1 Einleitung

1.1 Transport in der eukaryontischen Zelle

Die eukaryontische Zelle ist in mehrere Reaktionsräume, die Organellen aufgeteilt. Diese durch Membranen abgeschlossenen Kompartimente ermöglichen eine Aufrechterhaltung von Mikroumgebungen, die unterschiedlichen Stoffwechsel-anforderungen gerecht werden und daher gegenläufige Prozesse in nächster räumlicher Nähe ablaufen können. Da Proteine und Lipide zum Teil in anderen Organellen entstehen, als in den Komparimenten, in denen sie später ihre Funktion erfüllen, ist es für die eukaryontische Zelle lebensnotwendig, daß ein Austausch zwischen den Organellen stattfinden kann. Der Transport von Proteinen und Lipiden zwischen den Organellen erfolgt über Vesikel, die sich an der Ausgangsmembran abschnüren und mit der Zielmembran verschmelzen und so ihre Fracht in das Zielorganell entlassen. Wichtig ist nicht nur der Transport von Proteinen und Lipiden zu ihrem Wirkungsort, sondern auch die Rückführung von Proteinen und Membranen (d.h. Lipiden), um die individuelle Zusammensetzung der Kompartimente aufrecht zu erhalten. Aufgrund des ausgeprägten Austauschs zwischen den Organellen spricht man auch von einem Membranfluß.

1.2 Der sekretorische Weg

Ein Beispiel für den Membranfluß ist der sekretorische Weg. Sekretorische Proteine, wie Antikörper oder Neurotransmitter und Membranproteine, wie Hormonrezeptoren werden am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, zum Golgi-Apparat transportiert und gelangen schließlich zu ihrem Bestimmungsort in den extrazellulären Raum oder an die Plasmamembran. Dieser zielgerichtete Transport wurde erstmals von Palade und Mitarbeitern beschrieben (Palade, 1975).

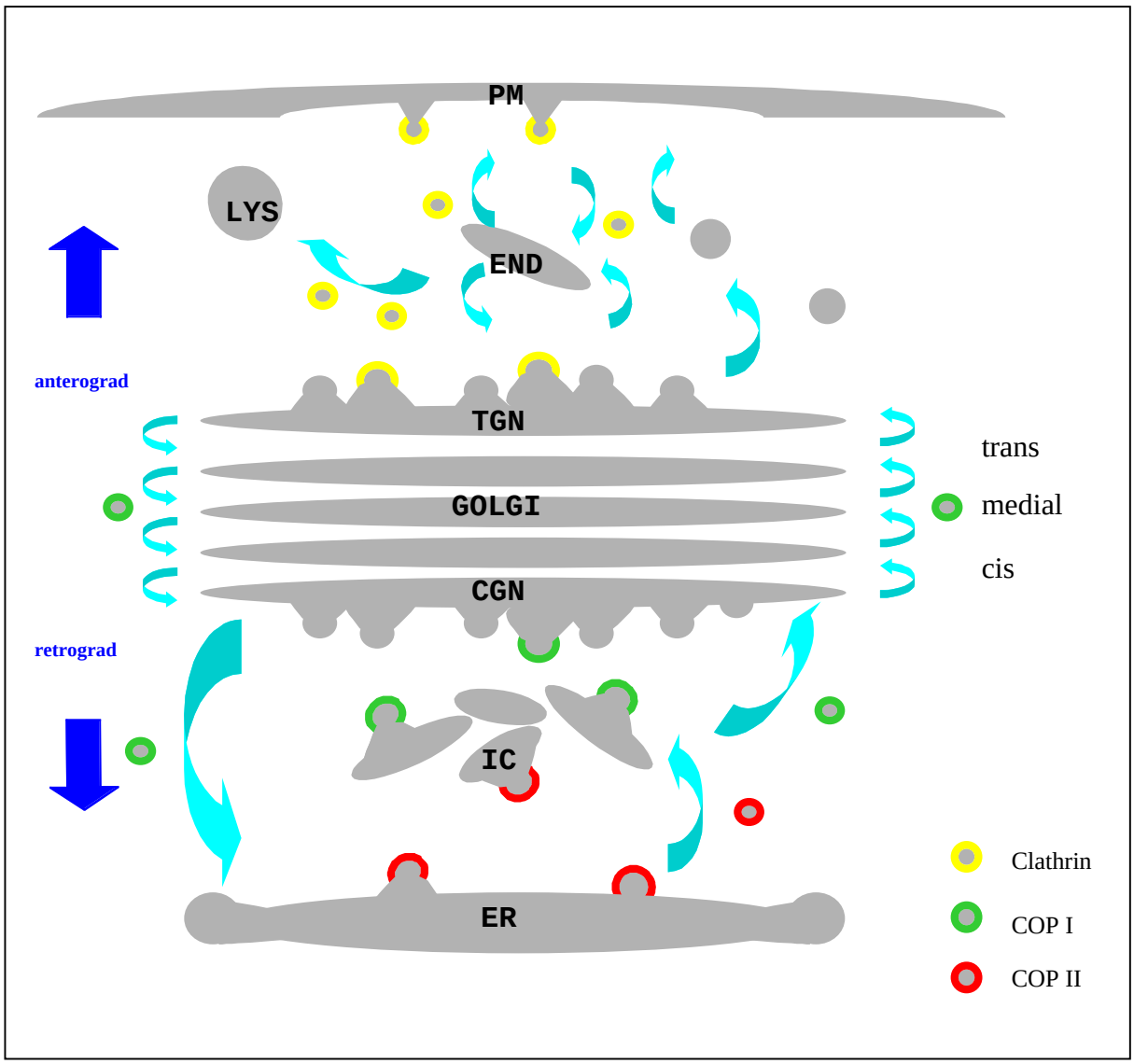


Abbildung 1: Schematische Darstellung des sekretorische Weges

Sekretorische Proteine werden am ER synthetisiert und über das intermediäre Kompartiment (IC) und den Golgi Apparat an ihren Bestimmungsort, den Endosomen, den Lysosomen oder die Plasmamembran transportiert. Der Transport wird von proteinumhüllten Vesikeln bewerkstelligt. COPII-Vesikel vermitteln den anterograden Transport zwischen ER und IC. COPI-Vesikel transportieren Fracht vom IC zum Golgi, innerhalb des Golgis (anterograd und retrograd) und vom Golgi zurück zum ER. Clathrin-Vesikel sind sowohl am Transport vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den Endosomen und Lysosomen, als auch an der Aufnahme von Fracht an der Plasmamembran und deren Transport zu den Endosomen beteiligt.
Clathrin-Vesikel: gelb, COPI-Vesikel: grün, COPII-Vesikel: rot
PM: Plasmamembran, LYS: Lysosomen, END: Endosomen, SV: sekretorische Vesikel

Der Ausgangspunkt für alle Proteine des sekretorischen Weges ist das ER. Es bildet das größte Endomembransystem und erstreckt sich durch die ganze Zelle. Morphologisch läßt es sich in drei Teilbereiche aufteilen: die Kernmembran, das glatte ER und das rauhe ER, das durch an ihm haftende Ribosomen charakterisiert ist. Die Synthese eines sekretorischen Proteins beginnt an einem Ribosom. Die sich bildende Polypeptidkette wird anschließend mit dem Ribosom aufgrund einer ER-Signalsequenz zielgerichtet zum ER transportiert (Blobel and Dobberstein, 1975). Dort bindet die hydrophobe Signalsequenz an ein Signalerkennungspartikel (SRP). Über mehrere Schritte führt diese Interaktion zur Translokation der entstehenden Polypeptidkette in das ER-Lumen (Kalies and Hartmann, 1998; Matlack et al., 1998; Wilkinson et al., 1997). Zeitgleich wird die richtige Faltung des entstehenden Proteins durch Chaperone des ER kontrolliert und erleichtert (Bukau and Horwich, 1998). Noch während oder auch nach der Translation werden die Proteine weiter modifiziert. Sie können N-glykosyliert werden (Abeijon and Hirschberg, 1992; Kornfeld and Kornfeld, 1985) und ebenso erfolgt hier die Ausbildung von Disulfidbrücken (Gething and Sambrook, 1992). Multimere Proteine setzen sich zu Proteinkomplexen zusammen. Nur richtig gefaltete, assemblierte und modifizierte Proteine passieren die Qualitätskontrolle des ERs und werden entlang des sekretorischen Weges zum Golgi transportiert. Fehlgefaltete Proteine dagegen werden ins Cytosol exportiert und dort durch Proteasomen abgebaut (Hershko and Ciechanover, 1992).

Zwischen dem ER und dem Golgi befindet sich das ER-Golgi intermediäre Kompartiment (ERGIC oder IC, für *intermediate compartment*) (Schweizer et al., 1991), das auch als VTCs (*tubular vesicular clusters*) (Balch et al., 1994), *salvage compartment* (Warren, 1987) oder 15°C-Kompartiment (Saraste and Kuismanen, 1984) bezeichnet wird. Entdeckt wurde es ursprünglich in Zellen, die für mehrere Stunden bei einer Temperatur von 15°C gehalten wurden (Saraste and Kuismanen, 1984). Unter dieser Bedingung reichern sich einige Proteine, die sonst im sekretorischen Weg zyklisieren, in diesem Kompartiment an, das zwar in nächster Nähe zum Golgi-Apparat liegt, aber diesem nicht zugeordnet werden kann (Saraste and Kuismanen, 1984; Schweizer et al., 1991; Ying et al., 2000). Marker für dieses Kompartiment sind die kleine GTPase Rab2 (Chavrier et al., 1990; Tisdale and Balch, 1996) und das intrazelluläre Lectin ERGIC-53/p58 (Schweizer et al., 1988).

Es wird allgemein akzeptiert, daß das IC eine wichtige Rolle als Sortierungsstation, sowohl im anterograden (vorwärts gerichteten) (Martinez-Menarguez, 1999), als auch im retrograden (rückwärts gerichteten) Transport spielt (Hauri et al., 2000). Trotzdem wird immer noch diskutiert, ob das IC ein eigenständiges Kompartiment (Hauri and Schweizer, 1992) oder ein Teil der ERs (Krijnse-Locker et al., 1995; Sitia and Meldolesi, 1992) oder des Golgis (Mellman and Simons, 1992) ist.

Nach dem IC passiert das sekretorische Protein den Golgi-Apparat, der in Säugerzellen eine perinucleäre Lokalisation aufweist. Er hat einen polaren Aufbau, d.h. er besitzt eine Eingangsseite, das cis-Golgi-Netzwerk (CGN) und eine Ausgangsseite, das trans-Golginetzwerk (TGN), die beide je nach Zelltyp aus mehr oder weniger verzweigten, tubulo-vesikulären Strukturen bestehen. Dazwischen befindet sich ein Stapel von Zisternen, der wiederum in cis, medial und trans aufgeteilt wird (siehe Abbildung 1). Innerhalb einer Zelle können, abhängig vom Zelltyp ein bis hundert Golgi-Stapel vorliegen, die aus zwei bis 20 Zisternen bestehen können (Rambourg, 1997).

Sekretorische Proteine treten am CGN in den Golgi ein und werden vektoriell durch diesen transportiert, bis sie ihn über das TGN verlassen (Rothman and Wieland, 1996). Beim Durchlaufen der verschiedenen Zisternen werden die Proteine nach einer strengen Reihenfolge modifiziert. Dazu zählt die O-Glykosylierung (Jentoft, 1990), die Modifikation N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide (Kornfeld and Kornfeld, 1985) und die Sulfatierung (Esko, 1991). Die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, werden deshalb auch als Marker für die verschiedenen Subkompartimente benutzt.

Sowohl der cis-Golgi als auch das TGN werden als Sortierstationen für Frachtproteine beschrieben (Farquhar, 1985; Hsu et al., 1991). Im cis-Golgi können Proteine entweder aufgrund eines ER-Rückführungssignals ins ER zurücktransportiert werden, oder sie werden weiter vorwärts durch den Golgi transportiert (Jackson et al., 1990; Nilsson et al., 1989). Im TGN wird entschieden, ob die Proteine zu den Lysosomen, den Endosomen oder zur Plasmamembran transportiert werden sollen (Griffiths and Simons, 1986; Lemmon and Traub, 2000).

1.2.1 Der vesikuläre Transport

Der Transport innerhalb des sekretorischen Weges erfolgt in allen eukaryontischen Organismen über proteinumhüllte Vesikel. Diese entstehen an ihrer Donormembran, wobei sich Hüllproteine, die aus dem Cytosol rekrutiert werden, auf der Oberfläche anlagern und die Abknospung ermöglichen. Die Anlagerung und Dissoziation der Hüllproteine wird meist von kleinen GTPasen der Ras-Familie reguliert (Rothman and Wieland, 1996).

Nach dem Transport zur Akzeptormembran und dem Verlust der Hülle verschmelzen die Transportvesikel mit dieser und entlassen ihre Fracht. Dabei übernimmt die Familie der SNAREs (*soluble NSF-attachment protein receptors*) die Funktion der Rezeptoren in den Vesikeln (*vesicle,* v-SNARE) und der entsprechenden Akzeptormembran (*target,* t-SNARE), so daß sichergestellt wird, daß ein Transportvesikel nur mit der richtigen Akzeptormembran fusionieren kann. Nach erfolgter Zielfindung wird Vesikelmembran mit der Akzeptormembran mittels SNARES verschmolzen.

Bisher wurden drei Vesikeltypen, COPII-, COPI- und Clathrin-Vesikel (COP, *coat protein*), näher charakterisiert, die in den nächsten Abschnitten beschrieben werden sollen (Kirchhausen, 2000b).

1.2.1.1 COPII-Vesikel

COPII-umhüllte Vesikel vermitteln den Transport vom ER zum IC (Barlowe, 1998; Barlowe et al., 1994). Ihre Hülle besteht aus der kleinen GTPase Sar1 (Barlowe et al., 1993; Nakano and Muramatsu, 1989), dem Sec23/24- und dem Sec13/31-Komplex (Hicke et al., 1992; Pryer et al., 1993; Salama et al., 1997).

Der Nukleotidaustausch von Sar1 von GDP zu GTP wird durch Sec12, einem integralen Membranprotein des ERs katalysiert (Barlowe and Schekman, 1993). Sar1-GTP bindet dann an die ER-Membran, was zur Rekrutierung des cytosolischen Sec23/24-Komplexes und anschließend des Sec13/31-Komplexes führt. Die Assemblierung der Kompexe vermittelt die Abschnürung von COPII-umhüllten Vesikeln. Sec23 dient als Bestandteil des Hüllkomplexes als GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Sar1 und sorgt damit für die spätere Entfernung der Hüllproteine, so daß eine spätere Fusion möglich ist (Barlowe, 2000).

1.2.1.2 COPI-Vesikel

COPI-umhüllte Vesikel sind an mehreren Schritten des frühen sekretorischen Transports beteiligt (Orci et al., 1986; Wieland and Harter, 1999). Sie vermitteln den bidirektionalen Transport zwischen IC und Golgi (Lowe and Kreis, 1998). Ebenso sind sie verantwortlich für den anterograden und retrograden Transport innerhalb des Golgis sowie dem retrograden Transport vom Golgi zum ER (Harter and Reinhard, 2000; Nickel and Wieland, 1998). Ihre Hülle besteht aus der kleinen GTPase ARF1 (*ADP ribosylation factor1*) (Serafini et al., 1991) und Coatomer, einem Proteinkomplex aus sieben Untereinheiten (α-, β-, β'-, γ-, δ-, ε- und ζ-COP), der vollständig assembliert im Cytosol vorliegt (Waters et al., 1991).

ARF1 liegt in seiner GDP-Form löslich im Cytosol vor, da sein Myristylrest im Inneren des Proteins verborgen liegt (Donaldson and Klausner, 1994). Katalysiert durch einen Nukleotid-Austauschfaktor GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) wird GDP durch GTP ersetzt (Jackson and Casanova, 2000). ARF1 ändert seine Konformation und sein Myristylrest wird exponiert, mit dem sich das Protein dann in der Membran verankert (Goldberg, 1998),(Kahn and Gilman, 1986). Da die Bindung an Membranen sättigbar ist, wird für ARF1 ein Rezeptor an Golgimembranen postuliert (Gommel, 2001b; Helms et al., 1993).

Nach der Aktivierung von ARF1 kann Coatomer aus dem Cytosol rekrutiert werden und bindet über β- und γ-COP an ARF1 (Donaldson et al., 1992; Palmer et al., 1993; Zhao et al., 1997; Zhao et al., 1999). Durch die Assemblierung der Hüllproteine wird anschließend ein Vesikel aus der Donormembran abgeschnürt. Wird ARF-GTP zu ARF-GDP hydrolysiert, vermittelt dies die Abspaltung der Proteinhülle von den Vesikeln (Tanigawa et al., 1993), was eine wichtige Voraussetzung für die spätere Fusion darstellt.

1.2.1.3 Clathrin-Vesikel

Clathrin–umhüllte Vesikel vermitteln an der Plasmamembran den Transport zu den frühen Endosomen und am TGN zu den späten Endosomen und den Lysosomen (Hirst and Robinson, 1998; Kirchhausen, 2000a; Pearse and Robinson, 1990). Die Proteinhülle setzt sich aus Clathrin und je nach Zielort einem unterschiedlichen Adaptorkomplex (AP) zusammen. Dabei vermitteln AP1, AP3 und AP4 den

Transport vom TGN zu späten Endosomen oder Lysosomen und AP2 von der Plasmamembran zu den Endosomen (Boehm and Bonifacino, 2001). Clathrin ist ein Proteinkomplex aus drei leichten und drei schweren Ketten, die sich zu einem Triskelion zusammenfügen (Ungewickell and Branton, 1981). Mehrere dieser Triskelien bilden eine käfigartige Struktur auf der Oberfläche der Vesikel aus. Die Adaptorkomplexe vermitteln dabei sowohl die Clathrin–Bindung an die Membran, als auch die Sortierung der Fracht. Die Rekrutierung von AP1 an die Golgimembran wird ebenfalls durch ARF1 vermittelt (Austin et al., 2000).

Die meisten bekannten Proteine, die bei der Bildung von Transportvesikeln beteiligt sind, sind cytosolische Proteine, die an die Membran rekrutiert werden, um ihre Funktion zu erfüllen. Vor einiger Zeit wurde bei der Suche nach Transmembranproteinen, die in Transportvesikeln vorkommen eine neue Proteinfamilie entdeckt, die sich in COPI- und COPII-Vesikeln anreichern (Belden, 2001; Gommel et al., 1999; Sohn et al., 1996; Stamnes et al., 1995). Diese Proteine werden in der p24-Familie zusammengefaßt.

1.3 Die p24-Familie

Die p24-Familie besteht aus kleinen Transmembranproteinen (ca. 25 kDa), von denen in Hefe acht und in Säugern sechs Mitglieder bekannt sind. Über Sequenzhomologie lassen sich die Mitglieder in 4 Subfamilien (α, β, γ, δ) aufteilen. In Säugerzellen gibt es je ein Mitglied der Subfamilie von δ (p23), β (p24) und α (p25). Die p26-Subfamilie (γ) besteht aus drei Mitgliedern: p26, p27 und tp24 (Emery, 1999). In Hefe gibt es in der p25-Subfamilie ebenfalls mehrere Mitglieder (siehe Tabelle 1).

Subfamilie	Mitglieder in Säuger	Mitglieder in Hefe
p23 oder δ	p23	Erv25p
p24 oder β	p24	Emp24p
p25 oder α	p25	Erp1p, Erp5p, Erp6p
p26 oder γ	p26, p27, tp24	Erp2p, Erp3p, Erp4p

Tabelle 1: Einteilung der p24-Familie in Subfamilien

Alle Mitglieder der p24-Familie sind Typ I-Transmembranproteine. Sie besitzen ein N-terminales Signalpeptid, zwei hochkonservierte Cysteine, eine Region, für die eine *coiled-coil*-Struktur vorhergesagt wird, eine Transmembrandomäne und eine kurze cytoplasmatische Domäne (siehe Abbildung 2). In dieser Domäne oder cytoplasmatischen „Tail“ befinden sich zwei Motive die hochkonserviert sind. Im Abstand von 5 Aminosäuren zur Transmembrandomäne findet man zwei Phenylalanine (FF), sowie im Abstand von neun Aminosäuren ein dibasisches Motiv bestehend aus zwei Lysinen, zwei Argininen oder einem Lysin und einem Arginin (KK, RR oder KR). p25 und bedingt p23 bilden ein klassisches ER-Rückführungssignal (K(X)KXX) aus, von dem bekannt ist, daß es Coatomer bindet (Cosson and Letourneur, 1994).

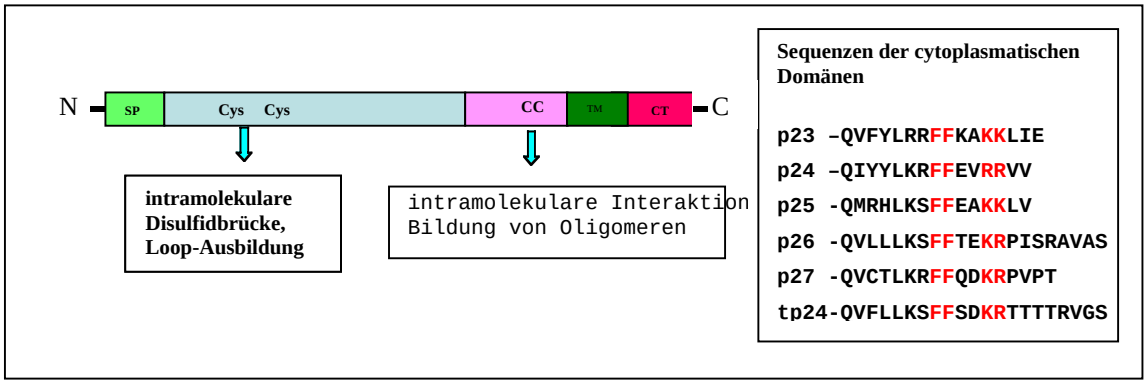


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der p24-Familienmitglieder

Alle Familienmitglieder besitzen ein N-terminales Signalpeptid (SP), zwei konservierte Cysteine (Cys), die eventuell einen intramolekularen Loop ausbilden und eine *coiled coil* Domäne (CC) kurz nach der Transmembrandomäne (TM). Der kurze cytoplasmatische Tail (CT) am C-Terminus ist hochkonserviert und zeigt in allen Familienmitgliedern ein Doppelphenylalaninmotiv (FF) und ein dibasisches Motiv (KK, KR, RR). Die Sequenzen der cytoplasmatischen Domäne von Säugern sind rechts in einer Box angegeben.

Alle p24-Mitglieder lokalisieren in Membranen des frühen sekretorischen Weges. p25 wurde ursprünglich als Protein des ER (Wada et al., 1991), p24 und p23 dagegen wurden als Membranproteine von COPI-Vesikeln entdeckt [Stamnes, 1995 #86; (Sohn et al., 1996). Elektronenmikroskopische Studien zeigen, daß p25 sich hauptsächlich in glatten Membrannetzwerken, aber auch in rauhen ER-Membranen befindet (Dominguez et al., 1998), während p23 auf tubulovesikuläre Strukturen des IC oder CGN und Zisternen des Golgi beschränkt ist (Rojo et al., 1997; Sohn et al., 1996). p27 befindet sich hauptsächlich auf der cis-Seite des Golgis und wird aber weiter in den Golgi hineintransportiert, da es Modifikationen von trans-Golgi-

Enzymen trägt (Füllekrug et al., 1999). p24, p26 und tp24 befinden sich nach Immunfluoreszenzdaten im IC und cis-Golgi (Blum et al., 1999; Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000). Zusätzlich gibt es mehrere Evidenzen, daß die p24-Mitglieder im frühen sekretorischen Weg zyklisieren (Blum et al., 1999; Füllekrug et al., 1999; Nickel et al., 1997; Rojo et al., 2000). Es ist aber bis heute unklar, bis zu welchem Grad unterschiedliche Mitglieder sich überlappend in einem Kompartiment befinden. Dies scheint für die Funktion der p24-Mitglieder von großer Bedeutung zu sein, da eine wichtige Eigenschaft dieser Proteinfamilie die Ausbildung von Heterooligomeren ist (Emery et al., 2000; Füllekrug et al., 1999). Für deren Bildung ist vermutlich ihre *coiled-coil* Domäne zuständig (Emery et al., 2000). Aber auch Peptide, die die cytoplasmatischen Domänen der p24-Mitglieder mimikrieren, sind in der Lage Oligomere auszubilden (Fligge et al., 2000).

Durch Coimmunopräzipitationen konnte gezeigt werden, daß p23, p24, p25 und p27 Komplexe miteinander bilden. Ob jedoch Dimere, Tetramere oder höhere Oligomere vorliegen, ist durch diese Experimente nicht zu bestimmen (Füllekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999). Über Dichtegradientenzentrifugation wurde in Säugerzellen eine Komplexgröße von 35S ermittelt. Dies würde einem Komplex aus ca. fünfzig 20kDa-Proteinen entsprechen (Dominguez et al., 1998). Eine Gelfiltrationsstudie über die Hefeanalogen von p24 ergab dagegen eine Komplexgröße von ca. 100kDa (Marzioch et al., 1999).

Daß die Interaktion der p24-Familienmitglieder von funktioneller Bedeutung ist, wird durch die Überexpression eines Familienmitglieds deutlich. Sie führt nicht nur zur Fehllokalisierung des überexprimierten, sondern auch aller anderer p24-Mitglieder in Strukturen, die positiv für ER-Marker sind (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Füllekrug et al., 1999). Die Bildung von Heterooligomeren von p23 und p24 scheint hierbei wichtiger zu sein als die der anderen p24-Mitglieder, da bei einer parallelen Überexpression von p23 und p24 zumindest 30% der Zellen die korrekte Lokalisation zeigen (Emery et al., 2000). Für eine perinucleäre Lokalisation ist jedoch die Expression von mindestens einem Mitglied jeder Subfamilie nötig (Emery et al., 2000; Füllekrug et al., 1999). Bei der Generierung von COPII-Vesikeln aus ER eines erv25pΔ-Stammes (Knock-out von p23 in Hefe) wird, im Vergleich zur Vesiklebildung aus Wildtypmembranen, nur 50% der Menge von emp24p (p24) in

Vesikel verpackt (Belden, 2001). Die p24-Mitglieder brauchen also offerbar die Ausbildung von Heterooligomeren, um das ER verlassen zu können.
Für eine Funktion der p24-Mitglieder als Oligomer spricht auch die Tatsache, daß bei einem *Knock-out* von einem p24-Mitglied in Hefe die übrigen p24-Mitglieder nicht mehr stabil sind und abgebaut werden (Marzioch et al., 1999).

1.3.1 Welche Funktion haben die p24-Mitglieder ?

Obwohl allgemein annerkannt wird, daß die p24-Mitglieder in Transportprozesse des frühen sekretorischen Weg involviert sind, ist ihre genaue Funktion immer noch unklar. Diskutiert wird eine Funktion als Frachtrezeptor oder -adaptor, als Coatrezeptor und eine Rolle bei der Vesikelbiogenese oder der Qualitätskontrolle im ER (siehe Tabelle 2).
Es wurde eine Funktion als Frachtrezeptor oder -adaptor vorgeschlagen, da die *Knock-out*–Mutanten der p24-Mitglieder in Hefe eine Verzögerung des Transports von einigen Frachtproteinen zeigen (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch et al., 1999; Schimmoller et al., 1995; Springer et al., 2000). Darüber hinaus wird eine Rolle bei der Sortierung oder Qualitätskontrolle von Fracht der COPII-Vesikel diskutiert, da die *Knock-out*-Mutanten ER-residente Proteine sezernieren (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch et al., 1999; Schimmoller et al., 1995). Im Gegensatz zu dem nicht gravierenden Phänotyp in der Hefe ist jedoch der *Knock-out* von p23 in der Maus schon im frühen embryonalen Stadium lethal (Denzel et al., 2000). Daher ist es schwierig zu beurteilen in wie weit die Situation in der Hefe der in Säugerzellen entspricht.
In vitro Studien ergaben, daß alle p24-Mitglieder COPII-Hüllproteine und p23, p24 und p25 auch COPI-Hüllproteine binden (Belden, 2001; Dominguez et al., 1998; Fiedler et al., 1996; Sohn et al., 1996). Die Bindung von p23 und p24 löst zusätzlich eine Konformationsänderung von Coatomer aus (Reinhard, 2000; Reinhard et al., 1999). Daher werden einige der p24-Mitglieder auch als Coatrezeptoren gehandelt. Dafür spricht auch, daß in einem Liposomensystem die cytoplasmatische Domäne von p23, welche als Lipopeptid in der Membran verankert wurde, eine Komponente der Minimalmaschinerie für die Generierung von COPI-Vesikeln ist (Bremser et al., 1999). Interessant ist außerdem, daß p23 und p25 ein funktionelles ER-Rückführungssignal besitzen, p24 jedoch nicht (Nickel et al., 1997). Dies läßt die

Spekulation zu, daß p23 und p25 für den retrograden und p24 für den anterograden Transport zuständig sind, bzw. daß ihre An- oder Abwesenheit in einem Vesikel dessen Richtung bestimmt.

Für eine Rolle der p24-Mitglieder bei der Vesikelbiogenese spricht auch der Phänotyp eines *Knock-outs* von emp24p, dem Hefehomolog von p24, in einem Sec18Δ-Stamm, der einen Fusionsdefekt hat und daher Vesikel akkumuliert. Durch den zusätzlichen *Knock-out* von emp24 wird die Anzahl der vesikulären Strukturen vermindert (Stamnes et al., 1995). Allerdings ist unklar, welche Art von Vesikeln es sich handelt. Auch die Interaktion von p24-Mitgliedern mit ARF und Sar1p, die beide an der Bildung von COPI bzw. COPII-Vesikeln beteiligt sind deutet auf eine Funktion bei der Vesikelbiogenese hin (Belden, 2001; Gommel, 2001b; Majoul, 2001). Eine direkte Bindung von p23 an ARF wurde *in vitro* mittels Photocrosslink-Studien gefunden (Gommel, 2001b). Durch eine FRET-Analyse (*fluorescence resonance energy transfer*) wurde *in vivo* eine Interaktion von p23 und p24 mit ARF und von p24 mit ARFGAP (*GTPase-activating protein*) nachgewiesen (Majoul, 2001). In Hefe konnte zusätzlich die Bindung von p24, aber nicht p23, an Sar1 gezeigt werden (Belden, 2001).

Funktion	
Frachtrezeptor oder -adaptor	• verlangsamter Transport von einigen Proteinen in Hefe *Knock-outs*
Qualitätskontrolle	• Sezernierung von ER residenten Proteinen in Hefe *Knock-outs*
Coatrezeptor	• Binden von Hüllproteinen (COPI und COPII) • Bindung an COPI führt zu einer Konformationsänderung von Coatomer • p23 gehört zur Minimalmaschinerie bei der Generierung von COPI-Vesikeln in einem Liposomensystem
Vesikelbiogenese	• verminderte Anreicherung von vesikulären Strukturen beim *knock-out* von p24 in Hefe bei gleichzeitigem Block der Fusion • p23 und p24 binden ARF • p24 bindet Sar1p und ARF-GAP

Tabelle 2: Funktion der p24-Familie

Erläuterungen siehe Text

Eine genaue Bestimmung der biologischen Bedeutung der p24-Familie wurde bislang durch die Komplexität des Systems erschwert. Daher wurden die meisten funktionellen Studien bisher mit nur einem oder zwei Mitgliedern der p24-Familie durchgeführt. Viele Versuche implizieren jedoch, daß der Schlüssel zur Funktion in der Ausbildung von Heterooligomeren liegt. Alle Familienmitglieder zyklisieren im frühen sekretorischen Weg, wogegen sie aber eine unterschiedliche Lokalisation in ER, intermediärem Kompartiment und Golgi zeigen. Dies bedeutet, daß die Interaktion verschiedener Familienmitglieder an unterschiedlichen Stationen innerhalb des sekretorischen Weges eine Rolle spielt. Die Herausforderung zur Bestimmung der Funktion liegt daher zum einen in der Betrachtung der p24-Familie als Ganzes und zum anderen in dem komplizierten Zusammenspiel der einzelnen Familienmitglieder in den unterschiedlichen Kompartimenten.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Durch Immunpräzipitationen wurde gezeigt, daß die p24-Proteine Herterooligomere ausbilden können. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß keine Aussagen über die Größe der Komplexe gemacht werden kann. Daher war ein Ziel dieser Arbeit die Größe der p24-Komplexe zu bestimmen. Da die p24-Proteine sich jedoch nicht nur im Golgi, sondern auch im IC und ER befinden, sollte die Komplexgröße in allen Organellen des frühen sekretorischen Weges bestimmt werden, um mögliche Unterschiede zu analysieren. Dazu mußte jedoch zuerst eine Strategie zur Aufreinigung dieser Organellen entwickelt werden. Da die p24-Proteine auch in COPI-Vesikeln als Heterooligomere vorliegen, sollte zusätzlich der Komplexstatus in COPI-Vesikeln analysiert werden.

Trotz der Ausbildung von Oligomeren, besitzen die p24-Mitglieder unterschiedliche Lokalisationen. Durch die Ermittlung der Konzentration der einzelnen p24-Mitglieder in ER, IC und Golgi über Westernblots, sollte ein Einblick in die Lokalisation, aber auch in die Stöchiometrie der einzelnen p24-Proteinen entlang des sekretorischen Weges gewonnen werden.

Alle p24-Mitglieder zyklisieren zwischen ER, IC und Golgi und sind in der Lage Herteooligomere auszubilden. Um einen Eindruck vom Zusammenspiel der p24-Proteine zu gewinnen, sollte, sowohl über Immunfluoreszenz, als auch über einen biochemischen Ansatz, die Umverteilung der p24-Mitglieder bei einem 15°C-Block und anschließender Erhöhung der Temperatur untersucht werden.

In einem Nebenprojekt sollte eine 2D-Strategie etabliert werden, die es ermöglicht neue Proteine, die in COPI-Vesikeln verpackt werden, durch Ansequenzieren zu ermitteln, obwohl nur geringe Mengen an Material zur Verfügung stehen. Damit wäre es dann möglich neue funktionelle Proteine der COPI-Vesikel zu analysieren.

2 Ergebnisse I: Die p24-Proteine

2.1 Die p24-Familie bildet Oligomere im Golgi und in COPI-Vesikeln

Eine herausragende Eigenschaft der p24-Familie ist die Ausbildung von Oligomeren (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Füllekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999). Da mit einem Antikörper gegen p24 aus Golgimembranen auch p23 und p25 koimmunpräzipitieren (siehe Abbildung 3A) müssen Heterooligomere ausgebildet werden. In weiteren Studien wurde gezeigt, daß auch p27 p23, p24 und p25 koimmunpräzipitieren kann (Füllekrug et al., 1999) und p24 p23 (Gommel et al., 1999). p26 jedoch wird mit p27 nur in sehr geringen Mengen koimmunpräzipitiert (Füllekrug et al., 1999). Mit tp24, einem weiteren Mitglied der p26-Subfamilie, wurden bisher keine Studien mit einem Antikörper gegen tp24 selbst gemacht, aber bei einer Präzipitation mit p27 aus radioaktiv markiertem Material wurden bei einer anschließenden Analyse über 2D-Gele keine Signale für tp24 gefunden (Füllekrug et al., 1999). Daher scheint p27 als einziges Mitglied der p26-Subfamilie in der Lage zu sein, Heterooligomere mit den anderen p24-Proteinen auszubilden.

Immunisoliert man COPI-Vesikel mit Antikörpern gegen p24 und p25 kann man in den Vesikeln über Westernblot immer auch p23 nachweisen (Abbildung 3B). Da man außerdem mit einem Antikörper gegen p24 auch p23 aus COPI-Vesikeln koimmunpräzipitieren kann, müssen auch in COPI-Vesikeln Heterooligomere vorliegen. Die Menge an p23 und p24, die aus Golgimembranen oder COPI-Vesikeln koimmunpräzipitiert wurde, ist dabei gleich, was für keine bevorzugte Verpackung von einem p24-Mitglied spricht (Gommel, 2001a). Zusätzlich wurde inzwischen auch über Immunelektronenmikroskopie gezeigt, daß sich p23, p24, p25 und p27 in einem Vesikel befinden können (Gommel, 2001a). Die p24-Proteine bilden also sowohl im Golgi, als auch im COPI-Vesikel Heterooligomere aus.

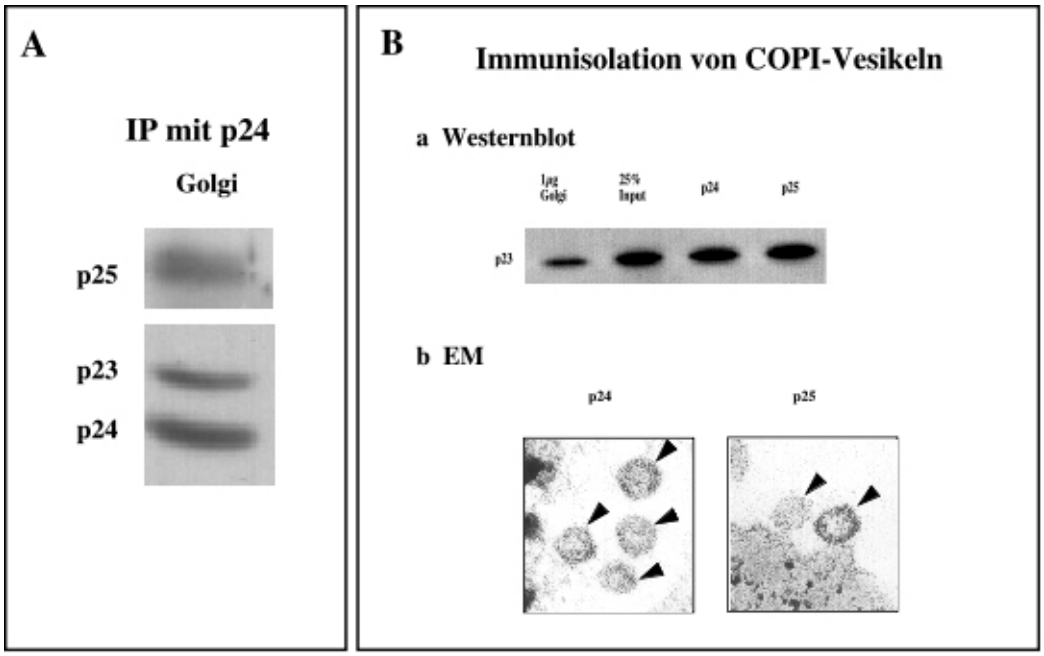


Abbildung 3: p24-Mitglieder bilden Heterooligomere in Golgimembranen und in COPI-Vesikeln

A Aus CHO-Golgi wurde wie in Material und Methoden beschrieben mit einem Antikörper gegen p24 (Elfriede) immunpräzipitiert (IP). Das präzipitierte Material wurde auf einem SDS-Tricingel nach Schägger elektrophoretisch aufgetrennt und mit Antikörpern gegen p23 (#1327), p24 (#1593) und p25 (#1708) analysiert.
B *In vitro* generierte COPI-Vesikel wurden mittels magnetischer Beads (Dynabeads, Dynal) mit Antikörpern gegen p24 (Elfriede) und p25 (#1708) immunisoliert (siehe Material und Methoden). Ein Viertel der Dynabeads wurde im Elektronenmikroskop analysiert. Die restlichen Dynabeads wurden mit SDS-Proteinprobenpuffer eluiert und die Menge an p23 in den Proben mit einem p23-Antikörper (#1593) über Westernblot nachgewiesen. Als Kontrolle wurden 1µg Golgi und 25% des eingesetzen Golgis aufgetragen (Input). Die Pfeile markieren die immunisolierten COPI-Vesikel, die an an Dynabeads haften.

Ein Nachteil der Koimmunpräzipitationsstudien ist, daß keine Aussage über die Komplexgröße der interagierenden Proteine gemacht werden kann. Da p27 mit p23, p24 und p25 koimmunpräzipitiert, wäre es möglich, daß ein Tetramer bestehend aus je einem p23, p24, p25 und p27 existiert. Allerdings würden auch Dimere von p27 mit jedem der anderen p24-Mitglieder zum gleichen Ergebnis in der Koimmunpräzipitation führen. Daher sollte in dieser Arbeit eine Größenbestimmung der p24-Oligomere durchgeführt werden.

2.2 Größenbestimmung der p24-Komplexe in ER, IC und Golgi über Gelfiltration

Bisher wurden in zwei Studien die Größe der p24-Oligomere bestimmt. In Säugerzellen wurde nach Solubilisation von Golgimembranen mit Cholsäure die Komplexgröße der p24-Proteine über Dichtegradientenzentrifugation ermittelt. Nach dieser Studie liegen die p24-Mitglieder in einem Komplex von 35S vor. Dies entspräche einem Oligomer von ca. fünfzig Proteinen einer Größe von 20kDa (Dominguez et al., 1998). In Hefe dagegen wurde nach Solubilisation von Sphäroblasten mit Octylglucosid und anschließender Gelfiltration eine Komplexgröße von ca. 100kDa festgestellt (Marzioch et al., 1999). Eine Gelfiltrationsstudie zur Größenbestimmung des p23 Oligomers in Säugern führte zu dem gleichen Ergebnis (Rojo et al., 2000). Um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu klären, wurde daher die Komplexgröße der p24-Mitglieder über Gelfiltration erneut geprüft. Da die p24-Mitglieder jedoch in allen Organellen des frühen sekretorischen Weges zyklisieren, wurde die Größe der p24-Oligomere nicht nur im Golgi, sondern auch im IC und im ER betrachtet, um eventuelle Unterschiede zu analysieren. Zusätzlich wurden alle derzeit bekannten p24-Mitglieder aus Säuger (p23, p24, p25, p26, p27 und tp24) berücksichtigt.

2.2.1 Testen der Solubilisationsbedingungen

Bei der Bestimmung der Größe eines Komplexes von Membranproteinen ist es notwendig, diese zunächst durch Detergenzien zu solubilisieren. Dabei darf das verwendete Detergenz die Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes jedoch nicht zerstören. Trotzdem müssen die Proteine so quantitativ wie möglich aus der Membran gelöst werden. Zusätzlich sollte das Detergenz eine möglichst kleine Mizelle ausbilden, um den Anteil des Detergenz an der Größe des Proteinkomplexes zu minimieren. Da die anschließende Größenbestimmung mittels Gelfitration durchgeführt werden sollte, darf das Detergenz außerdem den Ablauf der Gelfiltration nicht stören (z.B. keine Änderung der Fluidität bei niedrigen Temperaturen, keine Absorption bei 280nm und keine Interaktionen mit dem Säulenmaterial). Deshalb wurden zunächst mehrere, für die Gelfiltration geeignete

Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen und unter mehreren Puffer- und Salzbedingungen auf ihre Fähigkeit p23 (stellvertretend für die p24-Mitglieder) zu solubilisieren getestet (siehe Material und Methoden). Die Detergenzien, die sich am besten für eine Gelfiltrationsstudie eignen und gleichzeitig die p24-Mitglieder nahezu quantitativ solubilisieren sind Octylglucosid (OG, Calbiochem) und 8-POE (Octylpolyoxyethylen, Alexis) (siehe Abbildung 4). Cholsäure, die von Dominguez und Mitarbeitern benutzt wurde (Dominguez et al., 1998), solubilisiert dagegen nur ca. 20% von p23 im Gegensatz zu 80% bei Octylglucosid und 8-POE. Da Octylglucosid eine etwas kleinere Mizellengröße besitzt, wurden für die weiteren Versuche stets 4% Octylglucosid in Solubilisierungspuffer (20mM HEPES-KOH, pH 6,8, 50mM NaCl) zum Solubilisieren der Membranen benutzt.

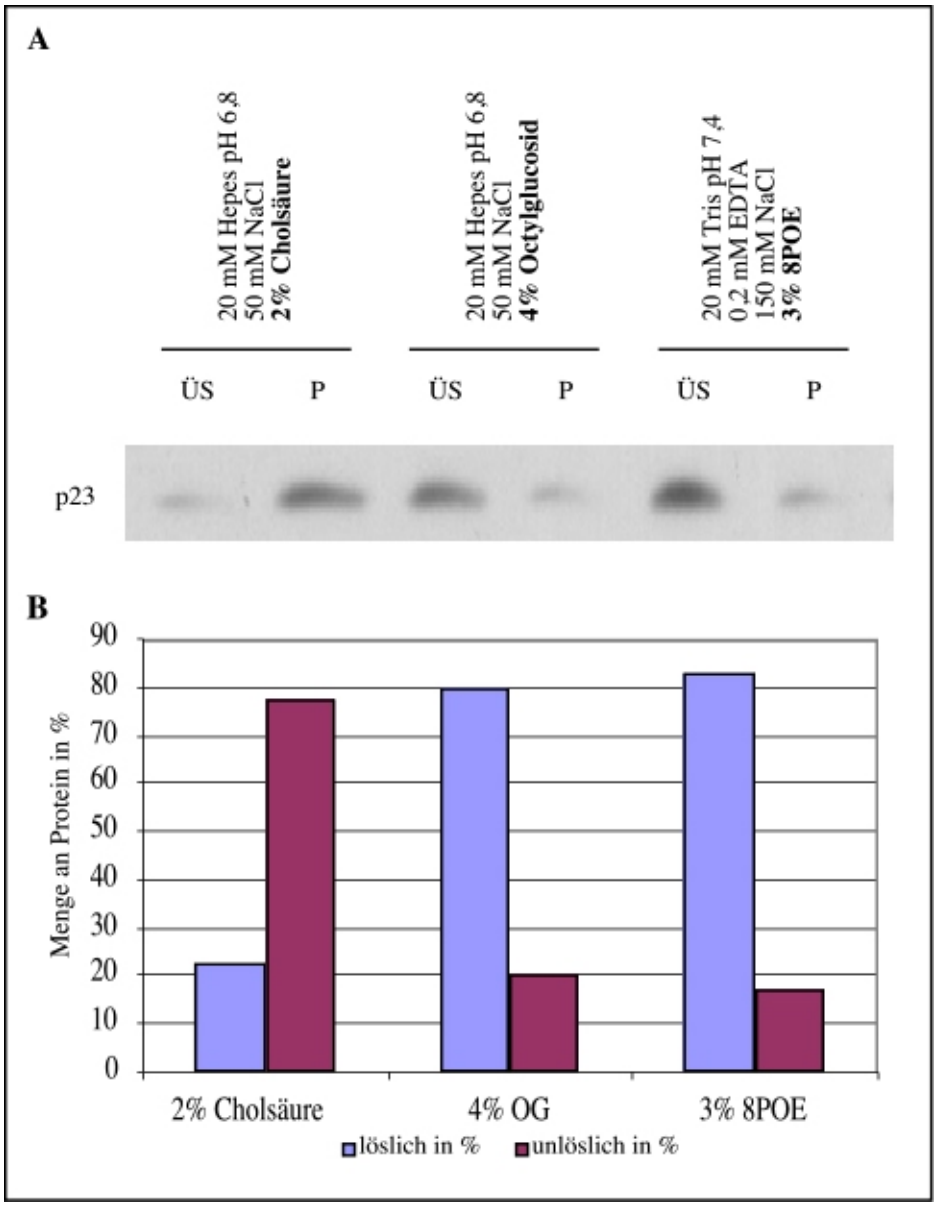


Abbildung 4: Solubilisation von p23 aus Kaninchenlebergolgi

Wie in Material und Methoden beschrieben wurden 50µg Kaninchenlebergolgi pelletiert und in den in **A** angegeben Detergenzien und Puffern 30min bei 4°C solubilisiert. Nach 30min Zentrifugation bei 100000g und 4°C wurde das Pellet (unlösliches Material) in SDS-Proteinprobenpuffer aufgenommen. Der Überstand (lösliches Material) wurde TCA-gefällt und ebenfalls in SDS-Proteinprobenpuffer aufgenommen. Die Proben wurde über ein Lämmligel aufgetrennt und durch Westernblotanalyse der Gehalt an p23 in Überstand und Pellet bestimmt (**A**). Die Banden wurden über das Programm Quantity One (BioRad) ausgewertet und der prozentuale Anteil des Proteins in Überstand und Pellet berechnet (**B**).

2.2.2 Präparation von ER, IC und Golgi aus Hela-Zellen

Das Material, um die Größe der p24-Protein-Komplexe in den Organellen des frühen sekretorischen Weges, ER, IC und Golgi, zu bestimmen, wurde aus Hela-Zellen, einer humanen Zellinie gewonnen, da die vorhandenen Antikörper gegen die humanen Sequenzen der p24-Mitglieder gerichtet sind. Die Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben in Spinnerflaschen kultiviert und aufgeschlossen. Durch eine subzelluläre Fraktionierung über einen Nycodenzgradienten wurde anschließend ER, IC und Golgi aufgereinigt (siehe Material und Methoden). 30µl jeder Faktion wurden pelletiert und das Pellet in SDS-Proteinprobenpuffer aufgenomen. Die Proben wurden auf einem 12% Lämmligel aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen Marker für ER und IC entwickelt. Die Verteilung des Golgis wurde durch Messung der Galactosyl-Transferaseaktivität nachgewiesen. Die Westernblots wurden eingescannt und über das Programm Quantity One (BioRad) die Pixeldichte der Banden ermittelt. Die Pixeldichte des einzelnen Banden und die Enzymaktivitäten wurden genormt (höchster Wert gleich 100, andere entsprechend berechnet) und innerhalb einer Grafik dargestellt (Abbildung 5).

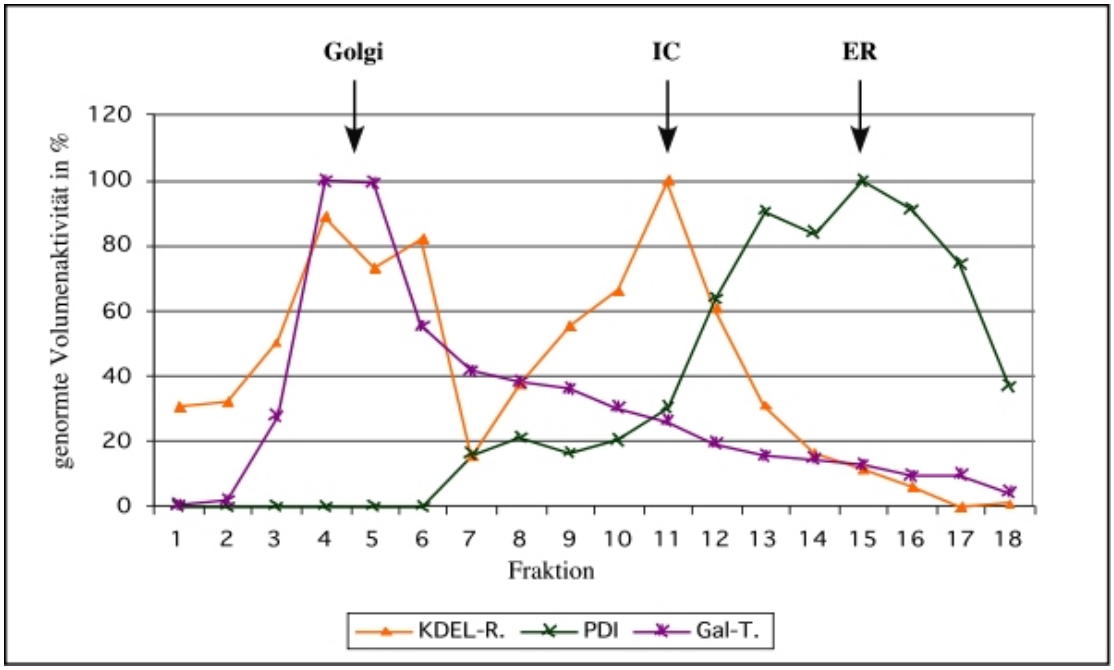


Abbildung 5: Subzelluläre Fraktionierung von Hela-Zellen

Hela-Zellen wurden in Spinnerflaschen kultiviert und wie in Material und Methoden beschrieben aufgeschlossen und einer subzellulären Fraktionierung unterworfen. Die Fraktionen des Gradienten wurden über Westernblot gegen Proteindisulfidisomerase (PDI, Marker für ER) und KDEL-Rezeptor (KDEL-R, Marker für Golgi und IC) und über einen Enzymtest für Galactosyl-Transferase getestet (Gal-T, Marker für Golgi). Die Westernblots wurden eingescannt und mit dem Programm Quantity One die Pixeldichte der Banden bestimmt. Die erhaltenen Daten aus Westernblot und Enzymtest wurden genormt und in einer Grafik dargestellt. Die Maxima der Verteilung von ER, IC und Golgi sind über Pfeile markiert.

Der Golgi, charakterisiert durch ein Maximum der Galactosyl-Transferaseaktivität (Gal-T) (Brew et al., 1975) und des KDEL-Rezeptor (KDEL-R) befindet sich in den leichten Fraktionen des Nycodenzgradienten. Der KDEL-Rezeptor ist jedoch nicht nur ein Marker für den cis-Golgi, sondern auch für das IC (Griffiths et al., 1994; Tang et al., 1993). Daher weist er ein zweites Maximum im Bereich mittlerer Dichte auf, welches das IC darstellt. Das ER, charakterisiert durch die Proteindisulfidisomerase (PDI) (Noiva and Lennarz, 1992) befindet sich im Bereich hoher Nycodenzdichte am Boden des Gradienten. Die Fraktionen, die ER, IC und Golgi enthalten, wurden möglichst eng gepoolt, um Kontaminationen durch andere Membranen so gering wie möglich zu halten (Golgi: Fraktionen 4+5; IC Fraktionen 10+11; ER Fraktionen 14-16). Um das Nycodenz zu entfernen, wurde ein Teil jedes Pools mit 1xK-Hop-Puffer verdünnt und pelletiert (1h, 100000g, 4°C). Anschließend wurde eine Lipidextraktion,

gefolgt von einer Phosphatbestimmung (siehe Material und Methoden) durchgeführt, um die Menge an Phospholipid pro Volumen zu bestimmen.

2.2.3 Gelfiltrationsanalyse der p24-Komlpexe

Für jede Größenbestimmung über Gelfiltration wurden dann 50nmol Phospholipid von ER, IC und Golgi eingesetzt. Die Membranen wurden wie in Material und Methoden beschrieben pelletiert, solubilisiert und die solubilisierten Membranproteine über eine Gelfiltration mit der Superdex200-Säule im SMART-System aufgetrennt. Es wurden 40 Fraktionen gesammelt, von denen Fraktion 9 (Ausschlußvolumen) bis Fraktion 32 (Einschlußvolumen) TCA gefällt wurden. Die Proben wurden auf einem SDS-Tricingel nach Schägger aufgetrennt und mittels Westernblot die Verteilung der p24-Mitglieder analysiert. Für jedes Organell wurde die Analyse der Komplexgröße mindestens dreimal durchgeführt. In Abbildung 6 wird die Westernblotanalyse eines typischen Experimentes dargestellt. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse nochmals zusammengefasst.

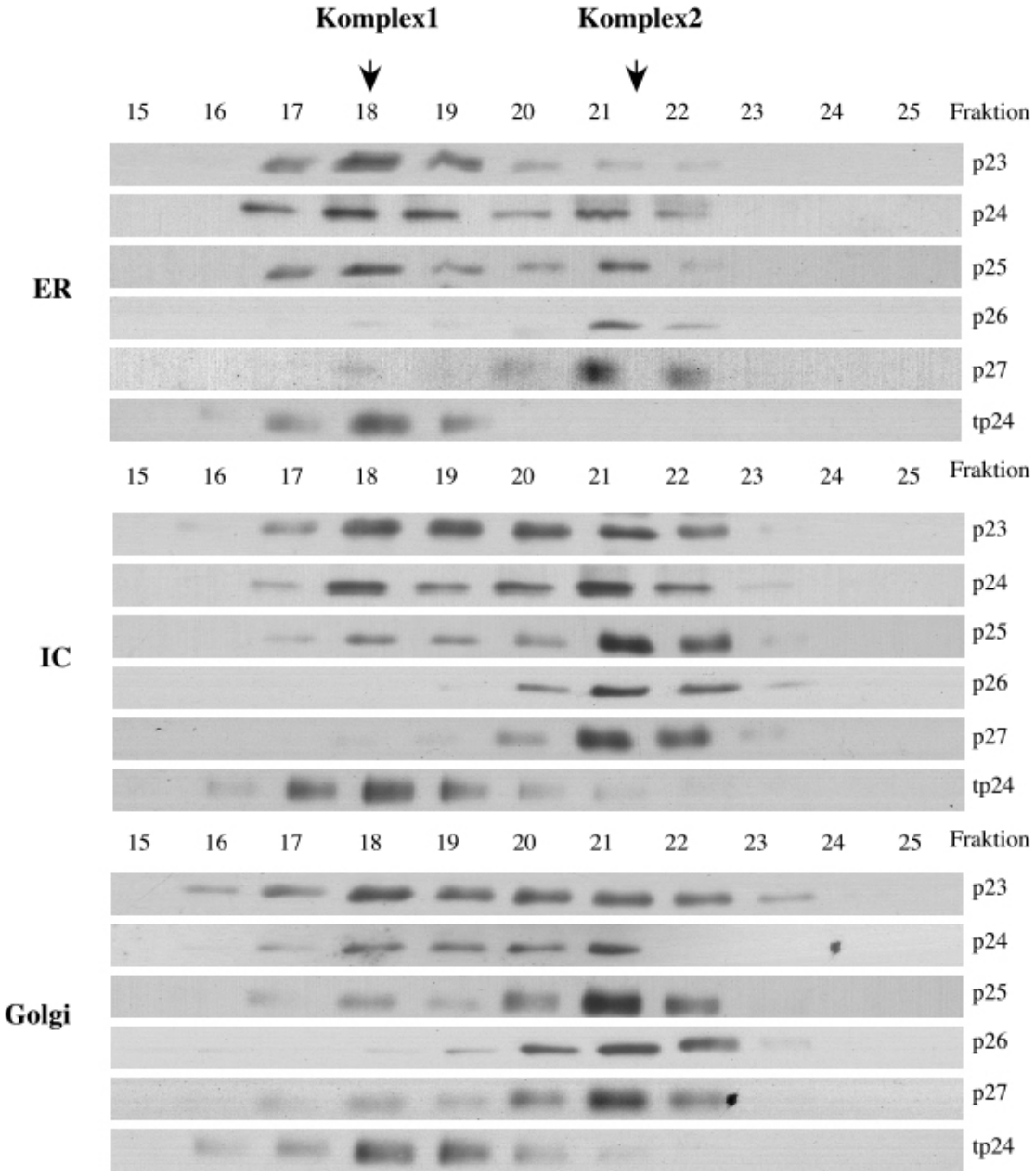


Abbildung 6: Gelfiltrationsanalyse der p24-Komplexe in ER, IC und Golgi

50nmol Phospholipidmembran wurden für jede Analyse eingesetzt. Nach Pelletieren und Solubilisieren der Membranen mit 4% Octylglucosid in Solubilisierungspuffer wurden die solubilisierten Proteine einer Gelfiltration mittels einer Superdex200-Säule im SMART-System unterzogen. Alle Fraktionen vom Ausschluß- bis zum Einschlußvolumen der Säule wurden TCA gefällt und über Westernblot mit Antikörpern gegen die p24-Familie (p23:Henriette, p24:Elfriede, p25:#2469R1, p26:#2088, p27:#2087R2, tp24:#2501R2) getestet. Die p24-Proteine eluieren in zwei definierten Elutionsvolumina (Fraktion 18 und 21/22), daher müssen zwei unterschiedlich große Komplexe (Komplex1+2) vorliegen.

		ER	IC	Golgi
p23	**Fraktion**	18	18-21	18-22
	Elutionsvolumen (ml)	1,37	1,37-1,52	1,37-1,57
p24	**Fraktion**	18 21	18 21	18 21
	Elutionsvolumen (ml)	1,37 1,52	1,37 1,52	1,37 1,52
p25	**Fraktion**	18 21	18 **21/22**	18 **21**
	Elutionsvolumen (ml)	1,37 1,52	1,37 **1,52/1,57**	1,37 **1,52**
p26	**Fraktion**	21/22	21/22	21/22
	Elutionsvolumen (ml)	1,52/1,57	1,52/1,57	1,52/1,57
p27	**Fraktion**	(18) **21**	(18) **21**	18 **21**
	Elutionsvolumen (ml)	1,37 **1,52**	1,37 **1,52**	1,37 **1,52**
tp24	**Fraktion**	18	18	18
	Elutionsvolumen (ml)	1,37	1,37	1,37

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gelfiltrationsanalyse

Die p24-Proteine eluieren in zwei definierten Fraktionen (Fraktion 18 und 21/22). In den fettgedruckten Fraktionen liegen im Vergleich zu den anderen mehr Material vor. Angaben in Klammern symbolisieren schwer detektierbare Signale.

ER-lokalisiertes p23 eluiert hauptsächlich in Fraktion 18. Im IC und Golgi liegt p23 dagegen gleichverteilt in Fraktion 18 und 21/22 vor. p24 zeigt in allen Organellen des frühen sekretorischen Weges eine Gleichverteilung zwischen Fraktion 18 und 21/22. Bei p25, wie bei p24, befinden sich im ER etwa gleiche Mengen in Fraktion 18 und 21/22. Im IC und Golgi jedoch ist der Hauptteil des Proteins in Fraktion 21/22. p27 ist in ER, IC und Golgi hauptsächlich in Fraktion 21/22 zu detektieren, während ein Signal in Fraktion 18 nur schwer detektierbar ist. Im Gegensatz zu den anderen p24-Mitgliedern werden p26 und tp24 jeweils nur in einer bestimmten Fraktion gefunden, wobei p26 immer in Fraktion 21/22 eluiert und tp24 immer in Fraktion 18. Es konnte also gezeigt werden, daß bei einer Gelfiltrationsanalyse die p24-Protein-Oligomere in ER, IC oder Golgi immer nur in zwei definierten Fraktionen eluieren. Dies bedeutet, daß unter den gewählten Solubilisationsbedingungen die p24-Mitglieder in zwei definierten, unterschiedlich großen Komplexen vorliegen müssen, wobei der Anteil der beiden Komplexe in ER, IC und Golgi bei jedem p24-Protein unterschiedlich ist.

2.2.4 Eichen der Gelfiltrationssäule

Um die Größe dieser beiden Komplexe zu bestimmen, wurde daher die Gelfiltrationssäule mit Proteinen bekannter Größe geeicht. Eine Mischung von Eichproteinen (Tyroglobin, 670kDa; Rinder-γ-Globulin, 158kDa; Ovalbumin, 44kDa; Pferdemyoglobin, 17kDa; VitaminB12, 1,32 kDa) wurde 1:1 mit 4% Octlyglucosid in Solubilisierungspuffer verdünnt und wie die Überstände aus der Solubilisation von ER, IC und Golgi einer Gelfiltration unterzogen. Das Elutionsvolumen der Eichproteine wurde bestimmt und in einer Grafik mit dem Logarithmus des Molekulargewichts in Dalton ins Verhältnis gesetzt. Durch die Meßpunkte wurde eine Eichgerade gelegt und deren Formel berechnet (Abbildung 7). Setzt man die Elutionsvolumina der p24-Proteine ein, kann man für den großen Komplex (Fraktion 18) eine Größe von 158kDa und für den kleineren in Fraktion 21/22 eine Größe von etwa 68 bis 52kDa berechnen. Dies würde jeweils etwa einem Tetramer bzw. einem Dimer eines p24-Mitgliedes entsprechen. Dies steht im Widerspruch zu den Daten, die bisher über die Komplexgröße der p24-Mitglieder in Säugern veröffentlicht wurden, da Dominguez und Mitarbeiter einen Komplex von 35S postulieren (Dominguez et al., 1998). In unseren Händen jedoch stellte sich das in dieser Studie verwendete Detergenz Cholsäure als ungeeignet heraus, da es nur 20% von p23 einer Golgimembran zu solubilisieren vermag (Abbildung 4). Außerdem wäre ein 35S-Komplex viel zu groß, um in COPI-Vesikel verpackt werden zu können und kann daher die Koimmunpräzipitation aus Vesikeln nicht erklären. Eine Komplexgröße von ca. 100kDa wurde dagegen auch in Hefe bei einer Gelfiltration von Octylglucosid solubilisierten Sphäroblasten gefunden. Ein kleiner Komplex von etwa 40kDa lag allerdings nur in Membranen der *Knock-out*-Mutanten der p24-Familie vor (Marzioch et al., 1999).

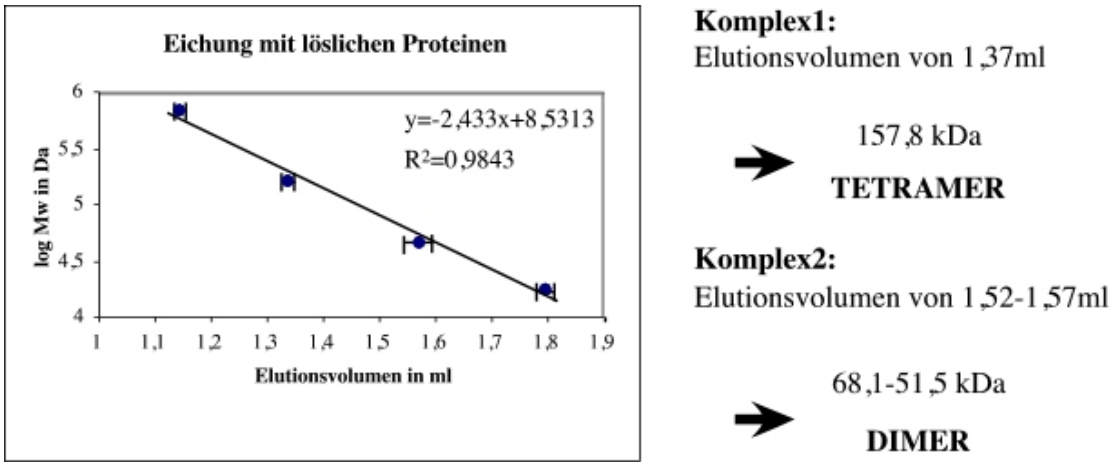


Abbildung 7: Eichung der Gelfiltrationssäule mit löslichen Proteinen

Zur Eichung der Superdex200-Säule mit löslichen Proteinen wurde der Gelfiltrationsstandard von BioRad (Tyroglobin, 670kDa; Rinder-γ-Globulin, 158kDa; Ovalbumin, 44kDa; Pferdemyoglobin, 17kDa; VitaminB12, 1,32 kDa) 1:1 mit 4% Octylglucosid in Solubilisierungspuffer aufgenommen und wie die Überstände aus der Solubilisierung von ER, IC und Golgi einer Gelfiltrationsanalyse unterzogen. Die Elutionsvolumina der Eichproteine wurden bestimmt und in einer Grafik gegen den Logarithmus des Molekulargewichts in Dalton (log Mw) aufgetragen. Durch die Meßpunkte wurde eine Eichgerade gelegt und deren Formel berechnet. Die Elutionsvolumina der p24-Proteine wurden in die Gleichung eingesetzt und deren Größe berechnet.

Da die p24-Proteine mit einer Größe von ca. 20-25kDa relativ klein sind und etwa der Größe der Detergenzmizelle von Octylglucosid (20kDa) entsprechen, wurde durch eine Eichung der Gelfiltrationssäule mit Membranproteinen der Einfluß der Detergenzmizelle auf die Größenbestimmung ermittelt. Mit Antikörpern gegen Membranproteine der Organellen des frühen sekretorischen Weges wurde zunächst deren Solubilisierbarkeit unter den für die p24-Mitglieder gewählten Bedingungen getestet. Da der Transferrin-Rezeptor (200kDa), Calnexin (90kDa), CD8-LT (60kDa, (Nickel et al., 1998)) und Cytochrom b5 in ausreichenden Mengen solubilisiert werden konnten, wurden diese Membranproteine zur Eichung der Säule eingesetzt. Für die Bestimmung des Elutionsvolumes von Calnexin wurde der Westernblot der Gelfiltrationsanalyse von ER zusätzlich mit einem Calnexin-Antikörper analysiert. Für die anderen Membranproteine dagegen wurde zur Eichung eine Mischung aus je 25µg CHO-Golgi aus Zellen, die stabil mit dem CD8-LT-Konstrukt transfiziert wurden (Nickel et al., 1998) und 25µg Kaninchenlebergolgi solubilisiert und analog der p24-Familie der Gelfiltrationsanalyse unterzogen. Mit Antikörpern gegen die

jeweiligen Proteine wurde ihr Elutionsvolumen ermittelt und gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichts in Dalton aufgetragen. Durch die erhaltenen Meßpunkte wurde eine Eichgerade gelegt und deren Gleichung berechnet (Abbildung 8).

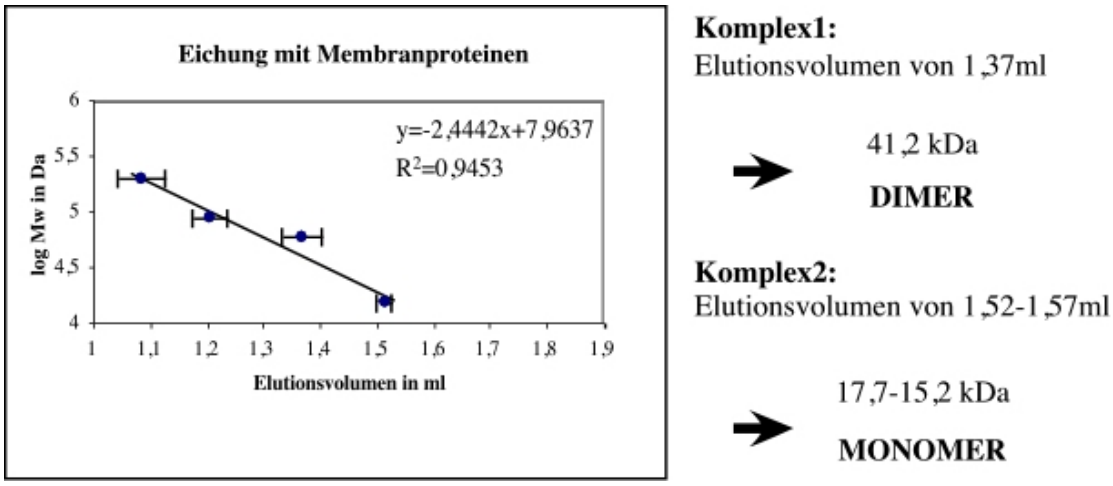


Abbildung 8: Eichung der Gelfiltrationssäule mit Membranproteinen

Durch Antikörper gegen Transferrin-Rezeptor (200kDa), Calnexin (90kDa), CD-LT(60kDa) und Cytochrom b5 (15kDa) wurde deren Elutionsvolumen auf der Superdex200-Säule bestimmt. Die Elutionsvolumina der Eichproteine wurden in einer Grafik gegen den Logarithmus des Molekulargewichts in Dalton (log Mw) aufgetragen, durch die Meßpunkte eine Eichgerade gelegt und deren Formel berechnet. Die Elutionsvolumina der p24-Proteine wurden eingesetzt und deren Größe berechnet.

Setzt man nun die Elutionsvolumina der p24-Mitglieder in diese Gleichung ein, kann man für den p24-Protein-Komplex, der in Fraktion 18 eluiert (Elutionsvolumen 1,37ml), eine Größe von 41 kDa berechnen. Die in Fraktion 21 und 22 eluierenden Proteine (Elutionsvolumen 1,52-1,57ml) haben nach dieser Eichung eine Größe von nur 17,7 bis 15,2 kDa. Die Größe der Detergenzmizelle fällt also weitaus mehr ins Gewicht als erwartet. Daher muß man nach diesen Ergebnissen annehmen, daß die p24-Proteine also nicht, wie durch die Eichung mit löslichen Proteinen vermutet, als Tetramer und Dimer, sondern als Dimer und Monomer in ER, IC und Golgi vorliegen. Um die Eichung mit Membranprotein nochmals zu zu überprüfen, wurde die lösliche luminale Domäne von p23 ebenfalls einer Größenbestimmung über Gelfiltration unterzogen. Da die Ausbildung von Oligomeren über die *coiled-coil*-Domäne im luminalen Teil des Proteins vermittelt wird (Emery et al., 2000), sollte auch die luminale Domäne alleine in der Lage sein Oligomere auszubilden. Es wurde sowohl ein N-terminal als auch ein C-terminal his-getaggtes Protein getestet. Die löslichen

Proteine wurden in 4%Octylglucosid in Solubilisierungspuffer aufgenommen und analog den solubilisierten Membranen der Gelfiltration unterzogen (Abbildung 9). Eine Gelfiltration ohne Detergenz mit PBS als Laufpuffer führte zum gleichen Ergebnis.

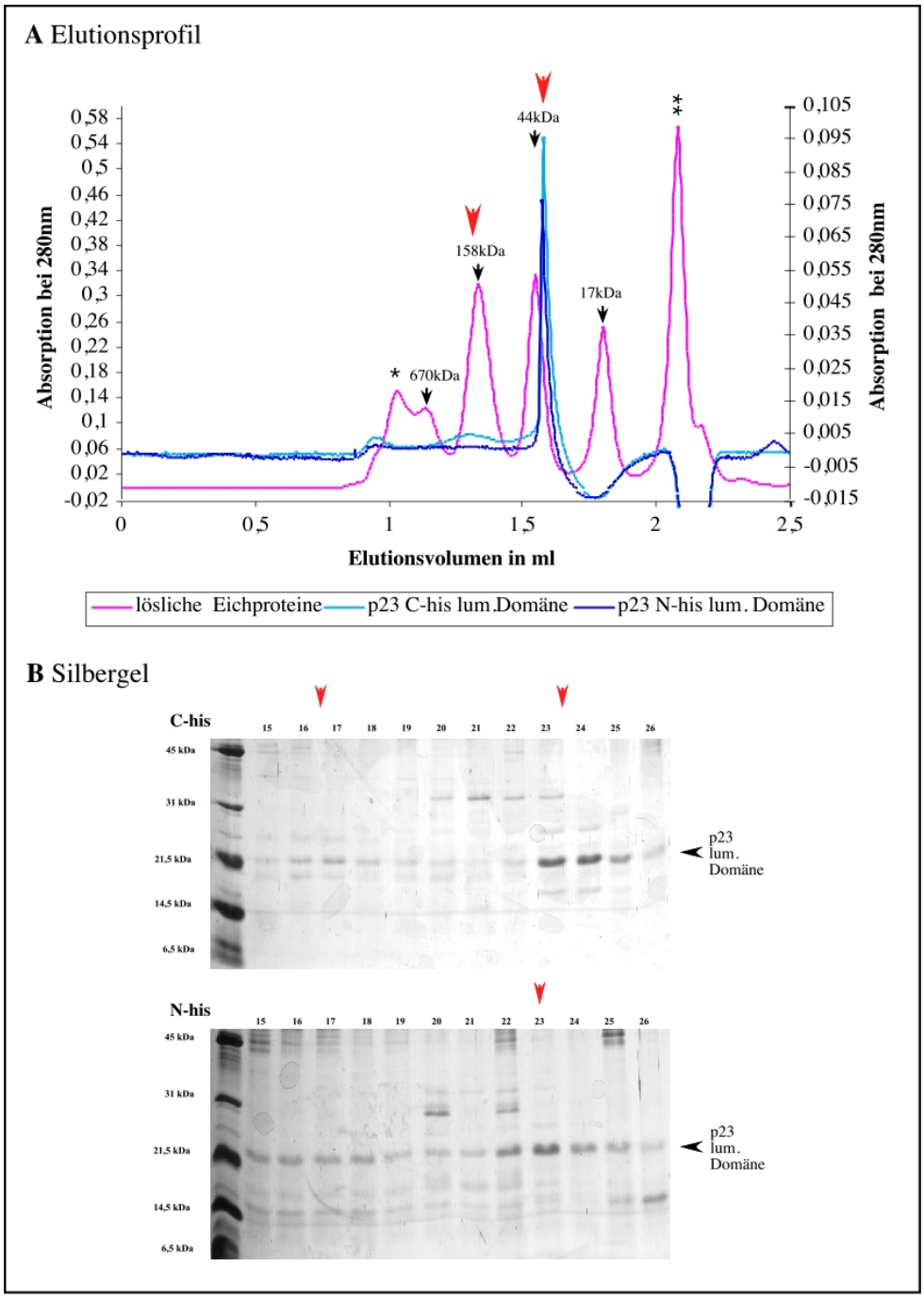


Abbildung 9: Größenbestimmung der luminalen Domäne von p23 über Gelfiltration

10µg der N- bzw. C-terminal his-getaggten luminalen Domäne von p23 wurde in 4% Octylglucosid in Solubilisierungspuffer aufgenommen, 30min bei 100000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand wie in Material und Methoden beschrieben einer Gelfiltration unterzogen. In **A** ist das Elutionsprofil der beiden Läufe und eines Eichlaufs mit dem Gelfiltrationsmarker von BioRad dargestellt. (linke y-Achse für Eichlauf, rechte y-Achse für die Läufe der luminalen Domäne von p23; *Ausschlußvolumen, ** Einschlußvolumen)
B Die Fraktionen 9 bis 32 wurden TCA gefällt und über ein 16% Lämmligel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel Silber-gefärbt. In der Abbildung ist nur Fraktion 15 bis 26 dargestellt, da nur in diesem Bereich ein Gipfel im Elutionsprofil vorlag. Die roten Pfeile deuten die zwei Gipfel der Elution an.

Sowohl die N-terminal als auch die C-terminal his-getaggte luminale Domäne von p23 eluieren hauptsächlich bei einem Elutionsvolumen, das einer Größe von ca. 40kDa entspricht und liegen daher hauptsächlich als Dimer vor. Nur beim C-terminal his-getaggten Protein ist auch ein kleiner Gipfel im Bereich eines Tetramers sowohl im Elutionsprofil, als auch auf dem Silbergel zu erkennen. Da das N-terminal his-getaggte Protein dies nicht zeigt, wäre es möglich, daß dieser Tetramer durch den his-tag am C-Terminus stabilisiert wird. Klar ist jedoch, das p23 sowohl solubilisiert aus Membranen und auch als lösliche luminale Domäne hauptsächlich als Dimer und nicht, wie in anderen Studien gezeigt, als Tetramer vorliegt. Die Oligomere bzw. Heterooligomere der p24-Proteine sind also Dimere.

2.3 Größenbestimmung der p24-Komplexe in COPI-Vesikeln

Immunpräzipitiert man COPI-Vesikel mit einem Antikörper gegen p24, koimmunpräzipitiert auch p23 (Gommel, 2001a), daher müssen auch in Vesikeln Heterooligomere der p24-Proteine vorliegen. Um die Größe dieser Oligomere zu ermitteln, wurde analog zur Größenbestimmung aus ER, IC und Golgi eine Gelfiltrationsstudie mit *in vitro* generierten COPI-Vesikeln durchgeführt. Zunächst wurden COPI-Vesikel analysiert, die aus Golgi und Cytosol aus Rattenleber in einem 1ml-Ansatz hergestellt wurden, da in diesem System die besten Ausbeuten bei der Generierung von COPI-Vesikeln erzielt werden. Vesikel aus drei dieser Ansätze wurden gepoolt, aus ihrer Schwimmdichte herausverdünnt und pelletiert. Anschließend wurden sie analog der ER-, IC- und Golgimembranen solubilisiert und einer Gelfiltration unterzogen. Als Kontrolle wurde zusätzlich der Donorgolgi (50µg) analysiert.

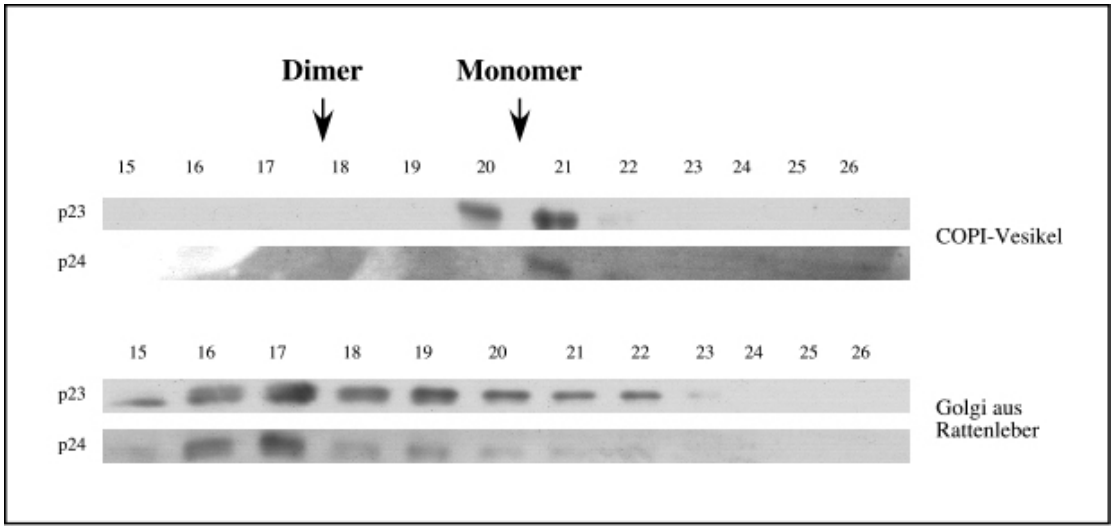


Abbildung 10: Bestimmung der Größe der p24-Protein-Komplexe in COPI-Vesikeln aus Rattenlebergolgi und -cytosol

COPI-Vesikel aus Rattenlebercytosol und -golgimembranen wurden wie in Material und Methoden beschrieben einer Gelfiltrationsanalyse unterzogen. Fraktion 9 bi 32 wurden TCA gefällt, über ein SDS-Tricinegel nach Schägger aufgetrennt und durch einen Westernblot mit Antikörpern gegen p23 (Henriette) und p24 (Elfriede) analysiert.

Im Donorgolgi liegen p23 und p24 hauptsächlich als Dimer vor. In COPI-Vesikeln dagegen können nur Monomere detektiert werden. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Koimmunpräzipitationen, da diese implizieren, daß auch in den COPI-Vesikeln ein Heterooligomer zwischen p23 und p24 vorliegen muß. Da die Protein- und Membranmenge der COPI-Vesikel bei der Solubilisierung jedoch deutlich geringer war als bei den Golgimembranen, wäre es möglich, daß durch das niedrige Lipid bzw. Protein zu Detergenz Verhältnis die Oligomere zu Monomeren solubilisiert wurden. Außerdem konnten in diesem System nicht alle p24-Mitglieder analysiert werden, da ein Teil der vorhandenen Antiköper nur die humanen Epitope erkennen. Um wirklich alle p24-Proteine berücksichtigen zu können, mußten daher COPI-Vesikel aus humanen Golgimembranen generiert werden.

Humane Golgimembranen wurden aus Hela-Zellen präpariert, indem das Protokoll zur Aufreinigung von Golgi aus CHO-Zellen an Hela-Zellen angepaßt wurde. Es wurde die Interphase zwischen 29%(w/v) und 35%(w/v) Saccharose (Interphase1) und 35%(w/v) und 37%(w/v) Saccharose (Interphase2) „gezapft“ und durch die Bestimmung der Volumenaktivität von Galactosyl-Transferase und NADH-Cytochrom C-Reduktase der Gehalt an Golgi und ER überprüft.

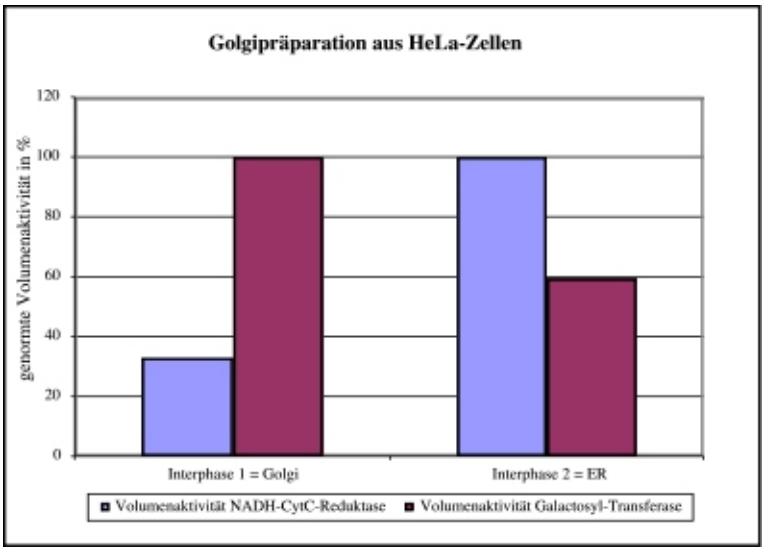


Abbildung 11: Präparation von Golgi aus Hela-Zellen

Die Präparation von Golgi aus Hela-Zellen wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die Volumenaktivität von Galactosyl-Transferase und NADH-Cytochrom C-Reduktase bestimmt und damit die Menge an ER und Golgi in der Interphase 1 zwischen 29 und 35% und der Interphase 2 zwischen 35 und 37% Saccharose analysiert.

Die Interphase1 zwischen 29 und 35% Saccharose enthält wie erwartet deutlich mehr Golgi als ER und wurde daher als Donormembran zur Generierung von COPI-Vesikeln eingesetzt (Abbildung11). Die COPI-Vesikel wurden wie in Material und Methoden beschrieben in einem 1,5ml Ansatz unter Verwendung von Golgimembranen aus Hela-Zellen, Rattenlebercytosol, ATP-regenerierendem System und einem nicht-hydrolysierbaren Analog von GTP hergestellt. Mittels nano-ESI-MS/MS wurde die Phosphatidylcholinkonzentration (PC-Konzentration) in COPI-Vesikeln und Donorgolgi bestimmt. Vier 1,5ml-Ansätze von COPI-Vesikeln wurden pelletiert und vor der Solubilisierung mit PC-Liposomen versetzt, so daß insgesamt 50nmol Phospholipid im Ansatz vorlagen. Der Ansatz wurde wie oben solubilisiert und über Gelfiltration und Westernblot mit Antikörpern gegen alle p24-Mitglieder analysiert. Als Kontrolle wurden ebenfalls 50nmol Phospholipid Donorgolgi der gleichen Prozedur unterzogen (Abbildung 12).

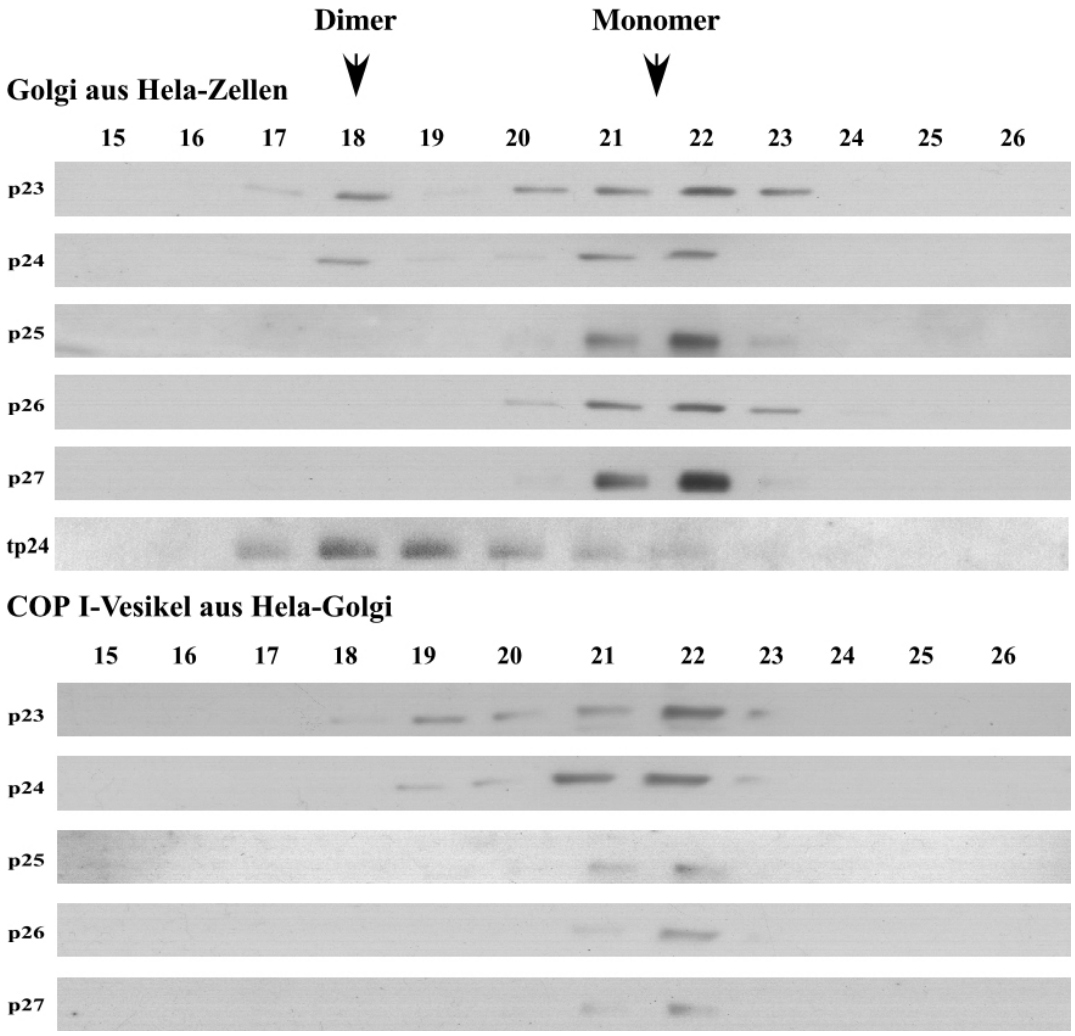


Abbildung 12: Bestimmung der Komplexgröße der p24-Mitglieder in COPI-Vesikeln aus Hela-Golgi

COPI-Vesikel aus Hela-Golgi wurden mit Liposomen aus Phosphatidylcholin gemischt und damit auf eine Phospholipidmenge von 50nmol gebracht. Anschließend wurde wie oben beschrieben solubilisiert und eine Gelfiltrationsanalyse mit nachfolgendem Westernblot durchgeführt. Als Kontrolle wurde mit 50nmol Phospholipid Donorgolgi analog verfahren.

Obwohl in diesem Experiment in COPI-Vesikeln und Donorgolgi gleiche Mengen an Phospholipid während der Solubilisation vorlagen, liegen die meisten p24-Mitglieder als Monomer vor. Nur mit Antikörperen gegen p23 und p24 können kleine Mengen an Protein im Bereich eines Dimers detektiert werden. Allerdings ist kein deutlicher Gipfel wie im Donorgolgi nachweisbar. Die bedeutet, daß p24-Mitglieder in COPI-Vesikel hauptsächlich als Monomere verpackt werden. Nur ein kleiner Teil liegt als Dimer vor. Allerdings ist die Menge des Materials am Detektionslimit des Systems, daher wäre es möglich, daß in geringer Menge vorliegende Dimere nicht mehr

detektiert werden können. tp24 ist in diesem Experiment z.B. in so geringen Mengen vorhanden, daß es in COPI-Vesikeln nicht mehr detektierbar ist.

2.4 Bestimmung der Konzentration der p24-Mitglieder in ER, IC und Golgi

Alle p24-Mitglieder befinden sich in unterschiedlichen Mengen in den Organellen des frühen sekretorischen Weges und zyklisieren ständig zwischen ihnen (Blum et al., 1996; Nickel et al., 1997; Rojo et al., 1997). Nur für einige p24-Proteine wurde bisher elektronenmikroskopisch ihre Lokalisation bestimmt (Dominguez et al., 1998; Füllekrug et al., 1999; Rojo et al., 1997; Sohn et al., 1996) daher ist bis heute unklar, welche p24-Mitglieder in welchen Konzentrationen in ER, IC und Golgi vorkommen. Daher wurde nun biochemisch der Versuch unternommen die Konzentration der p24-Mitglieder in aufgereinigtem ER, IC und Golgi zu bestimmen.

2.4.1 Test von ER, IC und Golgi auf Kontamination mit anderen Membranen

ER, IC und Golgi wurden wie oben beschrieben durch eine subzelluläre Fraktionierung über einen Nycodenzgradienten aus Hela-Zellen aufgereinigt. Die Fraktionen des Gradienten wurden durch Enzymtests und Westernblots mit Antikörpern gegen Markerproteine auf ihren Gehalt an ER, IC, Golgi, Plasmamembran, Mitochondrien und Peroxisomen getestet (siehe Abbildung16).

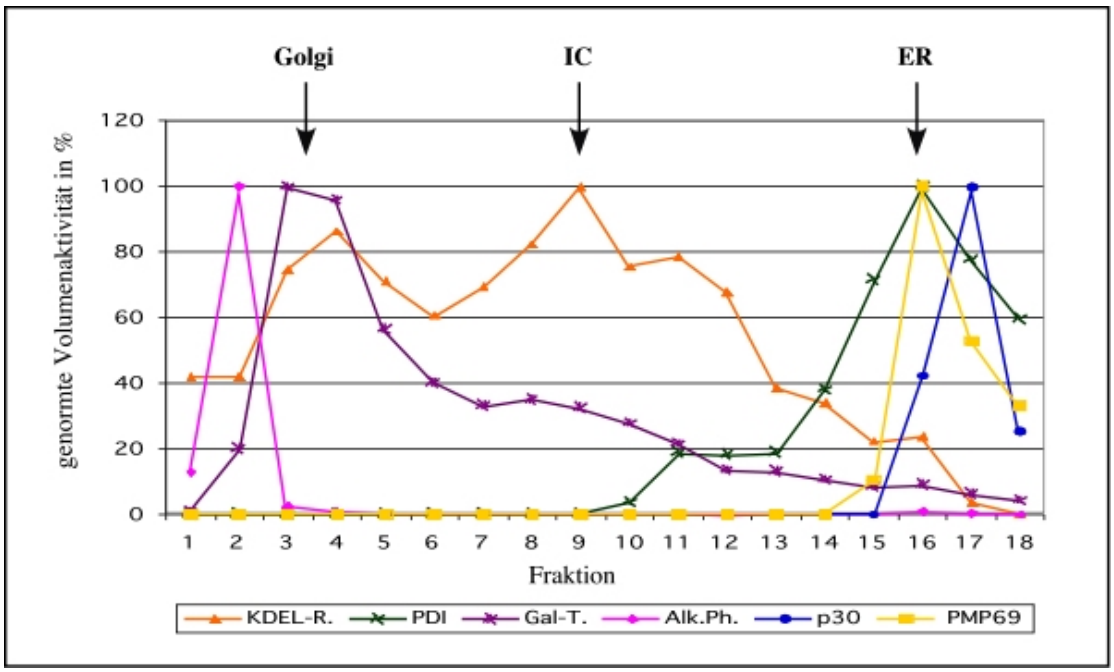


Abbildung 16: Kontamination von ER, IC und Golgi mit anderen Organellen

KDEL-Rezeptor (KDEL-R., Golgi und IC), Proteindisulfidisomerase (PDI, ER), Galactosyl-Transferase (Gal-T., Golgi), alkalische Phosphodiesterase (Alk.Ph., Plasmamembran), p30 (Mitochondrien), PMP-69 (Peroxisomen)

Der Golgi befindet sich, wie die Enzymaktivität der Galactosyl-Transferase zeigt, in den leichten Fraktionen des Gradienten. Die Hauptmenge an Plasmamembran, charakterisiert durch die Enzymaktivität der alkalischen Phosphodiesterase, ist vom Golgi abgetrennt. Im Bereich mittlerer Dichte befindet sich das IC, da hier der KDEL-Rezeptor einen weiteren Gipfel aufweist. Das ER befindet sich am Boden des Gradienten (gekennzeichnet durch die Proteindisulfidisomerase (PDI)) und ist mit Mitochondrien (p30) und Peroxisomen (PMP-69) kontaminiert. Dabei ist nur die Kontamination durch Mitochondrien wirklich relevant für die späteren Bestimmung der Konzentration der p24-Proteine im ER, da nur die Mitochondrien ähnliche Mengen an Membran aufweisen (Tabelle 4).

	Anteil an der Gesamtzellmembran in %		
Membrantyp	**BHK-Zellen(*)**	**Leber-hepatocyt(#)**	**Pankreatische Exokrine Zelle(#)**
Plasmamembran	13,9	2	5
ER	37	51	60
Golgi Apparat	12,5	7	10
Mitochondrien	31,7	39	21
Peroxisomen	< 1%	< 1%	< 1%

Anteil der Mitochondrien-kontamination im ER	***46,1%*** ***100% = 68,7% (ER+Mito.)*** ***31,7%=46,1%***	***43,3%***	***25,9%***

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der Membranen einer Zelle

(*) (Griffiths et al., 1989)
(#) (Alberts, 1994)

Hela-Zellen, die für die subzelluläre Aufreinigung benutzt wurden, sind wie die BHK-Zellen (*baby-hamster kidney*) Zellkulturzellen, die keine besonderen sekretorischen Fähigkeiten besitzen. Die Bestimmung der Anteile der einzelnen Membranen dieser Zellen kommt daher denen der Hela-Zellen am nächsten. Da bei der subzellulären Fraktionierung in den gepoolten ER-Fraktionen sich auch die Gesamtheit der Mitochondrien befindet, muß man annehmen , daß 46,1% der sich in dieser Fraktion befindlichen Membranen von Mitochondrien stammen und 58,9% vom ER. Um die Kontamination des ERs durch Mitochondrien zu berücksichtigen, wurden daher die Konzentrationen der p24-Proteine im ER jeweils durch einen Korrekturfaktor von 0,46 geteilt.

2.4.2 Herstellung von GST-Fusionsproteinen mit den cytoplasmatischen Domänen der p24-Mitglieder

Die Konzentration der p24-Proteine in den verschiedenen Membranen sollte über einen Westernblot bestimmt werden. Daher wurden Standardproteine benötigt, um von einem Westernblotsignal (Pixeldichte einer Bande) auf eine Proteinmenge rückschließen zu können. Der Antikörper gegen p23 (Henriette) ist gegen die luminale Domäne gerichtet. Da diese aufgereinigt als his-getaggtes Protein vorlag, wurde es als Eichprotein für p23 eingesetzt. Alle Antikörper gegen die übrigen p24-Mitglieder (p24:Frieda, p25:#2468R1, p26:#2088, p27:#2087R2) sind gegen die kurze cytoplasmatische Domäne gerichtet. Daher wurde ein Fusionsprotein zwischen

GST (Glutathion-S-Transferase) und der kurzen cytoplasmatischen Domäne (cytoplasmatischer „Tail“) von p24, p25, p26 und tp24 konstruiert.

2.4.2.1 Klonierungsstrategie und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Es wurden Oligonukleotide angefertigt, die für den kodierenden und nicht-kodierenden Stang der Sequenz des cytoplasmatischen Tails von p24, p25, p26 und tp24 kodieren. Ein Stoppcodon wurde eingefügt und die beiden komplementären Stränge so konzipiert, daß nach dem Hybridisieren der beiden Stränge die Überhänge einer EcoRI und eine BamHI-Schnittstelle vorhanden waren. Daher konnten die hybridisierten Oligonukleotide direkt in einen mit EcoRI und BamHI geschnittenen GST-Fusionsvektor (p-GEX-2T) kloniert werden. Die Konstrukte wurden anschließend über Restrikionverdau und Sequenzierung überprüft. Die getesteten Plasmide wurde in BL21 LysS-Zellen transformiert und die Überexpressionsbedingungen ausgetestet. Wie in Material und Methoden beschrieben wurden daraufhin alle Konstrukte überexprimiert und aufgereinigt (Abbildung 14). Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Fusionsproteine bestimmt.

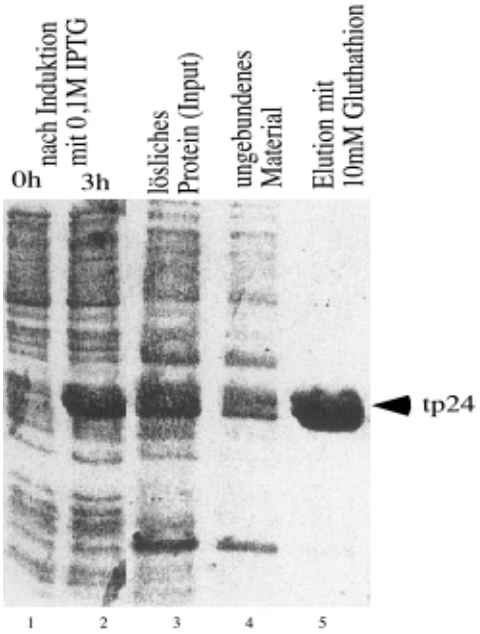


Abbildung 14: Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Stellvertretend für alle GST-p24-Protein-Tail Konstrukte wird in dieser Abbildung der Verlauf der Aufreingung von tp24 dargestellt (Coomassie gefärbtes Gel). In Spur 1 und 2 sind *E.coli*-Zellen vor und nach 3h Induktion mit 0,1M IPTG aufgetragen. In Spur 3 befindet sich das Material, das auf die Säule geladen wurde. In Spur 4 wurde das nicht an die Säule gebundene Material und in Spur 5 das aufgereinigte GST-tp24-Tail Fusionsprotein aufgetragen.

Da einige der Eichproteine (p23-luminale Domäne, GST-p27-Tail) Kontaminationen durch andere Proteine enthielten, wurde der Anteil der kontaminierenden Banden über ein Coomassie gefärbtes Gel bestimmt. Die Banden wurden eingescannt, über Quantity One die Pixeldichte analysiert und der prozentuale Anteil der kontaminierenden Banden berechnet. Die Proteinkonzentration der Standardproteine wurde dann um den entsprechenden Wert korrigiert.

2.4.3 Test der p24-Antikörper auf Kreuzreaktivität mit GST

Da als Eichstandards Fusionsproteine von GST mit dem cytoplasmatischen Tail der p24-Mitglieder benutzt wurden, wurden alle Antikörper auf eine Kreuzreaktivität mit GST überprüft. Dafür wurde jeweils die höchste Menge des eingesetzten Standardproteins und die gleiche Menge GST auf ein Gel aufgetragen und mit dem entsprechenden Antikörper im Westernblot analysiert. Wie in Abbildung 15 ersichtlich, kreuzreagiert keiner der p24-Protein Antikörper mit GST.

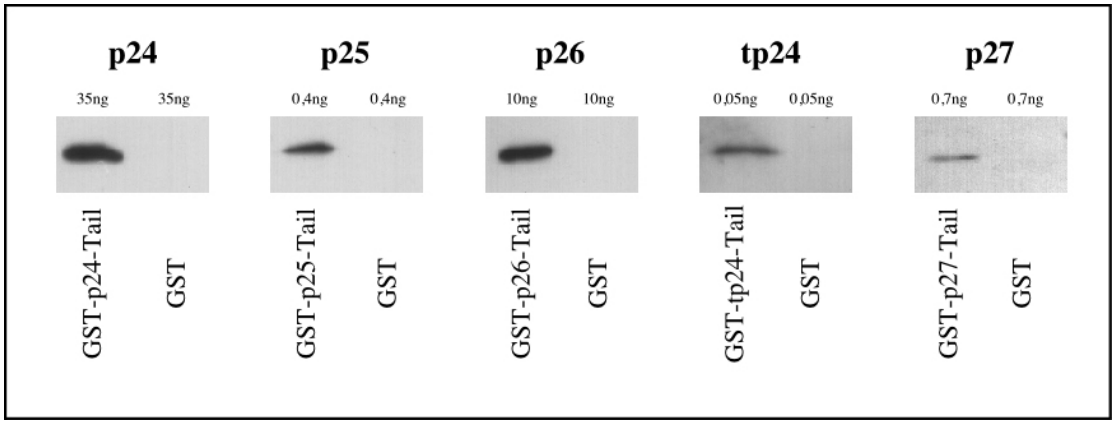


Abbildung 15: Test der p24-Antikörper auf Kreuzreaktivitäten mit GST

Für jedes Konstrukt wurde die höchste im Standard benutzte Proteinmenge des GST-p24-Protein-Tailkonstruktes und GST aufgetragen. Keiner der p24-Proteinantikörper kreuzreagiert jedoch mit GST.

2.4.4 Konzentrationsbestimmung der p24-Proteine

Zur Konzentrationsbestimmung der p24-Proteine in ER, IC und Golgi über Westernblot wurden nun auf ein Gel eine Standardreihe des aufgereinigten Eichproteins und unterschiedliche Mengen an Membran (in nmol Phospholipid) aufgetragen und geblottet. Nach Entwickeln des Blots mit dem entsprechenden Antikörper, wurden die Filme eingescannt und die Signale über das Programm

Quantity One ausgewertet. Mit den Werten der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt und deren Gleichung berechnet (Abbildung 16). Nur wenn der Regressionskoeffizient mindesten einen Wert von 0,9 aufwies wurde die Eichgerade zur Bestimmung der Konzentration weiterbenutzt. Lag die Pixeldichte der Banden in ER, IC und Golgi im Bereich der Eichgerade wurden die Werte in die Gleichung eingesetzt und die p24-Proteinmenge in ng p24-Protein/nmol Phospholipid berechnet.

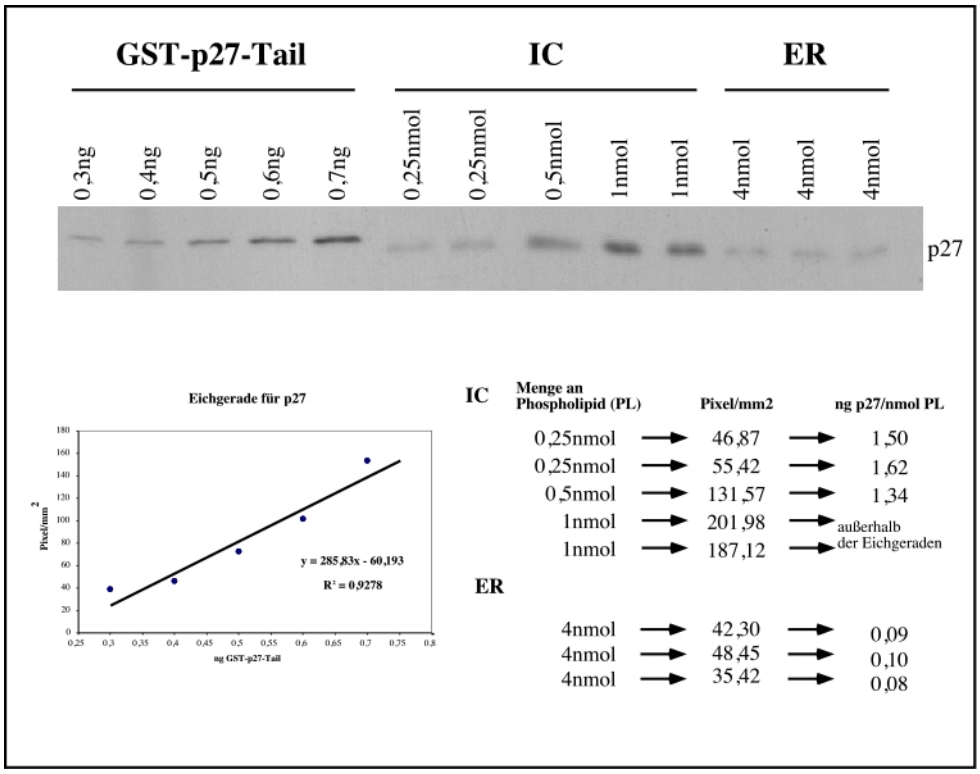
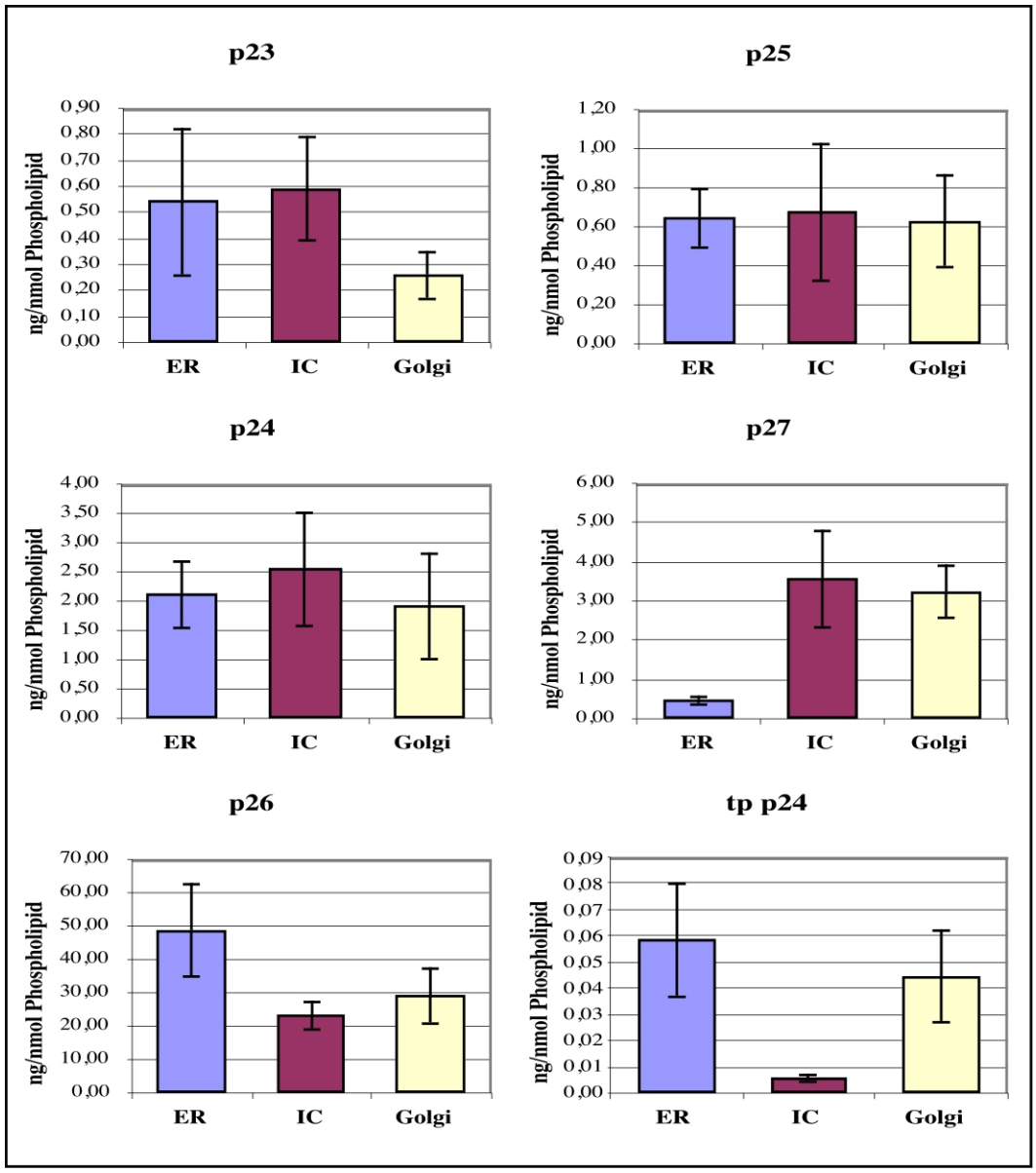


Abbildung 16: Bestimmung der Konzentration der p24-Proteine in ER, IC und Golgi

Stellvertretend für alle p24-Proteine ist in dieser Abbildung die Ermittlung der Konzentration von p27 in ER und IC gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung ist ein Westernblot des GST-p27-Tail-Proteins und verschiedener Mengen an IC und ER gezeigt. Die Banden wurden mit dem Programm Quantity One ausgewertet und mit den Werten des GST-p27-Tail-Proteins eine Standardgerade erstellt und deren Gleichung bestimmt (links unten). Setzt man nun die Pixeldichte der Signale von p27 in IC und Golgi in diese Gleichung ein, kann die Menge von p27 in ng Protein pro nmol ER bzw. IC bestimmt werden (rechts unten).

Für jedes p24-Protein wurde für ER, IC und Golgi mindestens dreimal unabhängig voneinander die Konzentration bestimmt und die Korrektur für die Eichproteine und die Kontamination des ER durch Mitochondrien einberechnet. In Abbildung 17 sind die auf diese Weise ermittelten Konzentrationen und die Verteilung aller p24-Proteine entlang des frühen sekretorischen Weges zusammengefasst.



	Konzentration in ng Protein pro nmol Phospholipid					
Organelle	**p23**	**p24**	**p25**	**p26**	**tp24**	**p27**
ER	0,54±0,28	2,13±0,56	0,65±0,15	48,95±13,71	0,059±0,024	0,48±0,11
IC	0,59±0,20	2,57±0,97	0,68±0,35	23,60±4,22	0,006±0,001	3,58±1,24
Golgi	0,26±0,09	1,94±0,91	0,63±0,24	29,54±8,35	0,045±0,018	3,27±0,69

Abbildung 17: Bestimmung der Konzentration der p24-Proteine in ER, IC und Golgi

Wie in Abbildung 16 gezeigt, wurde die Konzentration aller p24-Mitglieder in ER, IC und Golgi bestimmt und hier zusammengestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Werte an.

p26 liegt in allen Organellen des frühen sekretorischen Weges in einer um Faktor 10 höheren Konzentration als p24 und p27 vor, wobei sich der Hauptanteil von p26 im ER befindet. tp24 wiederum weist nur eine sehr geringe Konzentration (Faktor 50 weniger als p24) in allen Organellen des frühen sekretorischen Weges auf und besitzt als einziges Mitglied der p24-Proteine im IC die niedrigste Konzentration. Da p26 und tp24 im Vergleich zu p23, p24, p25 und p27 in einer so viel höheren bzw. niedrigeren Konzentration vorliegen, ist eine Sonderstellung dieser beiden p24-Mitglieder durchaus denkbar. Dafür spricht auch, daß beide Proteine bei der Größenbestimmung der p24-Oligomere in ER, IC und Golgi immer nur als Monomer (p26) bzw. Dimer (tp24) vorliegen und sie nur eine schwache bzw. keine Koimmunpräzipitation mit den anderen p24-Mitgliedern zeigen (Füllekrug et al., 1999). Die Verteilung von p23, p24, p25 und p27 in ER, IC und Golgi, die wie über Koimmunpräzipitationen und Gelfiltrationsanalysen gezeigt miteinander Heterodimere ausbilden, werden in Abbildung 18 innerhalb eines Schaubilds dargestellt.

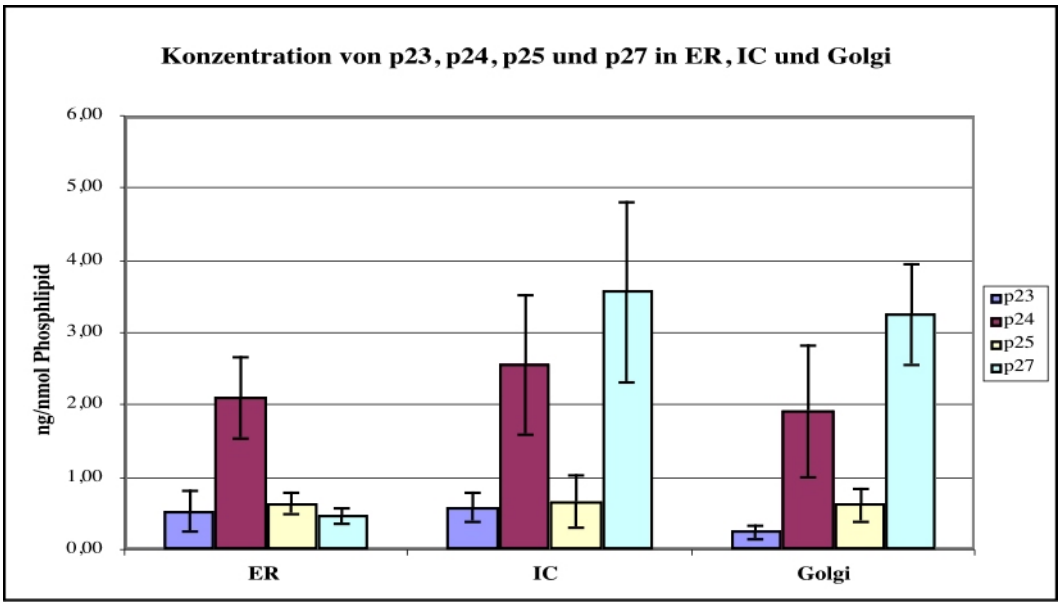


Abbildung 18: Konzentration von p23, p24, p25 und p27 in ER, IC und Golgi

Die Daten von p23, p24, p25 und p27 aus Abbildung 18 sind hier zum besseren Vergleich in einer Grafik dargestellt.

p24 und p25 sind in allen Organellen des frühen sekretorischen Weges etwa gleichverteilt. p24 liegt in einer Konzentration von ca. 2,5ng/nmol Phospholipid vor, p25 dagegen in einer um Faktor 5 niedrigeren (0,5ng/nmol Phospholipid). p23 (0,25 bis 0,5 ng/nmol Phospholipid) und p27 (0,5 bis 3,5 ng/nmol Phospholipid) besitzen

anders als p24 und p25 einen Konzentrationsgradienten entlang des sekretorischen Weges, wobei p23 eine höhere Konzentration in ER und IC und p27 in IC und Golgi aufweist. p27 liegt dabei im ER in der gleichen Konzentration vor wie p23 und p25 und weist aber in IC und Golgi eine Konzentration vergleichbar mit p24 auf. Bemerkenswert ist, daß die p24-Proteine mit einem funktionellen ER-Rückführungssignal (p23 und p25) in einer geringeren Konzentration vorhanden sind als die anterograd ausgerichteten p24-Mitglieder (p24 und p27) (Nickel et al., 1997).

2.5 Zyklisieren der p24-Mitglieder im frühen sekretorischen Weg

Durch unterschiedliche Versuche wurde gezeigt, daß p24-Familienmitglieder im frühen sekretorischen Weg zyklisieren (Blum et al., 1999; Füllekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999; Nickel et al., 1997; Rojo et al., 1997). Die p24-Mitglieder bilden Oligomere aus und diese Interaktion ist für ihre korrekte Lokalisation essentiell (Emery et al., 2000; Füllekrug et al., 1999). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß es sich bei diesen Komplexen um Dimere handelt. Da einige der p24-Mitglieder retrograde Transportsignale und andere wiederum anterograde besitzen und sie z.T. einen Gradienten entlang des frühen sekretorischen Weges ausbilden, ist es durchaus denkbar, daß bestimmte Zusammensetzungen der p24-Proteindimere für bestimmte Transportrichtungen und einzelne Abschnitte innerhalb des sekretorischen Weges zuständig sind. Um zu klären, in welchen Zusammensetzungen und in welchen Transportabschnitten die p24-Mitglieder als Oligomer, d.h. gemeinsam transportiert werden, ist es nötig, das normale Zyklisieren reversibel aus dem Gleichgewicht zu bringen. Dies führt dann zu einer anderen Lokalisation der p24-Mitglieder als unter normalen Bedingungen. Löst man nun diesen Block wieder auf, kann man beobachten, welche p24-Mitglieder sich gemeinsam wieder in ihre ursprüngliche Lokalisation umverteilen.

Da für einige der p24-Mitglieder gezeigt wurde, daß sie in Zellen, die für einige Zeit (2-3h) bei 15°C inkubiert wurden, im IC akkumulieren (15°C-Block) (Blum et al., 1999; Gommel et al., 1999; Nickel et al., 1997), wurde diese Methode gewählt, um das Zyklisieren der p24-Mitglieder zu unterbrechen. Wird die Temperatur jedoch auf 37°C erhöht, werden die p24-Mitglieder wieder transportiert und begeben sich in ihre ursprüngliche Lokalisation zurück. Bewegen sich die p24-Proteine als

Heterooligomere in bestimmten Paarungen, um an ihre reguläre Lokalisation zu gelangen, sollten sie nach dem 15°C-Block und anschließender Erhöhung der Temperatur die gleiche Umverteilung innerhalb der Kompartimente zeigen.

2.5.1 Immunfluoreszenzanalyse nach 15°C-Block und Erhöhung der Temperatur auf 37°C

Zunächst wurde das Verhalten aller p24-Proteine im 15°C-Block durch Immunfluoreszenz analysiert. Dadurch konnte morphologisch festgestellt werden, in welchen Kompartimenten die p24-Proteine akkumulieren und welche p24-Mitglieder sich nach Erhöhung der Temperatur gemeinsam in ihre ursprüngliche Lokalisation begeben. Da die meisten Antikörper gegen die p24-Proteine aus der gleichen Spezies stammen (Kaninchen), wurden die Antikörper nach einer Affinitätsreinigung direkt an die Fluoreszenzfarbstoffe cy3 bzw. cy5 gekoppelt. Da Verozellen relativ groß und flach sind und sich daher gut für morphologische Studien eignen, wurden diese anstelle von Hela-Zellen benutzt. Sie wurden auf Deckgläschen gezogen und für zwei Stunden bei 15°C inkubiert (15°C-Block). Anschließend wurden die Deckgläser für unterschiedliche Zeiten (0min, 5mim, 15min und 2h) in 37°C warmes Medium überführt und anschließend fixiert. Für die Antikörper gegen p23 (HAC344), p24 (Elfriede), p25 (#2469R1) und tp24 (#2501R1) wurde eine Fixierung mit Paraformaldehyd durchgeführt. Außer für die Detektion mit tp24 wurde anschließend mit TritonX-100 permeabilisiert. Die Präparate für den Nachweis von p26 (#2088) wurden mit Methanol fixiert. Innerhalb eines Experimentes (15°C-Block+mehrere Zeitpunkte nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C) wurde für jeden Zeitpunkt eine Kolokalisation von p27 (#2087R2), ERGIC-53 (Marker für IC) und eines weiteren p24-Mitglieds durchgeführt. p27 wurde immer als direkt an cy5 (blau) gekoppelter Antikörper eingesetzt und das andere p24-Mitglied als direkt an cy3 (rot) gekoppelt. ERGIC-53 wurde über einen sekundären Anti-Maus-Antiköper gekoppelt an Alexa 488 (grün) nachgewiesen. Für tp24 war keine Kolokalisation mit ERGIC-53 möglich, da die beiden Antikörper nicht unter den gleichen Fixationsbedingungen einsetzbar waren. die Bilddokumentation erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop TCS-SP von Leica. In Abbildung 19 und 20 sind für p23 und p24 die zweifache Kolokalisation mit p27 und ERGIC-53 gezeigt. Zur einfacheren Darstellung der übrigen p24-Mitglieder (p25, p26 und tp24), wird in Abbildung 22 bis 24 nur jeweils der Vergleich von einem

p24-Protein (rot) und p27 (grün, die blaue Farbe wurde wegen des besseren Kontrasts in grün umgewandelt) dargestellt. Die unterschiedlichen Strukturen wurden dabei wie folgt hervorgehoben: Golgi: weiße Pfeilspitze; tubulovesikuläre Strukturen des IC: gelbe Pfeilspitze; punktförmige Strukturen des IC: gelber Pfeil; retikuläre Strukturen (ER): blaue Pfeilspitze.

In 19A und 20A ist die Lokalisation von p23 und p24 unter normalen Bedingungen (37°C) gezeigt. Schon hier wird deutlich, daß p23 im Gegensatz zu p24 zusätzlich zu der typischen perinucleären Golgifärbung (weißer Pfeil) eine retikuläre Struktur (blaue Pfeilspitze) zeigt. p23, p27 und p24 zeigen bei 37°C nur eine schwache Kolokalisation mit ERGIC-53, einem Marker für das IC (gelbe Pfeilspitze, Überlagerung aller Kanäle zeigt kaum weiße Farbe). Durch Verringerung der Temperatur auf 15°C (Abbildung 19B und 20B) werden p23, p24 und p27 jedoch in das IC umverteilt (weiße Farbe bei der Überlagerung aller Kanäle). Es ist nun auch eine deutliche Kolokalisation in den kernnahen, tubulovesikulären Strukturen von p23, p24 und p27 mit ERGIC-53 zu erkennen (gelbe Pfeilspitze). Auch einige punktförmige Strukturen von p24 lokalisieren mit ERGIC-53 (gelbe Pfeile). p23 lokalisiert jedoch vermehrt in retikulären Strukturen, die eine zumindest teilweise Lokalisation im ER nahelegen (blaue Pfeilspitze), so daß schwer zu erkennen ist, ob auch p23 mit den punktförmigen Strukturen des IC kolokalisiert. Durch die Erhöhung der Temperatur auf 37°C (Abbildung 19 und 20 C+D) werden p23, p24 und p27 wieder vermehrt in den Golgi umverteilt, da die perinucleäre Anfärbung immer weniger tubulovesikulär ist und die Anfärbung von p23, p24 und p27 immer weniger mit den ERGIC-53 markierten Strukturen kolokalisiert (gelbe Pfeilspitze). Die punktförmigen Strukturen von p24 und p27, die mit ERGIC-53 kolokalisieren, bleiben jedoch erhalten, was darauf hindeutet, daß ein großer Teil von p24 und p27 sich 5 min nach Erhöhung der Temperatur noch im IC befindet. Bei p23 geht die Anfärbung von retikulären Strukturen etwas zurück und man findet auch hier teilweise eine Kolokalisation mit punktförmigen Strukturen des IC (gelbe Pfeile). Zusammenfassend kann man sagen, daß sich p27 während des Versuches wie p24 verhält. Durch die blaue Färbung von cy5 sind die punktförmigen Strukturen des IC jedoch nicht so gut zu erkennen.

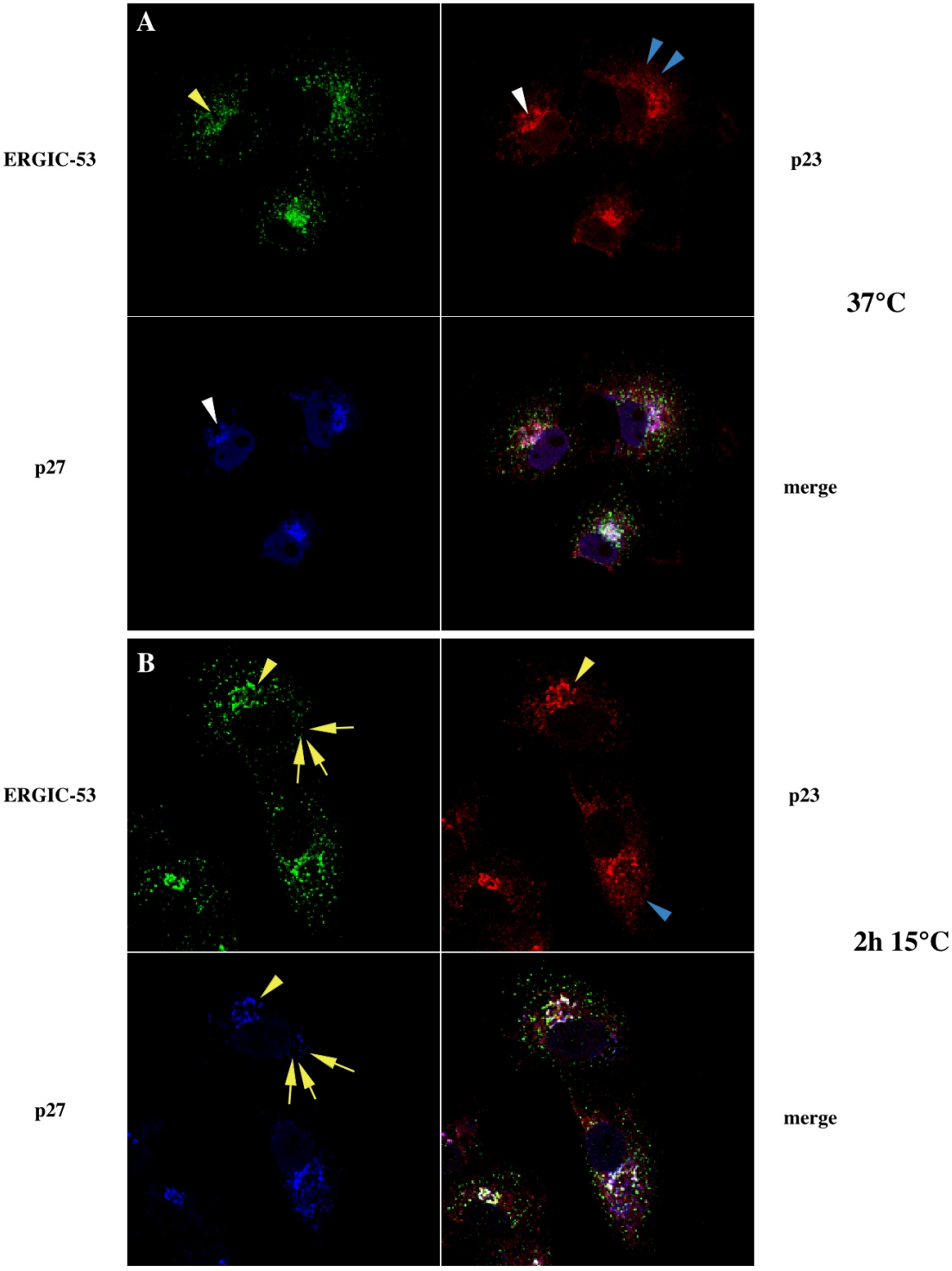


Abbildung 19A+B: Kolokalisation von p23, p27 und ERGIC-53

Erläuterungen siehe Text

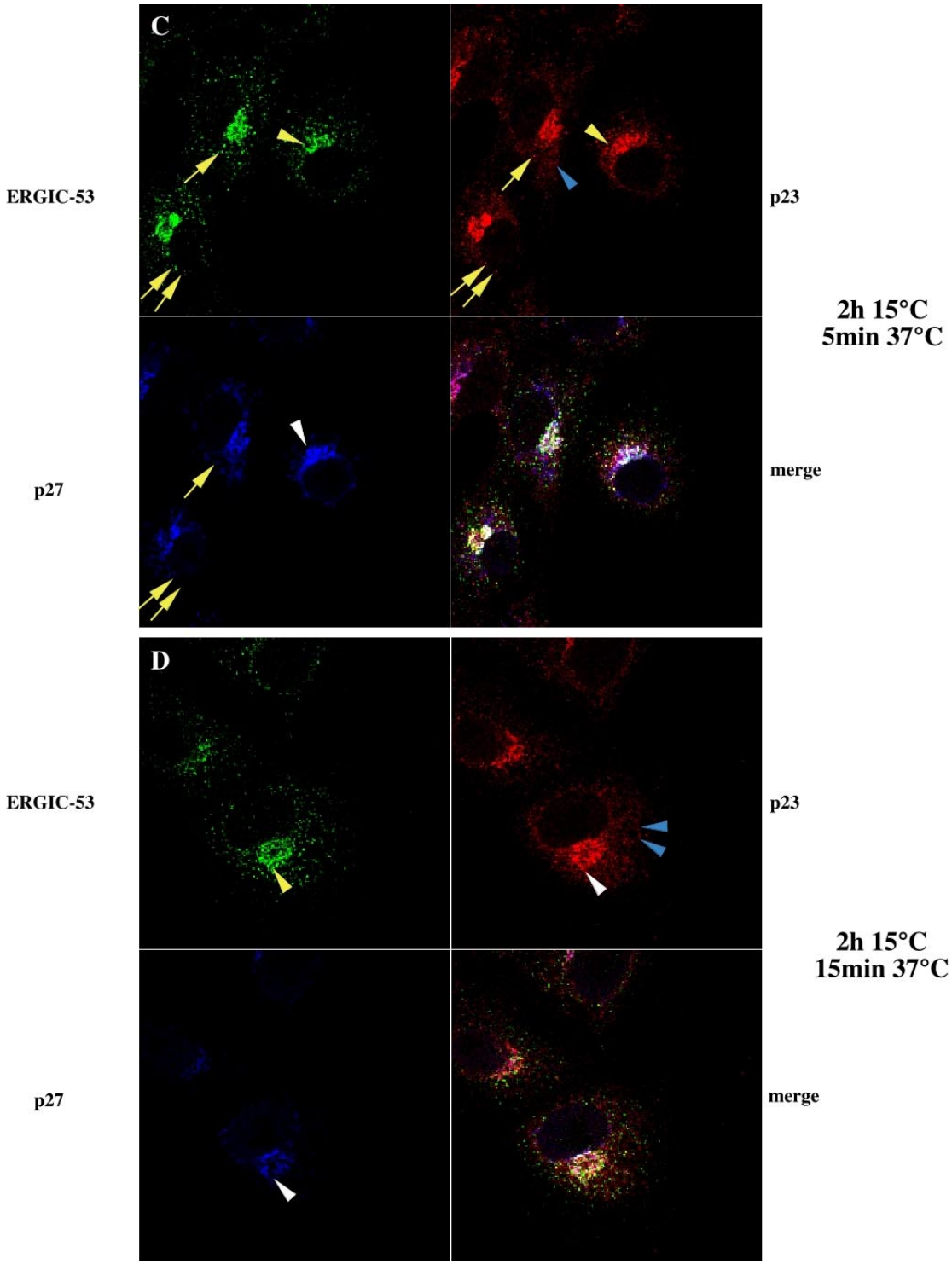


Abbildung 19C+D: Kolokalisation von p23, p27 und ERGIC-53

Erläuterungen siehe Text

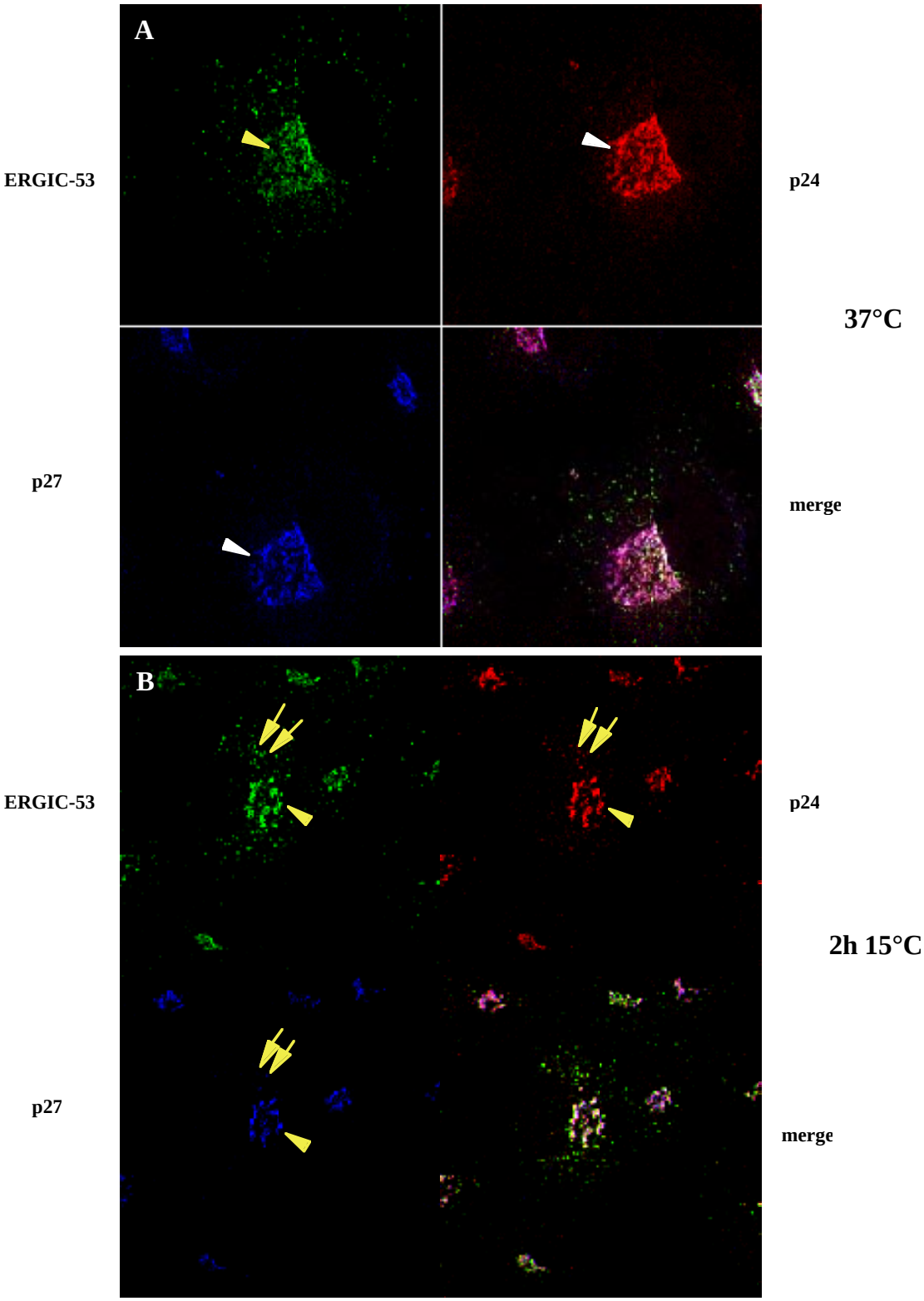


Abbildung 20A+B: Kolokalisation von p24, p27 und ERGIC-53

Erläuterungen siehe Text

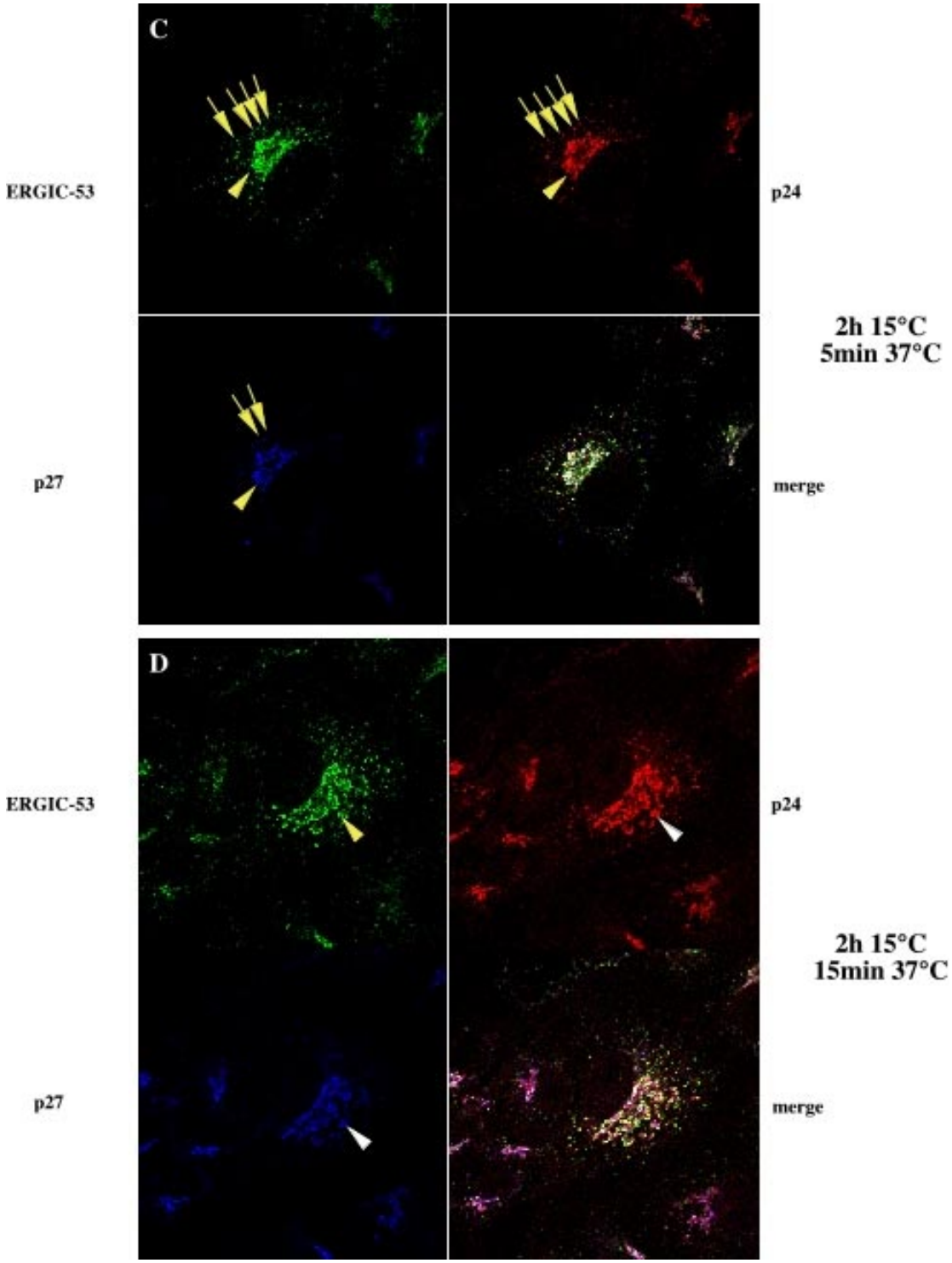


Abbildung 20C+D: Kolokalisation von p24, p27 und ERGIC-53

Erläuterungen siehe Text

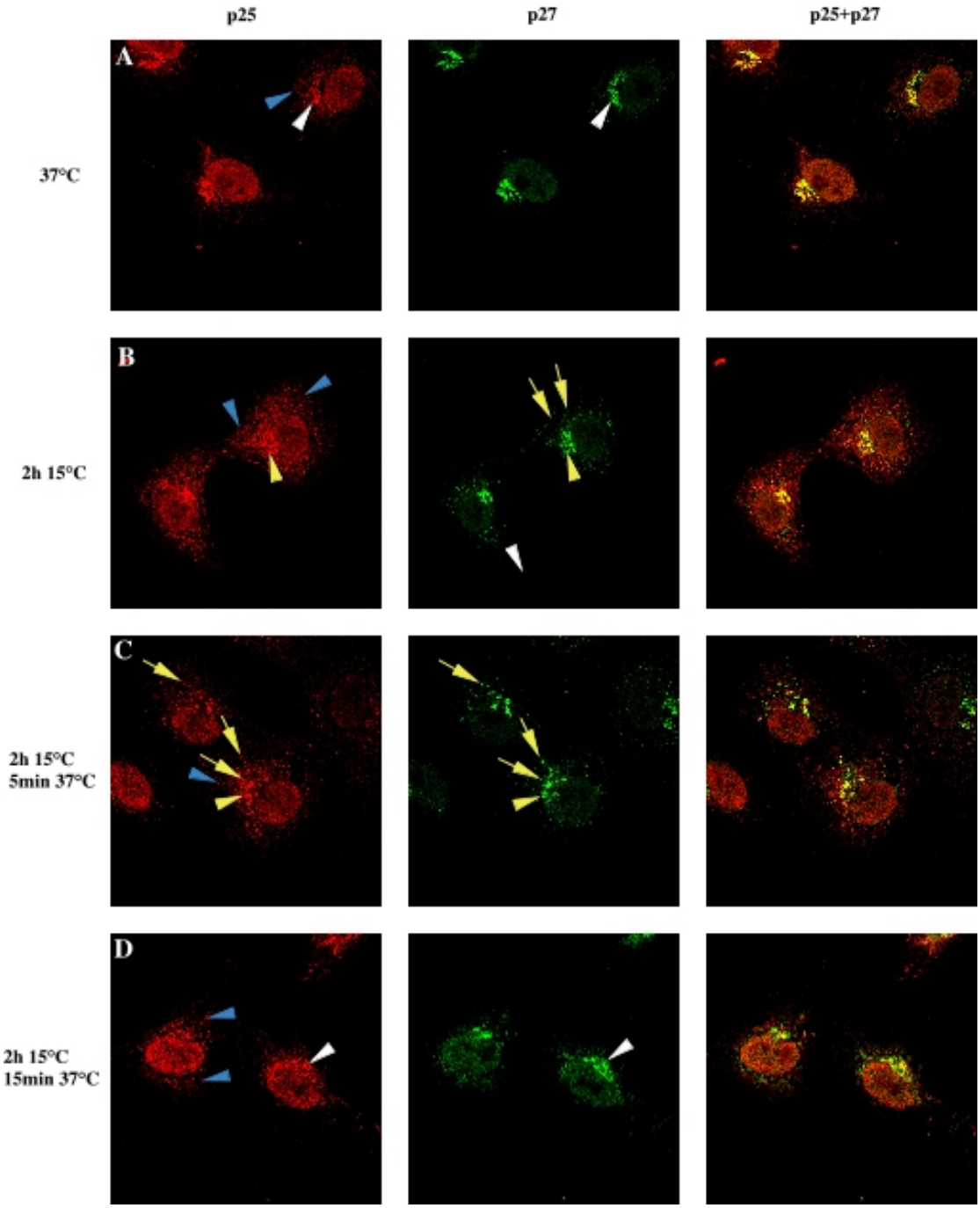


Abbildung 21A-D: Kolokalisation von p25 und p27

Erläuterungen siehe Text

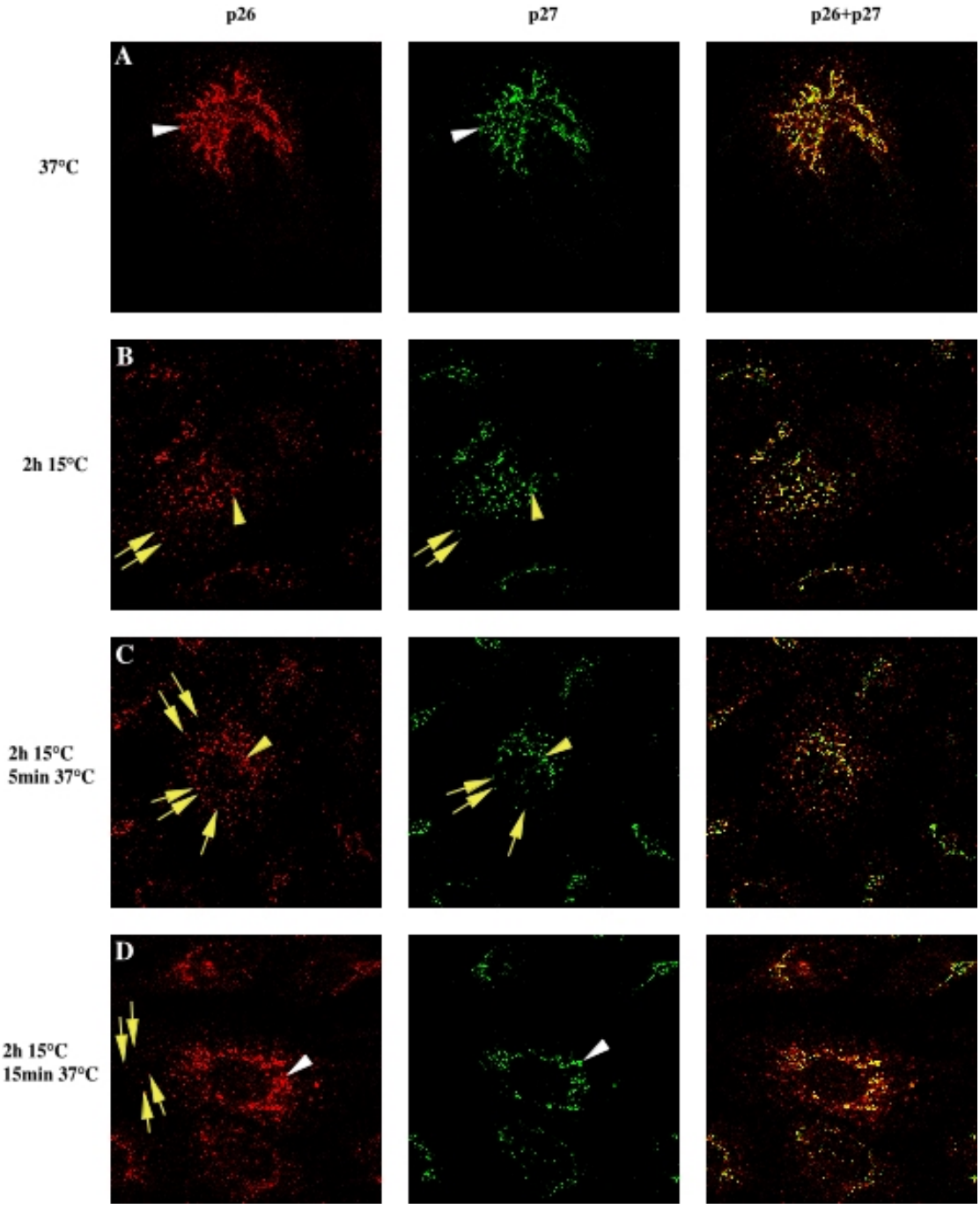


Abbildung 22A-D: Kolokalisation von p26 und p27

Erläuterungen siehe Text

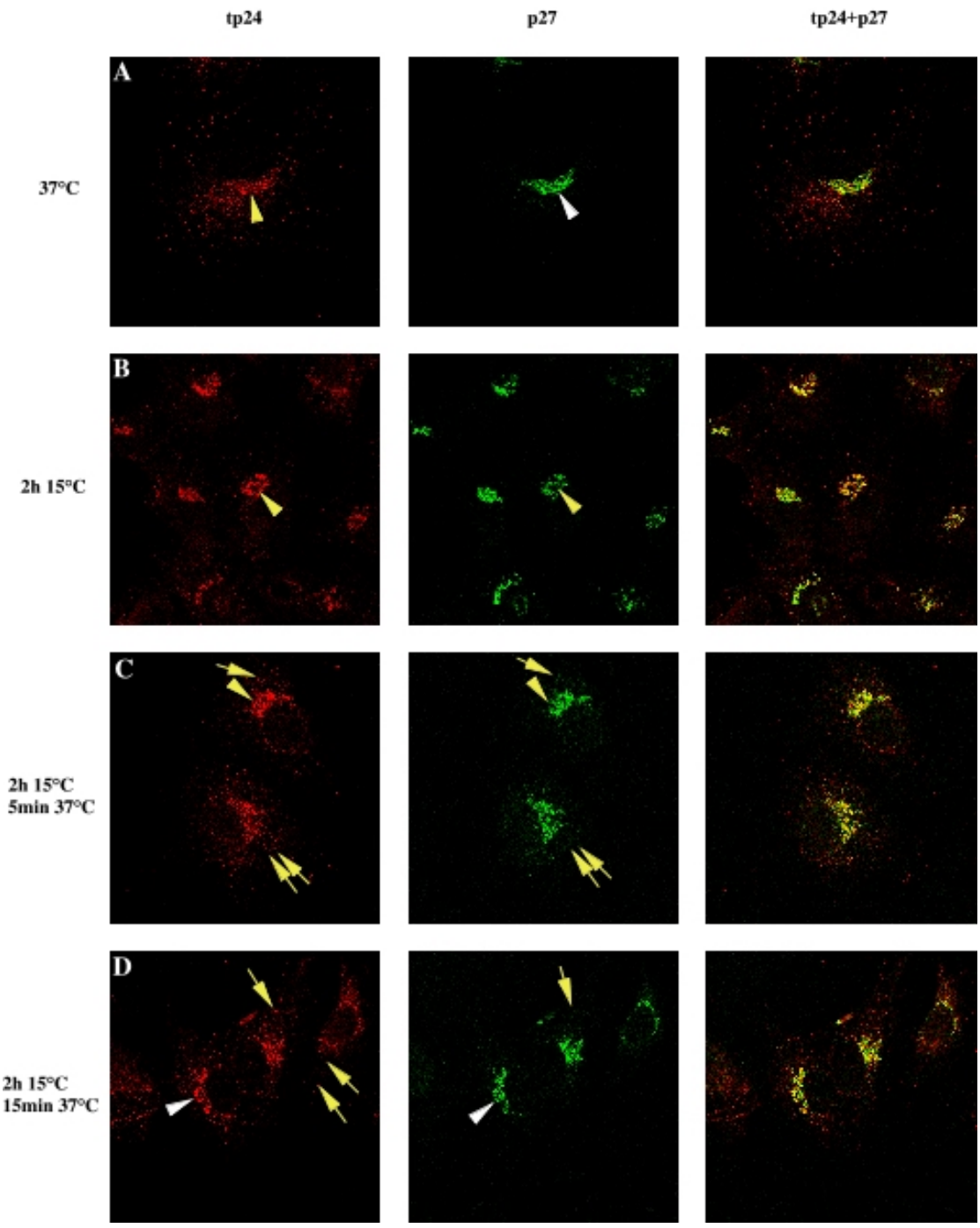


Abbildung 23A-D: Kolokalisation von tp24 und p27

Erläuterungen siehe Text

p25 dagegen verhält sich beim 15°C-Block und anschließender Erhöhung der Temperatur annähernd wie p23 (Abbildung 21). Durch Absenken der Temperatur wird es ebenfalls in retikuläre Strukturen (blaue Pfeilspitze) transportiert und es werden im Gegensatz zu p27 keine punktförmigen Strukturen (gelbe Pfeile) erkannt. Wie bei p23 geht nach Erhöhung der Temperatur die Anfärbung der retikulären Strukturen zurück.

p26 und tp 24 unterscheiden sich etwas von den übrigen p24-Proteinen. Sie werden zwar beide durch den 15°C-Block in das IC umverlagert, befinden sich aber in größerem Ausmaß in punktförmigen Strukturen. tp24 hat schon bei 37°C keine außgeprägte, perinucleäre Golgifärbung. In Tabelle 5 ist das Verhalten der einzelnen Mitglieder zusammengefasst.

	37°C	2h, 15°C	2h, 15°C, Erhöhung der Temperatur auf 37°C (5min bzw. 15min)
p23 p25	• starke perinucleäre Färbung (Golgi) • z.T. retikuläre Färbung (ER) • minimale Kolokalisation mit ERGIC-53 (IC)	• Kolokalisation mit ERGIC-53 in kernnahen, tubulovesikulären und nur z.T. in punktförmigen Strukturen • ein großer Teil lokalisiert in retikulären Strukturen (ER)	• Kolokalisation mit ERGIC-53 in kernnahen, tubulovesikulären Strukturen wird immer weniger • typische Golgifärbung • immer weniger retikuläre Strukturen werden angefärbt • punktförmige Strukturen, die mit ERGIC-53 lokalisieren werden sichtbar
p24 p27	• starke perinucleäre Färbung (Golgi) • minimale Kolokalisation mit ERGIC-53 (IC)	• Kolokalisation mit ERGIC-53 in kernnahen, tubulovesikulären und in punktförmigen Strukturen	• Kolokalisation mit ERGIC-53 in kernahen, tubulovesikulären Strukturen wird immer weniger • typische Golgifärbung • punktförmige Strukturen, die mit ERGIC-53 lokalisieren bleiben erhalten
p26 tp24	• ± perinucleäre Färbung (Golgi) • minimale Kolokalisation mit ERGIC-53 (IC)	• Kolokalisation mit ERGIC-53 in kernnahen, tubulovesikulären und vermehrt in punktförmigen Strukturen	• Kolokalisation mit ERGIC-53 in kernnahen, tubulovesikulären Strukturen wird immer weniger • ± typische Golgifärbung • punktförmige Strukturen, die mit ERGIC-53 lokalisieren bleiben erhalten

Tabelle 5: Verhalten der p24-Proteine beim 15°C-Block und Erhöhen der Temperatur auf 37°C

Dieser Versuch macht deutlich, daß die p24-Mitglieder auf unterschiedlichen Wegen innerhalb des sekretorischen Weges zyklisieren. Wie schon in den vorangegangenen Versuchen nehmen p26 und tp24 eine Sonderstellung ein, da beide Proteine zwar durch Erniedrigung der Temperatur auf 15°C in tubulovesikläre Strukturen des IC transportiert werden (Kolokalisation mit p27), aber eine weitaus stärkere Lokalisation in punktförmigen Strukturen zeigen. p24 und p27 scheinen sich eher zwischen IC und Golgi zubewegen, wogegen p23 und p25 bis in Strukturen des ER transportiert werden. Da p23 und p25 als einzige p24-Mitglieder funktionelle ER-Rückführungsignale haben, ist eine Funktion im retrograden Transport nicht verwunderlich.

Um das Zyklisieren der p24-Mitglieder noch genauer zu charakterisieren, wurde ein biochemischer Ansatz gewählt. Anhand dieses Ansatzes sollte es nicht nur möglich sein, die Umverteilung der p24-Proteine in unterschiedliche Kompartimente zu zeigen, sondern auch ob immer die gleichen p24-Proteine gemeinsam transportiert werden oder ob sich je nach Transportstufe andere Interaktionspartner finden müssen. Auch sollte der Transport in oder aus dem ER für alle p24-Proteine meßbar sein, was durch die Größe des Kompartiments in der Immunfluoreszenz erst bei einer sehr hohen Konzentration eines Proteins möglich ist. Ein Vorteil des biochemischen Ansatzes besteht auch darin, daß der Gehalt an p24-Proteinen immer in den gleichen Membranen untersucht wird, da die Westenblots mit allen Antikörpern gegen die p24-Proteine entwickelt wurden.

2.5.2 Subzelluläre Fraktionierung von Hela-Zellen nach 15°C-Block und Erhöhung der Temperatur auf 37°C

Biochemisch kann man die Umverteilung der p24-Mitglieder durch die Bestimmung der Menge der einzelnen Familienmitglieder in ER, IC und Golgi bei 15°C und nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Erhöhung der Temperatur messen.

2.5.2.1 Metabolische Markierung von Zellen

Um sicher zu gehen, daß innerhalb dieses Experiments der Transport von neusynthetisierten p24-Mitgliedern die Ergebnisse nicht verfälscht, wurde ermittelt, zu welchem Ausmaß Proteinbiosynthese bei 15°C im Zeitrahmen des Experiments (ca. 3h) stattfindet. Hierfür wurden Hela-Zellen mit radioaktivem Methionin

metabolisch markiert. Um die Verminderung der Biosyntheserate bei 15°C zu bestimmen, wurde der Einbau von Radioaktivität bei 37°C im Vergleich zu 15°C ermittelt (Abbildung 24A). Da innerhalb einer Zelle ein Gleichgewicht zwischen Proteinauf- und abbau herrschen muß, kann man annehmen, daß genausoviel Protein synthetisiert wie abgebaut wird. Deshalb wurde die Menge der Proteinbiosynthese im Zeitrahmen des Versuchs (3h) durch das Messen der Proteindegradation innerhalb von 3h durch ein *Pulse-Chase* Experiment abgeschätzt. Dafür wurden Zellen 1h bei 37°C mit radioaktivem Methionin (*Pulse*) und anschließend entweder 0h oder 3h bei 37°C mit einem Überschuß an kaltem Methionin inkubiert (*Chase*) (Abbildung 24 B). Anschließend wurden die Zellen lysiert und entsprechend der Zellzahl mit SDS-Proteinprobenpuffer versetzt, so daß pro Spur ein Äquivalent von $1x10^5$ Zellen aufgetragen wurde. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel Coomassie gefärbt und getrocknet. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde ein Film aufgelegt, die Banden eingescannt und über das Programm Quantity One die Pixel pro Fläche bestimmt. Der Unterschied der Pixeldichte einer Bande bei der Inkubation bei 37°C bzw. 0h Chase zur gleichen Bande bei 15°C bzw. 3h Chase, wurde prozentual berechnet und in einer Grafik dargestellt (siehe Abbildung 24 A und B). Die durchschnittliche Proteinsyntheserate ist bei 15°C auf nur 25,3% vermindert (roter Balken. Abbildung 24 A). Da der Proteinabbau bei 37°C in 3h ca. 21.1% beträgt (Abbildung 24 B), bedeutet dies, daß innerhalb von 3h ca. 21% der Proteine neu synthetisiert werden. Da die Synthese bei 15°C jedoch nur ca. 25% beträgt, werden während der Versuchsdauer von 3h etwa nur 5,25% der Proteine neu synthetisiert. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß im Zeitrahmen des Versuchs relevante Mengen der p24-Mitglieder neu synthetisiert werden und dadurch die Beobachtung der Umverteilung der p24-Mitglieder während des 15°C-Blocks und nach Aufhebung dessen stören.

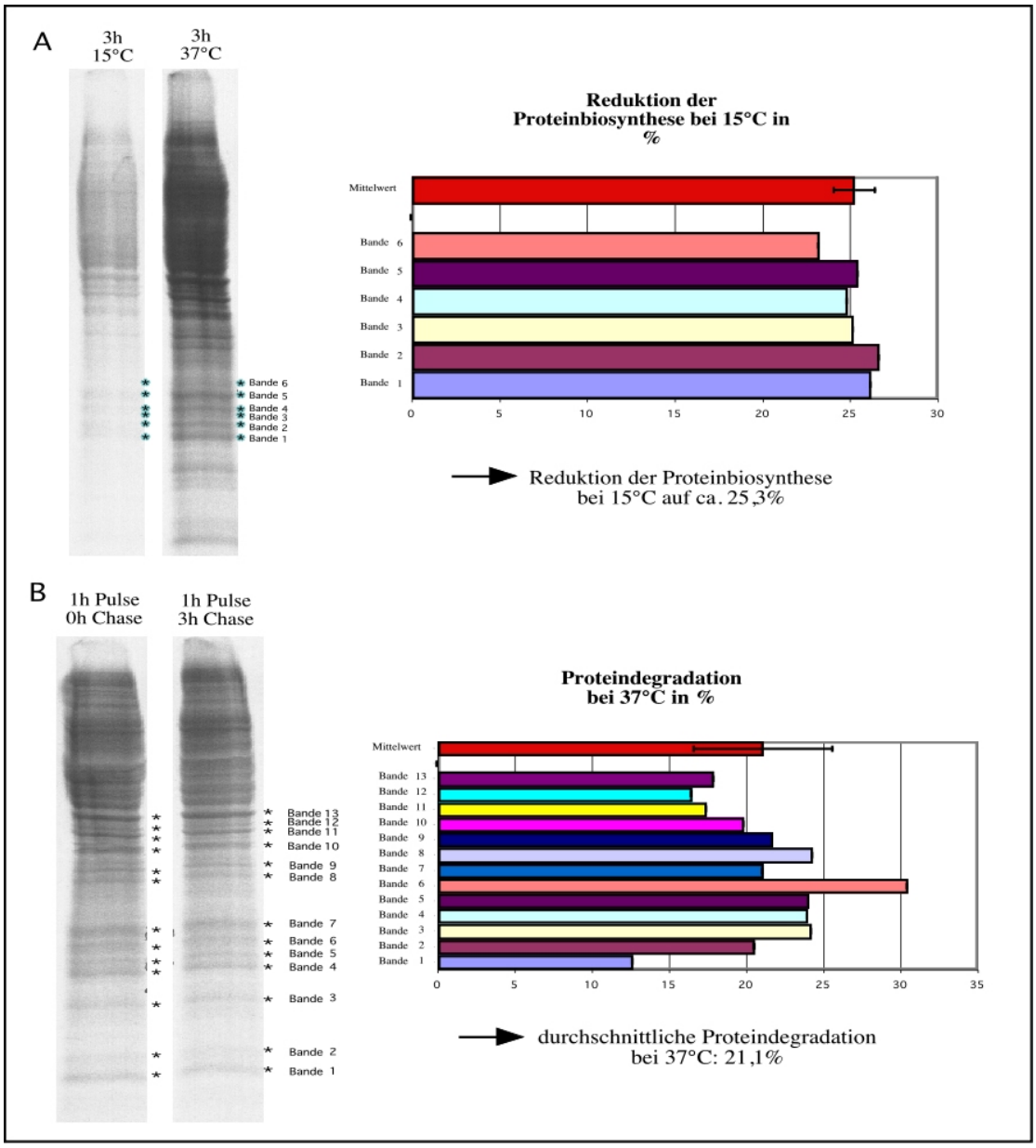


Abbildung 24: Metabolische Markierung von Hela-Zellen

Hela-Zellen wurden metabolisch markiert, um die durchschnittliche Abnahme der Proteinbiosyntheserate bei 15°C im Vergleich zu 37°C und die durchschnittliche Degradation von Proteinen innerhalb von 3h bei 37°C zu ermitteln. Daraus wurde die durchschnittliche Proteinbiosyntheserate bei 15°C innerhalb von 3h abgeschätzt.
A Zellen wurden für 3h bei 37°C und 15°C metabolisch markiert. Das Zelllysat wurde auf einem SDS-Proteingel aufgetrennt und durch Auflegen eines Films die Menge an Radioaktivität bestimmt. Die Filme wurden eingescannt und mit dem Programm Quantity One (BioRad) ausgewertet. Die Pixel pro Fläche für eine Bande bei 37°C wurde auf 100% gesetzt. Der Unterschied zu der Bande bei 15°C wurde entsprechend berechnet und in einer Grafik dargestellt. Der rote Balken entspricht dem durchschnittlichen Wert, der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder.
B Zellen wurden bei 37°C in einem *Pulse-Chase*-Experiment 1h radioaktiv markiert (*Pulse*) und anschließend 0h oder 3h mit einem Überschuß an kaltem Methionin inkubiert (*Chase*). Die Abnahme der Radioaktivität beim 3h-Wert im Vergleich zum 0h-Wert ist ein Maß für die Degradation von Proteinen im Zeitrahmen von 3h. Das Zelllysat wurde wie in A auf einem SDS-Proteingel aufgetrennt und ausgewertet. Die Abnahme der Pixel pro Fläche einer Bande bei 3h im Vergleich zu 0h wurde in Prozent berechnet und in einer Grafik dargestellt. Der rote Balken entspricht der durchschnittlichen Proteindegradation, der Fehlerbalken der Standardabweichung.

2.5.2.2 Subzelluläre Fraktionierung von Hela-Zellen nach 15°C-Block und Erhöhung der Temperatur auf 37°C

Durch eine subzelluläre Fraktionierung ist es möglich, die Organellen des frühen sekretorischen Weges (ER, IC und Golgi) aufzutrennen. Um den Transport der p24-Mitglieder nach Auflösung eines 15°C-Blocks zu bestimmen, wurde daher eine subzelluläre Fraktionierung von Hela-Zellen durchgeführt, die entweder 2,5h bei 15°C und 0min, 5min oder 15min bei 37°C inkubiert wurden (siehe Material und Methoden). Als Kontrolle wurden ebenfalls Zellen, die unter normalen Bedingungen gehalten wurden (37°C), einer subzellulären Fraktionierung unterzogen.

Zunächst wurde die Verteilung von Markerproteinen bzw. –enzymen der unterschiedlichen Kompartimente unter den verschiedenen Temperaturbedingungen getestet. Die Fraktionen der Gradienten wurden durch Enzymtests (Galactosyl-Transferase) oder Westernblots mit Antikörpern gegen Markerproteine der unterschiedlichen Kompartimente getestet. Die im Westernblot erhaltenen Banden wurden eingescannt und über das Programm Quantity One densitometrisch ausgewertet. Die erhaltenen densitometrischen Daten und Enzymaktivitäten wurden genormt (d.h. der höchste Wert wurde auf 100 gesetzt und die weiteren Werte entsprechend berechnet) und in einer Grafik dargestellt (siehe Abbildung 25).

GM130, ein Golgimatrixprotein (Nakamura et al., 1997) und Galactosyl-Transferase (Gal-T) (Brew et al., 1975) sind Marker für den Golgi-Apparat und befinden sich in den leichten Fraktionen des Gradienten (Fraktion 3 bis 6). Der KDEL-Rezeptor (KDEL-R) befindet sich im cis-Golgi, aber auch im IC (Griffiths et al., 1994; Tang et al., 1993) und beschreibt daher zwei Gipfel innerhalb des Gradienten, wobei der erste mit dem der Golgimarker zusammenfällt. Der zweite Gipfel ist im Bereich mittlerer Dichte und charakterisiert das IC. Die ER-Marker Proteindisulfidisomerase (PDI) (Noiva and Lennarz, 1992) und Calnexin (Ou et al., 1993) befinden sich in den schweren Fraktionen des Gradienten und beschreiben die Verteilung des ERs. Nur GM-130 und PDI zeigen eine leicht Verschiebung innerhalb des Gradienten bei einer niedrigeren Temperatur. Da die Verteilung der anderen Marker sich jedoch nicht verändert, ist diese Verschiebung eher auf den Transport von GM130 und PDI in andere Kompartimente zurückzuführen. Dafür spricht auch, daß sich die Morphologie des Endomembransystems bei einem 15°C-Block nicht ändert (Lotti et al., 1996). Es ist also ohne weiteres möglich, ER, IC und Golgi unter verschiedenen

Inkubationsbedingungen durch eine subzelluläre Fraktionierung zu trennen und über Westernblots die Menge der p24-Mitglieder innerhalb dieser Fraktionen zu vergleichen.

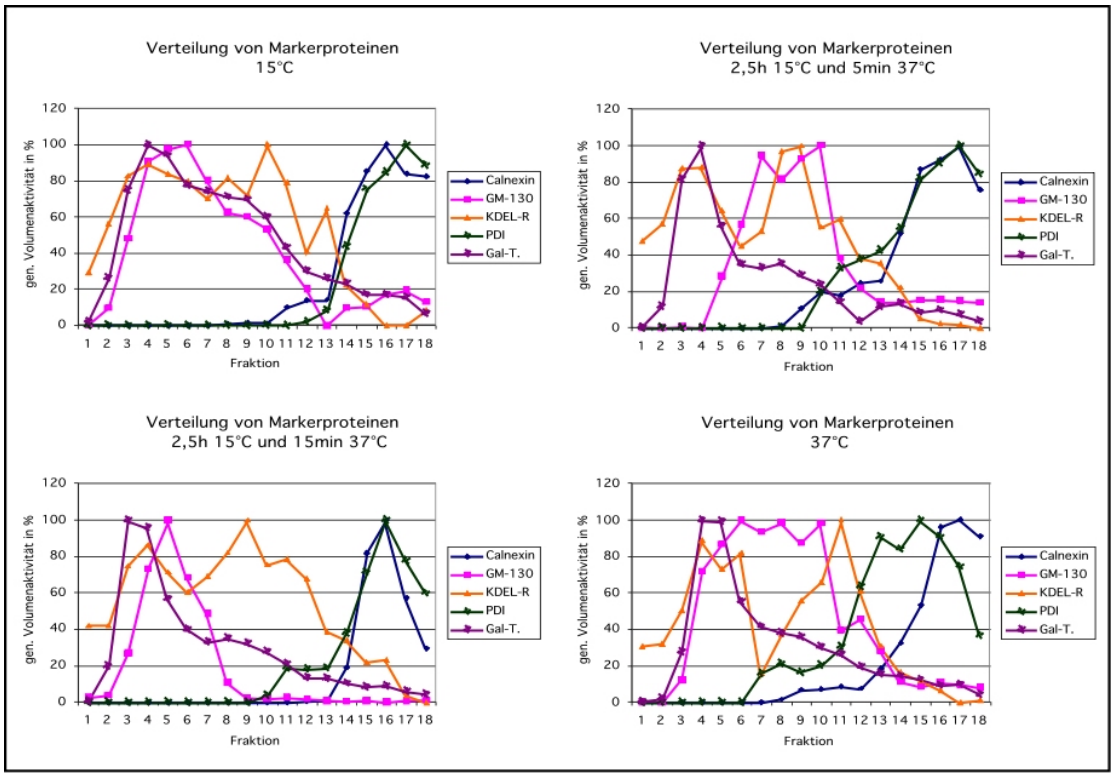


Abbildung 25: Verteilung von Markerproteinen bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen

Die unterschiedlichen Fraktionen wurden entweder durch Enzymtests (Galactosyl-Transferase) oder durch Westernblot mit Antikörpern gegen Markerproteine getestet. Der Golgi befindet sich hauptsächlich in den leichten Fraktionen des Gradienten, da für beide Golgimarker, Galactosyl-Transferase (Gal-T) und GM-130, hier die höchsten Signale gemessen werden. Der KDEL-Rezeptor (KDEL-R) lokalisiert im cis-Golgi und im IC und zeigt daher zwei Gipfel innerhalb des Gradienten. Der erste Gipfel fällt mit dem der anderen Golgimarkern zusammen und der zweite befindet sich in Fraktionen mit einer mittleren Nycodenzdichte und stellt den Teil des KDEL-Rezeptors dar, der sich im IC befindet. Das ER, gekennzeichnet durch die beiden ER-Marker Proteindisulfidisomerase (PDI) und Calnexin, befindet sich in den schweren Fraktionen des Gradienten.
Die unterschiedlichen Temperaturen wirken sich nur auf GM-130 und PDI aus, da ihre Lokalisation offensichtlich durch die Verminderung der Temperatur beeinflußt wird. Die übrigen Marker verhalten sich unter jeder Bedingung gleich.

Um kontaminierende Membranen möglichst auszuschließen, wurden nun nur die Fraktionen, die ein Maximum der Markerproteine zeigten gepoolt. Pool 1 enthält das ER, Pool 2 das IC und Pool 3 den Golgi. Eine Probe jedes Pools wurde einer Lipidextraktion unterzogen und durch quantitative Phospholipidanalytik mittels nano-ESI-MS/MS der Gehalt an Phosphatidylcholin (PC) bestimmt. Ein Teil der Proben wurde mit 1xK-Hop-Puffer verdünnt und pelletiert (1h, 100000g, 4°C). Das Pellet

wurde in SDS-Poteinprobenpuffer aufgenommen und pro Spur 750pmol PC von ER und 375pmol PC von IC und Golgi auf ein SDS-Tricingel nach Schägger aufgetragen. Zur Ermittlung der p27-Menge im ER mußten jedoch 1,125nmol PC pro Spur auf ein Gel aufgetragen werden, da bei geringerer Menge keine Antikörpersignale im Westernblot detektierbar waren. Es wurde je ein Gel von ER, IC und Golgi mit jeweils drei identisch geladenen Spuren für jede Bedingung geladen, um Schwankungen bei der späteren Auswertung zu minimieren. Nach dem Blotten der Gele wurden die unterschiedlichen p24-Mitglieder über Antikörper (p23: Henriette, p24: Elfriede, p25: #2469R1, p26: #2088, p27: #2087R2, tp24: #2501R2) in den unterschiedlichen Kompartimenten nachgewiesen. Die Filme wurden anschließend eingescannt und mit dem Programm Quantity One ausgewertet. Der höchste Wert innerhalb eines Kompartiments wurde auf 100 gesetzt und die übrigen Werte entsprechend berechnet (Abbildung 26).

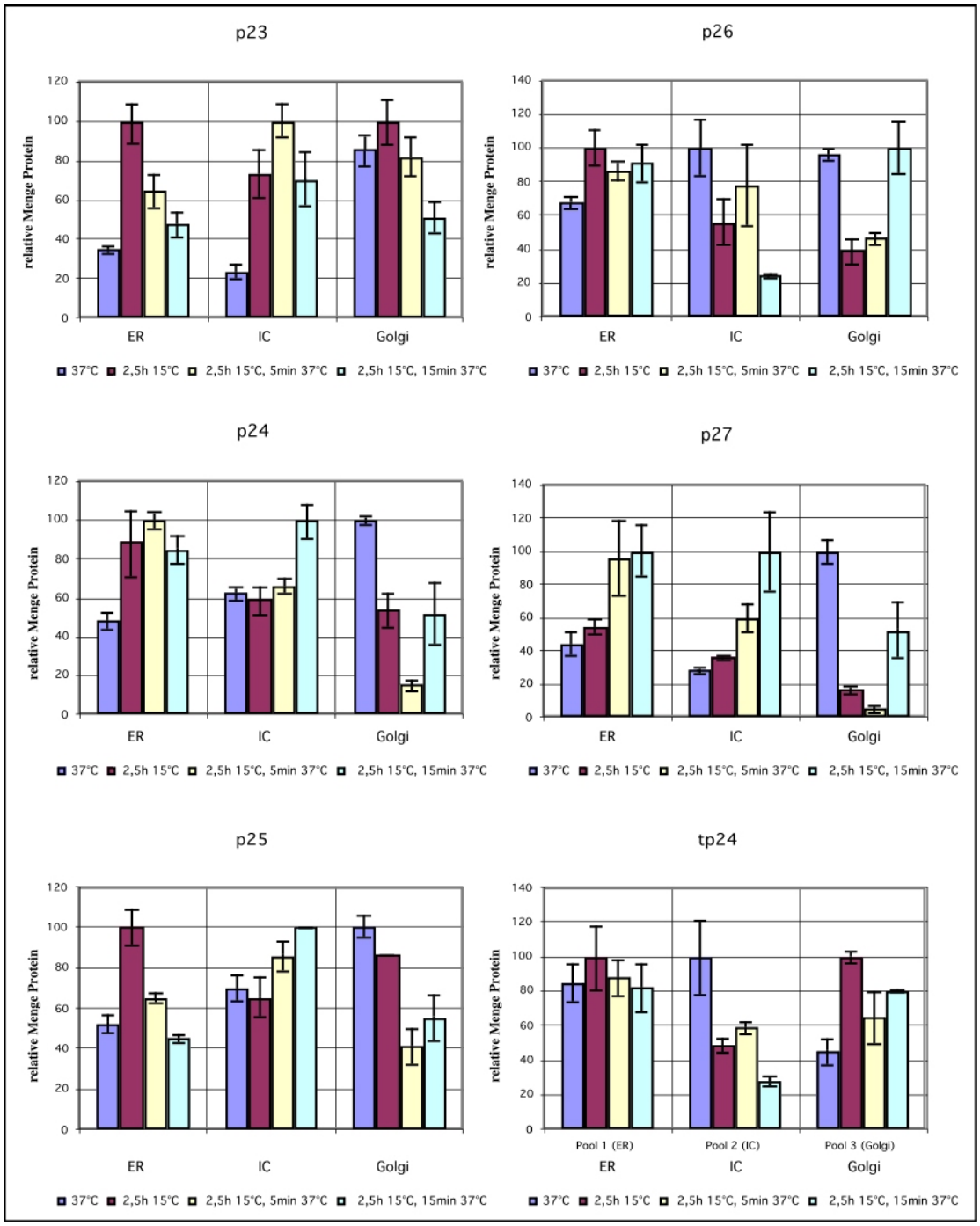


Abbildung 26: Zusammenfassung der Umverteilung der p24-Proteine nach einem 15°C-Block und Erhöhung der Temperatur auf 37°C

Erläuterungen siehe Text

Bei Erniedrigung der Temperatur auf 15°C erhöht sich die Konzentration aller p24-Proteine im ER. Im IC dagegen behalten p24, p25 und p27 ihre Konzentrationen bei,

wogegen p26 und tp24 aus den IC heraustransportiert werden und p23 hinein. Im Golgi wiederum erhöht sich nur die Konzentration von p23 und tp24. p24, p25, p26 und p27 werden im Gegensatz dazu aus dem Golgi hinaustransportiert. In Tabelle 6 wird die Umverteilung der p24-Proteine bei Erniedrigung der Temperatur auf 15°C zusammengefaßt.

	p23	p24	p25	p26	p27	tp24	Gruppen
ER	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	p23+p24+p25+p26+p27+tp24
IC	Ø	Ł	Ł	Œ	Ł	Œ	p24+p25+27 p26+tp24
Golgi	Ø	Œ	Œ	Œ	Œ	Ø	p23+tp24 p24+p25+p26+p27

Tabelle 6: Verhalten der p24-Proteine nach Erniedrigung der Temperatur auf 15°C

Die Pfeile symbolisieren das Erniedrigen (Œ), das Erhöhen (Ø) und Gleichbleiben (Ł) der Konzentration eines p24-Mitglieds innerhalb eines Kompartiments. Die Gruppen, die eine ähnliche Umverteilung in ER, IC oder Golgi zeigen, werden durch gleiche Farbmarkierungen hervorgehoben.

Auch bei der Erhöhung der Temperatur auf 37°C kann man die p24-Proteine aufgrund ihres Verhaltens in Gruppen einteilen. p23, p25 und tp24 werden z.B. aus dem ER heraustransportiert, p27 wird dagegen hineintransportiert. Im IC bilden p24+p25+p27 und p23+p26+tp24 eine Gruppe, da sich ihre Konzentration im IC ständig erhöht bzw. erhöht und darauf wieder erniedrigt. Im Golgi lassen sich dann p24, p25, p27 und tp24 in eine Gruppe zusammenfassen, die gleich umverteilt wird. Die übrigen Mitglieder verhalten sich unterschiedlich. In Tabelle 7 wird die Umverteilung der p24-Proteine bei Erhöhung der Temperatur auf 37°C zusammengefaßt.

	p23	p24	p25	p26	p27	tp24	Gruppen
ER	ŒŒ	Ø Œ	ŒŒ	Œ Ø	ØØ	ŒŒ	p23+p25+tp24
IC	Ø Œ	ØØ	ØØ	Ø Œ	ØØ	Ø Œ	p24+p25+p27 p23, p26, tp24
Golgi	ŒŒ	Œ Ø	Œ Ø	ØØ	Œ Ø	Œ Ø	p24+p25+tp24+p27

Tabelle 7: Verhalten der p24-Proteine nach Erhöhen der Temperatur auf 37°C

Die Pfeile symbolisieren das Erniedrigen (Œ) und das Ansteigen (Ø) der Konzentration eines p24-Mitglieds 5min und 15min nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C innerhalb eines Kompartiments. Die Gruppen, die eine ähnliche Umverteilung in ER, IC oder Golgi zeigen, werden durch gleiche Farbmarkierungen gekennzeichnet.

Die unterschiedlichen Gruppen, die je nach Kompartiment gebildet werden können, deuten an, daß es ein Zusammenspiel einzelner p24-Mitglieder beim Transport in ein

Kompartiment hinein oder aus einem Organell hinaus gibt. p23, p25 und tp24 werden zum Beispiel bei Erhöhung der Temperatur auf 37°C aus dem ER heraustransportiert. p27 dagegen wird durch die Erhöhung der Temperatur vermehrt ins ER hereintransportiert. Es ist daher unwahrscheinlich, daß p27 mit p23 und p25 im ER Oligomere ausbildet. p23 und p25 verhalten sich dagegen so ähnlich, daß sie höchstwahrscheinlich zusammen transportiert werden. Die tp24-Menge innerhalb des ER beim 15°C-Block ist auch relativ hoch und nimmt bei Erhöhung der Temperatur ab. Das Ausmaß der Abnahme ist jedoch viel geringer als bei p23 und p25, so daß wahrscheinlich nur bedingt ein gemeinsamer Transport stattfindet.

Da jedes p24-Protein zu jedem Zeitpunkt innerhalb des Versuchs und in ER, IC und Golgi jeweils mit anderen p24-Proteinen interagiert, ist das Modell, daß die p24-Proteine je nach Oligomerisierungspartner in unterschiedliche Kompartimente transportiert werden, sehr wahrscheinlich. Die unterschiedlichen Transportsignale der einzelnen p24-Proteine würden dabei die Transportrichtung bestimmen. Die Lokalisation jedes Mitglieds würde dann die relative Affinität der p24-Mitglieder zueinander und die Summe der gegenläufigen Transportsignale reflektieren. Leider ist das System durch die Anzahl der p24-Proteine so komplex, daß mit den bisherigen Versuchen die genaue Aufschlüsselung, der für die unterschiedlichen Transportschritte notwendigen Zusammensetzung der p24-Proteine nicht ermittelt werden konnte. Es konnte aber gezeigt werden, daß beim 15°C-Block und anschließender Erhöhung der Temperatur die p24-Proteine mit ständig wechselnden Partnern interagieren. Dies ist auch im Einklang mit dem Befund, daß die p24-Proteinkomplexe Dimere sind, da der ständige Austausch von Interaktionspartnern mit höheren Oligomeren kaum erklärbar wäre.

3 Ergebnisse II: Proteomics von COPI-Vesikeln

3.1 Das Konzept

Es ist heute ohne weiteres möglich, *in vitro* COPI-Vesikel aus aufgereinigten Golgimembranen, Cytosol, ATP-regenerierendem System und GTPγS, einem nicht-hydrolisierbaren Analog von GTP, herzustellen (Serafini et al., 1991). Allerdings sind die Ausbeuten an COPI-Vesikeln relativ gering. Um sequenzierbare Mengen von COPI-Vesikelproteinen zu erhalten, wurde daher eine 2D-Strategie etabliert. Nach der Generierung der COPI-Vesikel aus Kaninchenlebergolgi und Rinderhirncytosol wurden diese und das Ausgangsmaterial (Golgi und Cytosol) über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Gele Silber gefärbt und anschließend die Spotmuster verglichen. Wie in Abbildung 27 ersichtlich, ist die 2D-Gelelektrophorese so reproduzierbar, daß die Spots des COPI-Vesikel-Gels Spots auf den Gelen von Golgi und Cytosol zugeordnet werden können. Daher wurde ein 2D-Gel von Silber-färbbaren Mengen an COPI-Vesikeln angefertigt und parallel dazu Coomassie färbbare Mengen an Golgi und Cytosol ebenfalls über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum Sequenzieren wurden dann die Spots, die sowohl in COPI-Vesikeln und Golgi bzw. Cytosol gefunden wurden, aus dem Coomassie gefärbten Golgi- bzw. Cytosolgel ausgeschnitten. Wurden größere Mengen an Protein gebraucht, war es auch ohne weiteres möglich mehrere Gele mit der gleichen Probe laufen zu lassen und jeweils den gewünschten Spot auszuschneiden. Da im Golgi jedoch weit weniger Proteine vorhanden sind als im Cytosol, war die Zuordnung der Spots hier viel einfacher. Daher wurden in den weiteren Versuchen nur Proteine, die aus dem Golgi stammen berücksichtigt.

Das Sequenzieren der Proteine erfolgte in Kooperation mit Dr. F. Lottspeich (MPI für Biochemie, Martinsried). Die Proteine wurden im Gel mit Proteasen verdaut, die Peptide aus dem Gel eluiert und mittels HPLC aufgetrennt (Eckerskorn, 1989). Die erhaltenen Peptide wurden sequenziert und/oder über MALDI analysiert.

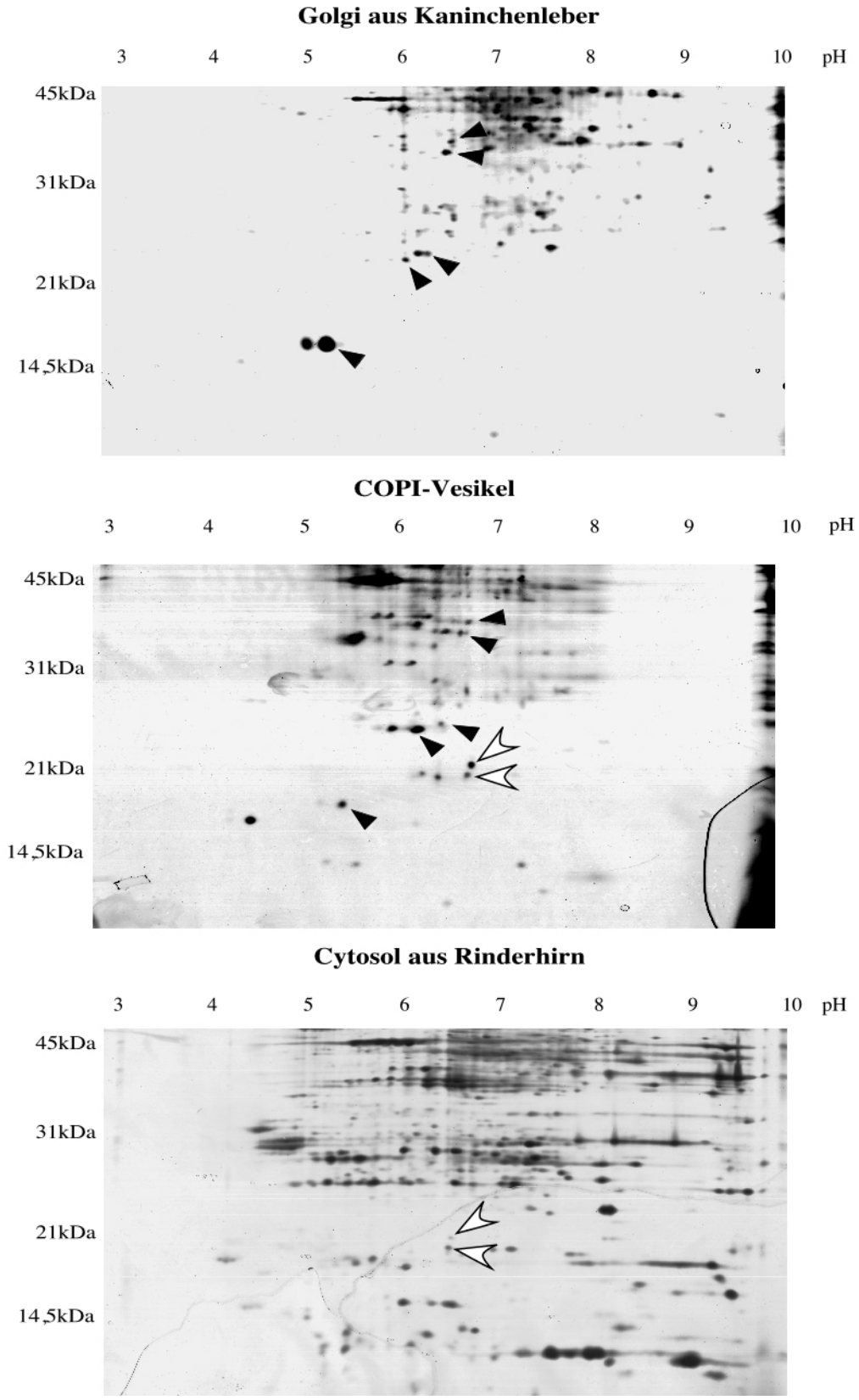


Abbildung 27: Die 2D-Strategie

Es wurden 2D-Gele von COPI-Vesikeln, Golgi aus Kaninchenleber und Cytosol aus Rinderhirn angefertigt und das Spotmuster verglichen. Zum Ansequenzieren der Spots wurden jeweils die Spots aus Cytosol und Golgi ausgeschnitten, die auch im COPI-Vesikelgel vorhanden waren. Offene Pfeilspitze: cytosolische Proteine; schwarze Pfeilspitze: Proteine aus Golgimembranen

Abbildung 28 zeigt ein typisches 2D-Gel von COPI-Vesikeln. Alle Spots, die ansequenziert wurden, sind mit schwarzen Pfeilspitzen markiert. C1 und C2 konnten über Westernblot ARF zugeordnet werden und repräsentieren die myristylierte und nicht-myristylierte Form des Proteins. Die offenen Pfeilspitzen markieren Proteine, die weder in Golgi- noch in Cytosol-2D-Gelen gefunden wurden. Die Spots 1 bis 9 um 25-30kDa wurden über Westernblot p25, einem Mitglied der p24-Familie, zugeordnet. p25 ist glykosyliert und ist daher durch mehrere Spots auf dem 2D-Gel vertreten.

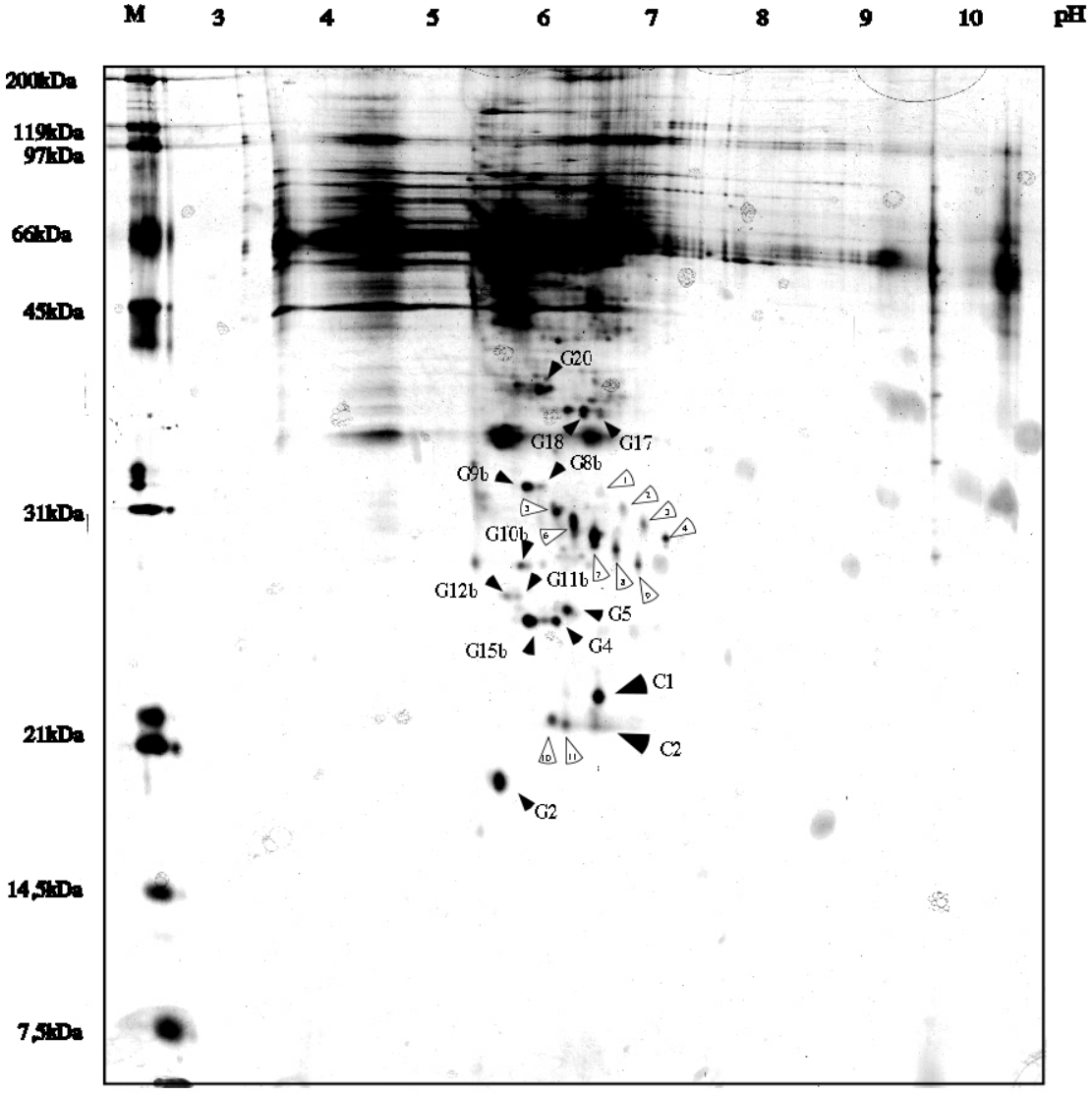


Abbildung 28: 2D-Gel von COPI-Vesiklen

COPI-Vesikel aus drei 30ml-Ansätzen wurden pelletiert (30min, 100000g, 4°C), in 2D-Solubilisierungspuffer aufgenommen und einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Anschließend wurde das Gel Silber gefärbt. Die ansequenzierten Proteine, die aus dem Golgi (G) stammen, sind mit schwarzen Pfeilspitzen markiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

Um kontaminierende Proteine aus Golgimembranen in den *in vitro* generierten COPI-Vesikeln zu ermitteln, wurde eine Negativkontrolle bei der keine Vesikel entstehen mit einem normalen Vesikelansatz verglichen. Dazu wurden in zwei Parallelansätzen (je 3x30ml) COPI-Vesikel einmal mit GTPγS bei 37°C und einmal bei 4°C unter Verwendung von GDPβS generiert. Sowohl von der Positiv- als auch von der Negativkontrolle wurden 2D-Gele angefertigt und Silber-gefärbt (Abbildung 29). Die Proteine G2, G2a, G4, G8b, G9b, G15b und G20 sind auch in der Negativkontrolle zu sehen und sind daher keine Proteine von COPI-Vesikeln.

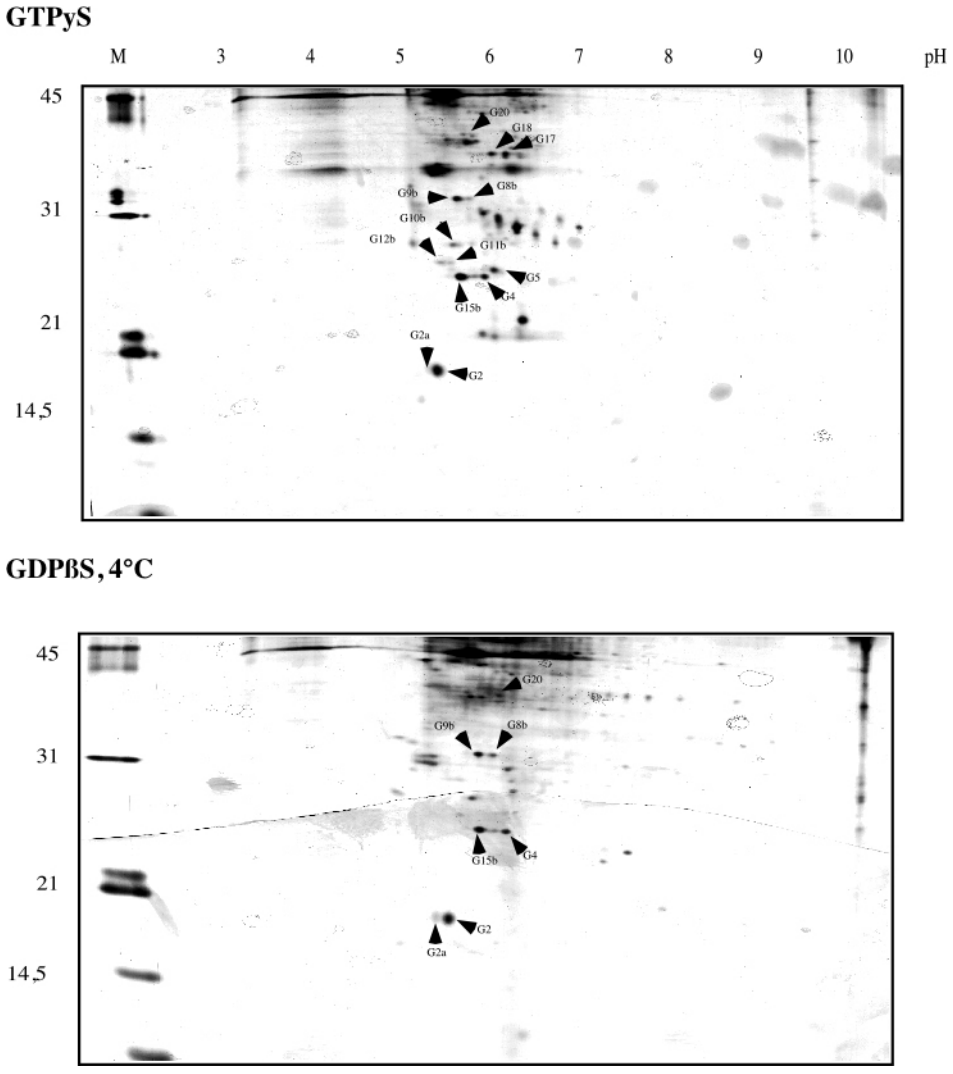


Abbildung 29: Ermittlung kontaminierender Proteine in COPI-Vesikeln

Erklärung siehe Text

In Tabelle 8 sind alle Daten der ansequenzierten Proteine zusammengefasst.

Protein Nr.	Größe in kDa + pI im Gel	erhaltene Peptidsequenz bzw. Maldi	Protein	Größe in kDa + pI nach Datenbank	Sequenz identisch mit Sequenz aus
G2	18 5,5	(K)STWLILHH	**Cytochrom b5**	15,2 5,2	Kaninchen
G2a	18 5,4	„	**Cytochrom b5**	s.o. s.o.	s.o.
G17	36 6,6	K/RYWANFAR	**Carboxyl-Esterase I**	59,5 6,1	Kaninchen
G18	36 6,4	K/RYWANFAR	**Carboxyl-Esterase I**	59,5 6,1	Kaninchen
G20	40 6	K/RSGGYVATVGTK K/RFNDGKVDPAGR	**SMP30**	33,1 5,5	Kaninchen
G15b	26 5,9	YTALVDAEEK	**ATP-Synthase δ-Untereinheit**	18,6 6,2	Ratte
G4	26 6,4	KYTALVDAEEKEDVK	**ATP-Synthase δ-Untereinheit**	18,6 6,2	Ratte
G5	27 6,1	KARFAGTWYAMAK KLVRQRQEELCLS	**Plasma-retinol binding-protein**	23,1 5,6	Kaninchen
G5b	25 6,3	MALDI	**Plasma-retinol binding-protein**	23,1 5,6	Kaninchen
G8b	32 6	MALDI	**Prohibitin**	29,8 5,6	Human
G9b	32 5,8	"	"	" "	"
G11b	29 5,8	MALDI AALEGTATYR	**Heme-binding protein** "	21,1 5,2 21,1 5,7	Maus Human
G12b	29 5,6	MALDI	**Apolipoprotein A1**	30,59 5,5	Kaninchen
G13b	28 6,6	MALDI	**ATP-Synthase α-Untereinheit**	58,8 9,2	Ratte
G14	28 6,7	ILGADTSVDLEETG VLSIGDGIAR	**ATP-Synthase α-Untereinheit**	38,9 9,6	Rind

Tabelle 8: Zusammenfassung der ansequenzierten Proteine

In Tabelle 8 ist die Auswertung der Negativ- und Positivkontrolle der ansequenzierten Proteine zusammengefaßt.

Protein	Protein Nr.	nicht in COPI-Vesikeln (in Negativkontrolle)	in COPI- Vesikeln
Cytochrom b5	G2	+	-
Cytochrom b5	G2a	+	-
Carboxyl-Esterase I	G17	-	+
Carboxyl-Esterase I	G18	-	+
SMP30	G20	+	-
ATP-Synthase δ-Untereinheit	G15b	+	-
ATP-Synthase δ-Untereinheit	G4	+	-
Plasma-retinol binding-protein	G5	-	+
Plasma-retinol binding-protein	G5b	-	+
Prohibitin	G8b	+	-
"	G9b	+	-
Heme-binding protein "	G11b	-	+
Apolipoprotein A1	G12b	-	+
ATP-Synthase α-Untereinheit	G13b	-	+
ATP-Synthase α-Untereinheit	G14	-	+

Tabelle 9: Proteine in COPI-Vesikeln

Es konnte mit dieser auf 2D-Gelen basierenden Technik mehrere Proteine identifiziert werden, die in COPI-Vesikeln enthalten sind. Da als Ausgangsmaterial zum Sequenzieren jeweils nur Golgi oder Cytosol benutzt werden, die in ausreichenden Mengen vorliegen, ist man mit diesem Ansatz auch in der Lage Proteine zu identifizieren, die nur in geringer Konzentration vorhanden sind.

4 Diskussion I: Die p24-Proteine

Die p24-Familie ist eine Proteinfamilie kleiner Transmembranproteine, von denen in Säugern bisher sechs Mitglieder identifiziert wurden (Emery, 1999). Obwohl allgemein anerkannt wird, daß die p24-Proteine in Transportprozesse des frühen sekretorischen Weges involviert sind, ist ihre genaue Funktion jedoch immer noch unklar. Es wird eine Rolle bei der Vesikelbiogenese, bei der Qualitätskontrolle im ER, die Funktion als Frachtrezeptor oder –adaptor und Coatrezeptor diskutiert (Emery, 1999; Kaiser, 2000). Zwei herausragende Eigenschaften der p24-Proteine sind jedoch ihr ständiges Zyklisiern zwischen ER, IC und Golgi (Blum et al., 1999; Füllekrug et al., 1999; Nickel et al., 1997; Rojo et al., 1997) und die Fähigkeit Heterooligomere untereinander auszubilden (Füllekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999). Studien in Hefe und Säugerzellen zeigen, daß *in vivo* die Proteinmengen der p24-Mitglieder voneinander abhängig reguliert werden (Belden and Barlowe, 1996; Denzel et al., 2000; Marzioch et al., 1999). Außerdem führt die Überexpression eines einzelnen p24-Mitglieds zu dessen Fehllokalisation, aber auch anderer p24-Proteine in ER-Strukturen (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Füllekrug et al., 1999). Die p24-Proteine müssen also in ihrer Funktion voneinander abhängig sein.

Um das komplexe Zusammenspiel der p24-Proteine besser zu verstehen, wurde daher in dieser Arbeit die Ausbildung von Heterooligomeren, deren Größe in ER, IC und Golgi, aber auch in COPI-Vesikeln und die Konzentrationsverhältnisse in den Organellen des frühen sekretorischen Weges bestimmt. Außerdem wurde versucht, durch die Analyse der Umverteilung der p24-Mitglieder bei einem 15°C-Block und dessen Aufhebung, die Interaktionen der p24-Proteine zu entschlüsseln.

4.1 Die p24-Proteine liegen als Dimere und Monomere in den Organellen des frühen sekretorischen Weges vor

Einige Mitglieder der p24-Familie in Säugerzellen bilden Heterooligomere in COPI-Vesikeln und Golgimembranen aus (Füllekrug et al., 1999; Gommel, 2001a, diese Arbeit; Gommel, 2001b). Ein Antikörper gegen p27 kann p23, p24 und p25 koimmunpräzipitieren, p26 und tp24 jedoch nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß

(Füllekrug et al., 1999). Demnach ist also nur ein Mitglied der p26-Subfamilie, p27, in der Lage, Heterooligomere mit den übrigen p24-Mitgliedern auszubilden. Da die Immunpräzipitationen keine Ausage über die Größe der p24-Komplexe erlauben, wurde versucht, über Dichtegradientenzentrifugation die Größe des p24-Protein-Oligomers in Säugerzellen zu bestimmen (Dominguez et al., 1998). Diese Studie ermittelte eine Komplexgröße der p24-Mitglieder im Golgi von 35S, was etwa fünfzig Proteinen der Größe von 20kDa entspricht. In Hefe dagegen wurde über Gelfiltration eine Komplexgröße, die etwa einem Tetramer (ca. 100 kDa) entspricht, ermittelt (Marzioch et al., 1999). Um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu klären, wurde in dieser Arbeit die Größe der p24-Oligomere erneut analysiert. Da die p24-Mitglieder aber nicht nur im Golgi, sondern auch im ER und IC vorhanden sind, wurde die Größe des p24-Komplexes in allen Kompartimenten des frühen sekretorischen Weges bestimmt, um eventuelle Unterschiede zu analysieren.

Bei den ersten Solubilisationsversuchen stellte sich heraus, daß das von Dominguez und Mitarbeitern benutzte Detergenz Cholsäure (Dominguez et al., 1998) ungeeignet ist, p24-Proteine zu solubilisieren, da nur etwa 20% von p23 in Lösung gehen. Da Dominguez und Mitarbeiter vor Bestimmung der Größe des p24-Komplexes keine Zentrifugation des Solubilisationsansatzes bei 100000g durchführten, ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem 35S-Komplex der p24-Proteine um unvollständig solubilisierte Golgimembranen handelt. In dieser Arbeit wurde dagegen Octylglucosid zum Solubilisieren von ER, IC und Golgimembranen benutzt, welches p23 nahezu quantitativ in Lösung bringt. Eine anschließende Gelfitrationsanalyse zeigte, daß die p24-Mitglieder in zwei definierten Fraktionen (18 und 21/22) in ER, IC und Golgi eluieren. Die Verteilung auf diese zwei Fraktionen in den Organellen des frühen sekretorischen Weges war allerdings für jedes p24-Protein unterschiedlich. Um die Größe der zwei definierten Oligomere zu bestimmen, wurde die Gelfiltrationssäule zunächst mit löslichen Proteinen geeicht. Hierbei ergabt sich eine Größe von ca. 150kDa für Komplex1 (Fraktion18) und ca. 60 kDa für den kleineren Komplex2 (Fraktion21/22). Dies würde etwa einem Tetramer und einem Dimer von p24-Proteinen entsprechen. Eine Komplexgröße von ca. 100kDa wurde auch in Hefe bei einer Gelfiltration von Octylglucosid-solubilisierten Sphäroblasten gefunden (Marzioch et al., 1999). Ein kleinerer Komplex von ca. 40kDa lag allerdings nur in Membranen der *Knock-out*-Stämme der p24-Familie vor. Durch eine Eichung der

Gelfiltrationssäule mit Membranproteinen wurde dann jedoch festgestellt, daß die Detergenzmizelle einen großen Einfluß auf das Wanderungsverhalten der Proteinkomplexe hat. Werden zur Eichung Membranproteine benutzt, die, wie die p24-Proteine, Detergenz benötigen, um in Lösung zu gehen, beträgt die Größe der p24-Komplexe nicht 150 und 60kDa, sondern 40 und 18kDa, was dann nicht einem Tetramer und einem Dimer, sondern einem Dimer und einem Monomer entspräche. Eine Detergenz-unabhängige Gelfiltrationanalyse der löslichen luminalen Domäne von p23, die aufgrund ihrer *coiled-coil* Domäne Oligomere ausbildet, zeigte ebenfalls, daß hauptsächlich Dimere und nicht Tetramere von p23 ausgebildet werden. Da Marzioch und Mitarbeiter bei der Gelfiltrationsanalyse der p24-Komplexe in Hefe lösliche Proteine, statt Membranproteine zur Eichung benutzten (Marzioch et al., 1999), liegt höchstwahrscheinlich auch hier ein Dimer der p24-Proteine und nicht eine Tetramer vor. Der kleinere „Komplex“, der bei den *Knock-out*-Stämmen auftrat, würde dann einem Monomer entsprechen.

In Säugerzellen ist das Verhältnis der Monomere zu den Dimeren der einzelnen p24-Proteine in ER, IC und Golgi unterschiedlich. So eluiert p26 zum Beispiel in allen Organellen nur als Monomer, tp24 dagegen nur als Dimer. Die übrigen p24-Proteine liegen jedoch sowohl als Dimer, als auch als Monomer vor, wobei p23 im ER fast nur Dimere ausbildet. p24 zeigt dagegen in allen Kompartimenten eine Gleichverteilung zwischen Monomer und Dimer. p25 ist nur im ER gleichverteilt. Im IC und im Golgi liegt p25 jedoch vermehrt als Monomer vor. p27 kann zum größten Teil nur als Monomer nachgewiesen werden. Nur im Golgi ist es ohne Schwierigkeiten möglich, p27 auch in der Fraktion, die einem Dimer entspricht, zu detektieren. Wie schon bei den Koimmunpräzipitationen nehmen p26 und tp24 eine Sonderstellung ein.

4.2 In COPI-Vesikeln liegen die p24-Proteine vermehrt als Monomere vor

Um zu analysieren, ob die p24-Proteine auch in den COPI-Vesikeln Heterooligomere bilden, wurde ihre Komplexgröße auch in hochgereinigten Vesikeln ermittelt. Dabei wurden nur für p23 und p24 Signale im Bereich eines Dimers detektiert. Die anderen p24-Proteine liegen dagegen in COPI-Vesikeln als Monomere vor. Damit ist in COPI-Vesikeln im Vergleich zum Golgi eine Verschiebung in Richtung der Monomere festzustellen. In *in vitro* Studien wurde jedoch gezeigt, daß wahrscheinlich ein

Tetramer eines p23-Tailpeptids in der Lage ist, eine Konformationsänderung von Coatomer zu induzieren (Reinhard et al., 1999). Diese Konformationsänderung löst die Polymerisation der Hüllproteine, und dadurch das Abschüren eines COPI-Vesikels aus. Nach diesem Modell würde man in den COPI-Vesikeln also vermehrt Tetramere der p24-Proteine erwarten. NMR-Studien zeigen ebenfalls, daß Peptide, die den cytoplasmatischen Tail von p23 entsprechen, Tetramere ausbilden können (Weidler et al., 2000). Da die luminale Domäne von p23, wie in dieser Arbeit gezeigt, jedoch Dimere ausbildet, könnte ein Tetramer nur über die cytoplasmatischen Tails ausgebildet werden. Ein Tetramer, der jedoch nur über die kurze, cytoplasmatischen Domäne aufrechterhalten wird, wäre unter den gewählten Detergenzbedingungen wahrscheinlich nicht stabil und könnte daher nicht nachgewiesen werden. Ein Problem bei der Bestimmung der Komplexgröße der p24-Proteine in COPI-Vesikeln ist jedoch die geringe Menge an Material, die zur Verfügung steht. Bei der Solubilisierung von COPI-Vesikeln war daher immer weniger Protein im Ansatz vorhanden, als bei den Golgimembranen. Durch die Zugabe von Phosphatidylcholinliposomen wurde versucht, das Lipid-zu-Detergenz Verhältnis anzupassen. Es besteht aber immer noch die Möglichkeit, daß die Protein-Protein-Interaktionen der p24-Proteine in der COPI-Vesikelprobe durch die geringe Proteinkonzentration beeinträchtigt wurden. Eine Möglichkeit, die Solubilisationsbedingungen anzupassen, wäre die gleichen (geringen) Mengen an Golgimembranen wie COPI-Vesikel einzusetzen. Da die p24-Proteine in COPI-Vesikeln angereichert werden (Gommel et al., 1999; Sohn et al., 1996), sind diese schon in geringen Mengen von Vesikeln nachzuweisbar. Versucht man aber die Membranmenge an Golgi, bezogen auf Phosphatidylcholin, der Menge an COPI-Vesikeln anzupassen (Faktor 40 bis 70 niedrigere Konzentration), liegen die Signale der p24-Proteine im Golgi unter der Detektionsgrenze. Die einzige Möglichkeit, Golgi und COPI-Vesikel unter genau den gleichen Bedingungen zu testen wäre, COPI-Vesikel im großen Maßstab herzustellen, was jedoch aufgrund der geringen Ausbeuten bei der *in vitro* Generierung äußerst schwierig ist.

4.3 Die p24-Proteine liegen in ER, IC und Golgi in unterschiedlichen Konzentrationen vor

Es wird angenommen, daß ein festes Mengenverhältnis zwischen den p24-Mitgliedern essentiell für ihre dynamische Positionierung innerhalb der Zelle ist, da eine Überexpression eines einzelnen p24-Mitglieds zu einer Mislokalisation dessen, aber auch anderer p24-Proteine in ER-Stukturen führt (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Füllekrug et al., 1999) und der *Knock-out* eines p24-Proteins in Hefe in der Degradation einiger weiterer Familiemitglieder resultiert (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch et al., 1999). Um die Mengenverhältnisse der p24-Mitglieder zu analysieren, wurden in dieser Arbeit mittels Westernblot die Konzentrationen der p24-Proteine in ER, IC und Golgi bestimmt, um einen Einblick in die Stöchiometrie der p24-Mitglieder zu bekommen. Überraschenderweise liegen p23, p24, p25 und p27, die Immunpräzipitationen zufolge Heterooligomere ausbilden, jedoch nicht in stöchiometrischen Mengen in ER, IC und Golgi vor. Vielmehr haben die p24-Proteine mit einem funktionellem ER-Rückführungssignal, p23 und p25, eine Konzentration um 0,5-0,6ng/nmol Phospholipid und p24 und p27, die anterograd gerichteten p24-Proteine, eine 5 fach höhere (2,5-3ng/nmol Phospholipid). p25 und p24 sind hierbei gleichverteilt zwischen ER, IC und Golgi, wogegen p23 und p27 Konzentrationsunterschiede entlang des frühen sekretorischen Weges aufweisen. Ein Maschinerieprotein, wie der KDEL-Rezeptor, der wie die p24-Proteine im frühen sekretorischen Weg zyklisiert, lokalisiert vorallem im IC und im cis-Golgi, in denen er seine Funktion beim Rücktransport ER-residenter Proteine ausübt (Griffiths et al., 1994; Tang et al., 1995; Tang et al., 1993). Dies würde übertragen auf die p24-Proteine bedeuten, daß p23 im ER und IC, p27 im IC und im Golgi und p24 und p25 auf allen Transportschritten zwischen ER, IC und Golgi ihre Funktion ausüben. Da p23 ein funktionelles Rückführungssignal trägt (Nickel et al., 1997), ist es wahrscheinlich beim Transport vom IC zu ER aktiv, wogegen p27, als anterogrades p24-Protein, eher eine Funktion im Transport vom IC zum Golgi besitzt. p25, das ein klassisches KKXX-ER-Rückführungssignal trägt, verhindert eventuell durch eine Interaktion über seine luminale Domäne mit anterograd ausgerichteten p24-Proteinen (p24 und p27) deren Transport bis zu Plasmamembran und sichert damit ihre

Lokalisation im Golgi und IC. Da die p24-Proteine auch in den Zusammenhang mit Sortierung von Fracht in Vesikel gebracht werden, wäre eine mögliche Erklärung für die höhere Konzentration der anterograd ausgerichteten p24-Proteine, daß damit der Transport von Fracht, der hauptsächlich in die anterograde Richtung verlaufen muß, gewährleistet wird. Das Recycling von Maschinerie und Membranen müßte dann teilweise unabhängig von p24-Proteinen ablaufen, damit die Zusammensetzung der Membranen aufrecht erhalten wird.

p26 liegt, im Gegensatz zu den anderen p24-Mitgliedern, in einer um den Faktor 10 höheren Konzentration als p24 und p27 vor. tp24 dagegen besitzt nur eine sehr geringen Konzentration in ER, IC und Golgi (0,05ng/nmol Phosphlipid, Faktor 10 weniger als p23). Da p26 und tp24 nur in sehr geringen Ausmaß mit den anderen p24-Proteinen koimmunpräzipitieren (Füllekrug et al., 1999) und in allen Kompartimenten des frühen sekretorischen Weges nur Dimere bzw. Monomere ausbilden, ist eine Sonderstellung dieser beiden Mitglieder der p26-Supfamilie sehr wahrscheinlich.

Über elektronenmikroskopische Studien wurden bisher nur einige der p24-Proteine analysiert. Diese Studien wurden alle in unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt, ohne Kolokalisationen mit Markern für die Organellen des frühen sekretorischen Weges. Daher ist nicht zu unterscheiden, ob die zum größten Teil markierten tubulovesikulären Strukturen zum glatten ER, zum IC oder CGN gehören. Man sollte außerdem berücksichtigen, daß viele der p24-Antikörper gegen die cytoplasmatischen Tails der Proteine gerichtet sind, die sowohl COPI- als auch COPII-Hüllproteine binden können, und dadurch das Antikörperepitop möglicherweise maskiert ist. Wegen den denaturierenden Bedingungen bei der Westernblotanalyse bestand diese Gefahr bei der Bestimmung der Konzentration der p24-Mitglieder in dieser Arbeit nicht. Um die Daten aus der Westernblotanalyse direkt vergleichen zu können und die so gewonnenen Daten zu überprüfen, müßte eine vergleichende EM-Studie über die Lokalisation und Konzentration der p24-Proteine im frühen sekretorischen Weg mit Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope gemacht werden.

4.4 Beim Zyklisieren im frühen sekretorischen Weg bewegen sich die p24-Proteine mit ständig wechselnden Partnern

Durch einen 15°C-Block wird das Zyklisieren der p24-Proteine im frühen sekretorischen Weg gestoppt, und sie akkumulieren im IC (Blum et al., 1999; Füllekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999; Nickel et al., 1997; Rojo et al., 1997), da der über Mikrotubulli vermittelte Transport vom IC zum Golgi gehemmt wird (Saraste and Kuismanen, 1984). Nach anschließender Erhöhung der Temperatur werden die p24-Mitglieder wieder in ihre ursprüngliche Lokalisation transportiert.

Durch eine Immunfluoreszenzanalyse konnte gezeigt werden, daß p24 und p27 bei einem 15°C-Block wie erwartet im IC akkumulieren, und sowohl in kernnahen, tubulovesikulären Strukturen, als auch in punktierten Strukturen mit dem IC-Marker ERGIC-53 kolokalisieren. p23 und p25 dagegen weisen, zusätzlich zur Kolokalisation mit ERGIC-53, eine Lokalisation in retikulären Strukturen des ER auf. Diese Akkumulation im ER ist möglicherweise auf einen Rückstau zurückzuführen, da der Transportschritt zwischen IC und Golgi gehemmt ist. p26 und tp24 nehmen, wie in den vorangegangen Versuchen, eine Sonderstellung ein, da sie schon vor dem 15°C-Block vermehrt in punktierten Strukturen zu finden sind, wobei p26 während des gesamten Versuchs die beste Kolokalisation mit ERGIC-53 zeigt.

Da es allerdings nur schwer möglich ist, quantitative Aussagen über die Umverteilung einzelner p24-Proteine in der Immunfluoreszenz zu machen, wurde in dieser Arbeit das Verhalten der p24-Proteine bei einem 15°C-Block und dessen Aufhebung auch in einem biochemischen Ansatz analysiert. Dabei konnte die Umverteilung der einzelnen p24-Proteine zwischen den Kompartimenten verglichen werden. Bei der Erniedrigung der Temperatur auf 15°C erhöht sich die relative Menge aller p24-Proteine im ER, wobei der Konzentrationanstieg von p23 und p25 am höchsten ist. Daher ist wahrscheinlich auch nur bei diesen p24-Mitgliedern in der Immunfluoreszenz eine Anfärbung von retikulären Strukturen des ER zu sehen. p23 und p25 verhalten sich dann im IC und im Golgi jedoch völlig anders. p23 wird im IC ähnlich wie p26 und tp24 zunächst angereichert und dann vermehrt aus dem IC transportiert. Im Golgi

nimmt die p23-Konzentration im Gegensatz zu den anderen p24-Proteinen beständig ab. Die Menge an p25 im IC wird, wie die von p27, beständig erhöht. Bei p24 verläuft die Erhöhung langsamer. Im Golgi werden p24, p25 und p27 abgereichert, aber nur p24 und p27 in etwa dem gleichen Ausmaß. Daraus muß man schließen, daß im Golgi vermehrt p24 und p25 und im IC p25 und p27 gemeinsam transportiert werden. Da die p24-Proteine jedoch nicht quantitativ im IC akkumuliert werden, ist es durch die Komplexität des Ansatzes nicht möglich, genau zu bestimmen, welche p24-Proteine bei welchem Transportschritt interagieren. Es können nur ähnliche Umverteilungen gemessen werden, die einen Eindruck erbringen, wie hochdynamisch dieses System sein muß. Da jedes p24-Protein im ER, IC und Golgi jeweils mit einem anderen p24-Protein interagiert und die p24-Proteine unterschiedliche Transportsignale besitzen, wäre es möglich, daß sie je nach Oligomerisierungspartner in unterschiedliche Kompartimente transportiert würden. Die Lokalisation würde zum einen der Affinität der p24-Proteine zueinander und zum anderen der Summe ihrer Transportsignale entsprechen. Dabei müßten in den einzelnen Kompartimneten bevorzugte Dimere ausgebildet werden. Dies ließe sich mit Immunpräzipitationen aus ER, IC und Golgi und einer anschließenden Analyse der Menge an koimmunpräzipitiertem Material nachweisen. Nicht zu vernachlässigen ist auch die Möglichkeit, daß die p24-Proteine auch Homooligomere ausbilden könnten. Dies ließe sich durch eine Immunpräzipitation aus den Fraktionen der Gelfiltration bestimmen. Dabei wäre auch interessant, die Verhältnis der Homo- und Heterodimer in ER, IC und Golgi zu analysieren.

4.5 Die Funktion der p24-Proteine

In dieser Arbeit wurden einige grundlegenede Erkenntnisse über den Oligomerisierungsstatus, die Konzentration und das Zyklisieren der p24-Mitglieder im frühen sekretorischen Weg gewonnen, die für das Verständnis ihrer Funktion essentiell sind.

Zwei Mitglieder der p24-Familie in Säugerzellen, p26 und tp24, nehmen eine gesonderte Funktion ein. Sie gehören, wie p27, zur p26 Subfamilie, die sich durch eine Maskierung des dibasischen Motifs des cytoplasmatischen Tails auszeichnet und daher nicht in der Lage ist, Coatomer zu binden. Beide Proteine werden mit einem p27-Antikörper nur schlecht oder nicht koimmunpräzipitiert (Füllekrug et al., 1999),

sie liegen nur als Monomer (p26) bzw. Dimer (tp24) vor und besitzen eine ungleich höhere bzw. niedrigere Konzentration in den Organellen des frühen sekretorischen Weges als die übrigen p24-Mitglieder. Bei einer Überexpression von einem der anderen p24-Proteine, werden sie nicht wie die anderen p24-Mitglieder, in ER-Strukturen umverteilt (Emery et al., 2000). Trotzdem scheinen p26 und tp24 im frühen sekretorischen zu zyklisieren, da sie durch eine 15°C-Block im IC akkumuliert werden können und bei der Behandlung mit BFA, wie die anderen p24-Proteine, im Gegensatz zu Golgi residenten Enzymen, nicht in ER-Membranen umverteilt werden (Emery et al., 2000).

Da p26 offensichtlich nur als Monomer in einer sehr hohen Konzentration in ER, IC und Golgi vorliegt, wäre eine Funktion als Platzhalter für Frachtmoleküle und/oder als Stukturkomponente in funktionellen Subdomänen der Organellen des frühen sekretorischen Weges denkbar. p26 würde dann Membranbereiche definieren, die sich durch Vesikelbildung und die Sortierung von Fracht auszeichnen. Dies ließe sich durch eine elektronenmikroskopische Studie analysieren. Hätte p26 eine Funktion als Platzhalter von Fracht, müßte es in Vesikeln, die Fracht enthalten, im Gegensatz zu solchen ohne Fracht, weniger vorhanden sein. Dies ließe sich durch den Vergleich der Menge an p26 in unter GTP- bzw. GTPγS-Bedingungen erzeugtenVesikeln bestimmen, da, wenn die Hydrolyse von GTP möglich ist, nur Fracht in COPI-Vesikel verpackt wird (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000).

tp24 liegt im Vergleich zu p26 in einer um Faktor 100 niedrigeren Konzentration vor und bildet in allen Organellen Dimere aus. Nach den biochemischen Daten liegt tp24 nur zu sehr geringem Ausmaß in Membranen des IC vor, obwohl durch einen Antikörper gegen tp24 in der Immunflupreszenz vermehrt punktformige Strukturen markiert werden, die sonst typisch für das IC sind. Leider konnte eine Kolokalisation mit ERGIC-53, einem IC-Marker, in der Immunfluoreszenz nicht durchgeführt werden, da die beiden Antikörper nicht unter den gleichen Fixationsbedingungen einsetzbar sind. Bisher gibt es nur sehr wenige weitere Daten über dieses Familienmitglied, so daß keine Aussage über seine Funktion getroffen werden kann.

Die vier übrigen p24-Mitglieder, p23, p24, p25 und p27, sind in ihrer Funktion voneinander abhängig. Sie bilden Heterodimere aus, und diese Interaktion ist essentiell für ihre korrekte Lokalisation im frühen sekretorischen Weg (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Füllekrug et al., 1999). Die Ausbildung von Dimeren ist

jedoch bei jedem p24-Protein in jeden Organell unterschiedlich (diese Arbeit). Außerdem interagieren die p24-Proteine beim Zyklisieren durch den frühen sekretorischen Weg mit ständig wechselnden Partnern, was auf ein hochdynamisches System von gegenseitigen Interaktionen schließen läßt. Da die p24-Proteine in COPI- und COPII-Vesikel verpackt werden (Belden, 2001; Gommel et al., 1999; Sohn et al., 1996) und einige p24-Proteine funktionelle ER-Rückführungssignale besitzen und andere wiederum nicht, wäre eine mögliche Funktion dieses komplexen Zusammenspiels die Richtungsbestimmung eines Vesikel. Alle vier p24-Proteine binden *in vitro* Komponenten der COPII-Proteinhülle (Belden, 2001; Dominguez et al., 1998), und p23, p24 und p25 binden auch Coatomer (Dominguez et al., 1998; Fiedler et al., 1996; Sohn et al., 1996). p23 und p24 sind durch ihre Interaktion mit Coatomer sogar in der Lage, eine Konformationsänderung des Hüllkomplexes auszulösen und damit das Abschnüren eines Vesikels zu induzieren (Reinhard, 2000; Reinhard et al., 1999). p23 interagiert zusätzlich mit ARF1, einem weiteren Maschinerieprotein der COPI-Vesikel, dessen Rekrutierung an Golgimembranen für die Bindung von Coatomer und das spätere Abschnüren der COPI-Vesikel essentiell ist (Gommel, 2001a; Majoul, 2001). Die GTP-Hydrolyse durch ARF vermittelt dabei die Verpackung von Fracht in die Vesikel (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000). p24 interagiert ebenfalls mit ARF, bindet aber zusätzlich auch ARF-GAP (Majoul, 2001), wobei ein p24-Tailpeptid die Coatomer abhängige Hydrolyse von GTP durch ARF hemmt (Goldberg, 2000; Gommel et al., 1999). In Hefe wurde außerdem kürzlich gezeigt, daß p24, nicht aber p23, Sar1 binden kann (Belden, 2001). Die p24-Proteine können also über ihren cytoplasmatischen Tail Hüllproteine und Proteine, die den Abschnürungsprozess und die Aufnahme von Fracht regulieren, binden oder sogar beeinflussen und regulieren möglicherweise durch ihre Zusammensetzung in einem Vesikel dessen Transportrichtung. Somit wären die p24-Proteine ideale Kandidaten für Frachtrezeptoren oder –adaptoren, da sie durch die unterschiedliche Zusammensetzung der p24-Dimeren die Transportrichtung eines Vesikels kodieren, ihre luminalen Domänen die Interaktion mit Fracht herstellen und über die cytoplasmatische Domäne mit den cytosolischen Maschinerieproteinen interagieren könnten. In Hefe führt ein *Knock-out* der p24-Proteine jedoch nur zu einem harmlosen Transportdefekt einiger, weniger Proteine (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch et al., 1999; Schimmoller et al., 1995; Springer

et al., 2000) und bis jetzt wurde nur ein Frachtprotein gefunden, das direkt mit p23 und p24 in Hefe interagiert (Muniz et al., 2000). In Säugern wurden bis heute leider keine Daten zur Interaktion mit Frachtproteinen veröffentlicht. Eine neue Studie in melanotropen Zellen von *Xenopus laevis* berichtet allerdings eine Verschiebung der Lokalisation der p24-Proteine in Richtung des ERs und ICs bei sekretorisch aktiven im Vergleich zu inaktiven Zellen (Kuiper et al., 2001), was wiederum auf eine Funktion der p24-Proteine im Zusammenhang mit Fracht hindeutet. Da zur Aufnahme von Fracht die Hydrolyse von GTP durch ARF essentiell ist und ARF und ARF-GAP von p24-Proteinen gebunden werden, könnten die p24-Proteine auch die Frachtsortierung regulieren, indem sie den zeitlichen Ablauf des Abknospungsprozesses bestimmen. Durch die Verzögerung der Vollendung eines Vesikels hätte die Fracht Zeit, ihre Liganden zu finden, und residente Proteine wäre es möglich aus dem Knospungsbereich herauszudiffundieren. Solche Mechanismen wären auch mit dem beschriebenen Defekt in der Qualitätskontrolle und der Suppression des lethalen sec13-*Knock-outs* (Belden and Barlowe, 1996; Elrod-Erickson and Kaiser, 1996; Marzioch et al., 1999) durch die Deletion der p24-Proteine in Hefe vereinbar.

5 Dikussion II: Proteomics von COPI-Vesikeln

Es wurde eine 2D-Strategie ausgearbeitet, durch die es möglich ist, neue Proteine aus COPI-Vesikeln zu analysieren, obwohl sie nur in geringen Mengen hergestellt werden können. Die meisten Proteine, die identifiziert wurden, sind sehr wahrscheinlich Frachtproteine, obwohl die Vesikel unter GTPγ-Bedingungen hergestellt wurden und vermindert Fracht enthalten sollten (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000). Da als Ausgangsmaterial jedoch Leber, eines des sekretorisch aktivsten Organe benutzt wurde, ist in diesen Membranen ungleich mehr Fracht enthalten als zum Beispiel in Membranen aus Zellkulturzellen. Außerdem konnten Maschinerieproteine, wie die p24-Mitglieder (siehe Abbildung 28, p27), die in COPI-Vesikeln angereichert werden, nur in den Vesikeln, nicht aber im Golgi detektiert werden. Um neue Maschinerieproteine der COPI-Vesikel zu analysieren, würde man daher als Ausgangsmaterial eher Membranen wählen, bei denen das Verhältnis Fracht zu Maschinerie geringer ist. Dann müßte bei der begrenzten Menge an Protein, die über ein 2D-Gel aufgetrennt werden kann, der Anteil an Proteinen, die zur Maschinerie gehören, größer sein.

Man könnte mit diesen 2D-Ansatz aber auch Vesikel vergleichen, die *in vitro* im GTPγS und mit GTP generiert wurden. Da zur Aufnahme von Fracht die Hydrolyse von GTP essentiell ist (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000), sollten die unter GTP-Bedingungen generierten Vesikel mehr Fracht enthalten. Durch den 2D-Ansatz sollte es möglich sein zu bestimmen, wieviel mehr endogene Fracht die GTP-Vesikel im Vergleich zu den GTPγS-Vesikeln geladen haben.

5.1 Zusammenfassung

Die p24-Familie ist eine hochkonservierte Proteinfamilie von Typ I Transmembranproteinen, deren Mitglieder im frühen sekretorischen Weg zyklisieren. Obwohl allgemein anerkannt ist, daß diese Proteinfamilie eine Rolle bei den Transportprozessen zwischen ER, IC und Golgi spielt, ist eine genaue Funktion bis heute immer noch unklar. Sie werden als Coatrezeptoren und Transportrezeptoren oder –adaptoren gehandelt, aber es wird ihnen auch eine Funktion in der Qualitätskontrolle im ER und bei der Vesikelbiogenese zugeschrieben.

Eine herausragende Eigenschaft der p24-Proteine ist die Ausbildung von Heterooligomeren. Da die p24-Mitglieder sowohl in der Lokalisation als auch der Biosynthese voneinander abhängig sind, muß auch der Schlüssel zu ihrer Funktion in der Ausbildung dieser Oligomere liegen. Daher wurde in dieser Arbeit die Ausbildung, und dabei vor allem die Komplexgröße der p24-Mitglieder in ER, IC und Golgi analysiert. Die p24-Proteine in Säugern liegen nicht, wie bisher gedacht, in einem 35S-Komplex vor [Dominguez, 1998 #77], aus dem sie herausgelöst werden müssen, um in Vesikel verpackt zu werden. Vielmehr sind in den Organellen des frühen sekretorischen Weges Dimere und Monomere vorhanden, wobei in COPI-Vesikel vorwiegend Monomere verpackt werden. Das Verhältnis von Monomer zu Dimer ist, je nach p24-Protein und Organell, unterschiedlich, und zwei Mitglieder der p26-Subfamilie (p26 und tp24) liegen immer nur als Dimer bzw. als Monomer vor.

Durch eine Westernblotanalyse wurden die Konzentrationen der p24-Proteine in den Organellen des frühen sekretorischen Weges bestimmt. Überraschenderweise liegen sie jedoch in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vor. Zwei Mitglieder der p26-Subfamilie, p26 und tp24, zeichnen sich zusätzlich durch eine ungleich höhere bzw. niedrigere Konzentration aus.

Um das dynamische Zusammenspiel der p24-Proteine zu analysieren, wurde biochemisch und über Immunfluoreszenz die Umverteilung der p24-Mitglieder bei einem 15°C-Block und dessen Auflösung analysiert. Sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch biochemisch, konnte gezeigt werden, daß ein p24-Protein in jeder Organelle mit einem anderen p24-Protein umverteilt wird, was auf einen ständigen Wechsel der Interaktionspartner bei jedem Transportschritt hindeutet.

Aufgrund der Erkenntnisse dieser Arbeit und weiteren Studien werden die p24-Proteine p23, p24, p25 und p27 als Vermittler zwischen Fracht und Maschinerieproteinen bei der Vesikelbiogenese vorgeschlagen. Durch ihre Interaktion mit Hüllproteinen, ARF, ARF-GAP und Sar1 wären sie in der Lage, die Abschnürung eines Vesikels und die Sortierung von Fracht zu regulieren. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der p24-Dimere könnte außerdem die Transportrichtung bestimmt werden.

6 Material und Methoden

6.1 Material

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen BioRad (München), Calbiochem (Bad Soden), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen und hatten den Reiheitsgrad „ analysenrein“.

6.1.1 Primärantikörper

gegen	Name / Tier	Antigen	von	Verdünnung
p23	Henriette / Kaninchen	rekombinante luminale Domäne	D.Gommel, K.Sohn	1:10000 (Wb)
p23	HAC344 / Kaninchen	C-Terminus	diese Arbeit	1:100 (IF, affi.Gly.)
p23	M2 / Meerschweinchen	rekombinante luminale Domäne	S. Rieger	1:5000 (Wb)
p23	#1327 / Huhn	rekombinante luminale Domäne	K.Sohn	1:1000 (Wb)
p24	Elfriede / Kaninchen	C-Terminus	D.Gommel K.Sohn	1:10000(Wb)
p24	Frieda / Kanninchen	C-Terminus	D.Gommel K.Sohn	1:1000 (Wb)
p24	#1593 / Huhn	C-Terminus	K.Sohn	1:1000 (Wb)
p25	#2469 R1/ Kaninchen	C-Terminus	diese Arbeit	1:5000 (Wb) 1:100 (IF, affi.Gly.)
p25	#1708 / Kaninchen	C-Terminus	D.Gommel K.Sohn	1:500 (Wb, affi.Gnd.)
p26	#2088 / Meerschweinchen	C-Terminus	D.Gommel K.Sohn	1:500 (Wb, affi.Gly) 1:250 (IF, affi.Gly.)
p26	#2088 R1/ Kaninchen	C-Terminus	D.Gommel K.Sohn	1:500 (Wb)

tp24	#2501 R2/ Kaninchen	C-Terminus	diese Arbeit	1:5000 (Wb) 1:500 (IF, affi.Gnd.)
tp24	#2501 R1/ Kaninchen	C-Terminus	diese Arbeit	1:1000 (Wb)
p27	#2087 R2/ Kaninchen	C-Terminus	D.Gommel	1:1000 (IF, affi.Gly) 1:500 (Wb, affi. Gly. alter Pool)
α/γ-COP	883	N-terminales Peptid von α-COP	C.Harter	1:1000 (Wb)
β-COP	M3A5 / Maus	internes Peptid	T.Kreis	1:100 (Wb)
ARF	#2048	rekombinantes Protein	B.Helms	1:4000 (affi., Wb)
Calnexin	SPA-865 / Kaninchen	Peptid (AS50-68)	Stressgen	1:2000 (Wb) 1:200 (IF)
PDI	P71720 / Maus	Peptid (AS109-214)	BD Transduction Laboratories	1:250 (Wb)
KDEL-Rezeptor	VAA-PT048 / Maus	Peptid (AS192-212)	Stressgen	1:250 (Wb) 1:1000 (IF)
GM130	G65120 / Maus	C-Terminus	BD Transduction Laboratories	1:250 (Wb) 1:500 (IF)
Cytochrom b5	Cytb5 / Kaninchen	cytb5 aus Ratte	Prof. N. Borgese University of Milan	1:250 (Wb)
myc	9E10 / Maus	C-Terminus	Evan et al. 1985	1:10 (Wb)
Transferinrezeptor	13-6800 / Maus	rekombinantes Protein	Zymed	1:500 (Wb)
ERGIC-53	G1/93 / Maus		Schweizer et al. 1988	1: 1000 (Wb) 1:1000 (IF)
p30	p30 / Kaninchen	mitochondriales Protein (30kDa)	Prof. W.Just	1:1000 (Wb)
PMP 69	PMP69/Pep 3 / Kaninchen	PMP 69	Prof. W.Just	1:1000 (Wb)

(Wb = Westernblot, IF = Immunfluoreszenz, affi. = affinitätsgereinigt, Gly./Gnd. = Glycin/Guanidiniumhydrochloridelution der Affinitätsreinigung)

Die in dieser Arbeit hergestellten Antikörper wurden durch Immunisierung mit an KLH (keyholelimpet hemocyanin) gekoppelten Antikörpern gewonnen. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Firma Pineda Antibodies (Berlin) übernommen.

6.1.2 Sekundärantikörper

Gegen	**gekoppelt an**	**von**	**Verdünnung**
Kaninchen	Meerrettichperoxidase	BioRad, München	1:5000
Kaninchen	Alexa488	Molecular Probes, Leiden	1:500
Kaninchen	Alexa546	Molecular Probes, Leiden	1:200
Maus	Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5000
Maus	Alexa488	Molecular Probes, Leiden	1:500
Meerschweinchen	Meerettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5000
Meerschweinchen	Alexa546	Molecular Probes, Leiden	1:200
Huhn	Meerettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5000

6.1.3 Peptide

Peptid	**Sequenz**
p23ct HAC344	CLRRFFKAKKLIE
p25ct #2469	CYLKSFFEAKKLV
tp24ct #2501	CTLKRFFQDKRPVPT
p27ct #2087	CLLKSFFSDKRTTTTRVGS
p26ct #2088	CLLKSFFTEKRPISRHVHS

Die Peptide wurden von der Peptidsyntheseeinheit des Zentrums für Molekularbiologie Heidelberg (ZMBH) synthetisiert und über HPLC aufgereinigt.

6.1.4 Zellen

Zellen	von	Medium
Vero-Zellen	ATTC: CCL-81 Epithelzellen aus Affenniere (*Cercopithecus aethiops*)	D-MEM 10% FKS, 500 Einheiten Penicillin und Streptomycin pro ml
s-Hela	ATTC: CCL-2.2 Epithelzellen aus humanem Zervixkarzinom (*Homo sapiens*)	RPMI, 10& FKS, 500 Einheiten Penicillin und Streptomyzin pro ml
CHO	ATTC: CCL-61 Epithelzellen aus den Ovarien des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*)	α-MEM, 7% FKS, 500 Einheiten Penicillin und Streptomycin pro ml
CHO-CD8-LT	Dr. W. Nickel (Nickel et al., 1998) CHO-Zellen, die stabil mit dem CD8-LT Konstrukt transformiert sind.	α-MEM, 7% FKS, 500 Einheiten Penicillin und Streptomycin pro ml

Zellkulturmedien wurden von Biochrom KG und fötales Kälberserum (FKS) von PAN^{TN} bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 in einem Brutschrank der Firma Haereus (Hanau).
Bei der Anzucht in Spinnerkultur wurden 1,5l Spinnerflaschen (Techne über Thermolux, Wertheim) benutzt.

6.1.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz
p24forward	5’-GATCCTACCTGAAACGTTTCTTCGAAGTTCGTCGTGTTGTTTGAG-3’
p24backward	5’-AATTCTCAAACAACACGACGAACTTCGAAGAAACGTTTCAGGTAG-3’
p25forward	5’-GATCCCACCTGAAATCTTTCTTCGAAGCTAAAAAACTGGTTTGAG-3’
p25backward	5’-AATTCTCAAACCAGTTTTTTAGCTTCGAAGAAAGATTTCAGGTGG-3’
p26*forward	5’-GATCCCTGAAACGTTTCTTCCAGGACAAACGTCCGGTTCCGACCTGAG-3’
p26*backward	5’-AATTCTCAGGTCGGAACCGGACGTTTGTCCTGGAAGAAACGTTTCAGG-3’
p26forward	5’-GATCCCTGCTGAAATCTTTCTTCACCGAAAAACGTCCGATCTCTTGAG-3’
p26backward	5’-AATTCTCAAGAGATCGGACGTTTTTCGGTGAAGAAAGATTTCAGCAGG-3’
p27forward	5’-GATCCTTCCTGCTGAAATCTTTCTTCTCTGACAAACGTACCACCACCACC CGTGTTGGTTCTTGAG-3’
p27backward	5’-AATTCTCAAGAACCAACACGGGTGGTGGTGGTACGTTTGTCAGAGAAGA AAGATTTCAGCAGGAAG-3’

Die Oligos wurden von der Firma Interactiva (Ulm) synthetisiert und HPLC gereinigt.

6.1.6 Plasmide

Name	**von**	**Insert**
pGEX-2T	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	
pGEX-p24CT	diese Arbeit	p24 cytoplasmatischer Tail
pGEX-p25CT	diese Arbeit	p25 cytoplasmatischer Tail
pGEX-p26CT	diese Arbeit	p26 cytoplasmatischer Tail
pGEX-p26*CT	diese Arbeit	tp24 cytoplasmatischer Tail
pGEX-p27CT	diese Arbeit	p27 cytoplasmatischer Tail

6.1.7 Bakterienstämme

Name	von
BL21 (DE3) LysS	Novagen
DH5α	Life Technologies

6.1.8 Molekulargewichtstandards

SDS-Page: BMW-Marker BioRad (Myosin 200kDa, β-Galactosidase 116kDa, Phosphorylase B 97kDa, Rinderserumalbumin 68kDa, Ovalbumin 45kDa, Carboanhydrase 30kDa, Trypsininhibitor 20kDa, Lysozym 14,3kDa, Aprotinin 6,5kDa)

Gelfiltration: Gelfiltrationsstandard von BioRad (Thyroglobin 670kDa, Rinder-γ-Globulin 158kDa, Ovalbumin 44kDa, Pferde-Myoglobin 17kDa, Vitamin B12 1,35 kDa)

Agarosegele: 1kb Ladder von MBI Fermentas (250 bis 10000kb, 3000kb hervorgehoben)

6.1.9 Proteaseinhibitoren

Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin wurden von Roche (Mannheim), PMSF und 1,10-Phenanthrolin von Serva (Heidelberg) bezogen. Zusätzlich wurden Proteinaseinhibitortabletten von Roche (Mannheim) verwendet.

6.2 Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Puffer und Lösungen

50xTAE:	24,2g	Tris
	57,1ml	Eisessig
	100ml	0,5M EDTA, pH 8,0
	ad 1l	
TE:	10mM	Tris-HCl, pH 8
	1mM	EDTA, pH 8
10xDNA-Probenpuffer:	50%	Glycerin
	0,25%	Bromphenolblau
	10mM	EDTA, pH 8
	mit TE auf 1x verdünnen	
1% Agarose:	2,5g	Agarose
	250ml	1xTAE
	12,5µl	10mg/ml Ethidiumbromid
LB-Medium:	10g/l	Bactotrypton
	5g/l	Hefeextrakt
	5g/l	NaCl
	bei Bedarf mit 100mg/ml Ampicillin supplememtiert.	
LB-Platten:	wie LB-Medium + 1,5% Agar-Agar	
	100mg/ml Ampicillin	
2xYTG:	16g/l	Bactotrypton
	10g/l	Hefeextrakt
	5g/l	NaCl
	100mg/ml Ampicillin	

6.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 1% (soweit nicht anders angegeben) Agarosegelen in TAE-Puffer+Ethidiumbromid. Die Proben wurden mit 0,3 Volumina 1xDNA-Probenpuffer versetzt, aufgetragen und mit 100-150V aufgetrennt. Zur Abschätzung der Größe eines DNA-Fragments wurde die 1kb Ladder (MBI Fermentas, 1:10 in 1x DNA-Probenpuffer verdünnt) benutzt. Als Laufpuffer diente 1x TAE.

6.2.1.3 Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA erfolgte in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem bei der vorgeschriebenen Temperatur. Pro µg DNA wurden 1 bis maximal 10 Enzymeinheiten eingesetzt und 1-2h verdaut. Das Enzymvolumen sollte nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens betragen, da sonst die Enzymreaktion gestört wird. Die verwendeten Enzyme stammten von der Firma NEB.

6.2.1.4 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde das TaKaRa-Ligationskit benutzt und nach Angaben des Herstellers verfahren.

6.2.1.5 Hybridisieren von Oligonukleotiden

Je 1µg pro Oligo wurde mit 2µl T7-RNA-Polymerasepuffer in 20µl Endvolumen gemischt und 5min auf 95°C erwärmt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in ein Wasserbad (ca. 2 l, 95°C) überführt und über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Um die Oligos zu fällen, wurden 80µl H_2O und 100µl 4M Ammoniumacetat zugegeben und gevortext. Nach 15min Inkubation bei -70°C wurden 400µl Ethanol (-20°C) zugegeben und 10min bei 13000rpm, 4°C in einer Tischzentrifuge die gefällte DNA pelletiert. Die Pellets wurden mit 70% Ethanol gewaschen, wie oben zentrifugiert und in 20µl H_2O aufgenommen.

Ob das Annealen erfolgreich war, wurde auf einem 3%Agarosegel getestet (2µl Hybridisierungsansatz pro Spur, 5min 150V)

6.2.1.6 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation wurden käufliche kompetente Zellen verwendet (siehe Bakterienstämme). Die Transformation erfolgte über Hitzeschock nach Angaben der Hersteller.

6.2.1.7 Plasmidisolierung aus *E.coli*

Zur Plasmidisolierung wurden je nach gewünschter Menge an Plasmid Übernachtkulturen (in LB-Medium) unterschiedlicher Volumina benutzt. Es wurde der Mini- oder Midi-Kit von Qiagen benutzt und nach Vorschrift unter Verwendung der vom Hersteller gelieferten Puffer und Lösungen angewendet.

6.2.2 Biochemische Methoden

6.2.2.1 Proteingelelektrophorese

Probenvorbereitung für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Proben wurden vor der SDS-Gelelektrophorese mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5min auf 95°C erhitzt.

SDS-Probenpuffer:	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
	10%	Glycerin (v/v)
	2%	SDS (w/v)
	5%	Mercaptoethanol
	0,05%	Bromphenolblau (w/v)

SDS-Page nach Lämmli (Laemmli, 1970)

Entsprechend der gewünschten Arcylamidkonzentrationen wurden die entsprechenden Mengen der Stammlösungen gemischt, in Gelkassetten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Gel mit dem Sammelgel überschichtet.
Die Gelelektrophorese wurde in 1x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 200V durchgeführt.

Acrylamidlösung:	30%	Acrylamid
	0,8%	N,N'-Methylenbisacrylamid
Trenngelpuffer (TP)	1,5M	Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer (SP)	0,5M	Tris-HCl, pH 6,8
10x SDS-Laufpuffer	250mM	Tris-HCl, pH 8,3
	1,92M	Glycin
	4%	SDS

Acrylamidkonzentration	**10% Trenngel**	**12% Trenngel**	**16% Trenngel**	**Sammelgel**
Acrylamidlösung (ml)	3	4	5,33	0,67
TP (ml)	2,5	2,5	2,5	-
SP (ml)	-	-	-	1,25
H_2O (ml)	4,35	3,35	2,02	3,05
10% SDS (µl)	100	100	100	50
TEMED (µl)	5	5	5	5
10% APS (µl)	50	50	50	25

Die angegebenen Mengen sind ausreichend für zwei Gele der Mini-ProteanII-Apparatur von BioRad, München.

SDS-Tricine-Page nach Schägger (Schagger and von Jagow, 1987)

Bei den SDS-Tricine-Gelen werden Trenn- und Sammelgel kurz hintereinander gegossen. Die Gele wurden über Nacht (mind. 2h) bei 4°C gelagert, damit ein völliges Auspolymerisieren gewährleistet ist.
Zur Gelelektrophorese wurde der Anodenraum mit 1x Anodenpuffer bzw. der Kathodenraum mit 1x Kathodenpuffer gefüllt. Der Lauf wurde 2h bei einer konstanten Spannung von 150V betrieben.

Acrylamidlösung:	48%	Acrylamid (w/v)
	1,5%	N,N'-Methylenbisacrylamid
Gelpuffer	3M	Tris-HCl, pH 8,45
	0,3%	SDS (w/v)
10xAnodenpuffer	2M	Tris-HCl, pH 8,9
10x Kathodenpuffer	1M	Tris-HCl, pH 8,25
	1M	Tricin
	1%	SDS (w/v)

Acrylamidkonzentration	**Sammelgel 4%**	**Trenngel 16,5%**
Acryamidlösung (ml)	1,0	10,0
Gelpuffer (ml)	3,1	10,0
87% Glycerin (ml)	-	4
H_2O (ml)	8,4	6
10% APS (µl)	100	100
TEMED (µl)	10	10

6.2.2.2 TCA-Präzipitation zur Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Proteinprobe wurde mit H_2O auf 445µl verdünnt und mit 50µl 100% Trichloressigsäure (TCA) und 5µl 2% DOC (Natriumdesoxycholat) versetzt. Nach kurzem Vortexen wurde 15min auf Eis inkubiert und bei 13000g, 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1ml eiskaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Aceton entfernt und die Probe zum Verdunsten des Acetons 5min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mit Hilfe von Ammoniakdampf neutralisiert.

6.2.2.3 Färbung von Proteingelen

Coomassie-Färbung

Die Proteingele wurden 30min in der Färbelösung und anschließend bis zum gewünschten Grad der Entfärbung in Entfärbelösung geschüttelt.

Färbelösung:	0,01%	Coomassie Serva Blue G250
	0,04%	Coomassie Serva Blue R250
	20%	Isopropanol
	10%	Eisessig
Entfärbelösung:	10%	Isopropanol
	10%	Eisessig

Silberfärbung modifiziert nach Blum (Blum, 1987)

Das Proteingel wurde 1h oder über Nacht in 30% Ethanol und 10% Essigsäure fixiert. Anschließend wurde zweimal 5min in 10% Ethanol, 1min in Natriumthiosulfatlösung und 20s in Wasser gewaschen. Nach 15minütiger Inkubation in Silbernitratlösung und kurzem Waschen in Wasser (20s), wurde mit Natriumcarbonatlösung entwickelt. Ist

der gewünschte Färbungsgrad erreicht, wurde die Reaktion mit 7% Essigsäure abgestoppt.

Natriumthiosulfatlösung:	10mg	$Na_2S_2O_3$ x 5 H_2O in 50ml H_2O
Sibernitratlösung:	100mg	$AgNO_3$
	50µl	37% Formaldehyd in 50ml H_2O
Natriumcarbonatlösung	3g	Natriumcarbonat
	1ml	Natriumthiosulfatlösung
	25µl	37% Formaldehyd in 50ml H_2O

Silberfärbung nach Protokoll von www.expassy.ch

Diese Silberfärbung benötigt viel mehr Zeit als die Silberfärbung nach Blum, ist aber um ein Vielfaches sensitiver.
Die Proteingele wurden 5min in Wasser gewaschen, 1h in Ethanol:Essigsäure:H_2O (40:10:50) und 2h oder über Nacht in Ethanol:Essigsäure:H_2O (5:5:90) fixiert. Anschließend wurde erneut 5min in H_2O gewaschen und 30min in 1% Glutaraldehyd, 500mM Natriumacetat inkubiert. Nach dreimaligem 10minütigen Waschen in H_2O folgte eine Inkubation von 30 min in 0,005% (w/v) 2,6-Naphthalendisulfonsäure. Dann wurde 4 mal 15min im H_2O gewaschen und die Gele in eine frisch angesetzte Silbernitratlösung überführt und darin 30 min inkubiert. Nach 4 mal 4min Waschen in H_2O, wurde die Färbereaktion mit 0,01% Zitronensäure und 0,1% Formaldehyd gestartet und bei gewünschtem Färbungsgrad mit 5% (w/v) Tris und 7% (v/v) Essigsäure gestoppt.

Silbernitratlösung: 6g $AgNO_3$ in 30ml H_2O schnell mischen mit einer Lösung aus 160ml H_2O, 10ml 25% Ammoniak und 1,5ml 10M NaOH und auf 750ml mit H_2O auffüllen.

6.2.2.4 Westernblot-Analyse

Nach der Proteingelelektrophorese wurden die Proteine durch das Semi-Dry Verfahren auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) transferiert und anschließend über Antikörper analysiert.
Der Transfer erfolgte in der Semi-Dry-Apparatur von BioRad (München). Sieben Filterpapiere (3MM, Whatman) und die PVDF-Membran wurden in der gewünschten Größe zurecht geschnitten. Die ersten zwei Filterpapiere wurden in Anode1-Puffer getränkt und auf der Anodenplatte plaziert. Darüber wurden zwei weitere Filterpapiere, die in Anode2-Puffer getränkt waren, gelegt. Darauf folgte die in Methanol getränkte Membran, das Gel und 3 in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Es wurde darauf geachtet das Gel, die Membran und die Filterpapiere möglichst blasenfrei übereinander zu legen. Zuletzt wurde die Kathodenplatte aufgelegt. Der Transfer erfolgte für 1,5h bei konstant 24V.

Anode1-Puffer:	300mM	Tris, pH 10,4
	20% (v/v)	Methanol
Anode2-Puffer:	25mM	Tris, pH 10,4
	20% (v/v)	Methanol
Kathodenpuffer:	25mM	Tris, pH 9,4
	40mM	6-Aminohexansäure
	20% (v/v)	Methanol

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran mit PonceauS (100mg PonceauS, 100ml H_2O, 1ml Eisessig) gefärbt, um den Transfer zu überprüfen und die Banden des Größenstandards sichtbar zu machen. Nach dem Markieren der gewünschten Banden wurde mit H_2O wieder entfärbt.
Zur Immundetektion wurde die Membran entweder 30min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 5% Milchpulver in PBS +0,05%Tween (PBST) blockiert.
Nach kurzem Waschen der Membran mit PBST wurde mit dem ersten Antikörper (verdünnt in 1%BSA in PBST) 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 5min mit PBST gewaschen und 30min mit dem zweiten Antikörper (verdünnt

nach Angaben des Herstellers in 2% Milchpulver in PBST). Dann wurde 3 mal 10min mit PBST gewaschen und das Signal mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham Pharmacia, Freiburg) detektiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden Fuji Medical X-Ray Filme (über Bechthold Röntgenhandel, Kelkheim) verwendet.
Die Quantifizierung der Banden erfolgte nach Einscannen der Filme mit dem Programm Quantity-One von BioRad, München.

PBS:	35,7mM	Na_2HPO_4
	14,3mM	KH_2PO_4
	136mM	NaCl
	3mM	KCl

6.2.2.5 2-D-Gelelektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten

Probenvorbereitung

Für analytische Ansätze (Silber-färbbare Mengen) wurden 100µg Golgi aus Kaninchenleber, 100µg Cytosol aus Rinderhirn oder drei 30ml Ansätze von COPI-Vesikeln benutzt. Für präparative Ansätze (Coomassie-färbbare Mengen) wurden 2mg Golgi oder Cytosol eingesetzt. Der Golgi und die Vesikel wurden pelletiert (30min, 45000rpm, 4°C, TLA-45) und das Pellet in 2D-Solubilisierungspuffer (2D-Sp) resuspendiert. Das Cytosol wurde in 2D-Sp aufgenommen. Je nachdem welche Streifengröße für die erste Dimension gewählt wurde, wurde die Probe in unterschiedlichen Volumina aufgenommen (11cm: 220µl, 18cm: 380µl).

2D-Solubilisierungspuffer:	5M	Harnstoff
	2M	Thioharnstoff
	2% (w/v)	CHAPS
	2% (w/v)	Caprylyl-Sulfobetain (SB 3-10)
	2mM	Tributylphosphin (TBP)
	0,5% (v/v)	Biolyte 3-10 (BioRad)

Die erste Dimension: Isoelektrische Fokusierung

Die erste Dimension besteht aus einer isoelektrischen Fokusierung und wurde mit käuflichen immobilisierten pH-Gradienten (Immobiline™ DryStrips, Amersham Pharmacia) in der IPGphor (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Es wurden 11cm und 18cm Streifen mit pH-Gradienten von 3 bis 10 und von 4 bis 7 benutzt. Die Probe wurde in die Keramikschiffchen der entsprechenden Größe pipettiert, der dehydrierte pH-Gradientenstreifen luftblasenfrei aufgelegt und darauf mit Parafinöl überschichtet. Die pH-Gradientenstreifen wurden 12h bei 20°C und 50V rehydratisiert. Darauf folgte die isoelektrische Fokusierung. Rehydratisierung und isoelektrische Fokusierung wurden beide in den IPGphor programmiert.

Programm: Rehydratation 0h, 20°C
IF-parameters 20°C, 50µA/strip
50V, step-n-hold, 12h (Rehydratisierung)
100V, step-n-hold, 1h
300V, step-n-hold, 1h
500V, step-n-hold, 1h
1000V, step-n-hold, 1h
6000V, Gradient, 1h
6000V, step-n-hold, 12h
25h, ca 50kV/h

Die zweite Dimension: SDS-Page

Nach der ersten Dimension wurden die Gelstreifen aus den Keramikschiffchen entfernt und je 15min in Äquilibrierungspuffer mit 2%(w/v) DTT und Äquilibrierungspuffer mit 2,5%(w/v) Iodacetamid inkubiert. Darauf wurde der Gelstreifen auf ein 16% SDS-Page Gel (nach Lämli) aufgelegt und mit 1%Agarose in SDS-Laufpuffer befestigt. Der Lauf erfolgte bei 10°C und konstant 200V für ca. 8h in der IsoDalt-Apparatur von Höfer, in der bis zu 10 Gele gleichzeitig gefahren werden können. Analytische Gele wurden anschließend Silber gefärbt mit der Methode nach expassy. Präparative Gele wurden Coomassie gefärbt, wobei das Gel über Nacht in der Färbelösung inkubiert wurde.

Äquilibrierungspuffer:	50mM	Tris-HCl, pH 8,8
	6M	Harnstoff
	30%(w/v)	Glycerin
	2%(w/v)	SDS

6.2.2.6 Quantitative Methoden

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit dem Bradford-Reagenz der Firma BioRad durchgeführt. Die Probe wurde mit H_2O auf 800µl aufgefüllt und anschließend mit 200µl Bradford-Reagenz gemischt. Anschließend wurde in einem ELISA-Reader die Absorption bei 620nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde aus einer parallel erstellten Standardgerade von 2,5 bis 25µg BSA als Eichprotein ermittelt.

Phosphatbestimmung nach Rouser (Rouser, 1970)

Vor der Phosphatbestimmung wurde eine saure Lipidextraktion (Bligh, 1959) durchgeführt. Für die Lipidextraktion wurden 10ml Glasgefäße (Neolab, Heidelberg) mit Schraubdeckeln verwendet. Zu einem Volumen wässriger Probe wurden 3,75 Volumen Bligh & Dyer-Lösung, ein Volumen Chloroform und ein Volumen H_2O (p.a. Merck) nacheinander unter Vortexen zugegeben. Die Phasentrennung wurde durch 10min Zentrifugieren bei 200g beschleunigt. Nach Abnahme der Chloroformphase wurde diese mit einem Volumen H_2O und die methanolische Phase mit einem Volumen Chloroform versetzt, gevortext und wie oben zentrifugiert. Die H_2O gewaschene Chloroformphase wurde in ein neues Glasgefäß überführt, die durch die Reextraktion gewonnene Chloroformphase mit einem Volumen H_2O gewaschen und anschließend beide Chloroformphasen in einem Glasgefäß vereinigt. Nach Verblasen des Lösungsmittels unter einem leichten Stickstoffstrom wurde der Extrakt bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Bligh & Dyer-Lösung:	50 Teile Chloroform
	100 Teile Methanol
	1,5 Teile HCl

Die Quantifizierung erfolgte im nmol-Bereich nach Rouser (Rouser, 1970). Für die Inkubation bei hohen Temperaturen wurden die Deckel der 10ml-Glasgefäße nicht vollständig geschlossen. Zu den getrockneten Lipidproben wurden jeweils 300µl 70% Perchlorsäure gegeben und nach kurzem Vortexen für 40min bei 180°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden nacheinander 1ml H_2O, 400µl Ammoniummolybdat-Lösung (1,25% in H_2O) und 400µl Ascorbinsäure (5% in H_2O) zugegeben, wobei nach jeder Zugabe kurz gevortext wurde. Nach der Inkubation bei 100°C für 5min wurde nach dem Abkühlen der Proben die Absorption bei 797nm photometrisch gegen einen Blindwert bestimmt. Bei dem Blindwert handelt es sich um eine Lipidextraktion, die mit Probenpuffer ohne Membran durchgeführt wurde. Die Eichgerade wurde mit einer Phosphatidylcholin-Stammlösung erstellt. Dazu wurden 0, 4, 10, 20, 40, 60 und 80nmol vorgelegt, das Lösungsmittel verblasen und dann parallel mit den Proben behandelt.

Quantitative Phospholipidanalytik mittels nano-ESI-MS/MS

Für die quantitative Phospholipidanalytik wurde die Lipidextraktion in Gegenwart von Phospholipidstandardlösungen durchgeführt. Die in Chloroform/Methanol (1:2) gelösten synthetischen Phospholipide wurden der Bligh & Dyer Lösung vor Zugabe der wässrigen Probe zugesetzt. Die Lipidextraktion und anschließende quantitative Phospholipidanalytik wurde dankenswerterweise von Dr. B. Brügger wie oben beschrieben bzw. nach (Brugger et al., 1997) durchgeführt.

6.2.2.7 Markerenzymbestimmungen

Galaktosyl-Transferase nach (Brew et al., 1975)

10µl Probe wurden mit 40µl Testmix gemischt und 1h bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde anschließend auf Filterpapier (1MM Whatman) getropft. Nach kurzem Antrocknen wurde 15min in 10% TCA, 3 mal kurz in H_2O und 3mal 5min in H_2O gewaschen. Nach vollständigem Trocknen des Filterpapiers mit Hilfe eines Heißluftföns, wurde es in 5ml Szintillationsgefäße überführt und mit 3ml

Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillationsmeßgerät.

Testmix:	253µl	H_2O
	25µl	1M Tris-HCl, pH 6,8
	5µl	20% (w/v) Triton X-100
	20µl	1M $MnCl_2$
	50µl	10mg/ml Ovalbumin
	25µl	40mM ATP
	1,2µl	25mM UDP-Galaktose
	1µl	^{3}H-UDP-Galaktose (Amersham)

NADH-Cytochrom C-Reduktase nach (Warnock et al., 1993)

In einer Elisa-Platte wurden 50µl CytochromC und 50µl Probe vorgelegt. Nach Erreichen einer konstanten Basislinie bei einer Wellenlänge von 552nm wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50µl NADH gestartet. Über einen Zeitraum von 2min wurden alle 15s die Absorptionswerte registriert.

Lösungen:	1mg/ml NADH in 0,001% Saponin
	5mg/ml Cytochrom C (ox.) in PBS, pH 8,0

Alkalische Phosphodiesterase nach (Warnock et al., 1993)

100µl Probe wurden in eine Elisa-Platte pipettiert, mit 100µl Substratmix gemischt und die Absorptionsänderung pro Zeit bei 405nm im Elisa-Reader bestimmt.

Substratmix:	5mM	Na-p-Nitrophenyl-5'-thymidylat
	200mM	Tris-HCl, pH 8,9
	0,2% (v/v)	NP-40

6.2.2.8 Immunpräzipitation

50µg Membran (z.B. Golgi) wurden mit PBS+1%BSA 1:5 verdünnt und pelletiert (13000 rpm, 30min, 4°C, Tischzentrifuge). Das Pellet wurde mit 500µl IP-Puffer resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut wie oben zentrifugiert und der Überstand (solubilisierte Membran) zur Immunpräzipitation eingesetzt.

20µl ProteinA-Sephorosebeads (Amersham Pharmacia) wurden 2 mal mit 1ml PBS+0,5% Milchpulver gewaschen (13000rpm, 2min, 4°C). Danach wurden 20µl Antikörperserum zu der ProteinA-Sepharose gegeben und mit PBS+0,5% Milchpulver auf 500µl aufgefüllt und 90min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose 2 mal mit 1ml IP-Puffer gewaschen. Die solubilisierte Membran wurde zu der ProteinA-Sepharose gegeben und 90min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschlißend wurde 4mal mit 1ml IP-Puffer uns einmal mit 1ml PBS gewaschen und die Protein A-Sepharose mit 20µl SDS-Proteinprobenpuffer eluiert.

IP-Puffer:	20mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150mM	NaCl
	2mM	EDTA
	1% (w/v)	NP-40

6.2.2.9 Immunisolation von COPI-Vesikeln mit Dynabeads

250µl COPI-Vesikel aus einem 30ml-Ansatz wurden mit 20 µl Antikörper in 1ml Isopuffer+Milchpulver in silikonisierten Eppendorfgefäßen für 2h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 500µl H2O zugegeben und 30min bei 45000rpm und 4°C im TLA-45-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl Isopuffer+Milchpulver resuspendiert und zu 50µl Dynabeads M-280-Anti-Kaninchen gegeben , die zuvor dreimal mit 500µl Isopuffer+Milchpulver gewaschen wurden. Nach zweistündiger Inkubation in einem Eppendorfmixer bei 4°C und Stufe 14, wurden die Dynabeads 3 mal mit Isopuffer+Milchpuver und einmal mit Isopuffer gewaschen. 75% der Dynabeads wurden mit 10µl SDS-Proteinprobenpuffer eluiert. Die übrigen Dynabeads wurden für die Elektronenmikroskopie fixiert und osmiert.

Isopuffer:	150mM	KCl
	10mM	HEPES, pH 7,2
	2,5mM	Mg-Acetat
	0,2M	Saccharose
Isopuffer+Milchpulver:	+ 0,5 mg/ml	Milchpulver

6.2.2.10 Präparation von Golgi aus CHO- und s-Hela-Zellen

8-9 l Spinnerkulturen von CHO- oder s-Hela Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von 4-6 x 10^5 Zellen/ml kultiviert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen durch Zentrifugation (10min, 500g, 4°C) pelletiert und anschließend zweimal mit PBS und einmal mit Homogenisationspuffer gewaschen. Nach Bestimmen des Volumens wurden die Zellen im vierfachen Volumen Homogenisationspuffer resuspendiert und mit Hilfe eines Balch-Homogenisators aufgeschlossen.
Zu 10ml Aufschluß wurden 9,1ml 62% Saccharoselösung und 192µl 100mM EDTA, pH 7,1 gegeben. Mittels eines Refraktometers wurde die Saccharosekonzentration überprüft und gegebenenfalls mit 10mM Tris-HCl, pH 7,4 oder 62% Saccharoselösung auf 37% eingestellt. In SW28-Zentrifugenröhrchen wurden 12ml Homogenat mit 15ml 35% Saccharoselösung und 9ml 29% Saccharoselösung überschichtet und 2,5h bei 25000rpm und 4°C im SW28-Rotor zentrifugiert. Der Golgi reichert sich an der Interphase zwischen 35 und 29% Saccharose an und wurde durch Anstechen des Röhrchens mit einer Kanüle in eine 5ml Spritze gesaugt. Pro Gradient wurden ca. 2-2,5ml „gezapft“. Die gepoolten Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

Homogenisationpuffer:	250mM	Saccharose
	10mM	Tris-HCl, pH 7,4
29% Saccharoselösung:	29 % (w/w) Saccharose in 10mM Tris-HCl, pH 7,4	

35% Saccharoselösung:	35% (w/w) Saccharose in 10mM Tris-HCl, pH 7,4
62% Saccharoselösung:	62% (w/w) Saccharose in 10mM Tris-HCl, pH 7,4

6.2.2.11 Präparation von Golgi aus Rattenleber

Sechs adulte Spargue-Dawley oder Wistar Ratten wurden für 24h auf Hunger gesetzt. Bevor die Ratten getötet wurden, wurden 6 diskontinuierliche Gradienten bestehend aus 13ml Puffer D, unterschichtet mit 7,5ml Puffer E in SW28-Zentrifugenröhrchen gegossen und bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gelagert. Die Ratten wurden mit Ether narkotisiert, mit einem Schnitt durch die Halsschlagader getötet, die Lebern schnell entfernt und in 200ml Puffer C gewaschen. Zu 48g Leber wurde 100ml frischer Puffer C gegeben und die Leber in Stücke geschnitten, um möglichst viel Blut zu entfernen. Der überschüssige Puffer wurde entfernt (maximales Endvolumen 80ml) und die Leber mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten (4-5mm). Das Gewebe wurde durch Pressen durch ein 150µm- Stahlsieb homogenisiert, das Homogenat in einen 100ml Standzylinder überführt und mit Puffer C auf 80ml aufgefüllt. Der zum Homogenisieren verwendete Puffer C wurde mit Proteinase-Inhibitortabletten von Roche (Mannheim) versetzt. Die vorgegossenen Gradienten wurden mit je 13ml Homogenat überschichtet und im SW28-Rotor 1h bei 28000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Lipidschicht auf dem Gradienten wurde entfernt und die Golgifraktion mit einer Pasteurpipette von der Zwischenschicht zwischen Puffer C und D abgesaugt. Es wurden ca. 2-3ml pro Gradient geerntet. Die gepoolten Golgifraktionen wurden mit Puffer A auf 0,25M Saccharose eingestellt. Der verdünnte Golgi wurde auf zwei neue SW28-Röhrchen verteilt, die mit Puffer B vorsichtig aufgefüllt und mit 100µl Puffer E unterschichtet wurden. Nach 30min Zentrifugation bei 7000rpm und 4°C im SW28-Rotor wurde der Überstand verworfen und die zwei Pellets in 4ml Puffer B resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde mit Puffer B auf 38ml aufgefüllt, in ein neues SW28-Röhrchen überführt und mit 100µl Puffer E unterschichtet. Nach erneuter Zentrifugation wie zuvor wurde der

Überstand entfernt und das Pellet in ca. 2ml Puffer B aufgenommen. Der Golgi wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

Puffer	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
Saccharose-konzentration (M)	0	0,25	0,5	0,86	1,3
0,5M Kaliumphosphat, pH 6,7 (ml)	20	40	80	20	12
2M Saccharose in H_2O (ml)	-	25	100	43	39
2M $MgCl_2$	0,25	0,5	1	0,25	0,15
H_2O (ml)	79,8	134,5	219	36,8	8,9
Endvolumen (ml)	100	200	400	100	60

6.2.2.12 Präparation von Golgi aus Kaninchenleber nach (Tabas and Kornfeld, 1979)

Drei 6-10 Wochen alte Kaninchen wurden einen Tag auf Hunger gesetzt und am nächsten Tag geschlachtet. Die Leber wurde entnommen und nach Entfernen der Gallenblase zum Transport auf Eis in 0,5M Saccharose, 10mM Tris-HCl, pH 7,4 aufbewahrt. Die Lebern wurden im Kühlraum auf Eis mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, gewogen und im vierfachen Volumen 0,5M Saccharose; 10mM Tris-HCl, pH 7,4; 2mM EDTA, pH 7 aufgenommen. Die Homogenisation erfolgte mit dem Ultrathurax (3x20s, Stufe 7 mit je 20s Kühlpause). Das Homogenat wurde 10min bei 650g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand durch 4 Lagen Mull filtriert. Je 30ml Überstand wurden in ein SW28-Röhrchen gegeben und mit 8ml 1,25M Saccharose, 10mM Tris-HCl, pH 7,4 unterschichtet und 1,5h und 25000rpm bei 4°C im SW28-Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Fettschicht entfernt und die Golgimembranen mit einer Pasteurpipette von der 0,5M-1,25M Saccharose-Interphase geerntet. Die gepoolten Membranen wurden mit 2M Saccharose, 10mM Tris-HCl, pH 7,4 auf 1,2 M Saccharose eingestellt. Maximal 14ml dieser Membranen wurden in neue SW28-Röhrchen gegeben und mit 10ml 1,1M Saccharose, 10mM Tris-HCl, pH7,4; 10ml 1M Saccharose, 10mM Tris-HCl, pH7,4 und 4-5ml 0,5M Saccharose, 10mM Tris-HCl, pH7,4 überschichtet. Nach erneuter

Zentrifugation im SW28-Rotor bei 25000rpm und 4°C für 2,5h wurde die Golgibande von der Zwischenschicht zwischen 0,5M und 1M Saccharose mit einer Kanüle abgezogen. Die gepoolten Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

6.2.2.13 Präparation von Cytosol aus Rinderhirn nach (Wattenberg and Rothman, 1986)

Drei Rinderhirne wurden so schnell wie möglich nach der Schlachtung entnommen und in Transportpuffer überführt. Nach Entfernen der Blutgefäße, der Hirnhaut, dem Kleinhirn und der weißen Substanz wurden die Gehirne in Transportpuffer gewaschen und gewogen. Zu 500g Gehirn wurden 600ml Aufschlußpuffer gegeben. Die Homogenisation erfolgte im Waring Blendor in drei Schritten (15s Stufe 1, 15s Stufe 2 und 30s Stufe 2 mit jeweils 1minütigen Kühlpausen). Anschließend wurde das Homogenat 1h bei 12000rpm, 4°C im HF12500-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde in TFT-Röhrchen überführt und 1,5h bei 44000rpm und 4°C im TFT50.38-Rotor zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde mit Hilfe einer Millitan-Apparatur (Millipore, Eschborn) auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens ankonzentriert. Das ankonzentrierte Cytosol wurde 2h und anschließend über Nacht gegen jeweils 30l Dialysepuffer dialysiert. Am nächsten Tag wurde nochmals 1,5h bei 44000rpm und 4°C im TFT50.38-Rotor zentrifugiert. Dann wurde das Cytosol aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert.

Transportpuffer:	320mM	Saccharose
	25mM	Tris-HCl, pH 7,4

Aufschlußpuffer:	500mM	KCl
	250mM	Saccharose
	25mM	Tris-HCl, pH 8
	2mM	EGTA
	1mM	DTT
	1mM	PMSF
	0,5mM	1,10-Phenanthrolin
	2mg/ml	Aprotinin
	0,5mg/ml	Leupeptin
	2µM	PepstatinA

Dialysepuffer:	50mM	KCl
	25mM	Tris-HCl, pH 8
	1mM	DTT

6.2.2.14 Präparation von Cytosol aus Rattenleber

Sechs männliche Wistarratten wurden mit Ether narkotisiert, durch einen Schnitt in die Halsschlagader getötet und die Lebern entnommen. Die Lebern wurden auf 4 Portionen a 9g verteilt und in jeweils 90ml Puffer H aufgenommen. Die Homogenisation erfolgte mit dem automatischen Potter bei 800rpm. Nach einer Zentrifugation von 10min mit 9000rpm und 4°C im JA-20-Rotor wurden die Überstände vereinigt und 1h bei 33000rpm und 4°C im TFT50.38-Rotor zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände nochmals 1,5h bei 44000rpm und 4°C im TFT50.38-Rotor zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde im Zeitraum von 20min auf 60% Ammoniumsulfat eingestellt (60% = 109,2g auf 280ml) und für weitere 30min bei 4°C gerührt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation von 30min und 7000g bei 4°C im HF12500-Rotor pelletiert. Die Pellets wurden in 10ml Dialysepuffer aufgenommen, resuspendiert und mit dem Potter homogenisiert. Es folgte eine Dialyse von 3h und eine über Nacht gegen jeweils 4l Dialysepuffer.

Puffer H: 165mM KOH
50mM HEPES, pH 7,55 (wurde mit Eisessig eingestellt)
2mM $Mg(OAc)_2$
+ Proteinase-Inhibitortabletten (Roche)
+1mM DTT nach der ersten Zentrifugation

Dialysepuffer: 25mM HEPES-KOH, pH 7,2
100mM KCl
1mM DTT

6.2.2.15 Generierung von COPI-Vesikeln nach (Serafini et al., 1991)

Zur Generierung von COPI-Vesikeln *in vitro* wurden Golgimembranen mit Cytosol, ATP-regenerierendem System und einem nicht-hydrolysierbaren Analog von GTP bei 37°C inkubiert.
30ml-Reaktionsansatz:

Lösungen	Volumen in µl
10x Assaypuffer	3000
2M KCl	240
100mM DTT	375
40mM ATP	375
100 mM UTP	75
66,7mg/ml Kreatinphosphat	750
4mg/ml Kreatinkinase	250
10mg/ml RNAse A	75
Rinderhirncytosol (35mg/ml)	2,05
Golgi (ca. 0,6mg/ml)	6000
GTPγS	60

Der Reaktionsansatz wurde mit H_2O auf 30ml aufgefüllt. Die Saccharosemenge sollte nach Zugabe der Membranen 0,2M und die KCl-Konzentration 20mM sein.

Golgimembranen wurden in einer Konzentration von 50-120µg/ml, Cytosol in einer Konzentration von 2,4mg/ml eingesetzt.

1 oder 1,5ml-Reaktionsansatz:

Golgimembranen und Cytosol wurden bezogen auf Protein in einem Verhältnis von 1:60 oder 1:120 eingesetzt. Um in diesem kleinen Volumen arbeiten zu können, wurden die Golgimembranen durch Zentrifugation auf ein 35% Saccharosekissen (1h, 55000rpm, 4°C, SW55-Rotor) pelletiert und in 1xAssaypuffer aufgenommen.

Lösung	**Volumen in µl**
10x Assaypuffer	150
4mg/ml Kreatinkinase	3,75
500mM Kreatinphoshat	15
10mg/ml RNAse A	3,75
40mM ATP	1,875
1M DTT	1,5
Cytosol (26,9mg/ml)	1116
Golgi (1mg/ml)	200
10mM GMP-PNP	15

Die Reaktionsansätze wurden 25min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend 10min auf Eis abgekühlt. Um die Golgimembranen zu pelletieren, wurden die 30ml Ansätze im JA-20-Rotor 20min bei 14000rpm 4°C und die 1,5ml-Ansätze in einer Tischzentrifuge 30min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 600µl LSSB resuspendiert, 5min auf Eis inkubiert und 20min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 600µl HSSB+S resuspendiert, 15min auf Eis inkubiert und 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nochmals für 15min wie oben zentrifugiert. 550µl des Überstandes wurden mit 170µl 55% Saccharose in HSSB gemischt und auf einen Gradienten von 50 bis 25% Saccharose in HSSB (Stufen von jeweils 5%, pro Stufe 720µl) aufgesetzt. Durch Zentrifugation von 18h bei 33000rpm und 4°C im SW55-Rotor wurden die COPI-Vesikel in ihr Gleichgewicht bei 41%

Saccharose zentrifugiert. Es wurden von unten 18 Fraktionen à 250µl gezapft. Die Vesikel befanden sich immer in den Fraktionen um 40% Saccharose. Dies wurde jedoch durch Westernblot mit mehreren Antikörpern überprüft.

10xAssaypuffer:	250mM	HEPES-KOH, pH 7,0
	25mM	Magnesiumacetat
LSSB:	50mM	KCl
	25mM	HEPES-KOH, pH 7,2
	2,5mM	Magnesiumacetat
	0,2M	Saccharose
HSSB:	250mM	KCl
	25mM	HEPES-KOH, pH 7,2
	2,5mM	Magnesiumacetat
HSSB+S:	0,2M	Saccharose in HSSB

6.2.2.16 Subzelluläre Fraktionierung von Hela-Zellen

Zwei Liter Spinnerkultur von s-Hela-Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von 4-6 x 10^5 Zellen/ml wachsen gelassen. Die Zellen wurden 10min mit 500g und 4°C pelletiert, 2 mal in PBS und 1mal in 1xK-Hop gewaschen. Das Naßgewicht des Zellpellets wurde bestimmt und das Pellet im gleichen Volumen 1xK-Hop+Proteinaseinhibitoren (Roche) aufgenommen. Zur Homogenisation wurden die Zellen zunächst mit einer 1ml Gilsonpipette gut resuspendiert und dann durch Kanülen mit unterschiedlichem Durchmesser gepresst (5x22G, 5x26G, 3x27G). Der Aufschluß wurde stets mit dem Mikroskop kontrolliert. Das Homogenat wurde 5min bei 1000g, 4°C zentrifugiert um unaufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und Zellkerne zu entfernen. Der Überstand wurde auf einen Gradienten, bestehend aus einem 660µl 40% Nycodenzkissen in 1xK-Hop und einem 10ml linearen Gradienten

von 25 bis 5% Nycodenz in 1xK-Hop, aufgesetzt. Es folgte eine Zentrifugation von 1h bei 28500rpm und 4°C im SW41-Rotor in der Ultrazentrifuge Optima Beckman (maximale Anfangsbeschleunigung und langsames Abbremsen). Es wurden 18 Fraktionen à 665µl von oben gezapft. Zur weiteren Analyse der Membranen wurde ein Teil der Fraktionen 1:1 mit 1xK-Hop verdünnt und 1h bei 45000rpm und 4°C im TLA-45-Roter pelletiert. Für die 15°C-Block-Versuche wurden die Zellen 10min bei 500g, 4°C pelletiert und in 15°C kaltes, carbonatfreies (mit 50mM HEPES-KOH, pH7,2 gepuffertes) Medium überführt und 2,5h in einer Spinnerflasche bei 15°C inkubiert. Für die Aufhebung des 15°C-Blocks wurden die Zellen für die entsprechenden Zeiten in 37°C warmes Medium überführt und in Spinnerflaschen im Brutschrank weiter inkubiert. Die Ernte der Zellen und deren Aufschluß erfolgte wie oben beschrieben.

6.2.2.17 Metabolische Markierung von Hela-Zellen

s-Hela Zellen wurden auf 10cm-Schalen wachsen gelassen, bis sie zu 80% konfluent waren. Anschließend wurden sie abtrypsiniert, pelletiert (10min, 500g, 4°C) und pro Platte in 5ml Hungermedium aufgenommen. Nach 1,5h Inkubation der Zellen bei 37°C wurden 100µCi/ml ^{35}S-Methionin (Amersham Pharmacia) zugegeben. Ein kleiner Teil der Zellen wurde vor Zugabe der Radioaktivität abgenommen, um die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer zu bestimmen. Eine Probe wurde 3h bei 15°C und eine 3h bei 37°C inkubiert. Durch Vergleich der eingebauten Radioaktivität sollte bestimmt werden, ob und wieviel Proteinsynthese in diesem Zeitraum bei 15°C stattfindet. Zwei weitere Proben wurden 1h bei 37°C radioaktiv markiert. Eine Probe davon wurde weitere 3h bei 37°C in Medium mit einem Überschuß an Methionin (5mM) inkubiert. Bei diesem Ansatz sollte ermittelt werden, wieviel Protein in 3h abgebaut wird. Nach den wie oben angegebenen Inkubationen, wurden die Zellen geerntet (500g, 10min, 4°C), in 250µl Lysepuffer aufgenommen, 30min auf Eis inkubiert und 5min bei 13000rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Pro Ansatz wurden 1x10^5 Zellen pro Spur mit 10µl SDS-Proteinprobenpuffer versetzt und auf ein Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, mit einem Geltrockner getrocknet und für unterschiedliche Zeiten Filme (Biomax, Kodak)

aufgelegt. Zur Quantifizierung wurden die Filme eingescannt und über das Quantifizierungsprogramm Quantity One (BioRad) ausgewertet.

Hungermedium:	RPMI-Medium ohne Methionin	
	50mM	HEPES-KOH, pH 7,4
	10%	dialysiertes FKS
Lysepuffer:	20mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150mM	NaCl
	2mM	EDTA
	1%(w/v)	NP-40

6.2.2.18 Überexpression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Nach dem Klonieren der cytoplasmatischen Tails von p24, p25, p26, p27 und tp24 in den pGEX-2T Vektor wurden die Sequenzen der erhaltenen Klone durch Sequenzieren überprüft (SeqLab, Göttingen). Die getesteten Plasmide wurden in BL21 LysS-Zellen transformiert und die Bedingungen für die Überexpression ausgetestet. Alle getesteten Klone zeigten ohne Induktion durch IPTG keine Expression. Die maximale Expression wurde 3h nach Induktion mit 1mM IPTG erreicht.Zur Überexpression wurden die Klone p24-3, p25-1, p26-1, p27-2 und p26*-2 (tp24) benutzt.

20ml Vorkultur (in 2xYTPG) wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. 200ml Hauptkultur wurden mit je 10ml Vorkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bis zu einer OD von 0,6-0,8 wachsen gelassen und dann mit 2ml 0,1M IPTG induziert. Nach 3h wurden die Zellen pelletiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei –80°C gelagert. Ein Pellet aus 100ml Kultur wurde in 5ml PBS resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Dann wurden 50µl Lysozym (40mg/ml) und 50µl DNase (40mg/ml) zugegeben und auf einem Drehrad 30min bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 250µl 20% (w/v) TritonX-100, wurden weitere 10min bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Die lysierten Zellen wurden in ein 15ml Falcongefäß überführt und 30min bei 4000rpm und 4°C (Haereus) zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert oder sofort weiterverwendet.

Der Überstand aus der Lyse wurde in Eppendorfgefäße überführt und 10min bei 13000rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 100µl Glutathion-Sepharose (50% in PBS; Amersham Pharmacia) zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Drehrad, wurde die Sepharose sedimentiert (500g, 5min) und der Überstand abgenommen (=ungebundenes Protein). Anschließend wurde 3 mal mit 500µl kaltem PBS gewaschen und 3 mal mit 50µl Elutionspuffer eluiert, wobei jeweils 10min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert wurde. Um die Elution zu überprüfen, wurde die Sepharose zum Schluß mit 50µl SDS-Proteinprobenpuffer eluiert.

Elutionspuffer:	10mM reduziertes Glutathion
	50mM Tris-HCl, pH 8,0
	immer frisch ansetzen

6.2.2.19 Solubilisierung von Membranproteinen

Zum Solubilisieren von Membranproteinen wurden mehrere Detergenzien unter verschiedenen Pufferbedingungen (siehe Ergebnisse) getestet. 50µg Golgi aus Kaninchenleber wurde mit PBS 1:5 verdünnt und pelletiert (15min, 45000rpm, 4°C, TLA-45). Das Pellet wurde in 50µl Puffer + Detergenz resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1h wie oben zentrifugiert, das Pellet in SDS-Proteinprobenpuffer resuspendiert, der Überstand TCA gefällt und ebenfalls in SDS-Proteinprobenpuffer aufgenommen. Über Westernblot-Analyse wurde getestet, wieviel des Proteins von Interesse im Pellet (d.h. unlöslich) bzw. im Überstand (d.h. löslich) war.

6.2.2.20 Größenbestimmung von Proteinkomplexen über Gelfiltration

Zur Größenbestimmung von Membranproteinkomplexen über Gelfitration müssen die Membranproteine über ein geeignetes Detergenz in Lösung gebracht werden. Geeignet bedeutet, daß die gewünschten Proteine sich gut solubilisieren lassen, daß das Detergenz aber möglichst mild ist, um Proteinkomplexe nicht aufzulösen. Das Detergenz sollte eine kleine Mizelle bilden und möglichst nicht den Ablauf der

Gelfiltration stören. Im Fall der p24-Proteine stellte sich das Detergenz Octylglucosid (Calbiochem) als das am besten geeigneteste heraus. Es wurden jeweils 50nmol Phospholipid der unterschiedlichen Membranen für die Solubilierung eingesetzt und wie in 1.2.2.19 beschrieben verfahren (Ausnahme: Zentrifugation zum Pelletieren der Membranen 1h und nach Solubilisieren 30min). Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde über eine Superdex200-Säule im SMART-System (Amersham Pharmacia) aufgetrennt. Der verwendete Laufpuffer entsprach dem Solubilisierungspuffer mit weniger Detergenz (1% statt 4%). Der Lauf erfolgte mit einem Fluß von 50µl/min. Nach 0,7ml Elutionsvolumen wurden 40 Fraktionen à 50µl gesammelt. Die Fraktionen 9 (Ausschlußvolumen) bis 32 (Einschlußvolumen) wurden TCA gefällt und über Westernblot analysiert. Die Eichung der Säule wurde mit löslichen Proteinen und Membranproteinen durchgeführt (siehe Ergebnisse).

Solubilisierungspuffer:	20mM	HEPES-KOH, pH 6,8
	50mM	NaCl
	4% (w/v)	Octylglucosid

6.2.2.21 Koppeln von Peptiden an KLH zur Antikörpergewinnung

Zur Herstellung von Antikörpern wurden Peptide mit Hilfe von Glutaraldehyd an KLH gekoppelt. 8mg Peptid wurden in 800µl und 10mg KLH in 1ml PBS gelöst und gemischt (KLH : Peptid ca. 1:40). Zur Quervernetzung wurden im Abstand von 5 min 5 mal gleiche Volumina an 5% Glutaraldehyd zugegeben bis eine Endkonzentration von 0,1 % erreicht war. Anschließend wurde 30 min auf Eis inkubiert. Zur Blockierung wurde 1M Glycin pH 8,5 bis zu einer Endkonzentration von 25mM zugegeben.

6.2.2.22 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Affinitätsreinigung von Antikörpern wurden die zur Immunisierung benutzten Peptide an Thiopropylsepharose (Amersham Pharmacia, Freiburg) gekoppelt. 375mg Thiopropylsepharose wurden in 5ml Kopplungspuffer aufgenommen und 15min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Durch 2-minütige Zentrifugation wurde die Sepharose pelletiert und der Überstand abgesaugt. Nach Aufnehmen der

Sepharose in 2ml Kopplungspuffer, wurde diese in ein 2ml-Eppendorfgefäß überführt, nochmals wie oben zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. In der Zwischenzeit wurden 2,7mg Peptid in 500µl Kopplungspuffer gelöst, die dann zu der Sepharose gegeben wurden. Der Sepharose-Peptid-Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Um den Überstand zu entfernen wurde die Sepharose 1min bei 13000rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Anschließend wurde sie mit Blockierungspuffer in ein 15ml-Greiner-Röhrchen überführt und fünfmal 5min mit 10ml Blockierungspuffer gewaschen (5min auf Drehrad; 1min, 3000rpm). Durch 10min Inkubation in 10ml Blockierungspuffer + 200µM β-Mercaptoethanol bei Raumtemperatur auf dem Drehrad wurden alle noch verbliebenen reaktiven Gruppen blockiert. Nach zweimaligem 5minütigen Waschen in Blockierungspuffer, dreimaligem 5-minütigen Waschen mit Kopplungspuffer wurde das an Thiopropylsepharose gekoppelte Peptid in PBS +0,02% Azid überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Kopplungspuffer:	100mM	Tris-HCl, pH 7,5
	500mM	NaCl
	1mM	EDTA
Blockierungspuffer:	100mM	Na-Acetat, pH 4,5
	500mM	NaCl

Für die Affinitätsreinigung der Antikörper wurde das an Thiopropylsepharose gekoppelte Peptid zweimal mit 10ml PBS gewaschen. Das Antikörperserum (5ml) wurde 15min bei 4°C und 10000g zentrifugiert und der Überstand zur Sepharose gegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Der Überstand wurde nach 1minütiger Zentrifugation bei 3000rpm und 4°C verworfen, die Sepharose dreimal mit PBS gewaschen und in eine Säule überführt. Die erste Elution erfolgte mit 10ml Glycinpuffer, wobei 1ml-Fraktionen gesammelt wurden. In die Eppendorfgefäße wurde jeweils 50µl 1M Tris-HCl, pH 8,8 vorgelegt, um die eluierenden Antikörper so schnell wie möglich wieder zu neutralisieren. Nach Waschen der Säule mit 5ml PBS erfolgte eine zweite Elution mit 10ml 6M Guanidiniumhydrochlorid in PBS. Auch hier wurden 10 Fraktionen à 1ml gesammelt.

Um die Thiopropylsepharose wiederzuverwenden, wurde sie 5mal in 10ml PBS gewaschen und anschließend in PBS+0,02% Azid überführt und bei 4°C gelagert. Zur Analyse der Elutionen wurde je 1µl pro Fraktion auf Nitrocellulose (Schleicher und Schüll) aufgetropft und 10min in Amidoschwarzlösung gefärbt. Die proteinreichen Fraktionen der ersten und der zweiten Elution wurden getrennt gepoolt und zuerst 2,5h und anschließend über Nacht bei 4°C gegen 5l PBS dialysiert.

Glycinpuffer:	100mM Glycin, pH 2,8	
Amidoschwarzlösung:	0,1%	Amidoschwarz
	5%	Eisessig
	20%	Methanol

6.2.2.23 Koppeln von Fluoreszenzfarbstoffen an Antikörper

Um bei der Immunfluoreszenz Antikörper aus der gleichen Spezies benutzen zu können, wurden affinitätsgereinigte Antikörper entweder mit cy3 oder cy5 direkt markiert. Es wurde das Fluoro-Link™ cy3 bzw. cy5 monofunctional dye-System von Amersham Pharmacia (Freiburg) benutzt. Die Antikörper wurden mit Hilfe von Microcon- Konzentratoren (Amicon) auf 1mg/ml ankonzentriert und dabei von PBS auf 0,1M Na_2CO_3 pH 9,3 umgepuffert. Der Farbstoff wurde nach Angaben des Herstellers zugegeben und die Farbstoff-Antikörpermischung 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Um den freien Farbstoff vom Antikörper zu trennen, wurde der Ansatz mit PBS+0,1% Azid verdünnt und über Microcon-Konzentratoren wieder ankonzentriert.

6.2.3 Mikroskopische Methoden

6.2.3.1 Immunfluoreszenz

Zellen wurden in 24-Loch Platten auf Deckgläschen angeimpft und bis zur 60-80%tigen Konfluenz wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert.

Fixieren von Zellen:

a) Methanol

Die Zellen wurden 4min mit –20°C kaltem Methanol bei –20°C fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Dann wurde zweimal mit PBS gewaschen.

b) Paraformaldeyd, TritonX-100

Die Zellen wurden 20min mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Um die verbliebenen reaktiven Gruppen zu blockieren, wurde 10min mit 50mM NH_4Cl inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann 10min mit 0,5% (w/v) TritonX-100 inkubiert, um sie zu permeabilisieren und erneut zweimal mit PBS gewaschen.

Nach 10min Blockieren mit 1% BSA in PBS wurden die Deckgläser 1h bei Raumtemperatur in dem ersten Antikörper bzw. dem direkt markierten Antikörper in geeigneter Verdünnung in 1% BSA in PBS inkubiert. Anschließend wurde 3 mal mit PBS gewaschen. Nach 30 minütiger Inkubation mit dem Zweitantikörper (gekoppelt an einen Fluoreszenzfarbstoff) in geeigneter Verdünnung in 1% BSA in PBS bei Raumtemperatur, wurde 3 mal mit PBS und einmal mit H_2O gewaschen. Dann wurden die Deckgläser in einem Tropfen Fluoromount G (Biozol) eingedeckelt und am nächsten Tag die Deckgläser mit farblosem Nagellack versiegelt.

Für Immunfluoreszenzaufnahmen wurde das Axiovert-35 von Zeiss mit der Axiocam-Kamera und der Axiovision-Software benutzt.

Konfokale Aufnahmen wurden mit dem TCS-SP von Leica unter Verwendung der *Leica Confocal Software* durchgeführt.

6.2.3.2 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie erfolgte in Kooperation mit Dr. J. Kartenbeck (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg).

Die Proben für die Elektronenmikroskopie wurden 30min in 2,5% Glutaraldehyd in EM-Puffer fixiert. Anschließend wurde 5 mal mit EM-Puffer gewaschen und 1h bei 4°C mit 2% OsO_4 in EM-Puffer osmiert. Nachdem nochmals 5 mal mit H_2O gewaschen wurde, wurden die Proben nach (Franke, 1976) weiterprozessiert.

EM-Puffer:	50mM	KCl
	2,5mM	$CaCl_2$
	50mM	Cacodylat, pH 7,2

7 Literatur

Abeijon, C., and C.B. Hirschberg. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*. 17:32-36.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff M., roberts K. und Watson J.D. 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York & London.

Austin, C., I. Hinners, and S.A. Tooze. 2000. Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with clathrin adaptor protein AP-1 on immature secretory granules. *J Biol Chem*. 275:21862-9.

Balch, W.E., J.M. McCaffery, H. Plutner, and M.G. Farquhar. 1994. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 76:841-852.

Barlowe, C. 1998. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 1404:67-76.

Barlowe, C. 2000. Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic*. 1:371-7.

Barlowe, C., C. d'Enfert, and R. Schekman. 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., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M.F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 77:895-907.

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

Belden, W.J., and C. Barlowe. 1996. Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem*. 271:26939-26946.

Belden, W.J.u.B., C. 2001. Distinct Roles for the Cytoplasmic Tail Sequences of Emp24p and Erv25p in Transport between the Endoplasmatic Reticulum and Golgi Complex. *JBC*. in press.

Bligh, E.G., und Dyer W. J. 1959. *Can. J. Biochem. Phys.* 37:911-917.

Blobel, G., and B. Dobberstein. 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*. 67:835-851.

Blum, H., D. Goldman, S.A. Sedman und M.H. Ebert. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacryamide gels. *Electrophoresis*. 8:93-99.

Blum, R., P. Feick, M. Puype, J. Vandekerckhove, R. Klengel, W. Nastainczyk, and I. Schulz. 1996. Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking. *J Biol Chem*. 271:17183-17189.

Blum, R., F. Pfeiffer, P. Feick, W. Nastainczyk, B. Kohler, K.H. Schafer, and I. Schulz. 1999. Intracellular localization and in vivo trafficking of p24A and p23. *J Cell Sci*. 112:537-548.

Boehm, M., and J.S. Bonifacino. 2001. Adaptins. The final recount. *Mol Biol Cell*. 12:2907-2920.

Bremser, M., W. Nickel, M. Schweikert, M. Ravazzola, M. Amherdt, C.A. Hughes, T.H. Sollner, J.E. Rothman, and F.T. Wieland. 1999. Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell*. 96:495-506.

Brew, K., J.H. Shaper, K.W. Olsen, I.P. Trayer, and R.L. Hill. 1975. Cross-linking of the components of lactose synthetase with dimethylpimelimidate. *J Biol Chem*. 250:1434-1444.

Brugger, B., G. Erben, R. Sandhoff, F.T. Wieland, and W.D. Lehmann. 1997. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:2339-2344.

Bukau, B., and A.L. Horwich. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92:351-366.

Chavrier, P., R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, and M. Zerial. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*. 62:317-329.

Cosson, P., and F. Letourneur. 1994. Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*. 263:1629-31.

Denzel, A., F. Otto, A. Girod, R. Pepperkok, R. Watson, I. Rosewell, J.J. Bergeron, R.C. Solari, and M.J. Owen. 2000. The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Curr Biol*. 10:55-58.

Dominguez, M., K. Dejgaard, J. Fullekrug, S. Dahan, A. Fazel, J.P. Paccaud, D.Y. Thomas, J.J. Bergeron, and T. Nilsson. 1998. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J Cell Biol*. 140:751-65.

Donaldson, J.G., D. Cassel, R.A. Kahn, and R.D. Klausner. 1992. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6408-12.

Donaldson, J.G., and R.D. Klausner. 1994. ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr Opin Cell Biol*. 6:527-32.

Eckerskorn, C.u.L., F. 1989. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia*. 28:92-94.

Elrod-Erickson, M.J., and C.A. Kaiser. 1996. Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol Biol Cell*. 7:1043-1058.

Emery, G., Grünberg, J. und Rojo, M. 1999. The p24 family of transmembrane proteins at the interface between endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus. *Protoplasma*. 207:24-30.

Emery, G., M. Rojo, and J. Gruenberg. 2000. Coupled transport of p24 family members. *J Cell Sci*. 113:2507-2516.

Esko, J.D. 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol*. 3:805-816.

Farquhar, M.G. 1985. Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu Rev Cell Biol*. 1:447-488.

Fiedler, K., M. Veit, M.A. Stamnes, and J.E. Rothman. 1996. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science*. 273:1396-9.

Fligge, T.A., C. Reinhard, C. Harter, F.T. Wieland, and M. Przybylski. 2000. Oligomerization of peptides analogous to the cytoplasmic domains of coatomer receptors revealed by mass spectrometry. *Biochemistry*. 39:8491-8496.

Franke, W.W., T.W. Keenan, J. Stadler, R. Genz, E.-D. Jarasch, and J. Kartenbeck. 1976. Nuclear membranes from mammalian liver.VII. Characteristics of highly purified nuclear membranesin comparison with other membranes. *Cytobiologie*. 13:28-56.

Füllekrug, J., T. Suganuma, B.L. Tang, W. Hong, B. Storrie, and T. Nilsson. 1999. Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members. *Mol Biol Cell*. 10:1939-1955.

Gething, M.J., and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*. 355:33-45.

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. 2000. Decoding of sorting signals by coatomer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell*. 100:671-679.

Gommel, D., L. Orci, E.M. Emig, M.J. Hannah, M. Ravazzola, W. Nickel, J.B. Helms, F.T. Wieland, and K. Sohn. 1999. p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated transport vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between the organelles of the early secretory pathway. *FEBS Lett*. 447:179-185.

Gommel, D.U. 2001a. Molekulare Mechanismen bei der Bildung von COPI-Vesikeln. *Fakultät für Biologie*.

Gommel, D.U., Memon, A. R., Heiss, A., Reinhard, C., Helms, J. B., Nickel, W. und Wieland F.T. 2001b. Binding to Golgi Membranes of ADP-Ribosylation Factor 1 is Mediated by the Cytoplasmic Domain of p23. *Embo J*. in press.

Griffiths, G., R. Back, and M. Marsh. 1989. A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J Cell Biol*. 109:2703-2720.

Griffiths, G., M. Ericsson, J. Krijnse-Locker, T. Nilsson, B. Goud, H.D. Soling, B.L. Tang, S.H. Wong, and W. Hong. 1994. Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J Cell Biol*. 127:1557-1574.

Griffiths, G., and K. Simons. 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science*. 234:438-443.

Harter, C., and C. Reinhard. 2000. The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell Biochem*. 34:1-38.

Hauri, H., C. Appenzeller, F. Kuhn, and O. Nufer. 2000. Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Lett*. 476:32-37.

Hauri, H.P., and A. Schweizer. 1992. The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr Opin Cell Biol*. 4:600-6008.

Helms, J.B., D.J. Palmer, and J.E. Rothman. 1993. Two distinct populations of ARF bound to Golgi membranes. *J Cell Biol*. 121:751-60.

Hershko, A., and A. Ciechanover. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem*. 61:761-807.

Hicke, L., T. Yoshihisa, and R. Schekman. 1992. Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 3:667-76.

Hirst, J., and M.S. Robinson. 1998. Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta*. 1404:173-93.

Hsu, V.W., L.C. Yuan, J.G. Nuchtern, J. Lippincott-Schwartz, G.J. Hammerling, and R.D. Klausner. 1991. A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for retention of unassembled MHC class I molecules. *Nature*. 352:441-444.

Jackson, C.L., and J.E. Casanova. 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*. 10:60-7.

Jackson, M.R., T. Nilsson, and P.A. Peterson. 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J*. 9:3153-31562.

Jentoft, N. 1990. Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci*. 15:291-294.

Kahn, R.A., and A.G. Gilman. 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.

Kaiser, C. 2000. Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3783-3785.

Kalies, K.U., and E. Hartmann. 1998. Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)--two similar routes with different modes. *Eur J Biochem*. 254:1-5.

Kirchhausen, T. 2000a. Clathrin. *Annu Rev Biochem*. 69:699-727.

Kirchhausen, T. 2000b. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:187-98.

Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 54:631-664.

Krijnse-Locker, J., R.G. Parton, S.D. Fuller, G. Griffiths, and C.G. Dotti. 1995. The organization of the endoplasmic reticulum and the intermediate compartment in cultured rat hippocampal neurons. *Mol Biol Cell*. 6:1315-32.

Kuiper, R.P., G. Bouw, K.P. Janssen, J. Rotter, F. van Herp, and G.J. Martens. 2001. Localization of p24 putative cargo receptors in the early secretory pathway depends on the biosynthetic activity of the cell. *Biochem J*. 360:421-9.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

Lemmon, S.K., and L.M. Traub. 2000. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol*. 12:457-466.

Lotti, L.V., M.R. Torrisi, M.C. Erra, and S. Bonatti. 1996. Morphological analysis of the transfer of VSV ts-045 G glycoprotein from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment in vero cells. *Exp Cell Res*. 227:323-331.

Lowe, M., and T.E. Kreis. 1998. Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim Biophys Acta*. 1404:53-66.

Majoul, I., Straub, M., Hell, S.W., Duden, R. und Soling, H.-D. 2001. KDEL-Cargo Regulates Interactions between Proteins involved in CopI Vesicle Traffic: Measurements in Living Cells Using FRET. *Developmental Cell*. 1:139-153.

Malsam, J., D. Gommel, F.T. Wieland, and W. Nickel. 1999. A role for ADP ribosylation factor in the control of cargo uptake during COPI-coated vesicle biogenesis. *FEBS Lett*. 462:267-272.

Martinez-Menarguez, J.A., Geuze, H.J., Slot, J.W., und Klumperman J. 1999. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell*. 98:81-91.

Marzioch, M., D.C. Henthorn, J.M. Herrmann, R. Wilson, D.Y. Thomas, J.J. Bergeron, R.C. Solari, and A. Rowley. 1999. Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol Biol Cell*. 10:1923-1938.

Matlack, K.E., W. Mothes, and T.A. Rapoport. 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell*. 92:381-390.

Mellman, I., and K. Simons. 1992. The Golgi complex: in vitro veritas? *Cell*. 68:829-40.

Muniz, M., C. Nuoffer, H.P. Hauri, and H. Riezman. 2000. The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol*. 148:925-930.

Nakamura, N., M. Lowe, T.P. Levine, C. Rabouille, and G. Warren. 1997. The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell*. 89:445-455.

Nakano, A., and M. Muramatsu. 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 109:2677-91.

Nickel, W., J. Malsam, K. Gorgas, M. Ravazzola, N. Jenne, J.B. Helms, and F.T. Wieland. 1998. Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J Cell Sci*. 111:3081-90.

Nickel, W., K. Sohn, C. Bunning, and F.T. Wieland. 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 F.T. Wieland. 1998. Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem Cell Biol*. 109:477-86.

Nilsson, T., M. Jackson, and P.A. Peterson. 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 58:707-718.

Noiva, R., and W.J. Lennarz. 1992. Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 267:3553-3556.

Orci, L., B.S. Glick, and J.E. Rothman. 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.

Ou, W.J., P.H. Cameron, D.Y. Thomas, and J.J. Bergeron. 1993. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature*. 364:771-776.

Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 189:347-358.

Palmer, D.J., J.B. Helms, C.J. Beckers, L. Orci, and J.E. Rothman. 1993. Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem*. 268:12083-9.

Pearse, B.M., and M.S. Robinson. 1990. Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol*. 6:151-71.

Pepperkok, R., J.A. Whitney, M. Gomez, and T.E. Kreis. 2000. COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J Cell Sci*. 113:135-144.

Pryer, N.K., N.R. Salama, R. Schekman, and C.A. Kaiser. 1993. Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. *J Cell Biol*. 120:865-75.

Rambourg, A.u.C., Y. 1997. Three-dimensional structure of the golgi apparatus in mammalian cells. E.G.B.a. J.Roth, editor. Birkenhäser Verlag, Basel, Boston, Berlin. 37-61 pp.

Reinhard, C. 2000. Molekulare Mechanismen bei der Bildung von COPI-Vesikeln. *Fakultät für Biologie*.

Reinhard, C., C. Harter, M. Bremser, B. Brugger, K. Sohn, J.B. Helms, and F. Wieland. 1999. Receptor-induced polymerization of coatomer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:1224-1228.

Rojo, M., G. Emery, V. Marjomaki, A.W. McDowall, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2000. The transmembrane protein p23 contributes to the organization of the Golgi apparatus. *J Cell Sci*. 113:1043-1057.

Rojo, M., R. Pepperkok, G. Emery, R. Kellner, E. Stang, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1997. Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport. *J Cell Biol*. 139:1119-1135.

Rothman, J.E., and F.T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272:227-234.

Rouser, G., Fkeischer, S. und Yamamoto, A. 1970. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. 5:494-496.

Salama, N.R., J.S. Chuang, and R.W. Schekman. 1997. Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 8:205-17.

Saraste, J., and E. Kuismanen. 1984. Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell*. 38:535-549.

Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 166:368-379.

Schimmoller, F., B. Singer-Kruger, S. Schroder, U. Kruger, C. Barlowe, and H. Riezman. 1995. The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *Embo J*. 14:1329-1339.

Schweizer, A., J.A. Fransen, T. Bachi, L. Ginsel, and H.P. Hauri. 1988. Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 107:1643-1653.

Schweizer, A., K. Matter, C.M. Ketcham, and H.P. Hauri. 1991. The isolated ER-Golgi intermediate compartment exhibits properties that are different from ER and cis-Golgi. *J Cell Biol*. 113:45-54.

Serafini, T., L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R.A. Kahn, and J.E. Rothman. 1991. 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.

Sitia, R., and J. Meldolesi. 1992. Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol Biol Cell*. 3:1067-72.

Sohn, K., L. Orci, M. Ravazzola, M. Amherdt, M. Bremser, F. Lottspeich, K. Fiedler, J.B. Helms, and F.T. Wieland. 1996. A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol*. 135:1239-48.

Springer, S., E. Chen, R. Duden, M. Marzioch, A. Rowley, S. Hamamoto, S. Merchant, and R. Schekman. 2000. The p24 proteins are not essential for vesicular transport in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:4034-4039.

Stamnes, M.A., M.W. Craighead, M.H. Hoe, N. Lampen, S. Geromanos, P. Tempst, and J.E. Rothman. 1995. An integral membrane component of coatomer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8011-8015.

Tabas, I., and S. Kornfeld. 1979. Purification and characterization of a rat liver Golgi alpha-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides. *J Biol Chem*. 254:11655-11663.

Tang, B.L., S.H. Low, H.P. Hauri, and W. Hong. 1995. Segregation of ERGIC53 and the mammalian KDEL receptor upon exit from the 15 degrees C compartment. *Eur J Cell Biol*. 68:398-410.

Tang, B.L., S.H. Wong, X.L. Qi, S.H. Low, and W. Hong. 1993. Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J Cell Biol*. 120:325-328.

Tanigawa, G., L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, J.B. Helms, and J.E. Rothman. 1993. Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol*. 123:1365-71.

Tisdale, E.J., and W.E. Balch. 1996. Rab2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates. *J Biol Chem*. 271:29372-29379.

Ungewickell, E., and D. Branton. 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature*. 289:420-2.

Wada, I., D. Rindress, P.H. Cameron, W.J. Ou, J.J. Doherty, 2nd, D. Louvard, A.W. Bell, D. Dignard, D.Y. Thomas, and J.J. Bergeron. 1991. SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. 266:19599-15610.

Warnock, D.E., C. Roberts, M.S. Lutz, W.A. Blackburn, W.W. Young, Jr., and J.U. Baenziger. 1993. Determination of plasma membrane lipid mass and composition in cultured Chinese hamster ovary cells using high gradient magnetic affinity chromatography. *J Biol Chem*. 268:10145-10153.

Warren, G. 1987. Protein transport. Signals and salvage sequences. *Nature*. 327:17-18.

Waters, M.G., T. Serafini, and J.E. Rothman. 1991. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*. 349:248-51.

Wattenberg, B.W., and J.E. Rothman. 1986. Multiple cytosolic components promote intra-Golgi protein transport. Resolution of a protein acting at a late stage, prior to membrane fusion. *J Biol Chem*. 261:2208-2213.

Weidler, M., C. Reinhard, G. Friedrich, F.T. Wieland, and P. Rosch. 2000. Structure of the cytoplasmic domain of p23 in solution: implications for the formation of COPI vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*. 271:401-408.

Wieland, F., and C. Harter. 1999. Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Curr Opin Cell Biol*. 11:440-6.

Wilkinson, B.M., M. Regnacq, and C.J. Stirling. 1997. Protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol*. 155:189-197.

Ying, M., T. Flatmark, and J. Saraste. 2000. The p58-positive pre-golgi intermediates consist of distinct subpopulations of particles that show differential binding of COPI and COPII coats and contain vacuolar H(+)-ATPase. *J Cell Sci*. 113:3623-3638.

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

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

Danksagung:

Ein herzliches Danke schön an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Felix Wieland für die Möglichkeit an einem interessanten Thema zu arbeiten, die Bereitstellung großzügiger Arbeitsbedingungen, seine wertvollen Anregungen und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Prof. Bernhard Dobberstein für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Friedrich Lottspeich für das Sequenzieren der Proteine.

Dr. Jürgen Kartenbeck für die EM-Aufnahmen.

Dr. Britta Brügger für die ständige Hilfsbereitschaft, die Quantifizierung der Lipide über ESI-MS/MS, das „Turbo“-Korrekturlesen der Doktorarbeit und das immer offene Ohr.

Karolin Frey für ihre großartige Unterstützung, ihre Einsatzbereitschaft und das Teilen aller Sorgen im Laborleben, denn geteiltes Leid ist nur halbes Leid.

Dr. Constanze Reinhard und Dr. Walter Nickel für viele anregende Diskussionen.

Dorothe Lay und Dr. Rainer Pepperkok für die Einführung am konfokalen Mikroskop.

Dr. Daniel Gommel und Silvia Rieger für die Überlassung von rekombinantem GST und der luminalen Domäne von p23.

allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wieland, besonders den Mitgliedern des Labors 312 für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Abkürzungsverzeichnis

8POE	Octyl-Polyoxyethylen
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ARNO	ARF *nucleotide-binding-site opener*
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BHK	*baby-hamster-kidney*
BFA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
CGN	cis-Golgi-Netzwerk
CHO	*chinese-hamster ovary*
Coatomer	*coat-protomer*
COP	*coat* Protein
DMEM	Dulbecco's *minimal essential medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ESI-MS	*electronspray ionisation mass spectrometry*
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-*intermediate compartment*
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GEF	Guanosinnukleotid-Austauschfaktor
GDP	Guanosin 5'-diphosphat
GDPβS	Guanosin 5'[β-thio]-diphosphat
GMP-PNP	Guanosin 5'[β,γ-imido]-triphosphat
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
GTPγS	Guanosin 5'[γ-thio]-triphosphat
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IC	*intermediate compartment*
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
KLH	*keyholelymphlet hemocyanate*
NMR	*nuclear magnetic resonance*
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionisation
MEM	*minimal essential medium*
NP-40	Nonidet-40
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitives Fusionsprotein
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*Phosphate buffered saline*
PC	Phosphatidylcholin
pI	isoelektrischer Punkt

PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
rpm	*rounds per minute*
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	*soluble NSF attachement protein*
SNARE	SNAP-Rezeptor
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Tris	tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitat-Monolaureat
w/v	Gewicht/Volumenverhältnis
w/w	Gewichtsverhältnis

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung 1
1.1 Transport in der eukaryontischen Zelle 1
1.2 Der sekretorische Weg 1
1.2.1 Der vesikuläre Transport 5
1.3 Die p24-Familie 7
1.3.1 Welche Funktion haben die p24-Mitglieder ? 10
1.4 Zielsetzung der Arbeit 13

2 Ergebnisse I: Die p24-Proteine 14
2.1 Die p24-Familie bildet Oligomere im Golgi und in COPI-Vesikeln 14
2.2 Größenbestimmung der p24-Komplexe in ER, IC und Golgi 16
2.2.1 Testen der Solubilisationsbedingungen 16
2.2.2 Präparation von ER, IC und Golgi aus Hela-Zellen 19
2.2.3 Gelfiltrationsanalyse der p24-Komlpexe 21
2.2.4 Eichen der Gelfiltrationssäule 24
2.3 Größenbestimmung der p24-Komplexe in COPI-Vesikeln 29
2.4 Bestimmung der Konzentration der p24-Mitglieder in ER, IC und Golgi .. 33
2.4.1 Test von ER, IC und Golgi auf Kontamination 33
2.4.2 Herstellung von GST-Fusionsproteinen 35
2.4.3 Test der p24-Antikörper auf Kreuzreaktivität mit GST 37
2.4.4 Konzentrationsbestimmung der p24-Proteine 37
2.5 Zyklisieren der p24-Mitglieder im frühen sekretorischen Weg 41
2.5.1 Immunfluoreszenzanalyse 42
2.5.2 Subzelluläre Fraktionierung von Hela-Zellen 52
3 Ergebnisse II: Proteomics von COPI-Vesikeln 61
3.1 Das Konzept 61

4 Diskussion I: Die p24-Proteine 67
5 Dikussion II: Proteomics von COPI-Vesikeln 78
5.1 Zusammenfassung 79

6 Material und Methoden 81
6.1 Material 81
6.1.1 Primärantikörper 81
6.1.2 Sekundärantikörper 83
6.1.3 Peptide 83
6.1.4 Zellen 84
6.1.5 Oligonukleotide 85
6.1.6 Plasmide 85
6.1.7 Bakterienstämme 86
6.1.8 Molekulargewichtstandards 86
6.1.9 Proteaseinhibitoren 86
6.2 Methoden 87
6.2.1 Molekularbiologische Methoden 87
6.2.2 Biochemische Methoden 89
6.2.3 Mikroskopische Methoden 115
7 Literatur 117