

Pablo Hess
Dr. med. dent.

γ -2-COP: Eine neue Untereinheit des COPI-Vesikel-Hüllproteins Coatomer

Geboren am 18. 02. 1974 in München
Reifeprüfung am 11. 03. 1993 in Mannheim
Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin vom WS 1994/ 95 bis WS 1999/ 2000
Physikum am 19. 03. 1997
Staatsexamen am 09. 12. 1999

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. Felix T. Wieland

COPI-Umhüllte Vesikel dienen vielerorts dem Transport von Proteinen im frühen sekretorischen Transportweg. Die Proteinhülle dieser COPI Vesikel besteht aus dem GTP-bindenden Protein ADP-Ribosylierungsfaktor 1 (ARF1) und Coatomer. Bis zu dieser Doktorarbeit waren sieben Coatomer-Untereinheiten (COPs) identifiziert und charakterisiert worden. Daher spricht man von einem heterooligomeren Proteinkomplex, welcher aus den folgenden Untereinheiten α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - und ζ -COP aufgebaut ist.

Bei der Charakterisierung eines neuen imprimierten Genclusters durch die Gruppe Kalscheuer und Mitarbeiter auf dem menschlichen Chromosom 7 wurde ein neues Gen identifiziert (Blagitko et al., 1999). Dieses Gen weist eine sehr starke Homologie zu dem bereits bekannten γ -COP (γ -1-COP) auf, sodass es als γ -2-COP bezeichnet wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde zunächst ein Mengenvergleich der Transkriptionsprodukte von γ -1-COP und γ -2-COP erstellt. Hierfür wurde das System der Maus ausgewählt, da sich die mRNA-Länge der beiden γ -COPs aufgrund der unterschiedlich langen „untranslated regions“ (UTRs) soweit unterscheidet, dass beide mRNAs durch ein Agarosegelsystem, wie es für einen Northern Blot verwendet wird aufgetrennt werden können. Dies ist im humanem System aufgrund der nahezu identischen mRNA-Länge von γ -1-COP und γ -2-COP nicht möglich. Zunächst wurden die beiden γ -COPs durch spezifische Sonden nachgewiesen und anschließend wurde ein Mengenvergleich durch Eichung einer Sonde, welche beide mRNAs erkennt ermöglicht. Hierbei stellte sich heraus, dass in der Maus wesentlich weniger γ -2-COP als γ -1-COP transkribiert wird.

Um zu zeigen, dass γ -2-COP-mRNA zu γ -2-COP-Protein translatiert wird war es zunächst notwendig spezifische γ -2-COP-Antikörper zu besitzen. Für die Herstellung dieser Antikörper wurden zunächst Epitope der γ -2-COP-Sequenz ausgewählt, welche sich stark von der γ -1-COP-Sequenz unterscheiden. Anhand dieser beiden Sequenzstücke konnten synthetische Peptide hergestellt werden, welche zur Immunisierung von Tieren dienten.

Da es noch keinerlei Hinweise für die Expression von γ -2-COP im Organismus gab, und um die sechs erhaltenen Antikörperseren auf ihre Spezifität testen zu können, wurde zunächst rekombinantes γ -2-COP in *E. coli*-Bakterien überexprimiert. Durch Charakterisierung der Antikörperseren anhand des rekombinanten γ -2-COPs erhielt man vier spezifische Antikörper-Seren. Die zwei Seren M2G2 und T2G1, die am sensitivsten sowie spezifischsten für γ -2-COP waren, wurden für die weiteren Versuche verwendet. Die Spezifität dieser zwei Antikörper wurde durch Affinitätsreinigung noch erhöht.

Mittels der spezifischen γ -2-COP-Antikörper konnte zum ersten Mal γ -2-COP-Protein in zahlreichen Organismen wie Maus, Kaninchen, Rind sowie in humanen HeLa-Zellen nachgewiesen werden.

Desweiteren konnte γ -2-COP als Protein auch im Coatomer-Komplex nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass γ -2-COP als eine Untereinheit des Coatomer-Komplexes vorhanden ist.

Schlußendlich konnte gezeigt werden, dass γ -2-COP-Protein in Maus ubiquitär exprimiert und in den Coatomer-Komplex integriert wird und die Expression gewebespezifisch verläuft.