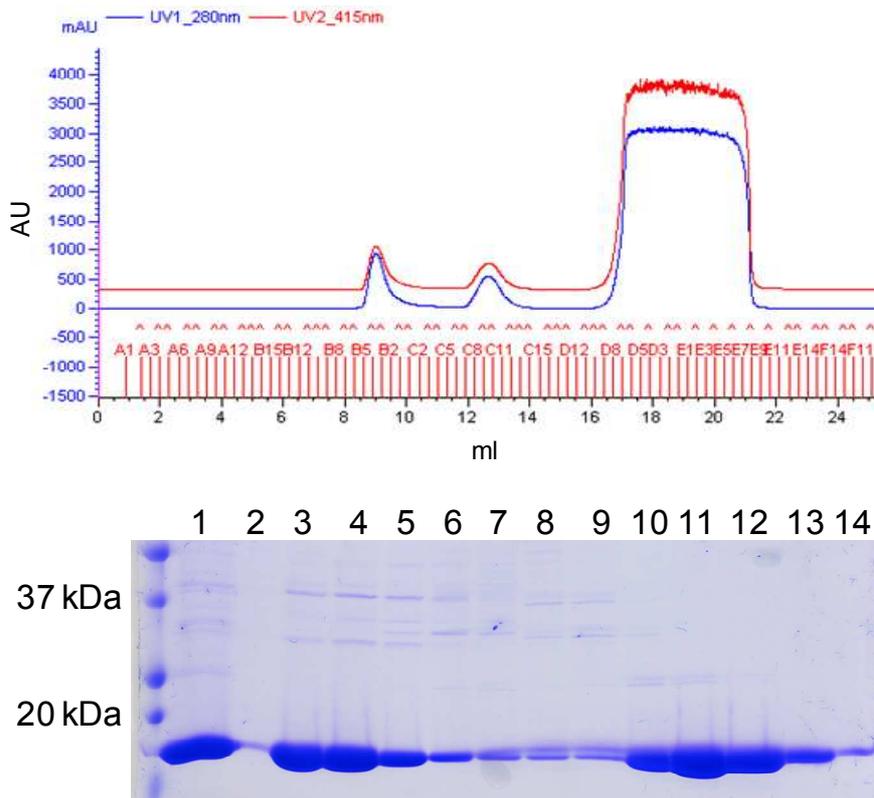


Abb. 2.10: Dimerisierung und Größenausschlusschromatographie von His₆-Arf1NΔ17

Die Größenausschlusschromatographische Trennung erfolgte über eine Superdex 75 (10/300)-Säule. Für die SDS-PAGE wurden 3 % von jeder Fraktion aufgetragen. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R 250.

Um überschüssiges Detergenz zu entfernen, wurde das GppNHp-gebundene Arf auf biobeads® (BIORad, München) gegeben und ÜN bei 4°C inkubiert. Die Ansätze, bei denen nach Zentrifugation bei 16000 g kein Präzipitat beobachtet wurde, wurden vereinigt und als Initialscreens der PEG-Screen und der Membrane-Gold-Screen (s. Tab. 5.1 im Anhang) angesetzt. Es wurden Tropfen von 200 nl Protein einer Konzentration von 12 mg/ml, die mit 200 nl Reservoirolösung gemischt wurden, angesetzt und bei 18°C gelagert. Da das Protein unter ca. 90 % der Bedingungen präzipitierte, wurde in einem zweiten Ansatz keine Inkubation mit Biobeads® (Biorad, München) durchgeführt, sondern das Protein mit der höheren Detergenzkonzentration im Membran-Gold-Screen in einer Konzentration von 7,5 mg/ml eingesetzt, wobei 300 nl der Proteinlösung mit 300 nl der Reservoirolösung gemischt wurden.

Es wurde jedoch keine Kristallisation beobachtet.

3. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Einblicke in die molekularen Details der COPI-Vesikelbiogenese gewonnen. So konnte die Rolle der Aminosäure Y35 für die Membranbindung und Dimerisierung von Arf1 analysiert werden.

Zur Analyse der Dimer-Interaktionsfläche wurde eine N-terminal verkürzte Arf1-Variante – Arf1NΔ17 – in ihrer GTP-gebundenen Form chemisch quervernetzt und kristallisiert; sie spiegelt jedoch nicht das aktive Arf1-Dimer wider. Da der N-Terminus von Arf1, der an Membranen bindet, auch eine Rolle bei der Dimerisierung spielen könnte, wurde an Vollängen-Arf1wt in Anwesenheit von Mizellen GDP zu GTP ausgetauscht und Kristallisationsversuche durchgeführt. Außerdem wurde die Rolle der amphiphilen N-terminalen α -Helix biochemisch untersucht.

3.1 Bedeutung der Aminosäure Tyrosin 35 für Arf1

Tyrosin35 ist in allen humanen Arfs und Arls sowie in Arfs vieler anderer Organismen (u.a. Säugern, Pflanzen, Hefe) konserviert (s. Sequenzvergleich Abb. 2.1). Die Mutation von Y35 zu Alanin führt dazu, dass Arf1 nicht mehr dimerisieren kann (Beck *et al.*, 2008). Die biochemische Charakterisierung ergab, dass Arf1Y35A Coatomer zu einem geringeren Maße rekrutiert als der Arf1 Wildtyp (ca. 20 %) und nicht an Membranen binden kann, wenn kein Coatomerkomplex vorhanden ist. In Anwesenheit von Coatomer werden zudem statt freier COPI-Vesikel vor der Abschnürung arretierte Knospen (im Folgenden: Rosetten) gebildet (Beck *et al.*, 2008).

Die Dimerisierung scheint also notwendig zu sein für die Coatomer-unabhängige Membranbindung von Arf1 und für die Abschnürung von COPI-Vesikeln. Da Tyrosin neben der aktiven Hydroxyl-Gruppe einen aromatischen Ring besitzt, könnten zwei Motive für die Dimerisierung und die Membranbindung von Arf1 von Bedeutung sein. Um zwischen diesen beiden Motiven zu unterscheiden, wurde die Mutante Arf1Y35F hergestellt und gereinigt. Die biochemische Charakterisierung ergab, dass Arf1Y35F ebenso wie Arf1wt in der Lage ist, Coatomer-unabhängig an Membranen zu binden und dort zu dimerisieren. Zudem können mit Arf1Y35F freie COPI-Vesikel generiert werden, die sich in ihrem Aussehen nicht von den mit Arf1wt generierten

unterscheiden (s. Abb. 2.4). Auch kinetische Untersuchungen der Geschwindigkeit des Nukleotidaustausches an Liposomen und der Rekrutierung von Coatomer, welche beide in Echtzeit beobachtet wurden (s. Abb. 2.5 und Abb. 2.6), zeigten keine Unterschiede zu Arf1wt.

Da Arf1Y35F Coatomer-unabhängig an Membranen binden kann und dort auch dimerisiert, ist für die Dimerisierung also eher der aromatische Ring als die Hydroxylgruppe entscheidend. Zwar ist die Kristallstruktur des aktiven Arf1-Dimers noch nicht bekannt; es kann jedoch angenommen werden, dass die Interaktion von Y35 bei der Dimerisierung nicht über Wasserstoffbrückenbindungen, sondern eher über π -Wechselwirkungen erfolgt. Somit gibt dieses Ergebnis einen Einblick in die Interaktionsfläche der Arf-Monomere bei der Dimerisierung.

Für die weitere Untersuchung des Mechanismus der Vesikelabschnürung ist die Mutante Arf1Y35F jedoch nicht geeignet, da sie zum einen in der Lage ist, freie COPI-Vesikel zu bilden und zum anderen keine kinetischen Unterschiede zum Wildtyp beobachtet werden. Da Tyrosin gegen Phenylalanin ausgetauscht werden kann, liefern diese Ergebnisse den wichtigen Hinweis, dass nicht eine spezifische Interaktion von Y35 z. B. mit Coatomer, sondern die Dimerisierung als solche notwendig ist zur Abschnürung von COPI-Vesikeln.

3.2 Struktur des quervernetzten Arf1N Δ 17

Aktives Arf1 ist ein Dimer (Beck *et al.*, 2008). Um zu verstehen, welche Rolle die Dimerisierung von Arf1 für dessen Membranoberflächenaktivität und die Biogenese von COPI-Vesikeln spielt, ist es notwendig, die Interaktionsflächen der beiden Monomere zu kennen. Daher sollte die Kristallstruktur von dimerem aktiven, d. h. GTP-gebundenen Arf1, bestimmt werden.

Bisher gibt es ein Modell des aktiven Dimers, das auf biochemischen Analysen beruht (Beck *et al.*, 2008). Bei der Erstellung des Modells wurden neben den bekannten Interaktionsflächen zu ArfGAPs und Coatomer massenspektrometrische Analysen eines tryptischen Verdaus von membrangebundenem Arf1-Dimer im Vergleich zu membrangebundenem Arf1-Monomer sowie die biochemischen Analysen zum Abstand der quervernetzten Cysteine berücksichtigt (Beck *et al.*,

2008). Außerdem müssen N- und C-Terminus zur Membran orientiert sein. In diesem Modell interagieren die beiden Monomere über ihre Vorderseiten miteinander.

Da Arf1 in der GTP-gebundenen Form nicht löslich ist, wurde eine N-terminal verkürzte Variante – Arf1N Δ 17 – als Konstrukt mit einem N-terminalen His-Tag gereinigt, das gebundene Nukleotid zu dem nicht spaltbaren GTP-Analogen GppNHp ausgetauscht, zwei Monomere über ihre C-Termini durch Zugabe der homobifunktionalen Quervernetzer BMH oder BMOE chemisch kovalent verknüpft und zu Kristallisationsversuchen angesetzt.

Nach einem ersten Kristallisationserfolg, dessen Kristalle jedoch nur schlecht streuten, wurde in Verfeinerungs-Screens unter sich ähnlichen Bedingungen Kristallwachstum beobachtet, wovon jedoch nur zwei Kristalle mit einer ausreichend guten Auflösung von 2,5 Å (Raumgruppe P2₁2₁2₁) bzw. 2,6 Å (Raumgruppe P6₅) streuten. Beide Kristalle entstammen Protein, das mit BMOE quervernetzt worden war. Durch Analyse eines kleinen Kristallstücks mittels SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Kristallen um dimeres Arf1N Δ 17 handelt. Mit BMH quervernetztes Protein kristallisierte zwar auch, die Kristalle streuten jedoch schlechter (bis 8 Å).

Der C-Terminus von Arf1 ist ungeordnet. Möglicherweise ist der C-Terminus von mit BMOE (11 Å) dimerisiertem His₆-Arf1N Δ 17 weniger flexibel als von mit BMH (16 Å) quervernetztem, was zu einer besser geordneten Packung der Moleküle im Kristall führt.

Die Flexibilität des C-Terminus erklärt, weshalb hier bei der Lösung der Kristallstruktur keine Elektronendichte beobachtet wurde. Die Position der letzten zwei bis drei C-terminalen Aminosäuren konnte nicht eindeutig bestimmt werden und somit auch nicht die Position des Quervernetzers. Das hat zur Folge, dass nicht eindeutig bestimmt werden kann, welche Monomere im Kristall chemisch kovalent verbunden sind. In Abb. 2.13 ist die Anordnung der einzelnen Monomere im Kristall der Raumgruppe P2₁2₁2₁ dargestellt.

Die Betrachtung der Anordnung der Proteine im Kristall zeigt in beiden Kristallen, dass die Arf-Moleküle helikale Stränge bilden, von denen zwei so miteinander verwunden sind, dass sich eine antiparallele doppelhelikale Struktur bildet. Daher musste überprüft werden, ob die beiden Kristallstrukturen miteinander symmetrieverwandt sind, d.h. ob die ähnliche Anordnung der Moleküle in beiden Kristallen auf die Kristallpackung zurückzuführen ist. Die Analyse der Raumgruppen

ergab, dass die beiden Raumgruppen $P2_12_12_1$ und $P6_5$ symmetrieverwandt sind; eine Achse der Einheitszelle hat in beiden Fällen die gleiche Länge. Wie aus Abb. 2.14 ersichtlich, sind die Moleküle des Kristalls der Raumgruppe $P2_12_12_1$ (blau) genauso angeordnet wie die Moleküle des Kristalls der Raumgruppe $P6_5$ (gelb). Die Unterschiede im Bereich von Schleifen sind darauf zurückzuführen, dass die hexagonale Raumgruppe $P6_5$ eine höhere Symmetrie aufweist als die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12_1$, was eine exaktere Bestimmung der Positionen der einzelnen Atome ermöglicht.

Aufgrund der gleichen Anordnung der Moleküle in beiden Kristallen wurden die weiteren Analysen nur im hexagonalen Kristall durchgeführt.

Da zwei Moleküle von His₆-Arf1NΔ17 miteinander chemisch dimerisiert wurden, wurden die verschiedenen Kombinationen von Dimeren gesucht. Zum einen können zwei Monomere einer Helix, also innerhalb eines Strangs, miteinander dimerisieren (dargestellt in Abb. 3.1, A), zum anderen zwei Monomere aus den beiden miteinander verwundenen Strängen (Abb 3.1, B). Die dritte Möglichkeit ist die Quervernetzung von zwei Monomeren zweier benachbarter Doppelhelices. Diese letzte Möglichkeit kann jedoch nicht vorliegen, da die Abstände der C-Termini zu groß sind, als dass die C-Termini mit BMOE kovalent verknüpft sein könnten.

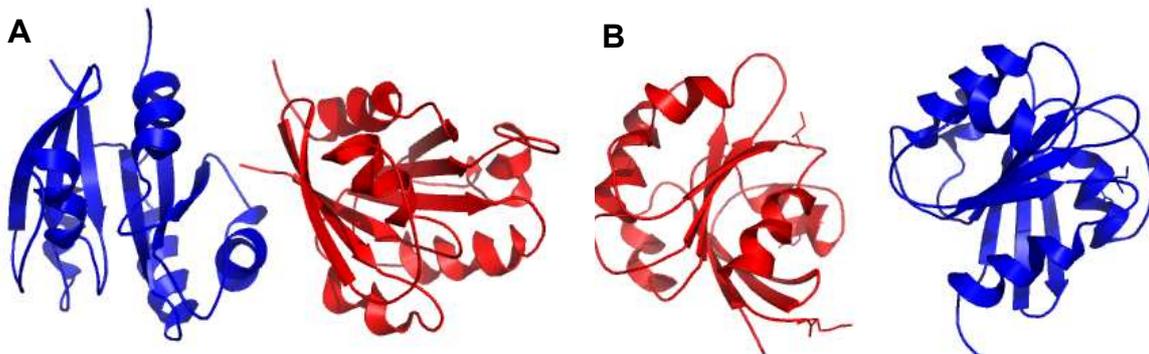


Abb. 3.1: Darstellung möglicher His₆Arf1NΔ17-Dimere

Kristall der Raumgruppe $P6_5$

A: Dimer aus Monomeren innerhalb einer Helix; B: Dimer aus Monomeren der beiden zu einer Doppelhelix verwundenen Stränge

Aus der Überlagerung mit dem Modell (s. Abb. 3.2) wird ersichtlich, dass das linke Dimer (A) orthogonal zum Modell orientiert ist, während das rechte Dimer (B) die gleiche Orientierung hat. Bedingt durch die Interaktion der Vorder- mit der Rückseite im Kristalldimer, liegt das eine Monomer (blau) genau spiegelverkehrt zum Modell, in

welchem die Monomere über ihre Vorderseiten miteinander in Wechselwirkung treten.

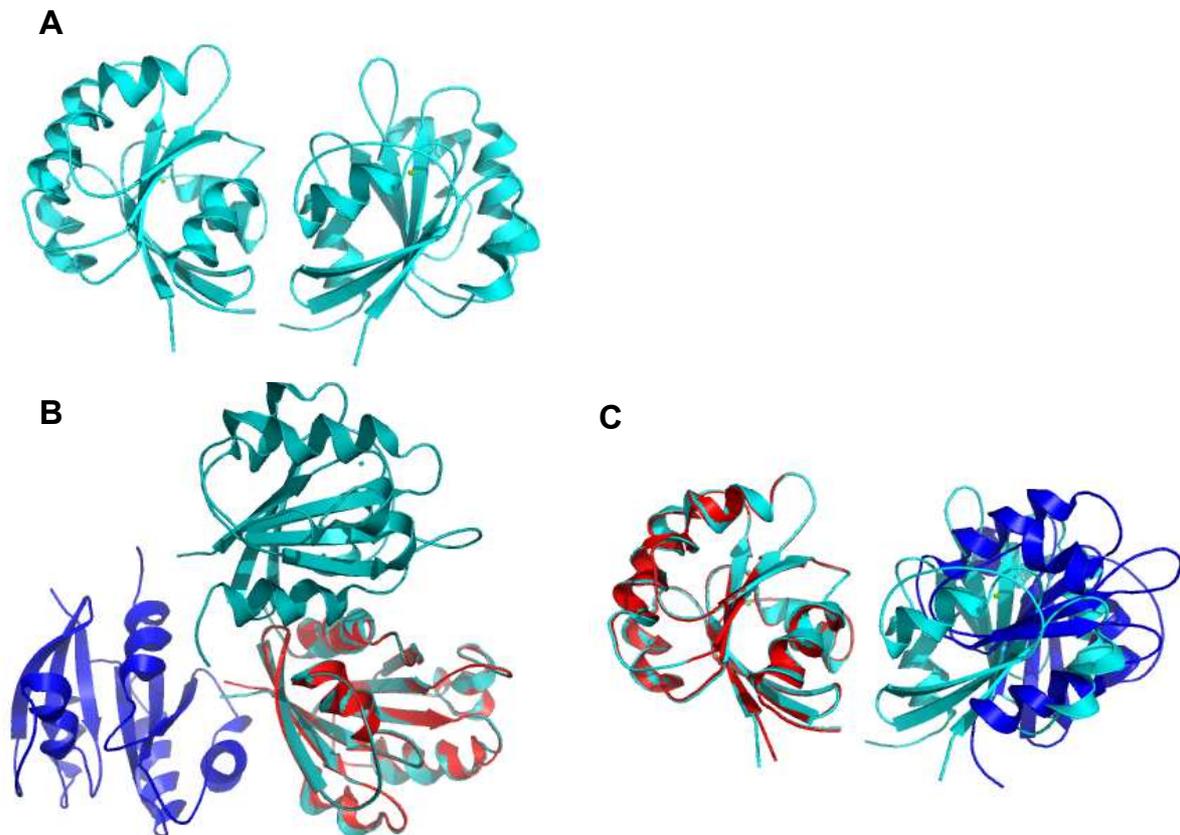


Abb. 3.2: Darstellung möglicher His₆Arf1NΔ17-Dimere überlagert mit dem Modell des aktiven Arf1-Dimers

A: Modell in der gleichen Orientierung wie in C

B: Dimer innerhalb eines Helixstrangs; rot/blau: Kristalldimer; cyan: Modell;

C: Dimer aus Monomeren der beiden zu einer Doppelhelix verwundenen Stränge; rot/blau: Kristalldimer; cyan: Modell;

Da es sich um ein Modell handelt, das mit der Struktur überlagert wurde, war zu überprüfen, ob das Kristalldimer physiologisch relevant sein kann und abzuwägen, ob es besser als das Modell das aktive Dimer widerspiegelt.

Die Analyse der Positionen der mit Coatomer interagierenden Aminosäuren I46, I49 und Y167 ergab in beiden möglichen Kristalldimeren, dass alle drei Aminosäuren an der Oberfläche liegen und somit die Interaktion mit Coatomer ermöglichen, was eine physiologische Relevanz der Struktur nicht ausschließt.

Zudem ist die Interaktionsoberfläche in beiden möglichen Kristalldimeren spezifisch für aktiviertes Arf1, da der an der Dimerkontaktfläche beteiligte *Interswitch*-Bereich, wie er in der GDP-Form vorliegt, mit einer Helix des Nachbarmoleküls

zusammenstoßen würde. Dies lässt vermuten, dass die *Interswitch*-Region an der Dimerisierung beteiligt ist. Dafür spricht, dass die beiden *Interswitch*-Bereiche bei Austausch von GDP zu GTP ein intermolekulares β -Faltblatt bilden könnten, wie es im Modell der Fall ist. Zudem sind die durch den Nucleotidaustausch hervorgerufenen Konformationsänderungen in diesem Bereich – das Hochschieben um 2 Aminosäuren, was 7 - 8 Å entspricht (Goldberg, 1998; Pasqualato *et al.*, 2002) – sehr groß.

Vermessen der Abstände der Serine159 (äquivalent zu Cys159 im Wildtyp) zwischen den Monomeren, die chemisch quervernetzt sein könnten, ergaben Längen von 33 - 40 Å. Dieser Abstand ist zu groß, als dass er dem Abstand im physiologisch aktiven Dimer entsprechen könnte, der biochemisch zu einer Länge von ca. 16 Å (+/-2 Å) bestimmt wurde (Beck *et al.*, 2008).

Die Bestimmung der Position der Tyrosine 35 ergab, dass immer nur ein Tyrosin35 am Rande der Interaktionsoberfläche lokalisiert ist. Da Y35 für die Dimerisierung essentiell ist (Beck *et al.*, 2008), sollten in einem physiologisch relevanten Dimer beide Y35 in der Interaktionsoberfläche liegen. Da dies nicht der Fall ist, sprechen die Positionen von Y35 gegen eine physiologische Relevanz der Struktur.

Zudem interagieren beide Monomer-Kombinationen über die Vorderseite des einen Monomers mit der Rückseite des anderen Monomers, was zu einer endlosen helikalen Anordnung führt.

Zusammengenommen deuten diese Befunde und Überlegungen darauf hin, dass die hier gefundene Struktur des quervernetzten Dimers von His₆-Arf1N Δ 17 nicht dem physiologisch aktiven Dimer entspricht.

Es muss also davon ausgegangen werden, dass es durch die chemische Quervernetzung der C-Termini nicht zur Bildung des aktiven Dimers kommt, sondern nur zwei Arf-Moleküle durch die chemische Verbindung in räumliche Nähe gebracht werden. Das aktive membrangebundene Arf1-Dimer ist aus sterischen Gründen nur in der GTP-beladenen, nicht aber in der GDP-beladenen Form möglich. Da Vollängen-Arf1, in dem das C-terminale Lysin zu Cystein mutiert worden war, in seiner GDP-gebundenen Form chemisch quervernetzbar ist, kann die chemische Quervernetzung nicht zur Ausbildung des aktiven Arf1-Dimers führen.

Es bleibt die Frage, wie sich nun die helikale Struktur erklären lässt.

Bei der Kristallisation von Proteinen kann eine artifizielle Oligomerisierung auftreten, die auf die Packung der Moleküle im Kristall zurückzuführen ist. Wird die gleiche räumliche Anordnung der Moleküle in zwei nicht symmetrieverwandten Raumgruppen beobachtet, ist es recht wahrscheinlich, dass die Struktur physiologisch relevant ist. Im Fall von quervernetztem His₆-Arf1NΔ17 liegt jedoch eine Symmetrieverwandtschaft vor, was die physiologische Relevanz unwahrscheinlicher macht.

Andererseits wurden in Cryo-EM-Experimenten mit GUVs (*giant unilamellar vesicles*) und Vollängen-Arf1 unter GppNHp-Bedingungen rigide helikale Tubuli beobachtet, die einen Durchmesser von 100 Å-400 Å aufwiesen (J. Briggs, EMBL; persönliche Mitteilung). Wäre die in den Kristallen beobachtete antiparallele Doppelhelix, die einen Durchmesser von ca. 90 Å besitzt, etwas dehnbar, bestünde die Möglichkeit, dass sie die Membrandoppelschicht umschließt. Dafür spricht auch, dass die N- und C-Termini aller Monomere ins Innere der Doppelhelix zeigen, also der Membran zugewandt wären, wenn die Doppelhelix diese umschlüsse.

Für eine bakterielle Dynamin ähnliche GTPase (BDLP: *Bacterial Dynamin Like Protein*) wurde beobachtet, dass sie Tubuli bildet, die eine Lipiddoppelschicht umschließen (Low *et al.*, 2009). Dabei interagieren die Spitzen einer Paddel-artigen Domäne mit der äußeren Lipidschicht der Lipiddoppelschicht, wodurch eine Krümmung erzielt wird. Hierbei ist allerdings noch nicht geklärt, ob Strukturen im Protein in die äußere Lipidschicht der Membran inserieren, wie es für Arf1 angenommen wird (Antonny *et al.*, 1997), oder ob die Lipiddoppelschicht einfach zusammengedrückt wird (Low *et al.*, 2009). Die Polymerisation von BDLP erfolgt unter anderem über seine GTPase-Domäne, wodurch Tubuli entstehen, deren Zentrum die Lipiddoppelschicht bildet (Low *et al.*, 2009).

Die lichtmikroskopisch beobachtete Tubulierung (vgl. 2.3.2.2, 3.3) lässt sich dagegen nicht mit der Hypothese erklären, dass die Arf-Doppelhelix die Membran umschließt, da der Durchmesser der hierbei beobachteten Tubuli mehr als 20fach größer ist und die Tubuli nicht rigide sind. Hier wäre es dagegen möglich, dass sich entweder die Arf-Doppelhelix oder eine einfache Helix ähnlich wie die Dynamin-Helix um Membranen windet. Für Dynamin wurde beobachtet, dass sich Helices aus Dynaminoligomeren bei der Tubulierung von Lipiden um diese wickeln (Roux *et al.*,

2006). Lange mit Dynamin umwickelte Tubuli werden jedoch nur *in vitro* beobachtet, nicht *in vivo* (Ramachandran, 2011).

Arf1 könnte ebenfalls oligomerisieren und sich in einer ähnlichen Weise um Membranen winden.

Die Kristallstruktur zeigt deutlich, dass die chemische Quervernetzung nicht die Bildung eines Dimers induziert. Die kovalente Verknüpfung führt nur dazu, dass zwei Arf-Moleküle aufgrund der chemischen Bindung über ein sehr kurzes (11 Å-16 Å) Verbindungsstück in räumliche Nähe gebracht werden. Da jedoch die N-terminal verkürzte Variante von Arf1 verwendet wurde, ist es durchaus möglich, dass die N-terminalen α -Helices bei der Ausbildung eines Dimers eine Rolle spielen. Ein Indiz dafür könnte sein, dass im Kristall Interaktionen zwischen den – allerdings nicht nativen – N-Termini einzelner Monomere zu beobachten sind, die über die Hauptketten der Polypeptide erfolgen, sodass diese Interaktionen unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung sind und möglicherweise auch zwischen nativen N-Termini auftreten können.

Eine NMR-Struktur von Hefe-Arf1*GTP an Bizellen zeigt eine hohe Beweglichkeit des N-Terminus (Liu *et al.*, 2010), was die Möglichkeit der Interaktionen zweier N-Termini offen lässt. Aussagen hierzu oder zu einer möglichen Dimerisierung werden nicht getroffen.

3.3 Einfluss des Myristoyl-Ankers und der Dimerisierung auf die Membranbindung von Arf1

Die Membranverankerung von Arf1 ist auf spezifische Interaktionen des N-Terminus des Proteins zurückzuführen, da eine N-terminal verkürzte Variante, die einen His-Tag statt des nativen N-Terminus besitzt, nicht an Membranen bindet. Ebenso bindet nicht-myristoyliertes Arf1 nicht an Membranen (s. 2.2; (Antonny *et al.*, 1997)). Dabei beruht die stabile Verankerung von Arf1 in der Membran nicht allein auf dem Myristoyl-Anker, der im Vergleich zu anderen *in vivo* relevanten Lipidmodifikationen (Farnesylierung, Palmitoylierung, Geranyl-Geranylierung) am wenigsten hydrophob ist (Shahinian and Silviu, 1995), sondern auch auf direkten Interaktionen der N-terminalen Aminosäuren I4, F5 (Krauss *et al.*, 2008), L8 und F9 (Antonny *et al.*, 1997) mit Membranlipiden. Dies konnte durch Mutagenesestudien, in denen für alle

Mutationen eine deutlich schlechtere oder gar keine Interaktion von Arf1 mit Liposomen beobachtet wurde, gezeigt werden (Antonny *et al.*, 1997; Krauss *et al.*, 2008). Ein einziger Myristoyl-Anker ist zu schwach, um eine stabile Membranassoziation zu bewirken; die Dissoziationsrate liegt in der Regel im Sekunden-Bereich, während die Dissoziationsraten von über zwei Lipidanker verankerten Peptiden im Bereich von Stunden liegen (Shahinian and Silvius, 1995). Die Membranverankerung von Arf1, die im Minutenbereich liegt (Antonny *et al.*, 1997), spiegelt somit weder die eine noch die andere Situation wider. Die Beobachtung, dass die chemisch quervernetzte Mutante Arf1Y35A an Liposomen bindet und chemisch quervernetztes Arf1wt eine höhere Avidität hat als nicht quervernetztes Arf1wt (Experimente von Dr. Petra Diestelkötter-Bachert), lässt vermuten, dass dimeres Arf1 für die stabile Membranverankerung notwendig ist, weil – ähnlich wie für Ras-Proteine – zwei Membrananker benötigt werden, hier die Myristoyl-Anker der beiden Arf1-Monomere.

3.4 Einfluss der Dimerisierung und der N-terminalen α -Helix auf die Membranoberflächenaktivität von Arf1

Von der nicht dimerisierenden Mutante Arf1Y35A ist bekannt, dass sie im Gegensatz zu Arf1wt nicht in Abwesenheit von Coatomer an Membranen bindet und somit auch keine Membranoberflächenaktivität aufweisen kann (Beck *et al.*, 2008).

Im Rahmen der Arbeiten zu (Beck *et al.*, 2011) war das interne Cystein159 in Arf1wt und Arf1Y35A zu einem Serin und das C-terminale Lysin zu einem Cystein mutiert worden (im Folgenden: Arf1cys, Arf1cysY35A). Diese Mutanten lassen sich über ihre C-terminalen Cysteine mit dem thioispezifischen homobifunktionalen Quervernetzer BMH kovalent verknüpfen. Während monomeres Arf1cysY35A keine Membrandeformation induzierte, war quervernetztes Arf1cysY35A dazu in der Lage. Das bedeutet, dass die chemische Dimerisierung ausreichend ist, um bei der Mutante eine Coatomer-unabhängige Bindung an Membranen und die Induktion der Membrandeformation zu erzielen.

Dass es sich bei chemisch quervernetztem Arf1 nicht um das aktive Dimer handelt, kann nicht nur aus der Kristallstruktur geschlossen werden, sondern auch aus der Fähigkeit zur chemischen Verknüpfung in Lösung. Das aktive Arf1-Dimer wäre – das Modell als korrekt vorausgesetzt – nicht in der GDP-Form möglich (s. 3.2).

Aufgrund der Beobachtung, dass die lichtmikroskopisch visualisierbare Membranoberflächenaktivität stark konzentrationsabhängig ist (4.3.10 und Experimente von Dr. Rainer Beck), sowie unter der Voraussetzung, dass die chemische Quervernetzung nicht zur Ausbildung eines Dimers mit einer bestimmten Interaktionsfläche führt, sondern lediglich zwei Arf-Moleküle in räumliche Nähe zwingt, kann angenommen werden, dass eine Mindest-"Dichte" an Arf-Molekülen, die nach Bindung an Membranen in einer bestimmten Weise in der Membran orientiert werden, notwendig ist, um die Membranauidität von Arf1 zu erhöhen und die Membrandeformation hervorzurufen.

Als nächstes war zu überprüfen, ob die amphiphile N-terminale α -Helix für die Arf1-induzierte Membrandeformation notwendig ist. Dazu wurde His₆-Arf1N Δ 17cys in monomerer und dimerer Form im Tubulierungsassay eingesetzt. Dem Lipidmix wurden Nickellipide zugegeben, sodass der N-terminale His-Tag mit diesen interagieren kann. Monomeres His₆-Arf1N Δ 17 zeigte keine Membranoberflächenaktivität. Wurde chemisch quervernetztes His₆-Arf1N Δ 17 eingesetzt, konnte Tubulierung beobachtet werden, wenn die Konzentration an His₆-Arf1N Δ 17cys doppelt so hoch war wie unter Verwendung von Vollängen Arf1wt (6-10 μ M bzw. 3-5 μ M). Dies ist kein unspezifischer Effekt von His-Tags im Allgemeinen wie die Kontrollen zeigten, bei denen His-*getaggtes* ARNO bis zu einer Konzentration von 50 μ M und His-*getaggtes* Coatomer bis zu einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt worden waren und keine Tubulierung auftrat. Die nur durch quervernetztes – nicht aber monomeres – His₆-Arf1N Δ 17cys induzierbare Membrandeformation lässt vermuten, dass im Falle von quervernetzten His₆-Arf1N Δ 17cys ebenso wie für Vollängen-Arf1, das bei Bindung an Membranen dimerisiert, ein Molekül mit zwei Membranankern vorliegt, was die Avidität deutlich erhöht. Außerdem könnte es möglich sein, dass die His-Tags der N-Termini, die eine Verknüpfung der Nickellipide bewirken, nahe beieinander liegen müssen, um die Bildung von Tubuli zu induzieren. Die Kristallstruktur des quervernetzten His₆-Arf1N Δ 17cys liefert einen Hinweis, dass die N-Termini miteinander interagieren könnten (s. 3.2).

Die Experimente zeigen aber auch, dass zur Induktion der Membrandeformation nicht eine spezifische Interaktion der amphiphilen N-terminalen α -Helix notwendig ist, sondern nur eine Struktur in die Membran inseriert werden muss. Dies steht im Gegensatz zum COPII-System. Für Sar1, das kleine GNBPs des COPII-Systems, wurde beobachtet, dass His-getaggtes Sar1N Δ 23 eine deutlich geringere Membranoberflächenaktivität besitzt als Sar1wt (Lee *et al.*, 2005). Allerdings wurden in dieser Studie keine Tubulierungsexperimente an Membranflächen, sondern nur Bindungsexperimente an Liposomen durchgeführt, bei denen die Proteine in niedrigeren Konzentrationen als im Tubulierungsassay eingesetzt werden, sodass die experimentellen Voraussetzungen nicht vergleichbar sind.

3.5 Bedeutung der Dimerisierung und der N-terminalen α -Helix von Arf1 für die Biogenese von COPI-Vesikeln

Im Rahmen der Untersuchung der Abschnürung von COPI-Vesikeln wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Petra Diestelkötter-Bachert Experimente zur Wiedergewinnung der Funktion der Vesikelabschnürung mit der Mutante Arf1Y35A durchgeführt. Hierzu wurden wieder die chemisch kreuzvernetzbaaren Mutanten Arf1cys und Arf1cysY35A verwendet.

Zu diesem Zweck wurden Ansätze zur Bildung von COPI-Vesikeln mit monomerem und dimerem Arf1cys und Arf1cysY35A mittels Western-Blot und Negativ-Kontrastierung-Elektronenmikroskopie (EM) analysiert. Als Positivkontrolle diente Arf1wt. Die quantitative EM-Analyse zeigte keine Unterschiede zwischen Arf1wt und Arf1cys, sodass angenommen werden kann, dass die vorgenommenen Punktmutationen keinen Einfluss auf die Aktivität von Arf1 haben. Die Mutante Arf1cysY35A ist in ihrer monomeren Form wie erwartet nicht in der Lage, freie COPI-Vesikel zu generieren. Die geringe Anzahl Vesikel, die bei der EM-Analyse gesehen wurde, lässt sich auf am Golgi verbliebenes Arf1wt zurückführen, wie der Vergleich mit einem Kontrollansatz zeigt, dem kein Arf1 zugegeben wurde. Arf1cysY35A in dimerer Form ist dagegen in der Lage, COPI-Vesikel abzuschneiden, wobei es eine Vesikulierungseffizienz von 70 % im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Da Arf1Y35A aber auch zu einem geringeren Maße Coatomer rekrutiert als Arf1wt, lässt sich die

Differenz in der Anzahl der freien COPI-Vesikel z. B. auf die schlechtere Coatomerrekrutierung zurückführen.

Da Arf1, das anstelle der amphiphilen N-terminalen α -Helix einen His-*Tag* besitzt, fähig ist, Membranen zu deformieren, galt es zu überprüfen, ob dieses Arf-Konstrukt auch COPI-Vesikel generieren kann. Dazu wurden Nickellipid enthaltende Liposomen verwendet, um His₆-Arf1N Δ 17 über seinen His-*Tag* an Liposomen rekrutieren zu können. Wie Abb. 2.18 zu entnehmen ist, ist His₆-Arf1N Δ 17 jedoch weder in monomerer noch in quervernetzter Form in der Lage, freie COPI-Vesikel zu bilden.

Die amphiphile N-terminale α -Helix ist also absolut notwendig für die COPI-Vesikelbiogenese, ebenso wie es auch für das COPII-System gezeigt wurde (Lee *et al.*, 2005).

3.6 Bedeutung der N-terminalen α -Helix von Arf1 für die Rekrutierung des Coatomerkomplexes

Da His₆-Arf1N Δ 17 nicht zur COPI-Vesikelbiogenese fähig ist, wurde überprüft, ob es überhaupt den Coatomerkomplex rekrutieren kann und ob dieser in der "korrekten" Konformation vorliegt. Die Konformationsänderung von Coatomer, die dieses bei der Inkorporation in COPI-Vesikel unterläuft, kann mit Hilfe eines partiellen proteolytischen Verdauens mit dem Enzym Thermolysin nachgewiesen werden (Reinhard *et al.*, 1999).

Zunächst wurden Nickellipid enthaltende Liposomen mit Kaninchenleber-Coatomer, His₆-Arf1N Δ 17cys in monomerer oder quervernetzter Form und GppNHp inkubiert und Harzeinbettungsschnitte der Ansätze mittels Transmissions-EM analysiert; als Positivkontrolle diente Vollängen-Arf1wt. Während mit Vollängen-Arf1wt eindeutig COPI-Vesikel gebildet werden, wie der Vergleich der EM-Aufnahmen mit denen von C. Reinhard (s. Abb. 2.19, Abb. 3.3 und (Reinhard *et al.*, 2003)) zeigt, sind bei den Ansätzen mit His₆-Arf1N Δ 17 keine Vesikel zu sehen. Auffällig ist jedoch, dass die Membranen deutlich verbreitert sind und an vielen Stellen kleine Spitzen aufweisen, die den Spitzen an den COPI-Vesikeln in der Probe mit Arf1wt sehr ähnlich sind. Diese Verbreiterungen und Spitzen sind in der Probe ohne Coatomer nicht zu sehen,

sodass angenommen werden kann, dass es sich um Liposomen-gebundenes Coatomer handelt, was bedeuten würde, dass His₆-Arf1NΔ17 in der Lage ist, den Coatomer-Komplex zur Membran zu rekrutieren. Dies konnte durch Liposomenbindungsexperimente (s. Abb. 2.20) gezeigt werden.

Bei den im Ansatz mit quervernetztem His₆-Arf1NΔ17 beobachteten "Vesikeln", die nur vereinzelt auftraten, könnte es sich auch um Abknospungen oder die Spitzen länglicher schmaler Liposomen handeln, da es sich bei den analysierten Proben um zweidimensionale Schnitte dreidimensionaler Proben handelt. Auch könnten die Liposomen deformiert sein, was im Laufe der Probenprozessierung auftreten kann.

Für die Mutante Arf1Y35A ist bekannt, dass sie in der Knospung arretierte Vesikelknospen bildet, was nicht nur mittels Cryo-Elektronenmikroskopie (Beck *et al.*, 2011), sondern auch durch Elektronenmikroskopie von Harzeinbettungsschnitten von Golgi-Membranen, Coatomer und dem entsprechenden Arf-Konstrukt gezeigt werden konnte (Experimente in Zusammenarbeit mit A. Hellwig; AG Bading). Vorläufige Ergebnisse von Proben, die statt Golgi-Membranen Liposomen enthielten, legen nahe, dass auch hier in der Knospung arretierte Vesikel gebildet werden. Wie Abb. 3.3 zu entnehmen ist, scheinen die Vesikel nicht frei zu sein, sondern an einer Schnur aus Membranen, möglicherweise aus einem sehr großen Liposom, zu hängen. Solche Strukturen wurden mit His₆-Arf1NΔ17 nicht beobachtet.

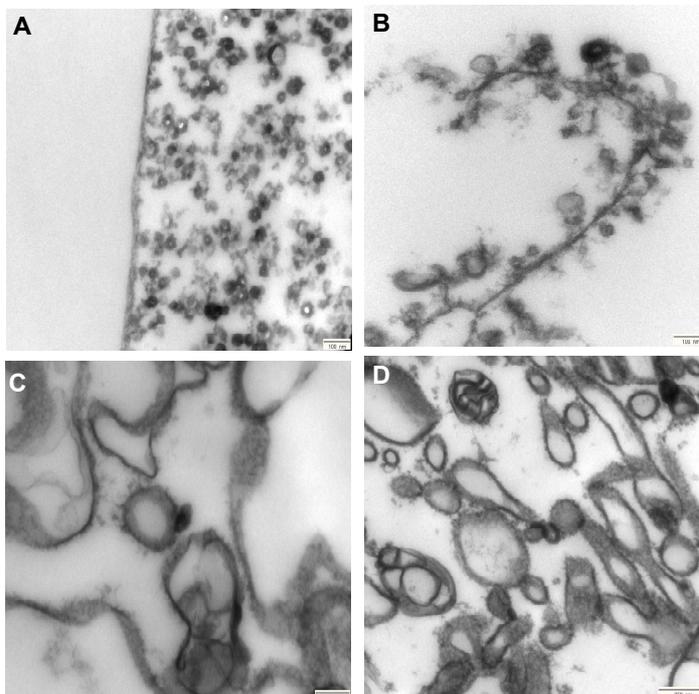


Abb. 3.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Harzeinbettungsschnitten

Die Arf1-vermittelte Rekrutierung von Coatomer (CM) an Membranen wurde mit nickelhaltigen Liposomen durchgeführt, wozu verschiedene Arf-konstrukte verwendet wurden.

A: Arf1 wt

B: Arf1Y35A

C: His₆-Arf1NΔ17 Monomer

D: His₆-Arf1NΔ17-Dimer

Maßstab: 100 nm

Da die His₆-Arf1NΔ17-Konstrukte weder rosettenartige Strukturen noch die in Abb. 3.3 gezeigten Vesikelknospen an Schnüren zeigten, kann vermutet werden, dass zur Ausbildung der Vesikelknospen die amphiphile N-terminale α-Helix benötigt wird. Diese könnte z. B. notwendig sein, um Coatomer in einer "korrekten" Konformation zu rekrutieren.

Um zu analysieren, in welcher Konformation Coatomer durch His₆-Arf1NΔ17 an die Membran rekrutiert wird, wurde nach Membranbindung ein partieller proteolytischer Verdau durchgeführt. Dieser zeigt für die His₆-Arf1NΔ17-Konstrukte ein Bandenmuster, das dem Muster von Arf1wt sehr ähnlich ist. Unter 2.3.2.4 (Abb. 2.20) sind die Unterschiede beschrieben, die gering sind, sodass angenommen werden kann, dass der Coatomerkomplex in der gleichen Konformation vorliegt wie in COPI-Vesikeln. Da die Liposomen jedoch p23-Lipopeptid enthielten und Coatomer bei Bindung an Dimere der cytosolischen Domäne von p23 in Abwesenheit von Membranen in der gleichen Konformation vorliegt wie in COPI-Vesikeln (Reinhard *et al.*, 1999), könnten auch die p23-Dimere den Coatomerkomplex in die "korrekte" Konformation zwingen. Da mit His₆-Arf1NΔ17 keine Vesikulierung beobachtet wird, kann angenommen werden, dass für die Bildung eines COPI-Vesikels Arf1 in einer definierten Konformation, die von der Orientierung der amphiphilen N-terminalen α-Helix in der Membran bestimmt wird, vorliegen muss, damit Coatomer die Kontur der Vesikelknospe formen kann. Es wäre möglich, dass die geringen Unterschiede im Bandenmuster des proteolytischen Verdau andeuten, dass der Coatomerkomplex nicht exakt in der Orientierung, die für die Bildung von COPI-Vesikeln notwendig ist, von His₆-Arf1NΔ17 zur Membran rekrutiert wird.

3.7 Reinigung von Vollängen-Arf1wt zur Kristallisation in Anwesenheit von Mizellen

Die Kristallstruktur des chemisch quervernetzten His₆-Arf1NΔ17 lieferte keinen Einblick in die Interaktionsflächen der beiden Monomere (s. 3.2). Aus der Struktur lässt sich vermuten, dass die N-Termini eine Rolle bei der Dimerisierung spielen. Da die N-Termini in die Membran inserieren, sind sie vermutlich an der richtigen

Orientierung der Arf1-Moleküle in der Membran und damit auch der Orientierung bei der Ausbildung des aktiven Dimers beteiligt.

Daher sollte Vollängen-Arf1 in Anwesenheit von Detergentien kristallisiert werden, falls es möglich ist den Austausch von GDP zu GTP an Arf1 in Anwesenheit von Detergentien statt Membranen durchzuführen.

Hierzu wurden verschiedene Detergentienkombinationen getestet, die immer – ebenso wie Bizellen aus DMPC und Natriumcholat, die als Positivkontrolle dienten – das Cholesterolderivat Natriumcholat enthielten. Wie Abb 2.21 zu entnehmen ist, erfolgt der Austausch zu GTP am besten an Mizellen aus DDM/Natriumcholat. Die Geschwindigkeit des Nukleotidaustauschs ist hier sogar höher als an Liposomen. Die Verwendung von Detergentien, die keine Ringstrukturen aufweisen, sondern aus funktionalisierten Alkylketten bestehen (FosCholin, LDAO, C12E8) führt dazu, dass kein Nukleotidaustausch beobachtet wird. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Arf1 besser an Mizellen aus Detergentien, mit Ringstrukturen bindet. Wird nur DDM ohne Natriumcholat eingesetzt, ist ebenfalls kein Nukleotidaustausch zu beobachten. Das Vorhandensein des Cholesterinderivats Natriumcholat in Mizellen ist also essentiell für den Nukleotidaustausch an Arf1 in Anwesenheit von Mizellen. Da Cholesterin in Membranen eine größere Rigidität bewirkt, ist anzunehmen, dass der gleiche Effekt in Mizellen auftritt. Daher kann vermutet werden, dass nur an Mizellen, die eine gewisse Rigidität aufweisen, der Nukleotidaustausch an Arf1 erfolgt.

Weiterhin kann festgestellt werden, dass Mizellen benötigt werden. Wird Detergenz (DDM) unterhalb seiner CMC eingesetzt, erfolgt der Nukleotidaustausch deutlich schlechter. Das lässt vermuten, dass es zum Ausklappen der amphiphilen N-terminalen α -Helix nicht ausreicht, Detergenz zu geben, sondern dass eine definierte hydrophobe Oberfläche vorhanden sein muss, um den Nukleotidaustausch und damit das Ausklappen der Helix und die Exposition des Myristoyl-Ankers zu ermöglichen. Zudem muss diese Oberfläche eine bestimmte Rigidität und Struktur aufweisen (s.o.). Die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Mizellen legt nahe, dass die amphiphile N-terminale α -Helix mit ihrem Myristoyl-Anker in die Mizellen inseriert – ähnlich wie es an Membranen erfolgt – und nicht nur von ungeordneten Detergenz-Molekülen umgeben ist.

Für die Kristallisationsansätze wurde ein präparativer Austausch zu GppNHp durchgeführt und das Protein anschließend mittels Größenausschlusschromatographie vom überschüssigen Nukleotid abgetrennt. Dabei traten zwei

getrennte Signalgipfel auf, die Arf1 enthielten. Durch HPLC-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Signalgipfel bei kleinerem Elutionsvolumen GppNHp gebundenem Arf1 entspricht und der Signalgipfel bei größerem Elutionsvolumen GDP-gebundenem Arf1. So konnte erstmalig aktiviertes Arf1 von nicht aktiviertem Arf1 mittels Größenausschlusschromatographie getrennt werden.

Für die Kristallisationsansätze wurde GppNHp-beladenes Arf1 in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, wobei jedoch unter keiner Bedingung Kristallwachstum beobachtet wurde. Unter wenigen Bedingungen wurde Proteinaggregation beobachtet, was vermuten lässt, dass die Arf-Moleküle sehr ungeordnet vorliegen. Das könnte daran liegen, dass die amphiphile N-terminale α -Helix mit ihrem Myristoyl-Anker sehr flexibel ist, und die Proteine sich daher nicht regelmäßig anordnen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit weitere Einblicke in die Details der COPI-Vesikelbiogenese erhalten wurden:

Der erste Schritt der Membranverankerung von Arf1 in der Membran ist auf eine spezifische Interaktion der amphiphilen N-terminalen α -Helix mit ihrem Myristoyl-Anker zurückzuführen. Weder bindet nicht-myristoyliertes noch N-terminal verkürztes Arf1, das anstelle der N-terminalen α -Helix einen His-Tag besitzt, an Membranen.

Letzteres kann mit Modellmembranen nur interagieren, wenn diese aus Nickellipid enthaltenden Liposomen bestehen. Dann ist auch für His₆-Arf1N Δ 17 in quervernetzter Form Membranoberflächenaktivität zu beobachten, was bedeutet, dass die Art der Membranverankerung keine Rolle spielt.

Die Dimerisierung von Arf1, die im Falle der nicht dimerisierenden Mutante Arf1Y35A und der N-terminal verkürzten Variante His₆-Arf1N Δ 17 durch chemische Quervernetzung zweier Arf-Moleküle über ihre C-Termini erreicht werden kann, erhöht die Membranavidität von Arf1 deutlich, indem zwei Strukturen eines Moleküls in die Membran inserieren. Das Vorhandensein von zwei Membranankern und damit die Dimerisierung von Arf1 ist essentiell für die Induktion der Membrandeformation.

Für die Bildung von COPI-Vesikeln ist die Dimerisierung absolut notwendig und – wenn es sich um Vollängen-Arf1 handelt – ausreichend für die Abschnürung von COPI-Vesikeln, wie die quantitative elektronenmikroskopische Analyse (3.4, (Beck *et al.*, 2011)) ergab. Außerdem ist die Orientierung von Arf1 und Coatomer in der Membran essentiell, wie die Experimente mit quervernetztem His₆-Arf1N Δ 17, das zwar den Coatomer-Komplex rekrutieren, nicht jedoch freie COPI-Vesikel bilden

kann, zeigten. Wahrscheinlich muss Arf1 selbst in einer definierten Form an die Membran binden, um Coatomer in der korrekten Konformation zu rekrutieren. Diese Orientierung könnte durch die amphiphile N-terminale α -Helix hervorgerufen werden. Dagegen wird die Polymerisation von Coatomer, die eine höhere Zugänglichkeit der Protease Thermolysin ermöglicht, nicht nur in COPI-Vesikeln, sondern auch durch die Interaktion des löslichen Coatomer-Komplexes mit dimerem p23 beobachtet, was bedeutet, dass diese Konformation nicht membranabhängig ist. So ist es durchaus möglich, dass His₆-Arf1N Δ 17 Coatomer in der gleichen Konformation rekrutiert, aber nicht die korrekte Membrankrümmung induzieren kann, weil His₆-Arf1N Δ 17 über seinen His-Tag möglicherweise in einer anderen Orientierung als der Arf1wt an die Membran bindet, sodass die Interaktionen mit Coatomer nicht die Krümmung eines COPI-Vesikels hervorrufen kann. Auch kann die Art der Membrandeformation durch Arf1 eine Rolle spielen. Es wäre möglich, dass zur Generierung der Membrankurvatur von Vesikeln eine spezifische Deformation durch die amphiphile N-terminale α -Helix notwendig ist, die der His-Tag nicht hervorrufen kann. Dies schließt nicht *per se* eine Tubulierungsaktivität aus, da Vesikel zum einen stärker gekrümmt sind als Tubuli und zum anderen am Vesikelhals negative Kurvatur erzeugt werden muss.

Probenpuffer (SDS-PAGE; 4x):	187,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) 6 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerin 15 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,0675 % (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
SDS-Laufpuffer (1x):	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Transfer-Puffer (Western-Blot):	25 mM Tris 250 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung:	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Eisessig 0,25 % (w/v) Coomassie-R 250
Coomassie-Entfärbelösung:	20 % (v/v) Ethanol 5 % (v/v) Eisessig
DNA-Probenpuffer (5x):	50 mM Tris 4 M Harnstoff 100 mM EDTA 25 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl
 20 mM Eisessig
 1 mM EDTA
 pH 8,0

Puffer für die Isolation des Coatomer-Komplexes aus Kaninchenleber

HP1: 25 mM Tris/HCl (pH 7,4)
 500 mM KCl
 250 mM Sucrose
 2 mM EGTA/KOH
 1 mM DTT
 PIC, EDTA free (Roche)

HP2: 25 mM Tris/HCl (pH 7,4)
 2 mM EGTA/KOH
 1 mM DTT
 PIC, EDTA free (Roche)

IEX1: 25 mM Tris/HCl (pH 7,4)
 200 mM KCl
 10 % (w/v) Glycerol
 1 mM DTT

IEX2: 25 mM Tris/HCl (pH 7,4)
 1 M KCl
 10 % (w/v) Glycerol
 1 mM DTT

IEX3: 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
 200 mM KCl
 10 % (w/v) Glycerol
 1 mM DTT

IEX4: 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
 1 M KCl
 10 % (w/v) Glycerol
 1 mM DTT

Puffer für die Reinigung von Coatomer-Mix

Lysepuffer: 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
 300 mM Natriumchlorid
 30 mM Imidazol
 2 mM β -Mercaptoethanol

Waschpuffer: 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
 300 mM Natriumchlorid
 50 mM Imidazol
 2 mM β -Mercaptoethanol

Elutionspuffer: 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
 300 mM Natriumchlorid
 250 mM Imidazol
 2 mM β -Mercaptoethanol

PD10-Puffer: 25 mM HEPES/KOH (pH 7,4)
 150 mM Natriumchlorid
 1 mM DTT

Puffer für die Reinigung von Arf1 wt/Y35F

Puffer B: 50 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 4°C)
 1 mM Magnesiumchlorid
 1 mM DTT

Puffer C:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 4°C) 1 mM Magnesiumchlorid 1 mM DTT 0,5 mM GDP
PD10-Puffer D:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 4°C) 1 mM Magnesiumchlorid 1 mM DTT
Puffer E:	250 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 4°C) 5 mM Magnesiumchlorid 1 mM DTT
Puffer F:	20 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 4°C) 1 M Kaliumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid 1 mM DTT
Hochsalzpuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 4°C) 3 M Natriumchlorid
Niedrigsalzpuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0 bei 4°C)
Puffer für die Reinigung von His ₆ -Arf1NΔ17	
Lysepuffer:	50 mM HEPES/KOH (pH 7,5) 300 mM Kaliumchlorid 30 mM Imidazol 2 mM β-Mercaptoethanol

Waschpuffer:	50 mM HEPES/KOH (pH 7,5) 300 mM Kaliumchlorid 50 mM Imidazol 2 mM β -Mercaptoethanol
Elutionspuffer:	50 mM HEPES/KOH (pH 7,5) 300 mM Kaliumchlorid 250 mM Imidazol 2 mM β -Mercaptoethanol
Goldberg-Puffer:	20 mM HEPES/KOH (pH 7,5) 150 mM Kaliumchlorid 2 mM Magnesiumchlorid 4 mM DTT
Dimerisierungspuffer:	20 mM HEPES/KOH (pH 7,0) 150 mM Kaliumchlorid 2 mM Magnesiumchlorid
HPLC-Puffer:	100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 6,5) 10 mM Tetrabutylammoniumbromid 7,5 % (v/v) Acetonitril
HKM-Puffer:	25 mM HEPES/KOH (pH 7,4) 120 mM Kaliumacetat 1 mM Magnesiumchlorid
Assaypuffer:	25 mM HEPES/KOH (pH 7,4) 2,5 mM Magnesiumacetat

4.1.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E.coli</i> DH5 α	F ⁻ end A1 glnV44 thi-1 recA1relA1 gyr96 deoR nupG Θ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) λ ⁻	Invitrogen
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Invitrogen

Tab. 4.1: Bakterienstämme

Plasmide

Plasmidname	Vektor	Insert
pRSF-Duet-yNMT1-Arf1wt	pRSF-Duet1	NMT1 (Hefe) Arf1wt (Mensch)
pRSF-Duet-yNMT1-Arf1Y35F	pRSF-Duet1	NMT1 (Hefe) Arf1wt (Mensch)
pETM11*-Arf1N Δ 17wt	pETM11*	Arf1N Δ 17wt (Mensch)
pETM11*-Arf1N Δ 17C159SK181C	pETM11*	Arf1N Δ 17C159SK181C (Mensch)
pETM11*-Arf1N Δ 17Y35AC159SK181C	pETM11*	Arf1N Δ 17Y35AC159SK181C (Mensch)

Tab. 4.2: Plasmide

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) bezogen und in Wasser zu einer Konzentration von 50 pmol/l gelöst.

4.1.3 Enzyme, Protein- und DNA-Standards

Enzym	Hersteller
Turbo- <i>Pfu</i> -Polymerase	Agilent
<i>Bam</i> HI	NEB
<i>Eco</i> RI	NEB
<i>Nde</i> I	NEB
T4-Ligase	Fermentas
<i>rapid alkaline phosphatase</i>	Roche, Mannheim

Tab. 4.3: Enzyme

Als DNA-Standard wurde der 1 kb DNA *ladder* von NEB (Newton, USA) verwendet.

Als Proteingrößenstandard wurde der *Prestained precision plus* Standard von Biorad (München) verwendet.

4.1.4 Antikörper

Antigen	Name	Epitop	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α -COP	α -COP 1409	C-term.	Kaninchen	1 : 5000	AG
		Peptid			Wieland
$\gamma_1\gamma_2$ -COP	γ R	rekomb.	Kaninchen	1 : 10000	AG
		γ_1 -COP			Wieland
δ -COP	δ -COP 877	internes	Kaninchen	1 : 1000	AG
		Peptid			Wieland
Arf1	Arf1CT- 1849	C-term.	Kaninchen	1 : 5000	AG
		Peptid			Wieland
His-Tag	His	His-Tag	Maus	1 : 2000	Sigma- Aldrich

Tab. 4.4: Antikörper

Alle Primärantikörper wurden in 1%iger BSA-Lösung in PBS-T-Puffer angesetzt und bei -20°C gelagert.

Als Sekundärantikörper wurden Alexa Fluor® 680 markierter Ziege-anti-Kaninchen- und Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls in 1%iger BSA-Lösung angesetzt; die Verdünnung betrug 1:10000.

4.1.5 Lipide

Alle Lipide lagen als Lösungen in Chloroform vor.

Bezeichnung	Ursprung	Hersteller
Phosphatidylcholin	Leber, Rind	Avanti Polar Lipids
Phosphatidylethanolamin	Leber, Rind	Avanti Polar Lipids
Phosphatidylinositol	Leber, Rind	Avanti Polar Lipids
Phosphatidylserin	Hirn, Schwein	Avanti Polar Lipids
Phosphatidyl-inositol (4,5)bisphosphat	Hirn, Schwein	Avanti Polar Lipids
1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3- [(N-(5-amino-1- carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl](Nickel Salz)	synthetisch	Avanti Polar Lipids
Cholesterol	Wolle, Schaf	Avanti Polar Lipids
Sphingomyelin	Hirn, Schwein	Avanti Polar Lipids

Tab. 4.5: Lipide

4.1.6 Nukleotide

Bezeichnung	Reinheit	Hersteller
GDP	≥ 85%	Sigma, Deisenhofen
GTP	99%	USB Europe, Staufen
GTP γ S	≥ 75%	Sigma, Deisenhofen
GppNHp	≥ 85%	Sigma, Deisenhofen

Tab. 4.6: Nukleotide

4.1.7 Kristallisationsscreens (Zusammensetzung s. Anhang):

JCSG I-IV	Kristallisationsplattform BZH
PEGs	Kristallisationsplattform BZH
Optimizer	Kristallisationsplattform BZH
Fein-Screen sEL15	Kristallisationsplattform BZH
Fein-Screen sEL16	Kristallisationsplattform BZH
MembraneGold	Kristallisationsplattform BZH

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren analytisch und präparativ aufgetrennt werden, wobei sie in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell zur Anode wandern.

Es wurden 1%ige Agarosegele, für die die Agarose in TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst wurde, verwendet. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer, die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V bis 120 V in einer entsprechenden Apparatur (PeqLab, Erlangen). Die Agarose enthielt 0,005% Ethidiumbromid, um die DNA-Fragmente unter UV-Licht detektieren zu können.

Die Proben wurden mit 5x-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde 1 kb DNA *ladder* (NEB; USA) verwendet. Bei präparativen Gelen erfolgte das Ausschneiden der gewünschten Banden bei UV-Licht (GelDoc, Biorad, München).

4.2.2 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden DNA-Fragmente amplifiziert. Hierzu wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

DNA-Matrize:	100 ng
<i>forward primer</i> :	10 pmol
<i>reversed primer</i> :	10 pmol
dNTP-Mix:	10 nmol
10x <i>Pfu</i> -Puffer:	5µl
<i>Pfu</i> -Polymerase:	1µl
<i>ad 50 µl Aqua bidest</i>	

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

1. 94°C: 2 min
2. 94°C: 30 s
3. 52°C: 30 s
4. 72°C: 1 min
5. 72°C: 10 min

Die Schritte 2-5 wurden 30mal wiederholt.

4.2.3 Ortsspezifische Mutagenese

Die zielgerichtete Einführung von Punktmutationen erfolgte nach dem *QuickChange Site Directed Mutagenesis* Protokoll (Stratagene, La Jolla, USA).

Die Ansätze wurden wie folgt zusammengegeben, als Polymerase wurde die *Pfu*-Polymerase eingesetzt.

DNA-Matrize:	100 ng
<i>forward primer</i> :	10 pmol
<i>reversed primer</i> :	10 pmol
dNTP-Mix:	10 nmol
10x <i>Pfu</i> -Puffer:	5µl
<i>Pfu</i> -Polymerase:	1µl
<i>ad 50 µl Aqua bidest</i>	

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

1. 95°C 30s
2. 95°C 30s
3. 55°C 60s
4. 68°C 12 min
5. 4°C ∞

Die Schritte 2-4 wurden 16mal wiederholt.

Nach der PCR wurde die methylierte Matrizen-DNA mit Hilfe des Enzyms *DpnI* restringiert. Da die neu synthetisierte DNA nicht methyliert ist, kann sie von *DpnI* nicht erkannt und somit auch nicht verdaut werden.

Hierzu wurden 10 U des Enzyms *DpnI* zum PCR-Ansatz gegeben und für 1,5 h bei 37°C inkubiert.

Danach wurden 10 µl des Ansatzes in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert.

4.2.4 Restriktion und Ligation von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte in allen Fällen gleichzeitig mit beiden Restriktionsenzymen für jeweils 1 h bei 37°C in einem Endvolumen von 20 µl. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf ein Agarosegel geladen und die entsprechenden Fragmente nach dem Gellauf mit Hilfe des QIAGEN *Gel extraction kits* aus dem Gel isoliert.

Für die Ligation wurden Matrizen-DNA und das in den Vektor einzubringende Fragment im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Es wurden 1,5 U T4-Ligase im entsprechenden T4-Ligase-Puffer verwendet; der Gesamtansatz betrug 10 µl. Die Reaktion erfolgte bei 16°C über Nacht. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert.

4.2.5 Transformation von DNA

Zu je 100 µl kompetenten *E.coli* Bakterien (DH5α oder BL21 (DE3)) wurde der gesamte Ligationsansatz oder 1 µl Plasmid-DNA gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s wurde 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C und 500 rpm

inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

4.2.7 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Bakterien

Es wurden Bakterien aus einem Glycerin-Stock auf eine Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Hiervon wurden 10 Kolonien genommen, um 10 ml LB-Medium anzupflegen und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 8 ml dieser Kultur wurden 400 ml LB-Medium, dem 4 ml Mg²⁺-Mix zugegeben wurden, angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,36 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (SCL 4000-Rotor) und das Pellet in 32 ml eiskaltem Puffer 1 resuspendiert. Nach einer 1stündigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0) und anschließend das Bakterienpellet auf Eis in eiskaltem Puffer 2 resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurden die Bakterien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassiefärbung

Zur Analyse von Proteingemischen und aufgereinigten Proteinen wurden diskontinuierliche denaturierende SDS-PAGEs (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Dazu wurden zuerst Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % oder 15 % gegossen (s. Tabelle) und nach deren Polymerisation mit einem 3,9%igen Sammelgel überschichtet.

Für die SDS-PAGE wurden die Proben mit 4x-Probenpuffer versetzt, 3-5 min bei 95°C hitzedenaturiert und in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte zunächst bei einer konstanten Spannung von 120 V – 140 V. Sobald die

Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Es wurde das Protean III-System (Biorad, München) verwendet .

Zur Anfärbung von Proteinen wurde das Gel nach der SDS-PAGE in Coomassie-Färbelösung gegeben und für 30 min geschwenkt. Anschließend wurde die Färbelösung mit *Aqua dest.* abgewaschen und Entfärbe-Lösung auf das Gel gegeben. Nach kurzem Aufkochen in der Mikrowelle und 10 min Schwenken waren die Proteinbanden deutlich sichtbar.

2 Gele	4%	7,5%	12%	15%
Acrylamidlösung (37.5 : 1)	0,65 ml	2,5 ml	4 ml	5 ml
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml	-	-	-
Wasser	3,05 ml	4,85 ml	3,35 ml	2,35 ml
SDS (10%)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS (10%)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,015 ml	0,015 ml	0,015ml

Tab. 4.7: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele

4.3.2 Western-Blot

Für die Immundetektion von Proteinen wurden Western-Blots nach dem Nassblot-Verfahren durchgeführt.

Der Transfer der Proteine vom denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P; Millipore, USA) erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h. Dazu wurde das Protean III-System (Biorad, München) verwendet.

Anschließend wurde die Membran für mind. 1 h in 5% Milch bei RT in PBS-T inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper in 1%iger BSA-Lösung in PBS-T für 1 h bei RT. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 5 min mit PBS-T wurde die Membran für 1 h mit

fluoreszierendem Sekundärantikörper (in 1% BSA in PBS-T) inkubiert und vor der Detektion 2mal mit PBS-T und zweimal mit PBS für je 5 min gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe des LICOR®-Systems.

4.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Dazu wurde das Bradford-Reagenz (BioRad, München) 1 : 5 verdünnt. Zu der 1x-Bradford-Lösung wurden 2 µl bis 5 µl Proteinlösung gegeben, sodass das Endvolumen 1 ml betrug. Die Eichgerade wurde mit 2 µg bis 10 µg Rinderserumalbumin erstellt. Vor Messen der Extinktion bei 595 nm wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert.

4.3.4 Isolation des Coatomer-Komplexes aus Kaninchenleber

Ca. 180 g frische Leber (3 Kaninchen) wurde mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und dabei direkt in 200 ml HP1 gegeben. In einem *Warring blendor mixer* wurden die Leberstücke zuerst für 30 s auf Stufe 1 und nach einer 2minütigen Pause auf Eis für 1 min auf Stufe 2 homogenisiert. Das Homogenat wurde für 1 h bei 10000 g und 4°C im SLC-4000-Rotor sedimentiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde durch vier Lagen Mull dekantiert und das Filtrat für 2 h bei 100000 g und 4°C zentrifugiert (TFT50.38-Rotor). Die sich bei der Zentrifugation bildende Lipidschicht wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Lysat durch vier Lagen Mull dekantiert. Nach Verdünnung (1:1) mit HP2 erfolgte eine Ammoniumsulfatfällung bis zu einer Konzentration von 35 % Sättigung. Dazu wurde das Ammoniumsulfat fein gemörsert und innerhalb von 45 min unter Rühren im Eisbad zugegeben. Nach weiteren 45 min Rühren im Eisbad wurde die Suspension für 30 min bei 7500 g und 4°C (SLC 4000-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100 ml Resuspensionspuffer gelöst und mit Hilfe eines *Douncers* vollständig homogenisiert. Das Homogenat wurde in einen Dialyseschlauch (Spectra Por7; MWCO: 50000 Da) überführt und bei 4°C zweimal für eine Stunde und anschließend ÜN gegen je 5 l IEX1 dialysiert.

Das Dialysat wurde für 1 h bei 100000 g und 4°C (TFT 50.38-Rotor) zentrifugiert und der Überstand auf eine DEAE-Anionenaustauschsäule (300 ml Säulenvolumen) mit einer Flussrate von 5 ml/min geladen. Nach Waschen mit IEX1-Puffer bis zu einer Leitfähigkeit von ca. 20 mS/cm erfolgte die Elution des gebundenen Proteins bei

einer Salzkonzentration von 600 mM Kaliumchlorid (je 50 % IEX1- und IEX2-Puffer). Die den Coatomerkomplex enthaltende Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch (Spectra Por MWCO 300 kDa; Cellulose Ester) überführt und zweimal für 1 h sowie ÜN bei 4°C gegen je 5 l IEX1-Puffer dialysiert.

Nach Filtrieren durch eine Millipore HV Durapore Membran (0,45 µm) wurde das Dialysat auf eine Resource-Q-Säule (25 ml Säulenvolumen) mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen und anschließend gewaschen, bis eine Leitfähigkeit von ca. 20 mS/cm erreicht worden war. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 200 mM Kaliumchlorid zu 720 mM Kaliumchlorid in 13 Säulenvolumen, wobei Fraktionen einer Größe von 3 ml gesammelt wurden. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert und die Coatomer-enthaltenden Fraktionen vereinigt.

Der letzte Schritt der Reinigung diente der Konzentrierung des Coatomerkomplexes. Dazu wurde die Leitfähigkeit der vereinigten Fraktionen mit Leitfähigkeitspuffer auf ca. 17 mS/cm eingestellt und die Proteinlösung mit einer Flussrate von 0,2 ml/min auf eine 2 ml-ResourceQ-Säule geladen. Nach Waschen mit IEX3-Puffer bis zur Basislinie der Leitfähigkeit erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten von 200 mM zu 1 M Kaliumchlorid in 4 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 0,25 ml/min. Nach Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung wurden die Coatomer-enthaltenden Fraktionen vereint, die Konzentration auf 5 mg/ml eingestellt, das Protein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.3.5 Reinigung von rekombinantem Coatomer

Ein oder zwei Pellets von je 0,75 l Expressionskultur (SF9-Zellen) pro Isoform ($\gamma 1\zeta 1$; $\gamma 1\zeta 2$; $\gamma 2\zeta 1$) wurden in je 20 – 25 ml Lysepuffer CM-Mix, dem je 1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail (EDTA-free; Roche, Mannheim) zugesetzt worden war, resuspendiert und mit Druck in einem *Microfluidizer* (Microfluidics, Newton, USA) bei ca. 15000 psi in vier bis sechs Passagen aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 1 h 20 min bei 100000 g (50.2Ti-Rotor, BeckmanCoulter, USA) erfolgte das Binden an 2 ml (Bettvolumen) Ni-Sepharose-beads (Sepharose™ fast flow; GE Healthcare, München) für 1 h bei 4°C unter Rotieren. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit je 30 ml Waschpuffer wurde der Coatomerkomplex mit 5 ml Elutionspuffer in Fraktionen à 0,5 ml eluiert. Zur Entfernung des Imidazols wurden die Fraktionen, die

den Coatomerkomplex enthielten (Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung), vereinigt und auf PD10-Säulen, die nach Herstellerangaben verwendet wurden, gegeben. Nach der Elution wurde die Konzentration nach der Bradford-Methode bestimmt (s. 4.3.3) und die Isoformen im Verhältnis 50% ($\gamma_1\zeta_1$), 30% ($\gamma_2\zeta_1$) und 20% ($\gamma_1\zeta_2$) gemischt, aliquotiert und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Die Konzentration lag zwischen 1 mg/ml und 3 mg/ml.

4.3.6 Expression und Reinigung von humanem, myristoylierten Arf1

4.3.6.1 Expression von humanem myristoylierten Arf1

Für die Expression von humanem myristoyliertem Arf1 wurden 6x 2 l NZCYM-Medium mit je 150 ml einer Vorkultur von *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen, in die das pRSF-Duet-NMT1/hARF1-Plasmid transformiert worden war, angeimpft. Nach Inkubation bei 37°C , 180 rpm bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 – 0,7 wurden 0,25 g Natrium-Myristat in einer 18%igen BSA-Lösung auf die Kulturen verteilt und die Temperatur auf 27°C reduziert. Dazu wurde das Natriummyristat bei ca 60°C in PBS-Puffer gelöst und zu der auf 37°C temperierten BSA-Lösung gegeben. Nach 10 min wurde die Expression von Arf1 und dem Enzym N-Myristoyl-Transferase (NMT) durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Es wurde 4 h bei 27°C und 180 rpm exprimiert. Anschließend wurden die Bakterien für 20 min bei 4000 rpm (Sorvall RC 12b-Zentrifuge) pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und nach Überführen in 50 ml-Reaktionsgefäße für 30 min bei 4000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) pelletiert. Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Pellets bei -80°C gelagert.

4.3.6.2 Reinigung von humanem myristoylierten Arf1

Pellets von 12 l-Bakterienkultur wurden in lauwarmem Wasser aufgetaut und in ca. 50 ml – 75 ml Puffer B, dem 2 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten (EDTA-frei; Roche, Mannheim) sowie GDP in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben worden waren, resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Druck in einem *Microfluidizer* (Microfluidics, Newton, USA) mit fünf bis sieben Passagen bei ca. 15000 psi. Anschließend wurde für 1 h 15 min bei 100000 g (50.2 Rotor, BeckmanCoulter, USA) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit Puffer B auf 200 ml aufgefüllt und in ein Becherglas in einem Eiswasserbad überführt. Es folgte eine Ammoniumsulfat-Fällung, für die frisch gemörsertes Ammoniumsulfat bis zu

einer Konzentration von 35% Sättigung innerhalb von 45 min unter Rühren zugegeben wurde. Es wurde für weitere 45 min im Eiswasserbad gerührt und die Suspension anschließend für 30 min bei 8000 g und 4°C (SLC1500-Rotor; Sorvall Evolution RC) zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurde das Pellet in einem kleinen Volumen von Puffer C resuspendiert und das Salz mittels PD10-Säulen, die mit PD10-Puffer nach Herstellerangaben äquilibriert worden waren, entfernt. Die Proteinlösung wurde so weit mit Wasser verdünnt, dass die Leitfähigkeit weniger als 2 mS/cm betrug. Für die anschließende Anionenaustauschchromatographie wurde eine DEAE-Anionenaustauschersäule (5 ml HiTrap DEAE *fast flow*; GE Healthcare, München) mit je 5 Säulenvolumen Puffer, F und zuletzt Puffer D mit einer Flußrate von 1 ml/min äquilibriert. Die Lösung wurde dann mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule geladen und anschließend mit Puffer D gewaschen, bis die Leitfähigkeit und das UV-Signal bei 280 nm die Basislinie erreicht hatten. Die fraktionierte Proteinelution (0,5 ml-Fraktionen) erfolgte durch Erhöhen der Salzkonzentration, was mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0 M zu 1 M Kaliumchlorid über 10 Säulenvolumen bei einer Flußrate von 0,5 ml/min erfolgte. Nach Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung wurden die Fraktionen, die einen hohen Anteil Arf1 und wenig Kontaminationen aufwiesen, vereinigt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Um 100% myristoyliertes Arf1 zu erhalten, wurde die Proteinlösung im Anschluss an die Anionenaustauschchromatographie auf eine Phenylsepharosesäule (HiTrap PhenylTM, High Performance; GE Healthcare, München) gegeben. Diese war zuvor mit je 10 Säulenvolumen Hoch- und Niedrigsalzpuffer bei einer Flußrate von 1 ml/min äquilibriert worden. Bei dieser Chromatographiemethode werden Proteine über ihre unterschiedlich starken hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial voneinander getrennt. Da myristoyliertes Arf1 deutlich hydrophober ist als nicht myristoyliertes, kann eine Trennung erzielt werden.

Die Proteinlösung wurde mit 0,5 ml/min auf eine 1 ml-Phenylsepharose-Säule geladen, mit Hochsalzpuffer gewaschen bis die Basislinie erreicht worden war und die Proteine mit einem linearen Gradienten von 3 M Natriumchlorid zu 0 M Natriumchlorid in 10 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Nach Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurden die Fraktionen, die myristoyliertes Arf1 enthielten, vereinigt, in Ultrafiltrationsgefäßen (MWCO: 10000 Da; 2 ml Volumen; Sartorius Stedim, Göttingen) konzentriert und vorhandene

Kontaminationen durch eine Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Dazu wurde das Protein mit 0,2 ml/min auf eine 24 ml Superdex 75-Säule (10/300; GE Healthcare, München), die mit Goldberg-Puffer äquilibriert worden war, geladen und mit Goldberg-Puffer eluiert, wobei Fraktionen von 0,5 ml gesammelt wurden. Die Fraktionen, die ausschließlich Arf1 enthielten, wurden vereinigt und in Ultrafiltrationsgefäßen (MWCO: 10000 Da; 2 ml Volumen; Sartorius Stedim, Göttingen) konzentriert. Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff wurde das Protein bei -80°C gelagert.

Für die Kristallisationsansätze mit Vollängen-Arf1wt in Anwesenheit von Detergenz wurde die Größenausschlusschromatographie mit Goldberg-Puffer, dem 0,5 mM DDM und 0,023 mM Natriumcholat zugesetzt worden waren, durchgeführt. Als Säule wurde eine Superdex 75 (10/300) Säule verwendet; die Flußrate betrug 0,3 ml/min, die Fraktionsgröße 0,3 ml.

Nach Aufkonzentrieren in 2 ml-Ultrafiltrationsgefäßen auf 12 mg/ml wurden folgende *Screens* angesetzt: PEGs, Membran Gold (Zusammensetzung: s. Tab. 5.1 im Anhang). 200 nl der Proteinlösung wurden 1 : 1 mit der Reservoirlösung gemischt und die Ansätze bei 18°C inkubiert. In keinem der beiden *Screens* konnte Kristallisation beobachtet werden, im Falle des Membrane-Gold-Screens trat jedoch unter ca. 90 % der Bedingungen Präzipitation auf, was bedeuten könnte, dass die Proteinkonzentration zu hoch war. Daher wurde dieser *Screen* mit einer frischen Charge des Proteins in einer Konzentration von 7,5 mg/ml angesetzt. Hier betrug die Tropfengröße 600 nl (1 : 1 Protein zu Reservoir), die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 18°C.

4.3.7 Expression und Reinigung von His₆-Arf1NΔ17

4.3.7.1 Expression von His₆-Arf1NΔ17

Mit 120 ml einer ÜN-Kultur von *E.coli* BL21 (DE3), in welche das pETM11-Plasmid, mit dem entsprechenden Arf1NΔ17-Konstrukt (Arf1NΔ17wt, Arf1NΔ17cys, Arf1NΔ17Y35Acys) transformiert worden war, wurden sechsmal 2 l LB-Medium, dem 40 mg/ml Kanamycin zur Selektionskontrolle zugesetzt wurden, angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 wachsen gelassen. Dann wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG die Überexpression des jeweiligen His₆-Arf1NΔ17-Konstrukts induziert. Nach vierstündiger Expression wurden die Bakterien für 20 min bei 4000 rpm (Sorvall RC 12b-Zentrifuge) pelletiert,

einmal mit PBS gewaschen und nach Überführen in 50 ml-Reaktionsgefäße für 30 min bei 4000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) pelletiert. Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.3.7.2 Reinigung von His₆-Arf1NΔ17

Pellets von 6 l-Bakterien-Kultur wurden in 30 ml Lysepuffer, dem 1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail (EDTA-frei; Roche, Mannheim) zugegeben wurde, resuspendiert, und die Zellen mittels Druck in einem *Microfluidizer* (Microfluidics, Newton, USA) in fünf bis sieben Passagen bei ca. 15000 psi aufgeschlossen. Anschließend wurde für 1 h 20 min bei 100000 g (TFT50.38-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde für 1,5 h mit 5 ml (*bed* Volumen) Ni-Sepharose-*beads* (Ni-Sepharose™ fast flow, GE Healthcare, München), die zuvor 2x mit je 40 ml Wasser und 2x mit je 40 ml Waschpuffer äquilibriert worden waren, bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit 50 ml Waschpuffer, wurde 1x mit 25 ml Waschpuffer gewaschen, die *beads* in eine leere Säule (20 ml Volumen; Biorad, München) überführt und erneut mit 25 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer in Fraktionen von 0,5 ml.

Das im Puffer enthaltene Imidazol wurde mittels PD10-Säulen, die mit Goldberg-Puffer nach Herstellerangaben äquilibriert worden waren, entfernt.

Nach Nukleotidaustausch ÜN (s. 4.3.7.3) wurden überschüssiges Nukleotid, der Austauschfaktor ARNO und die *rapid alkaline phosphatase* (Roche, Mannheim) durch Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Dazu wurde eine Superdex 75-Säule (16/60; Volumen: 120 ml; GE Healthcare, München) verwendet. Als Puffer diente Dimerisierungspuffer; die Flussrate betrug 0,8 ml/min. Es wurden Fraktionen einer Größe von 0,8 ml gesammelt und anhand einer SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Die Fraktionen, die ausschließlich His₆-Arf1NΔ17 enthielten, wurden vereinigt und in Ultrafiltrationsgefäßen (MWCO: 10000 Da; 2 ml Volumen; Sartorius Stedim, Göttingen) konzentriert.

Da das dimerisierte Protein kristallisiert werden sollte, wurde es chemisch kovalent quervernetzt. Da das Arf-Protein einen einzigen Cysteinrest besitzt, ist die spezifische Kreuzvernetzung zweier Monomere über ihre Cys-Reste möglich.

Es wurden thiol-spezifische Quervernetzer unterschiedlicher Länge verwendet: bis-Maleimido-Ethan (11 Å) und bis-Maleimido-Hexan (16 Å), wobei der Quervernetzer, der in DMSO gelöst worden war, in einem molaren Verhältnis von 1 : 3

(Quervernetzer zu Protein) eingesetzt wurde. Der molare Überschuss des Quervernetzers gegenüber dem Protein wurde gewählt, damit nicht jedes Proteinmolekül ein Quervernetzermolekül bindet, was die kovalente Verknüpfung zweier Moleküle verhindern würde. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei RT.

Zur Abtrennung des Monomers wurde erneut eine größenausschlusschromatographische Trennung über eine Superdex 75-Säule (16/60; Volumen: 120 ml; GE Healthcare, München) durchgeführt. Die Flussrate betrug 1 ml/min; es wurden Fraktionen à 0,5 ml gesammelt. Nach Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung wurden die Fraktionen, die fast ausschließlich dimeres Protein enthielten, vereinigt und in Ultrafiltrationsgefäßen (MWCO: 10000 Da; 2 ml Volumen; Sartorius Stedim, Göttingen) konzentriert. Die Konzentration wurde mit dem Durchfluss auf 20 mg/ml eingestellt und Kristallisationsansätze gemacht.

4.3.7.3 Nukleotidaustausch

His₆-Arf1NΔ17 ist nach der Isolation aus Bakterienlysat z. T. mit GTP und z. T. mit GDP beladen. Für die Kristallisation ist eine definierte Nukleotidbeladung notwendig. Da die Struktur des aktiven, also des GTP-beladenen Zustands kristallographisch bestimmt werden sollte, war es notwendig, His₆-Arf1NΔ17 mit dem nicht-spaltbaren GTP-Analogen GppNHp zu beladen. Dazu wurde zu einer definierten Proteinmenge der 20fache molare Überschuss an GppNHp, 0,5 U/mg *rapid alkaline phosphatase* (Roche, Mannheim) sowie das GEF ARNO im 50fachen molaren Überschuss im Verhältnis zu His₆-Arf1NΔ17 gegeben. Als Puffer diente der Dimerisierungspuffer. Der Austausch erfolgte ÜN bei 4°C unter Rotieren.

Der präparative Nukleotidaustausch von Vollängen Arf1wt erfolgte nach Umpuffern in Goldberg-Puffer, dem 0,5 mM DDM und 0,023 mM Natriumcholat zugesetzt worden waren, für 30 min bei 37 °C mit einem 100fachen molaren Überschuss an GppNHp.

4.3.7.4 Analyse der Nukleotidbeladung von Arf1 mittels HPLC

Um zu überprüfen, ob der Austausch von GTP/GDP zu GppNHp zu 100% erfolgt war, wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung auf 100 µM bis 500 µM verdünnt, für 1 min bei 95°C hitzedenaturiert, aufgetretenes Proteinpräzipitat durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm sedimentiert und der Überstand auf die C18-Säule (HiChrom NT; MZ Analysetechnik, Mainz) der HPLC-

Anlage (Modell 1525; Waters, Eschborn) aufgetragen. Als Kontrolle wurden je 100 μM GDP-, GTP- bzw. GppNHp in 100 mM HEPES/KOH (pH 7,5) verwendet. Die Detektion von GDP, GTP und GppNHp erfolgte unter Verwendung von HPLC-Puffer bei einer Wellenlänge von 254 nm und mit einer Flussrate von 1 ml/min.

4.3.7.5 Konzentrationsbestimmung mittels HPLC

Um zu verifizieren, dass das Protein vollständig mit Nukleotid beladen ist, wurde die Nukleotidkonzentration der Proteinlösung nach Ermittlung der Proteinkonzentration mittels der Bradford-Methode (s. 4.3.3) bestimmt. Da überschüssiges Nukleotid nach der Beladung der Proteine über eine Größenausschlusschromatographische Trennung abgetrennt wurde, muss alles in der Proteinlösung vorhandene Nukleotid Protein-gebunden sein. Nach Erstellung einer Eichgeraden mit verschiedenen Nukleotidkonzentrationen kann durch Vergleich mit der Probe die Konzentration des Proteins errechnet werden.

4.3.7.6 Kristallisationsansätze

Die Kristallisation von His₆-Arf1N Δ 17 erfolgte in der Kristallisationsplattform des BZH. Für die Ansätze von quervernetztem His₆-Arf1N Δ 17cys wurde die Proteinlösung mit dem Durchfluss der Ultrafiltrationsgefäße auf 30 mg/ml eingestellt. Als Initialscreens wurden zunächst JCSG I-IV, als sitzende Tropfen in Platten mit 96 Vertiefungen angesetzt, die bei 18°C inkubiert wurden. Das Volumenverhältnis von Protein zu Reservoirlösung betrug 1 : 1, die Tropfengröße 0,4 μl . Da keine Kristallisation beobachtet werden konnte, wurde als weiterer Screen der PEG-Screen angesetzt, wobei hier neben dem Quervernetzer BMH auch die Quervernetzer BMOE und BM(PEG)₃ verwendet wurden. Außerdem betrug die Proteinkonzentration 20 mg/ml. Das Volumenverhältnis von Protein zu Reservoirlösung betrug auch hier 1 : 1, die Tropfengröße 0,6 μl . Es wurden ebenfalls Platten mit 96 Vertiefungen und sitzenden Tropfen verwendet. Neben der Inkubation bei 18°C wurden die gleichen Ansätze auch bei 4°C inkubiert.

Als Verfeinerungsscreens wurde ein Additiv-Screen sowie ein Optimizerscreen und die Screens sEL15 und sEL16, die speziell die Bedingung 200 mM Natriumthiocyanat und 20 % PEG 3350 bzw. 200 mM Kaliumthiocyanat und 20 % PEG 3350 verfeinerten (Zusammensetzung der einzelnen Lösungen: s. Tab. 5.1 im Anhang), angesetzt.

Außerdem wurde von Hand in Platten mit 24 Vertiefungen als hängende Tropfen folgende Bedingungen angesetzt:

200 mM Natriumthiocyanat mit Variation der PEG3350-Konzentration von 15 % zu 23 %, wobei die PEG-Konzentration jeweils um 1 % erhöht wurde. Die Tropfengröße betrug 1 µl oder 1,5 µl Proteinlösung, zu der jeweils 1 µl der Reservoirlösung (Reservoir: 500 µl) gegeben wurde.

Alle Ansätze außer den von Hand angesetzten erfolgten in der Kristallisationsplattform des BZH (J. Kopp).

Die gewachsenen Kristalle wurden mit Hilfe von Ösen isoliert. Als Cryo-Reagentien wurde entweder Ethylenglycol zu 5 %, 10 % und 20 % oder Glycerin zu 5 % zur Reservoirlösung gegeben und der Kristall darin vor Schockfrieren in flüssigem Stickstoff für 5 s, 20 s oder 60 s inkubiert.

Die Messungen erfolgten an der *European Synchrotron Radiation Facility* in Grenoble durch Esther Lenherr und Klemens Wild von der AG Sinning, die ebenfalls die Strukturen lösten.

Die quervernetzte Mutante His₆-Arf1NΔ17Y35Acys konnte nur auf 5,7 mg/ml konzentriert werden, da sie bei höheren Konzentrationen präzipitierte. Kristallisation wurde nicht beobachtet.

4.3.8 Synthese von p23-Lipopeptid

Da Arf und Coatomer über Proteine der p24-Familie an Membranen binden, wurde den Liposomen (Herstellung s. u.) ein Lipopeptid zugesetzt. Dieses besteht aus dem cytosolischen Teil des p23-Proteins, der über einen Cystein-Rest kovalent an ein Phospholipid gebunden ist (Nickel and Wieland, 2001).

Zuerst wurde das Peptid in DMF gelöst und mit einem 10 %igen molaren Überschuss an Maleimidophenyl-Butyramid-PE ÜN bei RT rotierend inkubiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels unter einem Argonstrom wurde das Produkt in 30 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) resuspendiert.

Die Trennung von Lipopeptid und Edukten erfolgte über eine Self-Pak-C18-Säule, die zuvor mit 2 ml 100 % Acetonitril und 30 ml 30 % Acetonitril/0,1 % TFA äquilibriert worden war. Nach Laden der Probe wurde mit je 2 ml 30 % Acetonitril/0,1TFA, 40 % Acetonitril/0,1 % TFA, 60% Acetonitril/0,1 % TFA, 80% Acetonitril/0,1 % TFA, 4 ml 90 % Acetonitril/0,1 % TFA und 2 ml 100 % Acetonitril/0,1 % TFA eluiert. Die

Fraktionen wurden bei 37°C in einem Rotations-Vakuumverdampfer (RCV 2-18; Christ; Osterode) getrocknet und in je 100 µl 30 % Acetonitril/0,1 % TFA resuspendiert. Je 10 µl wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: 9,7 Butanol : 7,5 Pyridin : 1,5 Essigsäure: 6 Wasser) und anschließendem Färben mit Joddampf analysiert. Die Fraktionen, die das Lipopeptid enthielten, wurden vereinigt und die Konzentration anhand des Phosphatgehalts bestimmt. Die Lipopeptidlösung wurde aliquotiert (15 nmol) und das Lösungsmittel unter Argon verdampft.

4.3.9 Herstellung von Liposomen

Zur Generierung unilamellarer Liposomen wurden 300 µl eines 3 mM Golgi-like-Mixes (s. Tabelle) in einem chloroformresistenten Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 1 mol% PI(4,5)P₂ und 3 mol% p23Lipopeptid oder im Falle der His₆-Arf1NΔ17-Proteine 5 mol% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl](Nickelsalz) versetzt und das Chloroform, in dem die Lipide gelöst waren, unter einem sanften Stickstoffstrom verdampft. Dabei wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig bewegt, um eine möglichst filmartige Verteilung der Lipide an der Gefäßwand zu erhalten. Anschließend wurde eventuell verbliebenes Chloroform durch Inkubation für 30 min im Vakuum entfernt. Die Resuspension erfolgte in 37°C warmen HKM-Puffer durch 5minütiges Mischen auf dem Vortexgerät. Es wurden 8 Frier-Tau-Zyklen (flüssiger Stickstoff, 37°C Wasserbad) durchgeführt, um unilamellare Liposomen zu erhalten. Aliquotiert wurden die Liposomen bei -80°C gelagert.

Lipid	[mol%]
Phosphatidylcholin	43
Phosphatidylethanolamin	19
Phosphatidylinositol	10
Phosphatidylserin	5
Sphingomyelin	7
Cholesterin	16

Tab.4.8: Zusammensetzung Golgi-like-Mix

4.3.10 Analyse der Bindung und Dimerisierung von Arf1 an Membranen

4.3.10.1 Analyse der Membranbindung

Um die Bindung der verschiedenen Arf-Konstrukte an Membranen zu untersuchen, wurden Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt. Dazu wurden in einem Ansatzvolumen von 200 μ l 0,5 mM Liposomen (Golgi-like-Mix, mit 1 mol% PI(4,5)P₂ und, falls His₆-Arf1N Δ 17-Proteine verwendet wurden, 5 mol% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl](Nickelsalz)) mit 1 μ M Arf1, 50 nM ARNO mit oder ohne 1 mM GTP in HKM-Puffer für 10 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Probe wurde mit 75% (w/v) Sucrose auf 30 % (w/w) Sucrose eingestellt und mit 200 μ l 25 % (w/w) Sucrose sowie 50 μ l HKM-Puffer überschichtet. Es wurde für 1 h bei 250000 g (SW60Ti-Rotor; 50000 rpm; 4°C) zentrifugiert. Liposomengebundenes Material wandert aufgrund seiner spezifischen Schwimmdichte nach oben, sodass bei Entnahme der oberen 100 μ l nur liposomengebundenes Protein gesammelt wurde. Freies Protein verbleibt im unteren Bereich des Gradienten. Für die Analyse mittels Western-Blot und Immundetektion wurden 2 % des Probenansatzes nach Inkubation und 10 % des Gradientenmaterials eingesetzt.

4.3.10.2 Analyse der Dimerisierung an Membranen

Da Arf1wt nach Bindung an Membranen dimerisiert, wurden auch die Mutante Arf1Y35F auf diese Fähigkeit hin untersucht. Dazu wurde nach der Membranbindung (s. 4.3.10.1) eine chemische Kreuzvernetzungsreaktion durchgeführt. Das liposomengebundene Material (100 μ l) wurde in zwei Hälften geteilt und die eine Hälfte mit 0,5 mM BMH versetzt, die andere Hälfte mit dem entsprechenden Volumen an DMSO und für 1 h bei RT inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM DTT; die Analyse erfolgte mittels Western-Blot und Immundetektion.

4.3.11 Analyse der Membranoberflächenaktivität von Arf1

Arf1wt ist in der Lage, Membranen zu deformieren, wie durch Rainer Beck (Beck *et al.*, PNAS, 2008) gezeigt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode, die im folgenden beschrieben ist, für die Mutante Arf1Y35F sowie die His₆-Arf1N Δ 17-Konstrukte angewendet. Da letztere keine N-terminale Helix mit einem Myristoyl-Rest

besitzen, wurden Ni-haltige Lipide zum Golgi-like-Mix gegeben, mit denen der His-Tag interagieren und somit das Protein zur Membran rekrutieren kann.

1 μ l eines Golgi-like-Lipidmixes, dem 1 mol% PI(4,5)P₂ und im Falle der His₆-Arf1N Δ 17-Konstrukte 5 mol% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl](Nickelsalz) zugesetzt worden waren, wurden auf einen sauberen Objektträger gebracht und das Lösungsmittel Chloroform an der Luft evaporieren gelassen. Mit Hilfe zweier Schichten ausgezogenen Parafilms im Abstand von < 0,5 cm und einem darauf gesetzten Deckgläschen wurde eine Tubulierungskammer von 20 μ l – 30 μ l gebaut. Am Weitfeld-Mikroskop (WFM Axiovert-Axioram MRM; Carl Zeiss, Jena; Vergrößerung 100x; Phase III) wurde die Lipidschicht durch Zugabe von Puffer, der 1 mM GTP sowie 100 nM ARNO enthielt, hydratisiert. Durch Zugabe von 3 μ M bis 5 μ M Arf wurde die Reaktion gestartet. Es wurden Photos in verschiedenen Zeitabständen gemacht und Videos aufgenommen. Für die His₆-Arf1N Δ 17-Konstrukte wurden Konzentrationen von bis zu 25 μ M eingesetzt, als Negativkontrolle diente ARNO in einer Konzentration von 25 μ M. Das maximal zuzuführende Volumen an Proteinlösung betrug 4 μ l.

4.3.12 Herstellung von COPI-Vesikeln

Zur Herstellung von COPI-Vesikeln wurden 300 μ M Liposomen (Golgi-like-Mix mit 1 mol% PI(4,5)P₂, 3 mol% p23-Lipopeptid und ggf. 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl](Nickelsalz) mit 50 μ g Coatomer-Mix, 5 μ g Arf1 und 1 μ g ARNO mit oder ohne 1 mM GTP in 1x Assaypuffer in einem Endvolumen von 250 μ l für 15 min bei 37°C inkubiert. Es wurden 5 μ l Probe für die anschließende Analyse durch SDS-PAGE und Western-Blot genommen und der Rest der Probe nach Überführen in SW60Ti-Röhrchen mit 50 μ l 37,5 % (w/w) Sucrose und 5 μ l 50 % (w/w) Sucrose unterschichtet. Nach Dichtegradientenzentrifugation für 50 min bei 100000 g und 4°C (SW60Ti-Rotor mit Adaptoren) wurde die COPI-Vesikel enthaltende Fraktion (16 μ l knapp über dem Boden) gezapft.

4.3.13 Limitierte Proteolyse

Um zu untersuchen, welche Konformation der Coatomer-Komplex annimmt, wenn er von His₆-Arf1NΔ17 zur Membran rekrutiert wird, wurde eine limitierte Proteolyse wie von Reinhard *et al* (Reinhard et al., 1999) beschrieben, durchgeführt. Da His₆-Arf1NΔ17 keine freien COPI-Vesikel bildet, wurde das membrangebundene Material über eine Flotationsassay isoliert. Hierzu wurden 500 μM Liposomen, die 3 mol% p23-Lipopeptid sowie 5 mol% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl](Nickelsalz) enthielten, mit 50 μg Kaninchenleber-Coatomer, 10 μg Arf, 1 μg ARNO mit oder ohne 1 mM GTP in einem Endvolumen von 125 μl für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mit 75 %iger (w/v) Sucrose auf 47 % (w/w) Sucrose eingestellt und mit 250 μl 42 %iger (w/w) Sucrose sowie 70 μl 10 %iger (w/w) Sucrose überschichtet. Nach einer 2,5-stündigen Dichtegradientenzentrifugation bei 200000 g (44000 rpm; SW60Ti; 4°C) wurden 70 μl der Top-Fraktion gezapft. Für die limitierte Proteolyse wurde zu jedem Ansatz (10 μl) Thermolysin in einer Endkonzentration von 0,008 μM gegeben und für 30 min oder 60 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne die Zugabe von Thermolysin. Die Proteolyse wurde beendet durch die Zugabe von 40 mM (Endkonzentration) EDTA (pH 8,0). Zur Analyse wurden die Proben in einem 7,5 % - 15 %igem SDS-Gel aufgetrennt und ein Western-Blot gegen die γ-COP-Untereinheit durchgeführt.

4.3.14 Elektronenmikroskopie

4.3.14.1 Negativkontrastierung

Proben von COP-Vesikeln wurden elektronenmikroskopisch analysiert. Dazu wurde die Methode der Negativkontrastierung angewandt.

Für die Präparation wurden 5 μl Probe auf einem mit einem Kohle- und einem Kunststoffilm (Pioloform ®) beschichteten Kupfergrid für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung in 20 μl 1 % Glutaraldehyd in HKM-Puffer. Nach dreimaligem Waschen mit je 20 μl HKM-Puffer wurden die Grids für 5 min in 10 μl 0,05 % Tanninsäure inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 20 μl *Aqua bidest* erfolgte die Kontrastierreaktion in 0,4 % Uranylacetat/1,8 % Methylcellulose für 10 min. Der letzte Schritt wurde auf Eis durchgeführt; alle anderen Schritte bei RT.

Die Analyse der Proben erfolgte mit einem EM10CR-Transmissions-Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Jena); Bilder wurden bei unterschiedlichen

Vergrößerungen mit Hilfe einer am Mikroskop installierten Digitalkamera und der zugehörigen Software ImageSP (Tröndle Restlichtverstärkersysteme) aufgenommen.

4.3.14.2 Harzeinbettungs-Schnitte

Um Gesamt-Inkubationsansätze statt isolierter COPI-Vesikel zu untersuchen, wurden Harzeinbettungen vorgenommen.

Dazu wurden 20 µg Liposomen (Golgi-like-Mix mit 1 mol% PI(4,5)P₂, 3 mol% p23-Lipopeptid und ggf. 5 mol% 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)-succinyl](Nickelsalz)) mit 20 µg Kaninchenleber-Coatomer, 2 µg Arf1 und 0,5 µg ARNO mit oder ohne 1 mM GTP in Assaypuffer für 15 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert. Zur Fixierung wurden 500 µl 2 % Glutaraldehyd in 1x Assaypuffer zugegeben und die Membranen nach 15minütiger Inkubation bei RT für 1 h bei 100000 g und 4°C (TLA55-Rotor) zentrifugiert. Die weitere Prozessierung der Proben wurde von Andrea Hellwig (AG Bading, Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften, Universität Heidelberg) vorgenommen.

Die Analyse erfolgte mit einem EM10CR-Transmissions-Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Jena); Bilder wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungen mit Hilfe einer am Mikroskop installierten Digitalkamera und der zugehörigen Software ImageSP (Tröndle Restlichtverstärkersysteme) aufgenommen.

4.3.15 Fluorimetrische Bestimmung des Nukleotidaustauschs von Arf1

Der Austausch von GDP zu GTP an Arf1 führt zu Konformationsänderungen, die im Falle des konservierten Trp in der switchII-Region bewirken, dass dessen intrinsische Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt wird, was zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. Somit kann der Austausch zu GTP fluorimetrisch detektiert werden.

Dazu wurden in einer Quarzküvette zu 100 µM Liposomen (50 nm Durchmesser; Golgi-like-Mix mit 3 mol% p23-Lipopeptid und 1 mol% PI(4,5)P₂) in HKM-Puffer 1 µM Arf1 gegeben, nach 60 s 1 mM GTP und nach weiteren 60 s 2 mM EDTA. Die EDTA-Zugabe ermöglicht den effizienten Austausch von GDP zu GTP, der zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. Zur Stabilisierung der GTP-Form wurden nach weiteren 600 s 4 mM Magnesiumchlorid zugegeben und nach weiteren 60 s ArfGAP1, um dessen Hydrolyseaktivität zu untersuchen.

Eine weitere Frage war, ob Arf1wt auch in Anwesenheit von Detergentien statt Liposomen GDP zu GTP austauschen kann. Da aus Arbeiten von Kahn *et al.* bekannt war, dass Arf1wt an Mizellen aus Di-myristoyl-Phosphatidylcholin (DMPC) und Natriumcholat ebenfalls GDP zu GTP austauschen kann (Kahn and Gilman, 1986), wurden verschiedene Detergentien in Kombination mit dem Cholesterinderivat Natriumcholat getestet (s. u), um die Kombination des bestmöglichen Austauschs zu finden. Die Detergentien wurden in einer Konzentration, die höher ist als ihre jeweilige kritische Mizellenkonzentration (CMC), eingesetzt, während die Konzentration an Natriumcholat mit 0,01 % konstant gehalten wurde.

Als Positivkontrolle dienten zum einen 0,1 mM Golgilike-Liposomen, die 1 mol% PI(4,5)P₂ enthielten und zum anderen 3 mM DMPC/0,01 % Natriumcholat, wie es von Kahn *et al.* (Kahn and Gilman, 1986) eingesetzt wurde.

Als Gerät wurde ein Spektrofluorimeter der Firma Jasco (Groß-Umstadt) verwendet, wozu folgende Parameter festgesetzt wurden:

Anregungswellenlänge: 297,5 nm +/- 5 nm

Emissionswellenlänge: 340 nm +/-20 nm

1 Datenpunkt pro Sekunde

Die Messtemperatur betrug 37°C, das Endvolumen 600 µl. Es wurde mit 300 rpm gerührt.

Detergenz	CMC [mM]	eingesetzte Konzentration [mM]
DDM	0,15	0,5
CHAPS	6-10	8
FosCholin	0,12	0,4
CYMAL5	2,4-5,0	8
OG	25	84
LDAO	1-3	3,3
C12E8	0,08	0,4

Tab. 4.9: verwendete Detergentien

4.3.16 Analyse der Coatomerrekrutierung mittels Lichtbrechung (SLS)

Um die Rekrutierung des Coatomer-Komplexes durch Arf1Y35F zu untersuchen, wurde die Methode des *static light scatterings* angewandt. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich der Brechungsindex von Liposomen ändert, wenn Proteinkomplexe an die Liposomen binden. Die Veränderung des Brechungsindex führt zu einer veränderten Lichtbrechung an den Liposomen, was mit Hilfe eines Spektrofluorimeters unter Verwendung derselben Wellenlänge für die Anregung und Emission verfolgt werden kann.

Für die Messungen wurden in einer Quarzküvette 100 μ M Liposomen (50 nm Durchmesser; Golgi-like-Mix mit 3 mol% p23-Lipopeptid und 1 mol% PI(4,5)P₂) in HKM-Puffer vorgelegt. Nach 60 s wurde 1 μ M Arf1 zugegeben, nach weiteren 60 s rekombinanter Coatomer-Mix, nach weiteren 60 s 1 mM GTP und nach weiteren 60 s 2 mM EDTA. Nach EDTA-Zugabe erfolgt der effiziente Austausch von GDP zu GTP, woraufhin das membrangebundene Arf den Coatomer-Komplex zur Membran rekrutiert. Dies äußert sich in einer Zunahme der Lichtstreuung. Nach weiteren 600 s wurde der Zustand durch Zugabe von 4 mM Magnesiumchlorid stabilisiert und der Prozess der *Coat*-Ablösung durch Zugabe von ArfGAP1 für weitere 600 s beobachtet. Die Ablösung des *Coats* führt zu einer Abnahme des Lichtstreuungssignals.

Als Gerät wurde ein Spektrofluorimeter der Firma Jasco (Groß-Umstadt) verwendet, wozu folgende Parameter festgesetzt wurden:

Anregungs- und Emissionswellenlänge: 350 nm +/- 3 nm

1 Datenpunkt pro Sekunde

Die Messtemperatur betrug 37°C, das Endvolumen 600 μ l. Es wurde mit 300 rpm gerührt

5. Anhang

5.1 Literatur

Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A. and Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-8.

Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. and Chabre, M. (1997). N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**, 4675-84.

Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* **3**, 531-7.

Bannykh, S. I. and Balch, W. E. (1998). Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments. *Histochem Cell Biol* **109**, 463-75.

Barlowe, C., d'Enfert, C. and Schekman, R. (1993). Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **268**, 873-9.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.

Barlowe, C. and Schekman, R. (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* **365**, 347-9.

Beck, R., Adolf, F., Weimer, C., Bruegger, B. and Wieland, F. T. (2009). ArfGAP1 activity and COPI vesicle biogenesis. *Traffic* **10**, 307-15.

Beck, R., Prinz, S., Diestelkotter-Bachert, P., Rohling, S., Adolf, F., Hoehner, K., Welsch, S., Ronchi, P., Brugger, B., Briggs, J. A. et al. (2011). Coatomer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *J Cell Biol* **194**, 765-77.

Beck, R., Sun, Z., Adolf, F., Rutz, C., Bassler, J., Wild, K., Sinning, I., Hurt, E., Brugger, B., Bethune, J. et al. (2008). Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11731-6.

Belden, W. J. and Barlowe, C. (2001). Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J Biol Chem* **276**, 43040-8.

Bethune, J., Kol, M., Hoffmann, J., Reckmann, I., Brugger, B. and Wieland, F. (2006). Coatomer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Mol Cell Biol* **26**, 8011-21.

Bi, X., Mancias, J. D. and Goldberg, J. (2007). Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Dev Cell* **13**, 635-45.

Bigay, J., Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B. and Antonny, B. (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J* **24**, 2244-53.

- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S. and Antony, B.** (2003). Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**, 563-6.
- Boehm, M. and Bonifacino, J. S.** (2001). Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **12**, 2907-20.
- Boguski, M. S. and McCormick, F.** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-54.
- 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.
- Bremser, M., Nickel, W., Schweikert, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Hughes, C. A., Sollner, T. H., Rothman, J. E. and Wieland, F. T.** (1999). Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* **96**, 495-506.
- Cai, H., Reinisch, K. and Ferro-Novick, S.** (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* **12**, 671-82.
- Claude, A., Zhao, B. P., Kuziemy, C. E., Dahan, S., Berger, S. J., Yan, J. P., Arnold, A. D., Sullivan, E. M. and Melancon, P.** (1999). GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol* **146**, 71-84.
- Crowther, R. A. and Pearse, B. M.** (1981). Assembly and packing of clathrin into coats. *J Cell Biol* **91**, 790-7.
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M. and Cassel, D.** (1995). The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* **270**, 1999-2002.
- Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A. and Schekman, R.** (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* **349**, 806-8.
- Deshaies, R. J. and Schekman, R.** (1989). SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**, 2653-64.
- DiNitto, J. P., Delprato, A., Gabe Lee, M. T., Cronin, T. C., Huang, S., Guilherme, A., Czech, M. P. and Lambright, D. G.** (2007). Structural basis and mechanism of autoregulation in 3-phosphoinositide-dependent Grp1 family Arf GTPase exchange factors. *Mol Cell* **28**, 569-83.
- Donaldson, J. G.** (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-6.
- Donaldson, J. G. and Honda, A.** (2005). Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem Soc Trans* **33**, 639-42.
- Donaldson, J. G. and Jackson, C. L.** (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 362-75.
- Dunphy, W. G. and Rothman, J. E.** (1985). Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* **42**, 13-21.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. and Duden, R.** (2000). COP I domains required for coatomeer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J* **19**, 3905-17.
- Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M. A. and Rothman, J. E.** (1996). Bimodal interaction of coatomeer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**, 1396-9.

- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. and Paris, S.** (1995). Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem* **270**, 1337-41.
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T.** (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 379-84.
- Frigerio, G., Grimsey, N., Dale, M., Majoul, I. and Duden, R.** (2007). Two human ARFGAPs associated with COP-I-coated vesicles. *Traffic* **8**, 1644-55.
- Glick, B. S. and Malhotra, V.** (1998). The curious status of the Golgi apparatus. *Cell* **95**, 883-9.
- Goldberg, J.** (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-48.
- Goldberg, J.** (1999). Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell* **96**, 893-902.
- Gommel, D. U., Memon, A. R., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner, J., Reinhard, C., Helms, J. B., Nickel, W. and Wieland, F. T.** (2001). Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J* **20**, 6751-60.
- Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F. T. and Rothman, J. E.** (1994). En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J Cell Biol* **124**, 883-92.
- Harroun, T. A., Bradshaw, J. P., Balali-Mood, K. and Katsaras, J.** (2005). A structural study of the myristoylated N-terminus of ARF1. *Biochim Biophys Acta* **1668**, 138-44.
- Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H. and Appenzeller, C.** (2000). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci* **113** (Pt 4), 587-96.
- Honda, A., Al-Awar, O. S., Hay, J. C. and Donaldson, J. G.** (2005). Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE. *J Cell Biol* **168**, 1039-51.
- Jackson, C. L. and Casanova, J. E.** (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**, 60-7.
- Kahn, R. A. and Gilman, A. G.** (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem* **261**, 7906-11.
- Kirchhausen, T.** (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S.** (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-64.
- Krauss, M., Jia, J. Y., Roux, A., Beck, R., Wieland, F. T., De Camilli, P. and Haucke, V.** (2008). Arf1-GTP-induced tubule formation suggests a function of Arf family proteins in curvature acquisition at sites of vesicle budding. *J Biol Chem* **283**, 27717-23.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Langer, J. D., Roth, C. M., Bethune, J., Stoops, E. H., Brugger, B., Herten, D. P. and Wieland, F. T.** (2008). A conformational change in the alpha-subunit of coatamer induced by ligand binding to gamma-COP revealed by single-pair FRET. *Traffic* **9**, 597-607.
- Lee, C. and Goldberg, J.** (2010). Structure of coatamer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell* **142**, 123-32.

- Lee, M. C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M. and Schekman, R.** (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* **122**, 605-17.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H. and Cosson, P.** (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199-207.
- Liu, Y., Kahn, R. A. and Prestegard, J. H.** (2010). Dynamic structure of membrane-anchored Arf*GTP. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 876-81.
- Low, H. H., Sachse, C., Amos, L. A. and Lowe, J.** (2009). Structure of a bacterial dynamin-like protein lipid tube provides a mechanism for assembly and membrane curving. *Cell* **139**, 1342-52.
- Majoul, I., Straub, M., Hell, S. W., Duden, R. and Soling, H. D.** (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell* **1**, 139-53.
- Malsam, J., Gommel, D., Wieland, F. T. and Nickel, W.** (1999). A role for ADP ribosylation factor in the control of cargo uptake during COPI-coated vesicle biogenesis. *FEBS Lett* **462**, 267-72.
- Martinez-Menarguez, J. A., Geuze, H. J., Slot, J. W. and Klumperman, J.** (1999). Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* **98**, 81-90.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R. and Yeung, T.** (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**, 263-75.
- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. and Nakano, A.** (2006). Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* **441**, 1007-10.
- Mazelova, J., Astuto-Gribble, L., Inoue, H., Tam, B. M., Schonteich, E., Prekeris, R., Moritz, O. L., Randazzo, P. A. and Deretic, D.** (2009). Ciliary targeting motif VxPx directs assembly of a trafficking module through Arf4. *EMBO J* **28**, 183-92.
- Moelleken, J., Malsam, J., Betts, M. J., Movafeghi, A., Reckmann, I., Meissner, I., Hellwig, A., Russell, R. B., Sollner, T., Brugger, B. et al.** (2007). Differential localization of coatamer complex isoforms within the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4425-30.
- Monetta, P., Slavin, I., Romero, N. and Alvarez, C.** (2007). Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell* **18**, 2400-10.
- Nickel, W., Malsam, J., Gorgas, K., Ravazzola, M., Jenne, N., Helms, J. B. and Wieland, F. T.** (1998). Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J Cell Sci* **111 (Pt 20)**, 3081-90.
- Nickel, W., Sohn, K., Bunning, C. and Wieland, F. T.** (1997). p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11393-8.
- Nickel, W. and Wieland, F. T.** (2001). Receptor-dependent formation of COPI-coated vesicles from chemically defined donor liposomes. *Methods Enzymol* **329**, 388-404.
- Orci, L., Glick, B. S. and Rothman, J. E.** (1986). A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* **46**, 171-84.

- Orci, L., Starnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H. and Rothman, J. E.** (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-49.
- Ostermann, J., Orci, L., Tani, K., Amherdt, M., Ravazzola, M., Elazar, Z. and Rothman, J. E.** (1993). Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* **75**, 1015-25.
- Owen, D. J., Collins, B. M. and Evans, P. R.** (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 153-91.
- Pai, E. F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K. C., John, J. and Wittinghofer, A.** (1989). Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* **341**, 209-14.
- Pasqualato, S., Renault, L. and Cherfils, J.** (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep* **3**, 1035-41.
- Pearse, B. M. and Robinson, M. S.** (1990). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 151-71.
- Pfeffer, S. R.** (2010). How the Golgi works: a cisternal progenitor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19614-8.
- Ramachandran, R.** (2011). Vesicle scission: dynamin. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 10-7.
- Randazzo, P. A. and Hirsch, D. S.** (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell Signal* **16**, 401-13.
- Reinhard, C., Harter, C., Bremser, M., Brugger, B., Sohn, K., Helms, J. B. and Wieland, F.** (1999). Receptor-induced polymerization of coatomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1224-8.
- Reinhard, C., Schweikert, M., Wieland, F. T. and Nickel, W.** (2003). Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8253-7.
- Rothman, J. E.** (1981). The golgi apparatus: two organelles in tandem. *Science* **213**, 1212-9.
- Rothman, J. E. and Warren, G.** (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol* **4**, 220-33.
- Rothman, J. E. and Wieland, F. T.** (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-34.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. and De Camilli, P.** (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* **441**, 528-31.
- Sahlmuller, M. C., Strating, J. R., Beck, R., Eckert, P., Popoff, V., Haag, M., Hellwig, A., Berger, I., Brugger, B. and Wieland, F. T.** (2011). Recombinant heptameric coatomer complexes: novel tools to study isoform-specific functions. *Traffic* **12**, 682-92.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A. and Rothman, J. E.** (1991a). ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**, 239-53.
- Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J. E. and Wieland, F. T.** (1991b). A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature* **349**, 215-20.
- Shahinian, S. and Silviu, J. R.** (1995). Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry* **34**, 3813-22.

- Simmen, T., Honing, S., Icking, A., Tikkanen, R. and Hunziker, W.** (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* **4**, 154-9.
- Sohn, K., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Bremser, M., Lottspeich, F., Fiedler, K., Helms, J. B. and Wieland, F. T.** (1996). A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatamer binding. *J Cell Biol* **135**, 1239-48.
- Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-24.
- Spang, A.** (2008). The life cycle of a transport vesicle. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2781-9.
- Spang, A., Matsuoka, K., Hamamoto, S., Schekman, R. and Orci, L.** (1998). Coatamer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11199-204.
- Stalder, D., Barelli, H., Gautier, R., Macia, E., Jackson, C. L. and Antony, B.** (2011). Kinetic studies of the Arf activator Arno on model membranes in the presence of Arf effectors suggest control by a positive feedback loop. *J Biol Chem* **286**, 3873-83.
- Stamnes, M. A., Craighead, M. W., Hoe, M. H., Lampen, N., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E.** (1995). An integral membrane component of coatamer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8011-5.
- Sun, Z., Anderl, F., Frohlich, K., Zhao, L., Hanke, S., Brugger, B., Wieland, F. and Bethune, J.** (2007). Multiple and stepwise interactions between coatamer and ADP-ribosylation factor-1 (Arf1)-GTP. *Traffic* **8**, 582-93.
- Szul, T., Grabski, R., Lyons, S., Morohashi, Y., Shestopal, S., Lowe, M. and Sztul, E.** (2007). Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J Cell Sci* **120**, 3929-40.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S. and Walter, P.** (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-58.
- Vetter, I. R. and Wittinghofer, A.** (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-304.
- Volpicelli-Daley, L. A., Li, Y., Zhang, C. J. and Kahn, R. A.** (2005). Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell* **16**, 4495-508.
- Walter, P. and Blobel, G.** (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **91**, 557-61.
- Watson, P. J., Frigerio, G., Collins, B. M., Duden, R. and Owen, D. J.** (2004). Gamma-COP appendage domain - structure and function. *Traffic* **5**, 79-88.
- Wegmann, D., Hess, P., Baier, C., Wieland, F. T. and Reinhard, C.** (2004). Novel isotypic gamma/zeta subunits reveal three coatamer complexes in mammals. *Mol Cell Biol* **24**, 1070-80.
- Weimer, C., Beck, R., Eckert, P., Reckmann, I., Moelleken, J., Brugger, B. and Wieland, F.** (2008). Differential roles of ArfGAP1, ArfGAP2, and ArfGAP3 in COPI trafficking. *J Cell Biol* **183**, 725-35.

Wittinghofer, A., Franken, S. M., Scheidig, A. J., Rensland, H., Lautwein, A., Pai, E. F. and Goody, R. S. (1993). Three-dimensional structure and properties of wild-type and mutant H-ras-encoded p21. *Ciba Found Symp* **176**, 6-21; discussion 21-7.

Zhao, L., Helms, J. B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J. and Wieland, F. T. (1997). Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4418-23.

Zhao, L., Helms, J. B., Brunner, J. and Wieland, F. T. (1999). GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatamer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem* **274**, 14198-203.

Zhao, X., Lasell, T. K. and Melancon, P. (2002). Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic. *Mol Biol Cell* **13**, 119-33.

5.2 Abkürzungen

Einheiten:

AU	<i>arbitrary units</i>
C	Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
h (als Vorsatz)	Hekto
k (als Vorsatz)	Kilo
l	Liter
m	Meter
m (als Vorsatz)	milli
M	Molar
min	Minute
mol	Stoffmenge
μ (als Vorsatz)	Mikro
n (als Vorsatz)	nano
p (als Vorsatz)	Piko
Pa	Pascal

rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
U	Unit
V	Volt

chemische Verbindungen:

ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMH	bis-Maleimidohexan
BMOE	bis-Maleimidoethan
BM(PEG) ₃	1,11-bis-Maleimidotriehtylenglykol
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyldimethylammonio)propansulfonsäure
CY-MAL5	Cyclohexyl-methyl- β -D-Maltopyranosid
C12E8	Oktaethylenglykol-Monododecyl-Ether
DDM	n-dodecyl- β -D-Maltosid
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DMF	Dimethylformamid
DMPC	Dimyristoyl-Phosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
FOS-Cholin	N-dodecyl-phosphocholin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GppNHp	Guanosin-5'($\beta\gamma$ -imido)-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-[γ -thio]-triphosphat
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiol-galactosid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LDAO	Lauryl-dimethyl-Aminoxid

Ni ²⁺	Nickel
OG	β-Octyl-D-Glucosid
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Phosphatidylinositol
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Sphingomyelin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin

V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AP	Adaptor-Proteinkomplex
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
Arl	<i>Arf-like</i>
ARNO	<i>Arf nucleotide binding site opener</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CGN	<i>cis</i> -Golgi-Netzwerk
Coatomer	<i>coat protoamer</i>
COP	<i>coat protein complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Ribonukleotid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-intermediäres Kompartiment
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor
GNBP	Guaninnukleotid-bindendes Protein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LB	Luria-Bertani
MW	Molekulargewicht
NMT	N-Myristoyl-Transferase

OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PM	Plasmamembran
RMSD	<i>root mean square distance</i>
RT	Raumtemperatur
Sar	<i>secretion associated Ras related</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>thermophilus aquaticus</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen-Verhältnis
wt	Wildtyp
w/v	Gewichts-Volumen-Verhältnis
w/w	Gewichts-Verhältnis
WB	Western-Blot

5.3 verwendete Kristallisationsscreens

JCSG I

A1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
A1	0.1 M	CHES PH 9.5
A2	0.1 M	BICINE PH 9
A2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
A3	0.05 M	LITHIUM SULFATE
A3	0.05 M	SODIUM SULFATE
A3	0.05 M	TRIS PH 8.5
A3	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
A4	0.2 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
A4	0.1 M	TRIS PH 8.5
A4	50 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
A5	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
A5	3.4 M	1,6-HEXANEDIOL
A5	0.1 M	TRIS PH 8.5
A6	40 % (v/v)	ETHANOL

A6	0.05 M	MAGNESIUM CHLORIDE
A6	0.1 M	TRIS PH 8.5
A7	0.2 M	POTASSIUM CITRATE
A7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A8	0.2 M	SODIUM CITRATE
A8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A9	0.2 M	LITHIUM CITRATE
A9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A10	0.2 M	CALCIUM ACETATE
A10	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
A10	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
A11	0.2 M	POTASSIUM ACETATE
A11	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A12	0.2 M	MAGNESIUM ACETATE
A12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B1	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
B1	0.1 M	HEPES PH 7.5
B1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
B2	0.1 M	HEPES PH 7.5
B2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
B3	0.1 M	HEPES PH 7.5
B3	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
B4	0.19 M	CALCIUM CHLORIDE
B4	0.095 M	HEPES PH 7.5
B4	26.6 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
B4	5 % (v/v)	GLYCEROL
B5	0.1 M	HEPES PH 7.5
B5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B5	10 % (v/v)	2-PROPANOL
B6	0.8 M	DI-SODIUM HYDROGEN PHOSPHATE
B6	0.8 M	DI-POTASSIUM HYDROGEN PHOSPHATE
B6	0.1 M	HEPES PH 7.5
B7	0.2 M	DI-SODIUM TARTRATE
B7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B8	0.2 M	CALCIUM ACETATE
B8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B9	0.2 M	POTASSIUM FORMATE
B9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B10	0.2 M	POTASSIUM SODIUM TARTRATE
B10	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B11	0.2 M	SODIUM FORMATE
B11	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B12	0.2 M	POTASSIUM FLUORIDE
B12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C1	0.2 M	AMMONIUM ACETATE
C1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C2	0.2 M	LITHIUM NITRATE

C2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C3	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
C3	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
C3	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
C4	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C4	0.1 M	TRIS PH 7
C4	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
C5	0.2 M	CALCIUM ACETATE
C5	0.1 M	TRIS PH 7
C5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
C6	2.5 M	SODIUM CHLORIDE
C6	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C6	0.1 M	TRIS PH 7
C7	0.1 M	TRIS PH 7
C7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
C8	0.2 M	SODIUM ACETATE PH 7
C8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C9	0.2 M	POTASSIUM THIOCYANATE
C9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C10	0.1 M	HEPES PH 7
C10	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
C11	0.2 M	POTASSIUM NITRATE
C11	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C12	0.2 M	SODIUM THIOCYANATE
C12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D1	0.2 M	SODIUM IODIDE
D1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D2	0.2 M	POTASSIUM CHLORIDE
D2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D3	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
D3	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D4	0.2 M	POTASSIUM IODIDE
D4	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D5	0.2 M	LITHIUM CHLORIDE
D5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D6	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
D6	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
D6	50 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
D7	0.2 M	DI-AMMONIUM TARTRATE
D7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D8	0.2 M	SODIUM SULFATE
D8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D9	0.2 M	AMMONIUM FORMATE
D9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D10	0.1 M	HEPES PH 7.5
D10	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
D10	5 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL

D11	1.6 M	SODIUM CITRATE PH 6.5
D12	0.2 M	MAGNESIUM ACETATE
D12	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
D12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
E1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E1	0.2 M	AMMONIUM NITRATE
E2	0.2 M	AMMONIUM CHLORIDE
E2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E3	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
E3	0.1 M	NA K PHOSPHATE PH 6.2
E3	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
E4	0.2 M	AMMONIUM IODIDE
E4	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E5	0.2 M	AMMONIUM FLUORIDE
E5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E6	0.1 M	MES PH 6
E6	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
E6	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
E7	0.2 M	CALCIUM ACETATE
E7	0.1 M	MES PH 6
E7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
E8	0.2 M	LITHIUM SULFATE
E8	0.1 M	MES PH 6
E8	35 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
E9	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
E9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E10	0.1 M	MES PH 6
E10	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
E11	0.1 M	MES PH 6
E11	20 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
E12	0.1 M	MES PH 6
E12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
F1	0.1 M	MES PH 6
F1	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
F2	0.2 M	MAGNESIUM SULFATE
F2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F3	0.2 M	MAGNESIUM FORMATE
F3	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F4	0.2 M	MAGNESIUM NITRATE
F4	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F5	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
F5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F6	0.095 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
F6	19 % (v/v)	2-PROPANOL
F6	19 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
F6	5 % (v/v)	GLYCEROL
F7	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.6

F7	20 % (v/v)	2-PROPANOL
F7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
F8	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
F8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
F9	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
F9	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
F9	50 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
F10	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
F10	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
F10	40 % (v/v)	ETHANOL
F11	0.2 M	LITHIUM SULFATE
F11	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
F11	50 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
F12	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
F12	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
G1	0.18 M	TRI-AMMONIUM CITRATE PH 7
G1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G2	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 5
G2	20 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
G3	1 M	LITHIUM CHLORIDE
G3	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
G3	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
G4	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
G4	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
G5	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
G5	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
G6	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
G6	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
G7	0.2 M	POTASSIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
G7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G8	0.2 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
G8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G9	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
G9	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G9	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
G10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G10	8 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
G11	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
G11	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G11	25 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
G12	0.02 M	CALCIUM CHLORIDE
G12	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G12	30 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
H1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H1	35 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
H2	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000

H3	0.2 M	SODIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H3	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H4	0.05 M	POTASSIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H4	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
H5	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
H5	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
H5	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
H6	2 M	AMMONIUM SULFATE
H6	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
H7	0.2 M	LITHIUM SULFATE
H7	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
H7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
H8	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H8	20 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
H9	0.8 M	AMMONIUM SULFATE
H9	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H10	1 M	LITHIUM CHLORIDE
H10	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H10	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
H11	1 M	LITHIUM CHLORIDE
H11	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H11	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
H12	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H12	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000

JCSG II

A1	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
A1	0.1 M	CAPS PH 10.5
A1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
A2	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
A2	1.26 M	AMMONIUM SULFATE
A2	0.1 M	CHES PH 9.5
A3	1 M	SODIUM CITRATE
A3	0.1 M	CHES PH 9.5
A4	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
A4	0.1 M	CHES PH 9.5
A4	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
A5	0.1 M	BICINE PH 9
A5	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 20000
A5	2 % (w/v)	DIOXANE
A6	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
A6	0.1 M	BICINE PH 9
A6	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 550
A7	1 M	LITHIUM CHLORIDE
A7	0.1 M	BICINE PH 9
A7	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000

A8	0.1 M	TRIS PH 8.5
A8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
A8	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
A8	10 % (w/v)	GLYCEROL
A9	0.01 M	NICKEL (II) CHLORIDE
A9	0.1 M	TRIS PH 8.5
A9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
A10	0.1 M	TRIS PH 8.5
A10	20 % (w/v)	ETHANOL
A11	2 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
A11	0.1 M	TRIS PH 8.5
A12	0.1 M	TRIS PH 8.5
A12	8 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
B1	2 M	AMMONIUM SULFATE
B1	0.1 M	TRIS PH 8.5
B2	0.2 M	LITHIUM SULFATE
B2	0.1 M	TRIS PH 8.5
B2	40 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
B3	0.2 M	CALCIUM ACETATE
B3	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
B3	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
B4	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B4	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
B4	35 % (w/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
B5	1 M	LITHIUM CHLORIDE
B5	0.1 M	TRIS PH 8
B5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
B6	0.1 M	TRIS PH 8
B6	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
B7	0.2 M	LITHIUM ACETATE
B7	20 w/v	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B8	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B8	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
B8	40 % (w/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
B9	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B9	0.1 M	HEPES PH 7.5
B9	15 % (w/v)	ETHANOL
B10	0.1 M	HEPES PH 7.5
B10	70 % (w/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
B11	0.085 M	HEPES PH 7.5
B11	17 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B11	15 % (w/v)	GLYCEROL
B11	8.5 % (w/v)	2-PROPANOL
B12	0.6 M	SODIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
B12	0.6 M	POTASSIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
B12	0.075 M	HEPES PH 7.5
B12	25 % (w/v)	GLYCEROL

C1	0.18 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C1	0.09 M	HEPES PH 7.5
C1	27 v/v	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C1	10 v/v	GLYCEROL
C2	2 M	AMMONIUM SULFATE
C2	0.1 M	HEPES PH 7.5
C2	2 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C3	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C3	0.1 M	HEPES PH 7.5
C3	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C4	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
C4	0.1 M	NA K PHOSPHATE PH 6.2
C4	50 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
C5	0.2 M	SODIUM FLUORIDE
C5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C6	0.2 M	LITHIUM SULFATE
C6	2 M	AMMONIUM SULFATE
C6	0.1 M	TRIS PH 7
C7	0.2 M	CALCIUM ACETATE
C7	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
C7	40 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
C8	0.1 M	TRIS PH 7
C8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
C9	1 M	LITHIUM CHLORIDE
C9	0.1 M	HEPES PH 7
C9	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
C10	0.1 M	HEPES PH 7
C10	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
C11	40 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C11	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
C11	0.1 M	NA K PHOSPHATE PH 6.2
C12	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
C12	50 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
D1	0.1 M	NA K PHOSPHATE PH 6.2
D1	25 % (w/v)	1,2-PROPANEDIOL
D1	10 % (v/v)	GLYCEROL
D2	0.2 M	SODIUM NITRATE
D2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D3	0.05 M	LITHIUM SULFATE
D3	0.1 M	TRIS PH 7
D3	50 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
D4	0.2 M	POTASSIUM SULFATE
D4	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D5	0.2 M	MAGNESIUM FORMATE
D6	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
D6	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
D7	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE

D7	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
D7	20 w/v	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
D8	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
D8	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
D8	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
D9	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
D9	30 v/v	POLYETHYLENE GLYCOL 400
D9	0.2 M	LITHIUM SULFATE
D10	2 M	AMMONIUM SULFATE
D10	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
D10	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
D11	0.1 M	MES PH 6.5
D11	12 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 20000
D12	0.2 M	LITHIUM SULFATE
D12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E1	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
E1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
E1	0.1 M	NA K PHOSPHATE PH 6.2
E2	0.1 M	MES PH 6
E2	10 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
E3	1 M	LITHIUM CHLORIDE
E3	0.1 M	MES PH 6
E3	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
E4	1 M	LITHIUM CHLORIDE
E4	0.1 M	MES PH 6
E4	10 w/v	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
E5	0.1 M	MES PH 6
E5	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
E6	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
E6	25 % (v/v)	1,2-PROPANEDIOL
E6	10 % (v/v)	GLYCEROL
E6	0.2 M	ZINC ACETATE
E7	0.2 M	ZINC ACETATE
E7	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
E7	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
E8	0.5 M	AMMONIUM SULFATE
E8	0.1 M	TRIS PH 7
E8	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
E8	10 % (v/v)	GLYCEROL
E9	0.5 M	AMMONIUM SULFATE
E9	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
E9	1 M	LITHIUM SULFATE
E10	0.2 M	AMMONIUM ACETATE
E10	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
E10	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
E11	24 w/v	POLYETHYLENE GLYCOL 1500
E11	20 v/v	GLYCEROL

E12	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
E12	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
E12	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
F1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
F1	35 v/v	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
F1	10 v/v	GLYCEROL
F2	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
F2	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
F3	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
F3	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
F3	50 % (v/v)	ETHYLENE GLYCOL
F4	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
F4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
F4	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
F5	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
F5	40 v/v	1,2-PROPANEDIOL
F6	40 % (v/v)	ETHYLENE GLYCOL
F6	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
F7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 5
F7	10 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
F8	2.4 M	AMMONIUM SULFATE
F8	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
F9	1.6 M	AMMONIUM SULFATE
F9	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
F10	0.8 M	AMMONIUM SULFATE
F10	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
F11	1 M	LITHIUM CHLORIDE
F11	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
F11	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
F12	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
F12	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
F12	25 % (v/v)	1,2-PROPANEDIOL
F12	10 % (v/v)	GLYCEROL
G1	2 M	AMMONIUM SULFATE
G1	5 v/v	2-PROPANOL
G2	2 M	AMMONIUM SULFATE
G3	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
G3	0.1 M	MES PH 5.5
G3	40 v/v	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G4	0.01 M	COBALT CHLORIDE
G4	1 M	1,6-HEXANEDIOL
G4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G5	1.6 M	AMMONIUM SULFATE
G5	0.08 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G5	20 v/v	GLYCEROL
G6	0.07 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G6	5.6 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000

G6	30 % (v/v)	GLYCEROL
G7	0.14 M	CALCIUM CHLORIDE
G7	0.07 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G7	30 v/v	GLYCEROL
G7	14 v/v	2-PROPANOL
G8	0.08 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
G8	20 % (v/v)	GLYCEROL
G8	0.16 M	AMMONIUM SULFATE
G9	27 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
G9	10 % (v/v)	GLYCEROL
G9	0.09 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G9	0.018 M	CALCIUM CHLORIDE
G10	2 M	AMMONIUM SULFATE
G10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G11	0.2 M	ZINC ACETATE
G11	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
G11	10 w/v	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
G12	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
G12	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
G12	20 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
G12	10 % (v/v)	GLYCEROL
H1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H1	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
H1	0.2 M	CALCIUM ACETATE
H2	0.2 M	LITHIUM SULFATE
H2	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H2	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
H3	25 v/v	ETHYLENE GLYCOL
H4	0.2 M	LITHIUM SULFATE
H4	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
H4	10 % (v/v)	2-PROPANOL
H5	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
H5	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
H5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
H6	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
H6	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
H7	0.17 M	AMMONIUM SULFATE
H7	25.5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
H7	15 % (v/v)	GLYCEROL
H8	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1500
H9	0.4 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H10	35 % (v/v)	DIOXANE
H11	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H11	10 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
H12	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000

JCSG III

A1	0.1 M	CAPS PH 10.5
A1	30 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
A2	0.1 M	CHES PH 9.5
A2	40 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
A3	0.1 M	CHES PH 9.5
A3	50 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
A4	0.1 M	CHES PH 9.5
A4	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
A5	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
A5	0.1 M	CHES PH 9.5
A5	50 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
A6	0.2 M	DI-POTASSIUM HYDROGEN PHOSPHATE
A6	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A7	0.2 M	DI-SODIUM HYDROGEN PHOSPHATE
A7	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A8	0.1 M	BICINE PH 9
A8	40 %(v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
A9	0.1 M	BICINE PH 9
A9	5 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
A10	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
A10	0.1 M	CAPS PH 10.5
A10	30 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
A11	0.1 M	TRIS PH 8.5
A11	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
A12	1 M	DI-AMMONIUM HYDROGEN PHOSPHATE
A12	0.1 M	TRIS PH 8.5
B1	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B1	0.1 M	TRIS PH 8.5
B1	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
B2	0.2 M	LITHIUM SULFATE
B2	1.26 M	AMMONIUM SULFATE
B2	0.1 M	TRIS PH 8.5
B3	1 M	LITHIUM SULFATE
B3	0.01 M	NICKEL (II) CHLORIDE
B3	0.1 M	TRIS PH 8.5
B4	1.6 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
B4	0.08 M	TRIS PH 8.5
B4	20 %(v/v)	GLYCEROL
B5	0.2 M	SODIUM ACETATE PH 7
B5	0.1 M	TRIS PH 8.5
B5	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B6	1 M	SODIUM CITRATE
B6	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
B7	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B7	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8

B7	15 % (v/v)	ETHANOL
B8	0.2 M	LITHIUM SULFATE
B8	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
B8	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
B9	0.1 M	TRIS PH 8
B9	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
B10	2.4 M	AMMONIUM SULFATE
B10	0.1 M	TRIS PH 8
B11	0.2 M	DI-AMMONIUM HYDROGEN PHOSPHATE
B11	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B12	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
B12	0.1 M	HEPES PH 7.5
B12	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C1	0.05 M	CALCIUM ACETATE
C1	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
C1	35 % (v/v)	2-ETHOXYETHANOL
C2	0.2 M	SODIUM CITRATE
C2	0.1 M	HEPES PH 7.5
C2	10 % (v/v)	2-PROPANOL
C3	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
C3	1.6 M	AMMONIUM SULFATE
C3	0.1 M	HEPES PH 7.5
C4	0.18 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C4	0.09 M	HEPES PH 7.5
C4	10 % (v/v)	GLYCEROL
C4	27 % (v/v)	2-PROPANOL
C5	1.4 M	SODIUM CITRATE
C5	0.1 M	HEPES PH 7.5
C6	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
C6	0.1 M	HEPES PH 7.5
C6	28 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C7	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C7	0.1 M	HEPES PH 7.5
C7	30 % (v/v)	2-PROPANOL
C8	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
C8	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C9	0.1 M	HEPES PH 7.5
C9	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
C9	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C9	10 % (v/v)	GLYCEROL
C10	1 M	SODIUM CITRATE
C10	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
C10	0.1 M	TRIS PH 7
C11	0.1 M	TRIS PH 7
C11	15 % (v/v)	ETHANOL
C12	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
C12	0.1 M	TRIS PH 7

C12	35 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
D1	1 M	POTASSIUM SODIUM TARTRATE
D1	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
D1	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
D2	0.1 M	HEPES PH 7
D2	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
D3	0.1 M	HEPES PH 7
D3	20 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
D4	1 M	IMIDAZOLE PH 7
D5	0.4 M	POTASSIUM SODIUM TARTRATE
D6	2.4 M	AMMONIUM SULFATE
D6	0.1 M	HEPES PH 7
D7	1 M	LITHIUM CHLORIDE
D7	0.1 M	HEPES PH 7
D7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
D8	0.1 M	HEPES PH 7
D8	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
D9	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
D9	35 % (v/v)	2-ETHOXYETHANOL
D10	0.1 M	TRIS PH 7
D10	50 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
D11	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
D11	35 % (v/v)	2-ETHOXYETHANOL
D11	0.1 M	NA K PHOSPHATE PH 6.2
D12	1 M	SODIUM CITRATE
D12	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E1	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E1	1.26 M	AMMONIUM SULFATE
E2	0.01 M	COBALT CHLORIDE
E2	1.8 M	AMMONIUM SULFATE
E2	0.1 M	MES PH 6.5
E3	1.6 M	AMMONIUM SULFATE
E3	0.1 M	MES PH 6.5
E3	10 % (v/v)	DIOXANE
E4	1.6 M	MAGNESIUM SULFATE
E4	0.1 M	MES PH 6.5
E5	0.16 M	CALCIUM ACETATE
E5	0.08 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E5	14.4 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
E5	20 % (v/v)	GLYCEROL
E6	0.18 M	MAGNESIUM ACETATE
E6	0.09 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E6	27 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
E6	10 % (v/v)	GLYCEROL
E7	0.16 M	MAGNESIUM ACETATE
E7	0.08 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E7	16 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000

E7	20 % (v/v)	GLYCEROL
E8	0.2 M	CALCIUM ACETATE
E8	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E8	18 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
E9	0.2 M	SODIUM ACETATE PH 7
E9	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E9	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
E10	1 M	SODIUM ACETATE PH 7
E10	0.1 M	IMIDAZOLE PH 6.5
E11	0.2 M	MAGNESIUM ACETATE
E11	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E11	30 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
E12	1.4 M	SODIUM ACETATE PH 7
E12	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
F1	0.1 M	MES PH 6
F1	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
F1	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
F2	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
F2	35 % (v/v)	2-ETHOXYETHANOL
F3	35 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
F3	0.1 M	NA K PHOSPHATE PH 6.2
F4	2.5 M	SODIUM CHLORIDE
F4	0.1 M	NA K PHOSPHATE PH 6.2
F5	0.2 M	CALCIUM ACETATE
F5	0.1 M	MES PH 6
F5	10 % (v/v)	2-PROPANOL
F6	0.1 M	MES PH 6
F6	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
F6	0.2 M	ZINC ACETATE
F7	3.2 M	AMMONIUM SULFATE
F7	0.1 M	MES PH 6
F8	2.4 M	AMMONIUM SULFATE
F8	0.1 M	MES PH 6
F9	0.8 M	AMMONIUM SULFATE
F9	0.1 M	MES PH 6
F10	0.2 M	POTASSIUM SODIUM TARTRATE
F10	2 M	AMMONIUM SULFATE
F10	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
F11	0.17 M	AMMONIUM ACETATE
F11	0.085 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
F11	25.5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
F11	15 % (v/v)	GLYCEROL
F12	1 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
F12	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
G1	2 M	AMMONIUM SULFATE
G1	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
G2	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5

G2	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G3	0.1 M	TRIS PH 7
G3	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
G3	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
G4	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
G4	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
G5	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
G5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G6	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 5
G6	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
G7	1 M	LITHIUM CHLORIDE
G7	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
G8	0.1 M	CITRIC ACID PH 5
G8	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
G9	0.04 M	POTASSIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
G9	16 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
G9	20 % (v/v)	GLYCEROL
G10	0.1 M	CADMIUM CHLORIDE
G10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G10	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G11	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
G11	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G11	30 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
G12	2 M	SODIUM CHLORIDE
G12	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H1	2 M	SODIUM FORMATE
H1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H2	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
H2	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H2	20 % (v/v)	2-PROPANOL
H3	2.5 M	SODIUM CHLORIDE
H3	0.2 M	LITHIUM SULFATE
H3	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H4	20 % (v/v)	1,4-BUTANEDIOL
H5	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
H5	1.26 M	AMMONIUM SULFATE
H5	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H6	0.26 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H6	35 % (v/v)	GLYCEROL
H7	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H7	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
H8	2.4 M	AMMONIUM SULFATE
H8	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H9	1.6 M	AMMONIUM SULFATE
H9	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H10	2 M	SODIUM CHLORIDE

H10	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
H11	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
H11	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
H12	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
H12	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000

JCSG IV

A1	0.2 M	LITHIUM SULFATE
A1	2 M	AMMONIUM SULFATE
A1	0.1 M	CAPS PH 10.5
A2	1.2 M	SODIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
A2	0.8 M	DI-POTASSIUM HYDROGEN PHOSPHATE
A2	0.2 M	LITHIUM SULFATE
A2	0.1 M	GLYCINE PH 10.5
A3	0.1 M	CAPS PH 10.5
A3	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
A4	0.1 M	CHES PH 9.5
A4	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
A5	1 M	POTASSIUM SODIUM TARTRATE
A5	0.2 M	LITHIUM SULFATE
A5	0.1 M	CHES PH 9.5
A6	0.1 M	CHES PH 9.5
A6	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
A7	0.1 M	CHES PH 9.5
A7	15 % (v/v)	ETHANOL
A8	0.2 M	SODIUM CITRATE
A8	0.1 M	CHES PH 9.5
A8	20 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
A9	0.1 M	CHES PH 9.5
A9	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
A10	1.6 M	AMMONIUM SULFATE
A10	0.1 M	BICINE PH 9
A11	0.8 M	AMMONIUM SULFATE
A11	0.1 M	BICINE PH 9
A12	2.4 M	AMMONIUM SULFATE
A12	0.1 M	BICINE PH 9
B1	0.1 M	BICINE PH 9
B1	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
B2	2.4 M	AMMONIUM SULFATE
B2	0.1 M	BICINE PH 9
B3	0.1 M	BICINE PH 9
B3	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
B4	0.1 M	BICINE PH 9
B4	65 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
B5	2 M	MAGNESIUM CHLORIDE

B5	0.1 M	BICINE PH 9
B6	0.1 M	TRIS PH 8.5
B6	10 %(v/v)	2-PROPANOL
B7	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B7	0.1 M	TRIS PH 8.5
B7	50 %(v/v)	ETHYLENE GLYCOL
B8	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B8	0.1 M	TRIS PH 8.5
B8	25 %(v/v)	1,2-PROPANEDIOL
B8	10 %(v/v)	GLYCEROL
B9	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B9	0.1 M	TRIS PH 8.5
B9	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B10	0.2 M	SODIUM CITRATE
B10	0.1 M	TRIS PH 8.5
B10	30 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
B11	0.2 M	LITHIUM SULFATE
B11	0.1 M	TRIS PH 8.5
B11	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B12	0.2 M	AMMONIUM ACETATE
B12	0.1 M	TRIS PH 8.5
B12	30 %(v/v)	2-PROPANOL
C1	1.5 M	AMMONIUM SULFATE
C1	0.1 M	TRIS PH 8.5
C1	12 %(v/v)	GLYCEROL
C2	0.2 M	SODIUM CITRATE
C2	0.1 M	TRIS PH 8.5
C2	30 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C3	0.17 M	SODIUM ACETATE PH 7
C3	0.085 M	TRIS PH 8.5
C3	25.5 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
C3	15 %(v/v)	GLYCEROL
C4	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
C4	10 %(v/v)	2-PROPANOL
C5	2.5 M	SODIUM CHLORIDE
C5	0.2 M	ZINC ACETATE
C5	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
C6	2.5 M	SODIUM CHLORIDE
C6	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
C7	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
C7	10 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
C8	1 M	DI-AMMONIUM HYDROGEN PHOSPHATE
C8	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
C8	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
C9	1.6 M	AMMONIUM SULFATE
C9	0.1 M	TRIS PH 8
C10	0.1 M	TRIS PH 8

C10	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
C11	0.1 M	TRIS PH 8
C11	65 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
C12	1 M	LITHIUM CHLORIDE
C12	0.1 M	TRIS PH 8
C12	10 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
D1	3.2 M	AMMONIUM SULFATE
D1	0.1 M	TRIS PH 8
D2	1.26 M	AMMONIUM SULFATE
D2	0.1 M	HEPES PH 7.5
D3	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
D3	0.1 M	HEPES PH 7.5
D3	35 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
D4	0.1 M	HEPES PH 7.5
D4	50 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
D5	1.5 M	LITHIUM SULFATE
D5	0.1 M	HEPES PH 7.5
D6	4.3 M	SODIUM CHLORIDE
D6	0.1 M	HEPES PH 7.5
D7	0.2 M	SODIUM CITRATE
D7	0.1 M	HEPES PH 7.5
D7	30 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
D8	0.1 M	HEPES PH 7.5
D8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 10000
D8	8 % (v/v)	ETHYLENE GLYCOL
D9	1.26 M	SODIUM CITRATE
D9	0.09 M	HEPES PH 7.5
D9	10 % (v/v)	GLYCEROL
D10	1.7 M	AMMONIUM SULFATE
D10	0.085 M	HEPES PH 7.5
D10	1.7 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
D10	15 % (v/v)	GLYCEROL
D11	0.1 M	HEPES PH 7.5
D11	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
D11	10 % (v/v)	GLYCEROL
D11	0.05 M	LITHIUM SULFATE
D12	0.1 M	HEPES PH 7.5
D12	30 % (v/v)	1,2-PROPANEDIOL
D12	20 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
E1	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
E1	0.1 M	TRIS PH 7
E1	25 % (v/v)	1,2-PROPANEDIOL
E1	10 % (v/v)	GLYCEROL
E2	0.1 M	HEPES PH 7.5
E2	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
E2	40 % (v/v)	ETHYLENE GLYCOL
E3	0.2 M	AMMONIUM SULFATE

E3	0.1 M	TRIS PH 7
E3	40 %(v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
E4	4 M	SODIUM FORMATE
E5	3.6 M	SODIUM FORMATE
E5	10 %(v/v)	GLYCEROL
E6	0.2 M	CALCIUM ACETATE
E6	0.1 M	HEPES PH 7.5
E6	40 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
E7	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
E7	0.1 M	TRIS PH 7
E7	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
E8	1 M	POTASSIUM SODIUM TARTRATE
E8	0.2 M	LITHIUM SULFATE
E8	0.1 M	TRIS PH 7
E9	0.2 M	CALCIUM ACETATE
E9	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E9	40 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
E10	0.8 M	AMMONIUM SULFATE
E10	0.1 M	HEPES PH 7
E11	3.2 M	AMMONIUM SULFATE
E11	0.1 M	HEPES PH 7
E12	0.1 M	HEPES PH 7
E12	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
F1	1 M	LITHIUM CHLORIDE
F1	0.1 M	HEPES PH 7
F2	1 M	SODIUM CHLORIDE
F2	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
F2	30 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
F2	10 %(v/v)	GLYCEROL
F3	0.2 M	ZINC ACETATE
F3	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
F3	10 %(v/v)	2-PROPANOL
F4	0.2 M	CALCIUM ACETATE
F4	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
F4	45 %(v/v)	GLYCEROL
F5	0.1 M	HEPES PH 7
F5	30 %(v/v)	JEFFAMINE M-600 PH 7
F6	2 M	SODIUM CHLORIDE
F6	0.1 M	SODIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
F6	0.1 M	MES PH 6.5
F6	0.1 M	POTASSIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
F7	0.16 M	ZINC ACETATE
F7	0.08 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
F7	14.4 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
F7	20 %(v/v)	GLYCEROL
F8	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
F8	30 %(v/v)	1,2-PROPANEDIOL

F8	20 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
F9	0.2 M	ZINC ACETATE
F9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F10	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
F10	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
F10	35 % (v/v)	2-PROPANOL
F11	0.1 M	MES PH 6
F11	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
F11	5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
F11	10 % (v/v)	GLYCEROL
F12	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
F12	40 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
G1	0.2 M	ZINC ACETATE
G1	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
G1	35 % (v/v)	2-PROPANOL
G2	1 M	POTASSIUM SODIUM TARTRATE
G2	0.1 M	MES PH 6
G3	0.2 M	LITHIUM SULFATE
G3	0.1 M	MES PH 6
G3	20 % (v/v)	1,4-BUTANEDIOL
G4	0.2 M	ZINC ACETATE
G4	0.1 M	MES PH 6
G4	15 % (v/v)	ETHANOL
G5	1.6 M	AMMONIUM SULFATE
G5	0.1 M	MES PH 6
G6	0.1 M	MES PH 6
G6	30 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
G7	0.2 M	ZINC ACETATE
G7	0.1 M	IMIDAZOLE PH 8
G7	40 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
G8	0.2 M	AMMONIUM ACETATE
G8	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
G8	30 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
G9	0.01 M	FERRIC CHLORIDE
G9	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
G9	10 % (v/v)	JEFFAMINE M-600 PH 7
G10	0.7 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
G10	0.07 M	SODIUM CITRATE PH 5.6
G10	30 % (v/v)	GLYCEROL
G11	0.2 M	LITHIUM SULFATE
G11	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
G11	15 % (v/v)	ETHANOL
G12	0.05 M	CALCIUM ACETATE
G12	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
G12	40 % (v/v)	1,2-PROPANEDIOL
H1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H1	35 % (v/v)	2-PROPANOL

H2	0.2 M	AMMONIUM ACETATE
H2	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H2	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
H3	0.17 M	AMMONIUM ACETATE
H3	0.085 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H3	25.5 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
H3	15 %(v/v)	GLYCEROL
H4	0.2 M	ZINC ACETATE
H4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H4	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
H5	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H5	1 M	DI-AMMONIUM HYDROGEN PHOSPHATE
H6	0.8 M	SODIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H6	1.2 M	DI-POTASSIUM HYDROGEN PHOSPHATE
H6	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
H7	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
H7	40 %(v/v)	ETHYLENE GLYCOL
H7	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
H8	1.5 M	SODIUM CHLORIDE
H8	10 %(v/v)	ETHANOL
H9	1.5 M	AMMONIUM SULFATE
H9	25 %(v/v)	GLYCEROL
H10	1.6 M	SODIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H10	0.4 M	DI-POTASSIUM HYDROGEN PHOSPHATE
H10	0.1 M	PHOSPHATE-CITRATE PH 4.2
H11	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H11	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
H12	1 M	LITHIUM CHLORIDE
H12	0.1 M	CITRIC ACID PH 4
H12	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000

PEGs

A1	40 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
A1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A2	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A2	30 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
A3	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A3	30 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
A4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A4	25 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 550
A5	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A5	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
A6	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A6	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
A7	0.1 M	MES PH 6.5

A7	40	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
A8	0.1	M	MES PH 6.5
A8	30	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
A9	0.1	M	MES PH 6.5
A9	30	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
A10	0.1	M	MES PH 6.5
A10	25	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 550
A11	0.1	M	MES PH 6.5
A11	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
A12	0.1	M	MES PH 6.5
A12	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
B1	0.1	M	HEPES PH 7.5
B1	40	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
B2	0.1	M	HEPES PH 7.5
B2	30	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
B3	0.1	M	HEPES PH 7.5
B3	30	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
B4	0.1	M	HEPES PH 7.5
B4	25	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 550
B5	0.1	M	HEPES PH 7.5
B5	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
B6	0.1	M	HEPES PH 7.5
B6	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
B7	0.1	M	TRIS PH 8.5
B7	40	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
B8	0.1	M	TRIS PH 8.5
B8	30	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
B9	0.1	M	TRIS PH 8.5
B9	30	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
B10	0.1	M	TRIS PH 8.5
B10	25	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 550
B11	0.1	M	TRIS PH 8.5
B11	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
B12	0.1	M	TRIS PH 8.5
B12	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
C1	0.1	M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C1	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
C2	0.1	M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C2	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
C3	0.1	M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C3	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
C4	0.1	M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C4	25	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
C5	0.1	M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C5	20	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 10000
C6	0.1	M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C6	15	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 20000

C7	0.1 M	MES PH 6.5
C7	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
C8	0.1 M	MES PH 6.5
C8	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
C9	0.1 M	MES PH 6.5
C9	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
C10	0.1 M	MES PH 6.5
C10	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
C11	0.1 M	MES PH 6.5
C11	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 10000
C12	0.1 M	MES PH 6.5
C12	15 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 20000
D1	0.1 M	HEPES PH 7.5
D1	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
D2	0.1 M	HEPES PH 7.5
D2	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
D3	0.1 M	HEPES PH 7.5
D3	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
D4	0.1 M	HEPES PH 7.5
D4	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
D5	0.1 M	HEPES PH 7.5
D5	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 10000
D6	0.1 M	HEPES PH 7.5
D6	15 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 20000
D7	0.1 M	TRIS PH 8.5
D7	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
D8	0.1 M	TRIS PH 8.5
D8	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
D9	0.1 M	TRIS PH 8.5
D9	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
D10	0.1 M	TRIS PH 8.5
D10	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
D11	0.1 M	TRIS PH 8.5
D11	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 10000
D12	0.1 M	TRIS PH 8.5
D12	15 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 20000
E1	0.2 M	SODIUM FLUORIDE
E1	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E2	0.2 M	POTASSIUM FLUORIDE
E2	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E3	0.2 M	AMMONIUM FLUORIDE
E3	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E4	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E4	0.2 M	LITHIUM CHLORIDE
E5	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
E5	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E6	0.2 M	SODIUM CHLORIDE

E6	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E7	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
E7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E8	0.2 M	POTASSIUM CHLORIDE
E8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E9	0.2 M	AMMONIUM CHLORIDE
E9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E10	0.2 M	SODIUM IODIDE
E10	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E11	0.2 M	POTASSIUM IODIDE
E11	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E12	0.2 M	AMMONIUM IODIDE
E12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F1	0.2 M	SODIUM THIOCYANATE
F1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F2	0.2 M	POTASSIUM THIOCYANATE
F2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F3	0.2 M	LITHIUM NITRATE
F3	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F4	0.2 M	MAGNESIUM NITRATE
F4	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F5	0.2 M	SODIUM NITRATE
F5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F6	0.2 M	POTASSIUM NITRATE
F6	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F7	0.2 M	AMMONIUM NITRATE
F7	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F8	0.2 M	MAGNESIUM FORMATE
F8	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F9	0.2 M	SODIUM FORMATE
F9	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F10	0.2 M	POTASSIUM FORMATE
F10	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F11	0.2 M	AMMONIUM FORMATE
F11	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F12	0.2 M	LITHIUM ACETATE
F12	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G1	0.2 M	MAGNESIUM ACETATE
G1	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G2	0.2 M	ZINC ACETATE
G2	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G3	0.2 M	SODIUM ACETATE PH 7
G3	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G4	0.2 M	CALCIUM ACETATE
G4	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G5	0.2 M	POTASSIUM ACETATE
G5	20 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350

G6	0.2 M	AMMONIUM ACETATE
G6	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G7	0.2 M	LITHIUM SULFATE
G7	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G8	0.2 M	MAGNESIUM SULFATE
G8	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G9	0.2 M	SODIUM SULFATE
G9	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G10	0.2 M	POTASSIUM SULFATE
G10	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G11	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
G11	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G12	0.2 M	DI-SODIUM TARTRATE
G12	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H1	0.2 M	POTASSIUM SODIUM TARTRATE
H1	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H2	0.2 M	DI-AMMONIUM TARTRATE
H2	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H3	0.2 M	SODIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H3	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H4	0.2 M	DI-SODIUM HYDROGEN PHOSPHATE
H4	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H5	0.2 M	POTASSIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H5	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H6	0.2 M	DI-POTASSIUM HYDROGEN PHOSPHATE
H6	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H7	0.2 M	AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
H7	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H8	0.2 M	DI-AMMONIUM HYDROGEN PHOSPHATE
H8	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H9	0.2 M	LITHIUM CITRATE
H9	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H10	0.2 M	SODIUM CITRATE
H10	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H11	0.2 M	POTASSIUM CITRATE
H11	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H12	0.2 M	DI-AMMONIUM HYDROGEN CITRATE
H12	20 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350

Optimizer

A1	1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A2	100 %(v/v)	WATER
A3	1 M	TRIS PH 8.5
A4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A4	3.2 M	SODIUM CHLORIDE

A5	3.2 M	SODIUM CHLORIDE
A6	0.1 M	TRIS PH 8.5
A6	3.2 M	SODIUM CHLORIDE
A7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A7	2.4 M	SODIUM MALONATE PH 7.0
A8	2.4 M	SODIUM MALONATE PH 7.0
A9	0.1 M	TRIS PH 8.5
A9	2.4 M	SODIUM MALONATE PH 7.0
A10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
A10	1.5 M	MAGNESIUM CHLORIDE
A11	1.5 M	MAGNESIUM CHLORIDE
A12	0.1 M	TRIS PH 8.5
A12	1.5 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
B2	100 %(v/v)	WATER
B3	0.1 M	TRIS PH 8.5
B4	1.6 M	SODIUM CHLORIDE
B4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
B5	1.6 M	SODIUM CHLORIDE
B6	0.1 M	TRIS PH 8.5
B6	1.6 M	SODIUM CHLORIDE
B7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
B7	1.2 M	SODIUM MALONATE PH 7.0
B8	1.2 M	SODIUM MALONATE PH 7.0
B9	0.1 M	TRIS PH 8.5
B9	1.2 M	SODIUM MALONATE PH 7.0
B10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
B10	0.75 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B11	0.75 M	MAGNESIUM CHLORIDE
B12	0.1 M	TRIS PH 8.5
B12	0.75 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C1	1.2 M	SODIUM CITRATE
C2	1.2 M	SODIUM CITRATE
C3	0.1 M	TRIS PH 8.5
C3	1.2 M	SODIUM CITRATE
C4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C4	2 M	MAGNESIUM ACETATE
C5	2 M	MAGNESIUM ACETATE
C6	0.1 M	TRIS PH 8.5
C6	2 M	MAGNESIUM ACETATE
C7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
C7	3.5 M	AMMONIUM CHLORIDE
C8	3.5 M	AMMONIUM CHLORIDE
C9	0.1 M	TRIS PH 8.5
C9	3.5 M	AMMONIUM CHLORIDE
C10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6

C10	3.5 M	SODIUM BROMIDE
C11	3.5 M	SODIUM BROMIDE
C12	0.1 M	TRIS PH 8.5
C12	3.5 M	SODIUM BROMIDE
D1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
D1	0.6 M	SODIUM CITRATE
D2	0.6 M	SODIUM CITRATE
D3	0.1 M	TRIS PH 8.5
D3	0.6 M	SODIUM CITRATE
D4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
D4	1 M	MAGNESIUM ACETATE
D5	1 M	MAGNESIUM ACETATE
D6	0.1 M	TRIS PH 8.5
D6	1 M	MAGNESIUM ACETATE
D7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
D7	1.75 M	AMMONIUM CHLORIDE
D8	1.75 M	AMMONIUM CHLORIDE
D9	0.1 M	TRIS PH 8.5
D9	1.75 M	AMMONIUM CHLORIDE
D10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
D10	1.75 M	SODIUM BROMIDE
D11	1.75 M	SODIUM BROMIDE
D12	0.1 M	TRIS PH 8.5
D12	1.75 M	SODIUM BROMIDE
E1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
E1	3.5 M	SODIUM FORMATE
E2	3.5 M	SODIUM FORMATE
E3	0.1 M	TRIS PH 8.5
E3	3.5 M	SODIUM FORMATE
E4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
E4	2.2 M	CALCIUM CHLORIDE
E5	2.2 M	CALCIUM CHLORIDE
E6	0.1 M	TRIS PH 8.5
E6	2.2 M	CALCIUM CHLORIDE
E7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
E7	4.5 M	AMMONIUM ACETATE
E8	4.5 M	AMMONIUM ACETATE
E9	0.1 M	TRIS PH 8.5
E9	4.5 M	AMMONIUM ACETATE
E10	0.1 M	SODIUM ACETATE
E10	0.6 M	SODIUM FLUORIDE
E11	0.6 M	SODIUM FLUORIDE
E12	0.1 M	TRIS PH 8.5
E12	0.6 M	SODIUM FLUORIDE
F1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
F1	1.75 M	SODIUM FORMATE
F2	1.75 M	SODIUM FORMATE

F3	0.1 M	TRIS PH 8.5
F3	1.75 M	SODIUM FORMATE
F4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
F4	1.1 M	CALCIUM CHLORIDE
F5	1.1 M	CALCIUM CHLORIDE
F6	0.1 M	TRIS PH 8.5
F6	1.1 M	CALCIUM CHLORIDE
F7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
F7	2.25 M	AMMONIUM ACETATE
F8	2.25 M	AMMONIUM ACETATE
F9	0.1 M	TRIS PH 8.5
F9	2.25 M	AMMONIUM ACETATE
F10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
F10	0.3 M	SODIUM FLUORIDE
F11	0.3 M	SODIUM FLUORIDE
F12	0.1 M	TRIS PH 8.5
F12	0.3 M	SODIUM FLUORIDE
G1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G1	2.2 M	POTASSIUM CHLORIDE
G2	2.2 M	POTASSIUM CHLORIDE
G3	0.1 M	TRIS PH 8.5
G3	2.2 M	POTASSIUM CHLORIDE
G4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G4	2.4 M	SODIUM THIOCYANATE
G5	2.4 M	SODIUM THIOCYANATE
G6	0.1 M	TRIS PH 8.5
G6	2.4 M	SODIUM THIOCYANATE
G7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G7	3.5 M	SODIUM NITRATE
G8	3.5 M	SODIUM NITRATE
G9	0.1 M	TRIS PH 8.5
G9	3.5 M	SODIUM NITRATE
G10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G10	4 M	LITHIUM CHLORIDE
G11	4 M	LITHIUM CHLORIDE
G12	0.1 M	TRIS PH 8.5
G12	4 M	LITHIUM CHLORIDE
H1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H1	1.1 M	POTASSIUM CHLORIDE
H2	1.1 M	POTASSIUM CHLORIDE
H3	0.1 M	TRIS PH 8.5
H3	1.1 M	POTASSIUM CHLORIDE
H4	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H4	1.2 M	SODIUM THIOCYANATE
H5	1.2 M	SODIUM THIOCYANATE
H6	0.1 M	TRIS PH 8.5
H6	1.2 M	SODIUM THIOCYANATE

H7	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H7	1.75 M	SODIUM NITRATE
H8	1.75 M	SODIUM NITRATE
H9	0.1 M	TRIS PH 8.5
H9	1.75 M	SODIUM NITRATE
H10	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
H10	2 M	LITHIUM CHLORIDE
H11	2 M	LITHIUM CHLORIDE
H12	0.1 M	TRIS PH 8.5
H12	2 M	LITHIUM CHLORIDE

sEL15 und sEL16**sEL15**

A1	15 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A1	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A2	15.909 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A2	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A3	16.818 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A3	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A4	17.727 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A4	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A5	18.636 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A5	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A6	19.545 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A6	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A7	20.455 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A7	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A8	21.364 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A8	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A9	22.273 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A9	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A10	23.182 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A10	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A11	24.091 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A11	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
A12	25 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A12	0.15 M	SODIUM THIOCYANATE
B1	15 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B1	0.2 M	SODIUM THIOCYANATE
B2	15.909 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B2	0.2 M	SODIUM THIOCYANATE
B3	16.818 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B3	0.2 M	SODIUM THIOCYANATE
B4	17.727 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B4	0.2 M	SODIUM THIOCYANATE

sEL16

A1	15 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A1	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A2	15.909 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A2	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A3	16.818 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A3	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A4	17.727 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A4	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A5	18.636 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A5	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A6	19.545 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A6	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A7	20.455 w/v	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A7	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A8	21.364 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A8	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A9	22.273 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A9	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A10	23.182 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A10	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A11	24.091 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A11	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
A12	25 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
A12	0.15 M	POTASSIUM THIOCYANATE
B1	15 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B1	0.2 M	POTASSIUM THIOCYANATE
B2	15.909 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B2	0.2 M	POTASSIUM THIOCYANATE
B3	16.818 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B3	0.2 M	POTASSIUM THIOCYANATE
B4	17.727 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B4	0.2 M	POTASSIUM THIOCYANATE

B5	18.636	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	B5	18.636	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B5	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	B5	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
B6	19.545	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	B6	19.545	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B6	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	B6	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
B7	20.455	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	B7	20.455	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B7	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	B7	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
B8	21.364	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	B8	21.364	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B8	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	B8	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
B9	22.273	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	B9	22.273	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B9	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	B9	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
B10	23.182	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	B10	23.182	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B10	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	B10	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
B11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	B11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B11	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	B11	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
B12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	B12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B12	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	B12	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C1	15	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C1	15	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C1	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C1	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C2	15.909	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C2	15.909	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C2	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C2	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C3	16.818	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C3	16.818	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C3	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C3	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C4	17.727	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C4	17.727	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C4	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C4	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C5	18.636	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C5	18.636	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C5	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C5	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C6	19.545	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C6	19.545	% w/v	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C6	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C6	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C7	20.455	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C7	20.455	%w/v	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C7	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C7	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C8	21.364	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C8	21.364	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C8	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C8	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C9	22.273	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C9	22.273	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C9	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C9	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C10	23.182	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C10	23.182	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C10	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C10	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C11	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C11	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
C12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	C12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
C12	0.25	M	SODIUM THIOCYANATE	C12	0.25	M	POTASSIUM THIOCYANATE
D1	15	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D1	15	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D1	0.3	M	SODIUM THIOCYANATE	D1	0.3	M	POTASSIUM THIOCYANATE
D2	15.909	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D2	15.909	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D2	0.3	M	SODIUM THIOCYANATE	D2	0.3	M	POTASSIUM THIOCYANATE
D3	16.818	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D3	16.818	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D3	0.3	M	SODIUM THIOCYANATE	D3	0.3	M	POTASSIUM THIOCYANATE
D4	17.727	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D4	17.727	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350

D4	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D4	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
D5	18.636 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D5	18.636 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D5	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D5	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
D6	19.545 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D6	19.545 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D6	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D6	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
D7	20.455 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D7	20.455 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D7	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D7	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
D8	21.364 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D8	21.364 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D8	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D8	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
D9	22.273 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D9	22.273 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D9	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D9	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
D10	23.182 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D10	23.182 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D10	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D10	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
D11	24.091 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D11	24.091 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D11	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D11	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
D12	25 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	D12	25 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D12	0.3 M		SODIUM THIOCYANATE	D12	0.3 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E1	15 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E1	15 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E1	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E1	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E1	0.1 M	7	BIS-TRIS	E1	0.1 M	7	BIS-TRIS
E2	15.909 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E2	15.909 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E2	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E2	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E2	0.1 M	7	BIS-TRIS	E2	0.1 M	7	BIS-TRIS
E3	16.818 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E3	16.818 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E3	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E3	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E3	0.1 M	7	BIS-TRIS	E3	0.1 M	7	BIS-TRIS
E4	17.727 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E4	17.727 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E4	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E4	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E4	0.1 M	7	BIS-TRIS	E4	0.1 M	7	BIS-TRIS
E5	18.636 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E5	18.636 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E5	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E5	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E5	0.1 M	7	BIS-TRIS	E5	0.1 M	7	BIS-TRIS
E6	19.545 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E6	19.545 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E6	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E6	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E6	0.1 M	7	BIS-TRIS	E6	0.1 M	7	BIS-TRIS
E7	20.455 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E7	20.455 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E7	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E7	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E7	0.1 M	7	BIS-TRIS	E7	0.1 M	7	BIS-TRIS
E8	21.364 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E8	21.364 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E8	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E8	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E8	0.1 M	7	BIS-TRIS	E8	0.1 M	7	BIS-TRIS
E9	22.273 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E9	22.273 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E9	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E9	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E9	0.1 M	7	BIS-TRIS	E9	0.1 M	7	BIS-TRIS
E10	23.182 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E10	23.182 % (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E10	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	E10	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
E10	0.1 M	7	BIS-TRIS	E10	0.1 M	7	BIS-TRIS

E11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E11	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	E11	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
E11	0.1	M	7 BIS-TRIS	E11	0.1	M	7 BIS-TRIS
E12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	E12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E12	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	E12	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
E12	0.1	M	7 BIS-TRIS	E12	0.1	M	7 BIS-TRIS
F1	15	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F1	15	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F1	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F1	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F1	0.1	M	7 HEPES	F1	0.1	M	7 HEPES
F2	15.909	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F2	15.909	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F2	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F2	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F2	0.1	M	7 HEPES	F2	0.1	M	7 HEPES
F3	16.818	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F3	16.818	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F3	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F3	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F3	0.1	M	7 HEPES	F3	0.1	M	7 HEPES
F4	17.727	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F4	17.727	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F4	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F4	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F4	0.1	M	7 HEPES	F4	0.1	M	7 HEPES
F5	18.636	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F5	18.636	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F5	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F5	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F5	0.1	M	7 HEPES	F5	0.1	M	7 HEPES
F6	19.545	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F6	19.545	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F6	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F6	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F6	0.1	M	7 HEPES	F6	0.1	M	7 HEPES
F7	20.455	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F7	20.455	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F7	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F7	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F7	0.1	M	7 HEPES	F7	0.1	M	7 HEPES
F8	21.364	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F8	21.364	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F8	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F8	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F8	0.1	M	7 HEPES	F8	0.1	M	7 HEPES
F9	22.273	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F9	22.273	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F9	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F9	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F9	0.1	M	7 HEPES	F9	0.1	M	7 HEPES
F10	23.182	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F10	23.182	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F10	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F10	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F10	0.1	M	7 HEPES	F10	0.1	M	7 HEPES
F11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F11	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F11	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F11	0.1	M	7 HEPES	F11	0.1	M	7 HEPES
F12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	F12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
F12	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	F12	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
F12	0.1	M	7 HEPES	F12	0.1	M	7 HEPES
G1	15	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G1	15	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G1	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	G1	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE
G1	0.1	M	8 HEPES	G1	0.1	M	8 HEPES
G2	15.909	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G2	15.909	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G2	0.2	M	SODIUM THIOCYANATE	G2	0.2	M	POTASSIUM THIOCYANATE

G2	0.1	M	8	HEPES	G2	0.1	M	8	HEPES
G3	16.818	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G3	16.818	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G3	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G3	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G3	0.1	M	8	HEPES	G3	0.1	M	8	HEPES
G4	17.727	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G4	17.727	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G4	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G4	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G4	0.1	M	8	HEPES	G4	0.1	M	8	HEPES
G5	18.636	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G5	18.636	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G5	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G5	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G5	0.1	M	8	HEPES	G5	0.1	M	8	HEPES
G6	19.545	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G6	19.545	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G6	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G6	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G6	0.1	M	8	HEPES	G6	0.1	M	8	HEPES
G7	20.455	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G7	20.455	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G7	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G7	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G7	0.1	M	8	HEPES	G7	0.1	M	8	HEPES
G8	21.364	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G8	21.364	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G8	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G8	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G8	0.1	M	8	HEPES	G8	0.1	M	8	HEPES
G9	22.273	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G9	22.273	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G9	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G9	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G9	0.1	M	8	HEPES	G9	0.1	M	8	HEPES
G10	23.182	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G10	23.182	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G10	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G10	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G10	0.1	M	8	HEPES	G10	0.1	M	8	HEPES
G11	24.091	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G11	24.091	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G11	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G11	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G11	0.1	M	8	HEPES	G11	0.1	M	8	HEPES
G12	25	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	G12	25	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
G12	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	G12	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
G12	0.1	M	8	HEPES	G12	0.1	M	8	HEPES
H1	15	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H1	15	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H1	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	H1	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
H1	0.1	M	8	TRIS	H1	0.1	M	8	TRIS
H2	15.909	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H2	15.909	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H2	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	H2	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
H2	0.1	M	8	TRIS	H2	0.1	M	8	TRIS
H3	16.818	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H3	16.818	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H3	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	H3	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
H3	0.1	M	8	TRIS	H3	0.1	M	8	TRIS
H4	17.727	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H4	17.727	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H4	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	H4	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
H4	0.1	M	8	TRIS	H4	0.1	M	8	TRIS
H5	18.636	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H5	18.636	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H5	0.2	M		SODIUM THIOCYANATE	H5	0.2	M		POTASSIUM THIOCYANATE
H5	0.1	M	8	TRIS	H5	0.1	M	8	TRIS
H6	19.545	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H6	19.545	% (w/v)		POLYETHYLENE GLYCOL 3350

H6	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	H6	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
H6	0.1 M	8	TRIS	H6	0.1 M	8	TRIS
H7	20.455	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H7	20.455	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H7	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	H7	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
H7	0.1 M	8	TRIS	H7	0.1 M	8	TRIS
H8	21.364	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H8	21.364	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H8	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	H8	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
H8	0.1 M	8	TRIS	H8	0.1 M	8	TRIS
H9	22.273	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H9	22.273	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H9	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	H9	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
H9	0.1 M	8	TRIS	H9	0.1 M	8	TRIS
H10	23.182	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H10	23.182	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H10	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	H10	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
H10	0.1 M	8	TRIS	H10	0.1 M	8	TRIS
H11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H11	24.091	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H11	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	H11	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
H11	0.1 M	8	TRIS	H11	0.1 M	8	TRIS
H12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350	H12	25	% (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
H12	0.2 M		SODIUM THIOCYANATE	H12	0.2 M		POTASSIUM THIOCYANATE
H12	0.1 M	8	TRIS	H12	0.1 M	8	TRIS

Additive

A1	0.1 M		BARIUM CHLORIDE
A2	0.1 M		CADMIUM CHLORIDE
A3	0.1 M		CALCIUM CHLORIDE
A4	0.1 M		COBALT CHLORIDE
A5	0.1 M		COPPER (II) CHLORIDE
A6	0.1 M		MAGNESIUM CHLORIDE
A7	0.1 M		MANGANESE (II) CHLORIDE
A8	0.1 M		STRONTIUM CHLORIDE
A9	0.1 M		YTTRIUM CHLORIDE
A10	0.1 M		ZINC CHLORIDE
A11	0.1 M		FERRIC CHLORIDE
A12	0.1 M		NICKEL (II) CHLORIDE
B1	0.1 M		CHROMIUM (III) CHLORIDE
B2	0.1 M		PRASEODYMIUM (III) ACETATE
B3	1 M		AMMONIUM SULFATE
B4	1 M		POTASSIUM CHLORIDE
B5	1 M		LITHIUM CHLORIDE
B6	2 M		SODIUM CHLORIDE
B7	0.5 M		SODIUM FLUORIDE
B8	1 M		SODIUM IODIDE
B9	2 M		SODIUM THIOCYANATE
B10	1 M		POTASSIUM SODIUM TARTRATE
B11	1 M		TRI-SODIUM CITRATE

B12	1 M	CESIUM CHLORIDE
C1	1 M	SODIUM MALONATE PH 7
C2	0.1 M	PROLINE
C3	0.1 M	PHENOL
C4	30 %(v/v)	DMSO
C5	0.1 M	SODIUM BROMIDE
C6	30 %(w/v)	6-AMINOCAPROIC ACID
C7	30 %(w/v)	1,5-DIAMINOPENTANE DIHYDROCHLORIDE
C8	30 %(w/v)	1,6-DIAMINOHEXANE
C9	30 %(w/v)	1,8-DIAMINOCTANE
C10	1 M	GLYCINE
C11	0.3 M	GLYCYL-GLYCYL-GLYCINE
C12	0.1 M	TAURINE
D1	0.1 M	BETAINE HYDROCHLORIDE
D2	0.1 M	SPERMIDINE
D3	0.1 M	SPERMINE TETRAHYDROCHLORIDE
D4	0.1 M	HEXAMMINE COBALT (III) CHLORIDE
D5	0.1 M	SARCOSINE
D6	0.1 M	TRIMETHYLAMINE HYDROCHLORIDE
D7	1 M	GUANIDINE HYDROCHLORIDE
D8	0.1 M	UREA
D9	0.1 M	NAD
D10	0.1 M	ATP
D11	0.1 M	TCEP
D12	0.01 M	GLUTATHIONE
D12	0.01 M	GLUTATHIONE
E1	0.1 M	EDTA DISODIUM SALT
E2	5 %(w/v)	POLYVINYLPIRROLIDONE K 15
E3	30 %(w/v)	DEXTRAN SULFATE
E4	40 %(v/v)	PENTAERYTHRITOL ETHOXYLATE (3/4 EO/OH)
E5	10 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E6	30 %(w/v)	GLUCOSE
E7	30 %(w/v)	SUCROSE
E8	30 %(w/v)	XYLITOL
E9	30 %(w/v)	SORBITOL
E10	12 %(w/v)	INOSITOL
E11	30 %(w/v)	TREHALOSE
E12	30 %(w/v)	GALACTOSE
F1	30 %(v/v)	ETHYLENE GLYCOL
F2	30 %(v/v)	GLYCEROL
F3	3 M	NDSB 195
F4	2 M	NDSB 201
F5	2 M	NDSB 211
F6	2 M	NDSB 221
F7	2 M	NDSB 256
F8	0.15 mM	CYMAL 7
F9	20 %(w/v)	BENZAMIDINE HYDROCHLORIDE

F10	5 % (w/v)	N,N-DIMETHYLDODECYLAMINE N-OXIDE
F11	5 % (w/v)	N-OCTYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE
F12	5 % (w/v)	N-DODECYL-B-D-MALTOSIDE
G1	30 % (w/v)	TRIMETHYLAMINE N-OXIDE
G2	30 % (w/v)	1,6-HEXANEDIOL
G3	30 % (v/v)	2-METHYL-2,4-PENTANEDIOL
G4	50 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G5	50 % (v/v)	JEFFAMINE M-600 PH 7
G6	40 % (v/v)	2,5-HEXANEDIOL
G7	40 % (v/v)	1,3-BUTANEDIOL
G8	40 % (v/v)	POLYPROPYLENE GLYCOL P 400
G9	30 % (v/v)	DIOXANE
G10	30 % (v/v)	ETHANOL
G11	30 % (v/v)	2-PROPANOL
G12	30 % (v/v)	METHANOL
H1	40 % (v/v)	1,4-BUTANEDIOL
H2	40 % (v/v)	TERT-BUTANOL
H3	40 % (v/v)	1,3-PROPANEDIOL
H4	40 % (v/v)	ACETONITRILE
H5	40 % (v/v)	GAMMA BUTYROLACTONE
H6	40 % (v/v)	1-PROPANOL
H7	5 % (v/v)	ETHYL ACETATE
H8	40 % (v/v)	ACETONE
H9	0.25 % (v/v)	DICHLOROMETHANE
H10	7 % (v/v)	1-BUTANOL
H11	40 % (v/v)	2,2,2-TRIFLUOROETHANOL
H12	40 % (v/v)	1,1,1,3,3,3-HEXAFLUORO-2-PROPANOL

Membrane Gold

A1	2.2 M	AMMONIUM SULFATE
A1	0.08 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
A2	1.2 M	SODIUM CITRATE
A2	0.01 M	TRIS PH 8.0
A3	0.015 M	TRICINE PH 8.5
A3	24 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
A4	0.36 M	SODIUM CHLORIDE
A4	0.015 M	SODIUM PHOSPHATE PH 6.8
A4	9.9 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
A5	0.3 M	SODIUM CHLORIDE
A5	0.01 M	TRIS PH 8.0
A5	27.5 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
A6	0.225 M	MES-BIS TRIS PH 6.6
A6	6.6 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
A7	0.1 M	AMMONIUM SULFATE
A7	0.1 M	HEPES PH 7.5

A7	12	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
A7	22	%(v/v)	GLYCEROL
A8	0.02	M	CALCIUM CHLORIDE
A8	0.01	M	MAGNESIUM SULFATE
A8	0.02	M	SODIUM CHLORIDE
A8	0.02	M	MES PH 6.5
A8	7.7	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1500
A9	2.5	M	AMMONIUM SULFATE
A9	0.05	M	HEPES PH 7.5
A10	1.1	M	SODIUM CITRATE
A10	0.066	M	HEPES PH 7.5
A11	3.3	M	AMMONIUM SULFATE
A11	0.15	M	POTASSIUM PHOSPHATE PH 7.0
A12	0.1	M	MAGNESIUM ACETATE
A12	0.1	M	SODIUM CITRATE PH 5.6
A12	14	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 5000
B1	0.1	M	SODIUM CHLORIDE
B1	0.02	M	SODIUM CITRATE PH 5.6
B1	11	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B2	0.1	M	SODIUM CHLORIDE
B2	0.02	M	SODIUM CITRATE PH 5.6
B2	5.5	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B3	0.05	M	CALCIUM CHLORIDE
B3	0.05	M	BARIUM CHLORIDE
B3	0.1	M	TRIS PH 8.2
B3	32	%(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
B4	0.05	M	SODIUM CHLORIDE
B4	0.1	M	SODIUM PHOSPHATE PH 6.2
B4	16	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B5	0.1	M	MAGNESIUM CHLORIDE
B5	0.03	M	TRIS PH 8.2
B5	19	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B6	0.2	M	SODIUM CHLORIDE
B6	0.025	M	HEPES PH 7.5
B6	13	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B7	0.1	M	HEPES PH 7.5
B7	11	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B8	0.1	M	SODIUM CHLORIDE
B8	0.02	M	MES PH 6.5
B8	6.6	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B9	0.1	M	POTASSIUM CHLORIDE
B9	0.02	M	TRIS PH 7.0
B9	20	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
B10	0.05	M	MAGNESIUM CHLORIDE
B10	0.1	M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
B10	6.6	%(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
B11	0.2	M	POTASSIUM CHLORIDE

B11	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
B11	37 %(v/v)	PENTAERYTHRITOL PROPOXYLATE (5/4 PO/OH)
B12	0.1 M	TRIS PH 8.0
B12	5.5 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
C1	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
C1	0.02 M	TRIS PH 7.0
C1	7.7 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
C2	0.1 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C2	0.1 M	TRIS PH 7.5
C2	22 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C3	0.04 M	SODIUM CHLORIDE
C3	0.04 M	TRIS PH 8.0
C3	27 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 350
C4	0.05 M	SODIUM CHLORIDE
C4	0.02 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C4	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 6.5
C4	22 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
C5	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 5.5
C5	8.8 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
C6	0.4 M	AMMONIUM ACETATE PH 8.0
C6	13 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
C7	0.02 M	BIS-TRIS PH 7.0
C7	15 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 2000
C8	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
C8	0.1 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C8	0.02 M	TRIS PH 7.5
C8	11 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1500
C9	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
C9	0.1 M	MAGNESIUM CHLORIDE
C9	0.1 M	HEPES PH 8.2
C9	11 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1500
C10	0.2 M	SODIUM ACETATE PH 7.0
C10	0.2 M	POTASSIUM CHLORIDE
C10	0.1 M	HEPES PH 7.0
C10	22 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
C11	0.02 M	NICKEL SULFATE
C11	0.01 M	HEPES PH 7.0
C11	33 %(v/v)	JEFFAMINE M-600 PH 7.0
C12	0.15 M	SODIUM CHLORIDE
C12	0.1 M	TRIS PH 8.0
C12	13 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
D1	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
D1	0.1 M	HEPES PH 7.5
D1	53 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
D2	0.05 M	MAGNESIUM ACETATE
D2	0.05 M	SODIUM ACETATE PH 5.0
D2	28 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400

D3	0.05 M	HEPES PH 7.5
D3	22 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
D4	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
D4	0.1 M	TRIS PH 8.0
D4	44 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
D5	0.05 M	MAGNESIUM ACETATE
D5	0.05 M	SODIUM ACETATE PH 5.4
D5	24 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
D6	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
D6	0.1 M	MES PH 6.5
D6	26 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 350
D7	0.1 M	POTASSIUM CHLORIDE
D7	0.1 M	TRIS PH 8.5
D7	39 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
D8	0.05 M	MAGNESIUM CHLORIDE
D8	0.1 M	GLYCINE PH 9.0
D8	22 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
D9	0.1 M	AMMONIUM SULFATE
D9	0.1 M	GLYCINE PH 3.8
D9	28 %(v/v)	TRIETHYLENE GLYCOL
D10	0.15 M	SODIUM FORMATE
D10	0.1 M	HEPES PH 7.0
D10	18 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
D11	0.2 M	SODIUM ACETATE PH 7.0
D11	8.8 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
D12	0.2 M	POTASSIUM CHLORIDE
D12	0.1 M	MES PH 6.5
D12	18 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
E1	0.22 M	SODIUM CITRATE
E1	0.1 M	TRIS PH 8.0
E1	35 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
E2	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.5
E2	17 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
E3	1 M	LITHIUM SULFATE
E3	0.02 M	TRIS PH 8.5
E3	1.8 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
E4	0.02 M	TRIS PH 7.5
E4	22 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 550
E5	0.05 M	SODIUM CHLORIDE
E5	0.02 M	GLYCINE PH 10.0
E5	33 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
E6	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
E6	0.1 M	TRIS PH 8.5
E6	25 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
E7	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
E7	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.5
E7	31 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 2000

E8	0.64 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
E8	18 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3350
E9	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
E9	0.1 M	CADMIUM CHLORIDE
E9	0.1 M	TRIS PH 8.0
E9	33 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
E10	0.1 M	BICINE PH 8.9
E10	31 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 2000
E11	0.05 M	SODIUM SULFATE
E11	0.05 M	LITHIUM SULFATE
E11	0.05 M	TRIS PH 8.5
E11	35 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
E12	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
E12	0.05 M	GLYCINE PH 9.5
E12	33 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
F1	0.3 M	MAGNESIUM NITRATE
F1	0.1 M	TRIS PH 8.0
F1	23 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 2000
F2	0.12 M	LITHIUM SULFATE
F2	0.02 M	TRIS PH 7.5
F2	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.0
F2	20 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
F3	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
F3	0.12 M	TRIS PH 9.2
F3	20 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
F4	0.2 M	SODIUM CHLORIDE
F4	0.1 M	HEPES PH 7.0
F4	22 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 550
F5	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
F5	0.325 M	SODIUM ACETATE PH 7.0
F5	0.1 M	TRIS PH 8.0
F5	21 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
F6	0.02 M	SODIUM CITRATE
F6	0.08 M	SODIUM PHOSPHATE PH 6.2
F6	18 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 2000
F7	0.02 M	POTASSIUM NITRATE
F7	0.03 M	SODIUM CITRATE PH 6.5
F7	7.7 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
F8	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
F8	0.005 M	MAGNESIUM CHLORIDE
F8	0.1 M	TRIS PH 8.5
F8	30 %(w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
F9	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
F9	0.1 M	HEPES PH 7.0
F9	33 %(v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
F10	0.1 M	CALCIUM CHLORIDE
F10	0.1 M	TRIS PH 7.0

F10	13 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 2000
F11	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
F11	0.02 M	SODIUM CHLORIDE
F11	0.02 M	SODIUM ACETATE PH 4.0
F11	33 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 200
F12	0.07 M	SODIUM CHLORIDE
F12	0.05 M	SODIUM CITRATE PH 5.0
F12	22 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G1	0.2 M	AMMONIUM SULFATE
G1	0.1 M	SODIUM ACETATE PH 4.6
G1	28 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL MONOMETHYL ETHER 550
G2	0.05 M	GLYCINE PH 9.0
G2	55 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G3	0.1 M	MAGNESIUM CHLORIDE
G3	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
G3	0.1 M	TRIS PH 8.5
G3	33 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G4	0.1 M	LITHIUM SULFATE
G4	0.05 M	DI-SODIUM HYDROGEN PHOSPHATE
G4	0.05 M	CITRIC ACID PH 5.0
G4	19 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 1000
G5	0.2 M	MAGNESIUM CHLORIDE
G5	0.1 M	POTASSIUM CHLORIDE
G5	0.025 M	SODIUM CITRATE PH 3.5
G5	33 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G6	0.05 M	ZINC ACETATE
G6	0.05 M	MES PH 6.1
G6	11 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
G7	0.3 M	MAGNESIUM NITRATE
G7	0.1 M	TRIS PH 8.0
G7	22 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
G8	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
G8	0.1 M	MES PH 6.5
G8	33 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G8	4 % (v/v)	ETHYLENE GLYCOL
G9	0.05 M	SODIUM CHLORIDE
G9	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 5.5
G9	26 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G10	0.1 M	LITHIUM SULFATE
G10	0.1 M	GLYCINE PH 9.5
G10	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
G11	0.15 M	POTASSIUM CITRATE
G11	0.05 M	LITHIUM CITRATE
G11	0.1 M	SODIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE
G11	22 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 6000
G12	0.001 M	ZINC SULFATE
G12	0.05 M	HEPES PH 7.5

G12	28 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 600
H1	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
H1	0.1 M	SODIUM PHOSPHATE PH 6.8
H1	33 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
H2	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
H2	0.05 M	BICINE PH 9.0
H2	33 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 300
H3	0.05 M	ZINC ACETATE
H3	0.1 M	SODIUM CACODYLATE PH 6.0
H3	6.6 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 8000
H3	6 % (v/v)	ETHYLENE GLYCOL
H4	0.2 M	LITHIUM SULFATE
H4	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 3.5
H4	28 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
H5	0.1 M	SODIUM CHLORIDE
H5	0.1 M	TRIS PH 7.5
H5	11 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
H6	0.05 M	LITHIUM SULFATE
H6	0.1 M	TRICINE PH 7.4
H6	7 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 3000
H7	0.2 M	CALCIUM CHLORIDE
H7	0.1 M	MES PH 6.5
H7	33 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
H8	1 M	SODIUM CHLORIDE
H8	0.1 M	SODIUM CITRATE PH 6.5
H8	28 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
H9	0.1 M	HEPES PH 7.5
H9	11 % (w/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 4000
H10	0.002 M	ZINC SULFATE
H10	0.08 M	HEPES PH 7.0
H10	25 % (v/v)	JEFFAMINE ED-2001 PH 7.0
H11	0.001 M	CADMIUM CHLORIDE
H11	0.03 M	MAGNESIUM CHLORIDE
H11	0.1 M	MES PH 6.5
H11	30 % (v/v)	POLYETHYLENE GLYCOL 400
H12	3 M	SODIUM CHLORIDE
H12	0.1 M	BIS-TRIS PROPANE PH 7.0

Tab. 5.1 Kristallisationsscreens

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Felix Wieland und Dr. Britta Brügger bedanken, dass sie mir diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht haben, für die interessante Aufgabenstellung, die wissenschaftlichen Anregungen und die stetige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Walter Nickel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und des TAC-Komitees.

Herrn Prof. Dr. Thomas Söllner danke ich ebenfalls für die Übernahme des TAC-Komitees.

Dr. Petra Diestelkötter-Bachert danke ich für die gute Betreuung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Esther Lenherr und Dr. Klemens Wild danke ich für die Lösung der Kristallstrukturen, die unkomplizierte Zusammenarbeit und ihre Anregungen.

Ingrid Meißner danke ich für die technische Unterstützung und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Andrea Hellwig danke ich für die kompetente Einführung und Betreuung der Elektronenmikroskopie und ihre Bereitschaft, auch kurzfristig Proben vorzubereiten und auszuwerten.

Allen Mitarbeitern der AG Wieland – besonders meiner "Bench-Nachbarin" Simone Röhling – danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern und meiner Schwester Stephanie danke ich für ihre stetige Unterstützung in einfachen und schwierigen Zeiten und das Korrekturlesen dieser Arbeit.