INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

In vivo Analyse der Dynamik von COPI-Vesikeln und p24-Proteinen

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Christoph Rutz

aus

Frankfurt am Main

2007

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Christoph Rutz

aus

Frankfurt am Main

Tag der mündlichen Prüfung:

In vivo Analyse der Dynamik von COPI-Vesikeln und p24-Proteinen

Gutachter: Prof. Felix Wieland

Gutachter: Prof. Michael Brunner

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung/Abstract 1
1 Zusammenfassung 1
2 Abstract 3
II. Einleitung 4
1 Der sekretorische Transportweg 4
1.1 Import in das ER sowie die ersten Prozessierungschritte 5
1.2 Der COPII-vermittelte Transport vom ER zum Golgi 6
1.3 Der Golgi-Apparat und die Rolle von COPI-Vesikeln 7
1.4 Transport vom Golgi zum Bestimmungsort: Clathrin-Vesikel 9
2 COPI-Vesikel: Biogenese und Funktion 11
2.1 Biogenese von COPI-Vesikeln 11
2.2 Die p24 Proteinfamilie 14
2.3 Modelle zur Frachtaufnahme 16
2.4 Transport von COPI-Vesikeln und die Fusion mit der Zielmembran 20
2.5 Existenz unterschiedlicher COPI-Vesikeltypen 22
3 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer 23
3.1 Grundlagen des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers 23
3.2 Die Anwendung von FRET in der Zellbiologie 25
4 Ziel der Arbeit 27
III. Ergebnisse 29
A Interaktion der p24 Familienmitglieder *In Vivo* 29
1 Der oligomere Zustand der p24 Proteine *in vivo* 29
1.1 Herstellung eukaryontischer Expressionsvektoren für die FRET-Analyse 29
1.2 Expression der p24 Konstrukte in Vero Zellen 29
1.3 Bestimmung der Interaktion mittels FRET-Messungen 30
1.4 Berechnung der FRET-Effizienzen 32
1.5 p23 und Galaktosyltransferase interagieren nicht miteinander 33
1.6 Einige p24 Familien Mitglieder liegen *in vivo* im Golgi-Apparat als Homodimere vor 34
1.6.1 Validierung der gemessenen Interaktionen 36
1.7 Im ER bilden p24-Proteine *in vivo* keine Dimere 36
2 Der Effekt von ARF1 auf den oligomeren Zustand von p23 und p24 40
2.1 Fixierung von ARF1 in seiner GDP Form durch BFA Behandlung hat keinen Einfluss auf die Interaktion von p23 mit p24 41
2.2 Fixierung von ARF1 in seiner GTP Form durch AlF_4^- Behandlung hat keinen Einfluss auf die Interaktion von p23 mit p24 43
B Generierung monoklonaler Zelllinien, welche CFP- und YFP-markierte p24-Proteine exprimieren 45
1.1 Herstellung geeigneter retroviral transduzierbarer Plasmide 45
1.2 Herstellung monoklonaler CHO-Zelllinien 47
1.3 Charakterisierung der generierten Zelllinien 50

1.4 Veränderungen der spektralen Eigenschaften sowie der Expressionsraten der Fusionskonstrukte ... 52
1.5 Isolierung fluoreszierender Golgi-Membranen ... 55
C Etablierung eins Systems zur Untersuchung von COPI-Vesikel *in vivo* ... 57
1 Isolierung und Charakterisierung fluoreszierender COPI-Vesikel ... 58
1.1 Generierung fluoreszierende COPI-Vesikel ... 58
1.2 Charakterisierung der Zusammensetzung der Vesikel ... 60
1.3 Analyse der Fluoreszenzmarkierung ... 62
2 Mikroinjektion fluoreszierender COPI-Vesikel ... 64
2.1 Mikroinjizierte COPI-Vesikel fusionieren mit dem Golgi-Apparat ... 64
2.2 Mikroinjektion permanent bedeckter Vesikel ... 68
2.3 Beteiligung von Mikrotubuli am Vesikeltransport ... 69
IV. Diskussion ... 71
A Das dynamische Verhalten der p24-Proteine *in vivo* ... 71
1 Einige p24-Proteine bilden Homodimere im Golgi-Apparat ... 73
2 p24-Homodimere dissoziieren im ER ... 75
3 Der Effekt von ARF1 auf den oligomeren Zustand von p23 und p24 ... 77
4 Modell zur Zyklisierung der p24-Proteine ... 79
B Generierung induzierbarer p24-Zelllinien ... 80
C Etablierung eines Systems zur Untersuchung von COPI-Vesikeln *in vivo* ... 82
1 Die Generierung fluoreszenzmarkierter COPI-Vesikel ... 83
2 Das Verhalten mikroinjizierter COPI-Vesikel *in vivo* ... 84
V. Materialien und Methoden ... 88
1 Materialien ... 88
1.1 Nährmedien ... 88
1.1.1 Eukaryontische Nährmedien ... 88
1.1.2 Prokaryontische Nährmedien ... 89
1.2 Antikörper ... 89
1.2.1 Primärantikörper ... 89
1.2.2 Sekundärantikörper ... 90
1.3 Plasmide ... 91
1.4 Oligonukleotide ... 92
1.4.1 PCR- und Hybridisierungs-Primer ... 93
1.4.2 Sequenzier-Primer ... 94
1.5 Zelllinien ... 95
1.5.1 Prokaryontische Zelllinien ... 95
1.5.2 Eukaryontische Zelllinien ... 95
1.6 Protein-Molekulargewichtstandards ... 96
1.7 DNA-Größenstandards ... 96
1.8 Geräte ... 97
2 Methoden ... 97

2.1 Molekularbiologische Methoden ... 97
2.1.1 Transformation von Plasmiden in *E.coli* ... 97
2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA ... 97
2.1.3 Umpufferung von DNA-Fragmenten und Aufreinigung von PCR-Produkten ... 98
2.1.4 Präparative und analytische Agarose-Gelelektrophorese ... 98
2.1.5 Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA ... 98
2.1.6 Bestimmung von Reinheit und DNA-Konzentrationen ... 99
2.1.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ... 99
2.1.8 Restriktionsverdau von Plasmiden und PCR-Produkten ... 100
2.1.9 Ligation der DNA-Fragmente ... 100
2.1.10 Generierung neuer Plasmide ... 100
2.1.11 Sequenzierung von DNA-Konstrukten ... 102
2.2 Biochemische Methoden ... 103
2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 103
2.2.2 Coomassie-Färbung ... 104
2.2.3 Western-Blot (WB) ... 104
2.2.4 Immunochemischer Nachweis auf PVDF-Membranen ... 105
2.2.5 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford ... 105
2.2.6 Isolierung von Coatomer aus Kaninchenleber ... 106
2.2.7 Präparation von humanem myristoylierten ARF1 ... 108
2.2.8 Aufreinigung von His_6-Sar1H79G ... 111
2.2.9 Isolierung von Golgi aus Ratten Leber ... 112
2.2.10 Isolierung von Golgi aus CHO-Zellen ... 113
2.2.11 Herstellung fluoreszenzmarkierter COPI-Vesikel ... 114
2.3 Zellbiologische Methoden ... 117
2.3.1 Allgemeine Puffer und Bedingungen ... 117
2.3.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen ... 117
2.3.3 Elektroporation von Vero-Zellen ... 118
2.3.4 Retrovirale Transduktion von CHO-Zellen ... 118
2.3.5 Präparative FACS-Sortierung ... 119
2.3.6 Immunfluoreszenz ... 120
2.3.7 Brefeldin A Behandlung ... 120
2.3.8 AlF_4^- Behandlung ... 121
2.3.9 Nocodazol Behandlung ... 121
2.3.10 Mikroinjektion von Sar1H79G ... 121
2.3.11 Mirkoinjektion von COPI-Vesikeln ... 122
2.4 Biophysikalische Methoden ... 123
2.4.1 Mikroskopie ... 123
2.4.2 FRET-Messungen ... 123
2.4.3 Bestimmung der FRET-Effizienz ... 124
VI. Literaturverzeichnis ... 126

VII. Abkürzungsverzeichnis 134
VIII. Danksagung 137

I. Zusammenfassung/Abstract

1 Zusammenfassung

Die p24-Proteine stellen eine hochkonservierte Familie an Typ I Transmembranproteinen dar, die zwischen den Organellen des frühen sekretorischen Transportwegs zyklisieren. Sie sind als Homodimere in der Lage die Komponenten der COPI Vesikelhülle, ARF1 und Coatomer, zu binden, und somit die Vesikelbildung zu initiieren. Darüber hinaus wurden Interaktionen der p24-Proteine mit Bestandteilen der COPII Vesikelhülle beschrieben. Es ist jedoch nicht bekannt, wie eine selektive Rekrutierung der COPI Hüllproteine an Golgi-Membranen bzw. von COPII Komponenten an ER-Membranen gewährleistet wird. In einer Reihe verschiedener *in vitro* Studien wurde die Bildung spezifischer Heterooligomere beschrieben, wohingegen die Existenz von Homodimeren *in vivo* bisher noch nicht untersucht wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *in vivo* die Bildung von Homodimeren sowohl im Golgi-Apparat als auch im ER mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Technik zu studieren. Aufgrund der gemessenen FRET-Effizienzen bilden p23, p24 und p25 zu einem erheblichen, p27 zu einem geringeren Anteil Homodimere im Golgi Apparat, wohingegen p26 ausschließlich in monomerer Form vorliegt. Diese Homodimere, sowie das im Golgi ebenfalls nachgewiesene Heterodimer aus p23 und p24, dissoziieren im ER. Darüber hinaus zeigt die Fixierung von ARF1 in seiner GDP- oder GTP-gebundenen Form, dass ARF1 keinen Einfluss auf den oligomeren Zustand von p23 und p24 ausübt. Diese Daten verdeutlichen, dass die p24-Proteine, durch ausschließlich Bildung von Homodimeren im Golgi die exklusive Rekrutierung von ARF1 und Coatomer an diese Membranen regulieren. In einem entsprechenden Modell wurden die gewonnenen Daten zusammengeführt.

Ein weiteres Projekt bestand darin, ein System zur Untersuchung von COPI Vesikel *in vivo* zu etablieren. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte COPI Vesikel *in vitro* von isolierten Ratten Leber Golgi-Membranen generiert, aufgereinigt und charakterisiert. Diese konnten aufgrund der fluoreszenzmarkierten Proteine nach

Mikroinjektion in Säugetierzellen identifiziert und ihr Verhalten somit weiter verfolgt werden. Innerhalb von 30 min waren diese in der Lage, unabhängig von Mikrotubuli zum Golgi Apparat zu wandern und mit diesem zu fusionieren. Einige Vesikel, insbesondere solche die Mannosidase II enthielten, fusionierten dabei direkt mit dem Golgi und nicht mit dem ER. Die markierten, exogenen Vesikelproteine reagierten auf eine BFA-Behandlung wie endogene Proteine und konnten bezüglich ihres Verhaltens in zwei Klassen eingeteilt werden. Dieses System bietet somit in Zukunft die Möglichkeit eine Reihe ungeklärter Fragstellungen über die Funktion und das Verhalten von COPI Vesikeln *in vivo* eindeutiger zu untersuchen.

2 Abstract

The members of the p24-protein family constitute a highly conserved family of type I transmembrane proteins that cycle between the organelles of the early secretory pathway. They were shown to bind and recruit the components of the COPI vesicle coat, ARF1 and coatomer, in their homodimeric form and thus initiate vesicle biogenesis. Moreover, interactions between the p24-proteins and components of the COPII coat were reported. To date, however, the regulation of selective binding of COPI components to Golgi membranes and COPII components to ER membranes, respectively, has not yet been elucidated. In a series of *in vitro* studies, the formation of different heterooligomers was described, whereas the existence of homodimers *in vivo* has not yet been studied.

The aim of the present work was to investigate *in vivo* the formation of homodimers in the Golgi as well as in the ER by utilising Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer (FRET). Based on the determined FRET-efficiencies, p23, p24 and p25 form homodimers to a great extent in the Golgi region, whereas p27 only showed weak interactions and p26 was found exclusively in its monomeric form. These homodimers, as well as the already reported heterodimer of p23 and p24 dissociate in the ER. Moreover, fixing ARF1 in its exclusively GDP- or GTP-bound state does not have an influence on the oligomeric state of p23 and p24. These findings demonstrate how p24-proteins regulate the recruitment of ARF1 and coatomer to the Golgi membrane by exclusively forming homodimers in the Golgi.

The goal of a second project was to establish a method to investigate the fate and function of COPI vesicles *in vivo*. To this end, fluorescently labelled COPI vesicles were generated *in vitro* from isolated rat liver Golgi membranes. After purification and characterisation they were microinjected into mammalian cells. Due to the fluorescently labelled vesicle proteins they could unambiguously be identified and further monitored. Within 30 minutes these vesicles moved independently of microtubules towards the Golgi and eventually fused with this compartment. Some vesicles, particularly those containing Mannosidase II, fused directly with the Golgi and not with ER membranes. The labelled, exogenous proteins behaved like endogenous proteins after BFA treatment and could be classified into two different populations. This system now provides the opportunity to more unambiguously address several open questions about the fate and function of COPI vesicles *in vivo*.

II. Einleitung

Eukaryontische Zellen unterscheiden sich von den Prokaryonten dadurch, dass sie eine Vielzahl an verschiedenen membranumhüllten Kompartimenten, auch Organellen genannt, in ihrem Cytosol vorliegen haben. Diese Organellen sind durch ihre Lipide und Proteinzusammensetzung definiert und führen unterschiedliche, spezielle Funktionen aus. Die Hauptvertreter sind der Zellkern, der über seine Kernmembran mit dem netzförmigen Endoplasmatischen Retikulum (ER) verbunden ist, der Golgi-Apparat, Lysosomen und Endosomen, sowie die Mitochondrien und auch Chloroplasten, welche z.B. in Pflanzenzellen vorkommen. Die unterschiedlichen Funktionen sowie die unterschiedlichen Zusammensetzungen machen den Austausch von Proteinen und Lipiden zwischen den einzelnen Organellen notwendig. Dies beinhaltet zum einen Maschinerie, die zur korrekten Ausführung der Funktion notwendig ist, als auch die spezifischen Substrate. Dieser Austausch wird dabei meist von Transportvesikeln durchgeführt, die durch Abknospung von einen Kompartiment und anschließender Fusion mit der Zielmembran sowohl lösliche- als auch Membranproteine und Lipide transportieren können.

1 Der sekretorische Transportweg

Der Großteil der sezernierten Proteine sowie Membranproteine werden innerhalb des sekretorischen Transportwegs prozessiert, und anschließend an ihre Bestimmungsorte transportiert. Die Prozessierung der Proteine erfolgt dabei zum einen im Endoplasmatischen Retikulum, und zum anderen im Golgi-Apparat, wobei der Transport zwischen den Organellen, sowie zum Zielort hin durch Vesikel vermittelt wird. Proteine, die den sekretorischen Weg beschreiten, besitzen im Gegensatz zu Proteinen die im Cytosol verbleiben, eine spezielle Aminosäuresequenz (die Signalsequenz), die sie als sekretorische Proteine markiert, und die Rekrutierung zum ER, dem Startpunkt des sekretorischen Wegs, initiiert (Blobel and Dobberstein, 1975a; Blobel and Dobberstein, 1975b). Nach der korrekten Faltung der Proteine werden in verschiedenen Schritten posttranslationale Modifizierungen durchgeführt, wie z.B. die Bildung von Disulfidbrücken, N- und O-

Glykosylierung, Prolin-Hydroxylierung und Tyrosin-Sulfatierung, sowie die Anheftung von GPI-Ankern. Die Existenz eines solchen gerichteten sekretorischen Transportwegs wurde erstmals in den 60er Jahren für exokrine, pankreatische Zellen beschrieben (Caro and Palade, 1964; Jamieson and Palade, 1966). Der sekretorische Weg lässt sich grob in 4 Bereiche einteilen: Der kotranslationale Import neu synthetisierter Protein in das ER, der COPII-vermittelte Transport vom ER zum Golgi, der Rücktransport zum ER und intra-Golgi Transport, welcher durch COPI-Vesikel vermittelt wird, und schließlich der Transport zum Bestimmungsort, vermittelt durch Clathrin-umhüllte Vesikel (Abbildung 1).

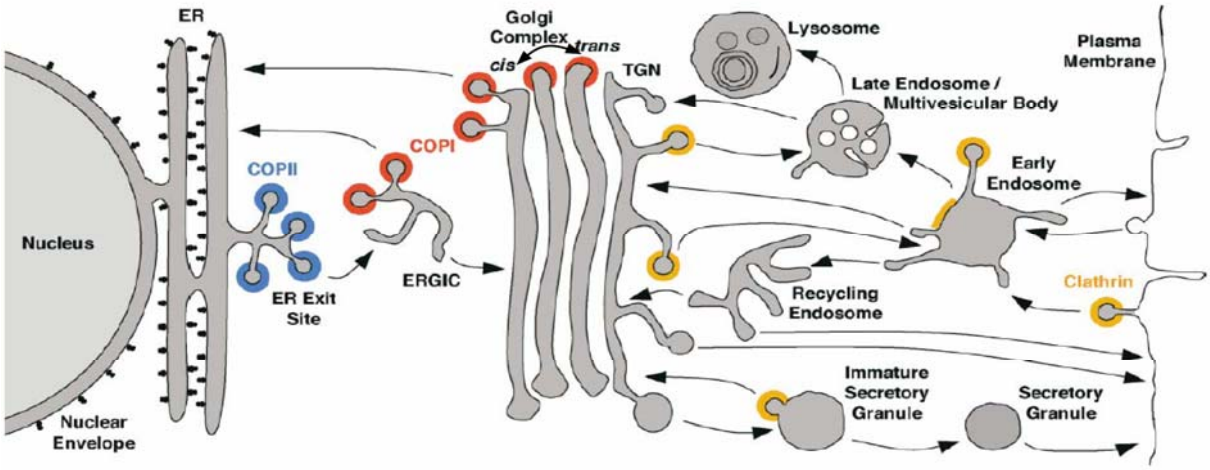


Abbildung 1: Schematische Darstellung des sekretorischen Transportwegs. Nach Import in das ER gelangen die Proteine via COPII-Vesikel (blau) zum *ER-Golgi-intermediate-compartment* (ERGIC). Der bidirektionale intra Golgi sowie der retrograde Golgi-ER Transport wird durch COPI-Vesikel vermittelt (rot). Der Export vom *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Zielmembran wird durch Clathrin umhüllte Vesikel vermittelt (gelb). Modifiziert nach (Bonifacino and Glick, 2004).

1.1 Import in das ER sowie die ersten Prozessierungschritte

Sekretorische Proteine sowie Membranproteine besitzen eine hydrophobe Signalsequenz, die dazu führt, dass die Translation an Ribosomen angehalten wird (Walter and Blobel, 1981a; Walter and Blobel, 1981b; Walter et al., 1981) und die naszierende Polypeptidkette zusammen mit dem Ribosom an die ER-Membran rekrutiert wird (Blobel and Potter, 1967a; Blobel and Potter, 1967b). Die hydrophobe Signalsequenz wird dabei von dem so genannten *signal-recognition-particle* (SRP) erkannt, welches durch Bindung an den SRP-Rezeptor (SR) die Rekrutierung an die ER-Membran vermittelt (für eine Zusammenfassung siehe (Wild et al., 2004). Nachdem dieser Komplex an die Membran gebunden wurde, startet die Translation

erneut, und die naszierende Polypeptidkette wird über das so genannte Translokon in das ER inseriert (Kalies and Hartmann, 1998; Wilkinson et al., 1997). Membranproteine besitzen weitere Signalsequenzen, die dazu führen, dass die Proteine bei diesem Schritt in die Membran einlagert werden. Sezernierte und luminal verbleibende Proteine werde dagegen vollständig in das ER transportiert. Chaperone im ER vermitteln und kontrollieren die korrekte Faltung der inserierten Proteine, und als erste Prozessierungsschritte werden sowohl Disulfidbrücken gebildet als auch Asparagin-Reste N-glykosidisch modifiziert (Abeijon and Hirschberg, 1992; Bukau and Horwich, 1998; Gething and Sambrook, 1992). Zwei interagierende Kontrollsysteme stellen dabei sicher, dass falsch gefaltete oder unvollständig prozessierte Proteine nicht im ER akkumulieren und nach Rücktransport in das Cytosol proteolytisch abgebaut werden. Diese Systeme werden als *unfolded protein response* (UPR) und *ER-associated degradation* (ERAD) bezeichnet (Friedlander et al., 2000; Travers et al., 2000). Haben die Proteine diese Qualitätskontrollen passiert, werden sie weiter zum Golgi-Apparat transportiert.

1.2 Der COPII-vermittelte Transport vom ER zum Golgi

Die korrekt gefalteten und prozessierten Proteine verlassen das ER von speziellen Membranbereichen aus, die als *ER-exit-sites* oder *transitional endoplasmic reticulum* (tER) bezeichnet werden (Hammond and Glick, 2000). Proteine, die ein entsprechendes ER-Export-Signal aufweisen, werden dort in 60-65 nm große COPII-Vesikel (COP von *coat protein*) aufgenommen, und anschließend zum *ER-Golgi-intermediate-compartment* (ERGIC) transportiert (Barlowe et al., 1994). COPII-Vesikel entstehen, indem die in ihrer GDP-gebundenen Form lösliche, kleine GTPase Sar1p durch den Austauschfaktor Sec12 aktiviert wird (Barlowe et al., 1993; Barlowe and Schekman, 1993). Da Sec12 an der ER-Membran lokalisiert, ist der Austausch zu Sar1p-GTP und somit die COPII-Vesikel Bildung auf die ER-Membranen beschränkt. Sar1p-GTP ist nun über seine N-terminale amphiphatische Helix an die Membran gebunden, und kann somit den heterodimeren Komplex Sec23/24 rekrutieren. Diese Proteine bilden die innere Hülle der COPII-Vesikel und binden anschließend den heterotetrameren Komplex Sec13/31, welcher die äußere Hülle bildet und die Membran deformiert (Fath et al., 2007; Matsuoka et al., 1998). Der so genannte *prebudding complex* aus Sar1p und Sec23/24 bindet

direkt an Vesikelfracht und hat eine konkave Struktur, wodurch die Möglichkeit zur Interaktion mit Frachtproteinen auf der Vesikeloberfläche maximiert wird (Bi et al., 2002; Miller et al., 2003). Um mit dem ERGIC zu fusionieren, muss das COPII-Vesikel seine Proteinhülle verlieren. Dazu ist die GTP Hydrolyse durch Sar1p notwendig, die durch das Sec23 Protein der inneren Hülle aktiviert wird (Yoshihisa et al., 1993).

Der Ursprung des ERGIC, welches auch als 15°C-Kompartiment oder *vesicular-tubular-cluster* (VTC) bezeichnet wird, ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist sowohl für COPI als auch für COPII Marker positiv, und wird durch das Lectin ERGIC-53 definiert (Hauri et al., 2000). Für die Entstehung des in der Nähe des *cis*-Golgi liegenden Kompartiments werden verschiedene Modelle diskutiert. So wird in einigen Modelle angenommen, dass es *de novo* durch homotypische Fusion von COPII-Vesikeln entsteht und durch Maturierung in *cis*-Golgi-Zisternen übergeht (Glick and Malhotra, 1998). In anderen Modellen wird hingegen angenommen, dass es sich um ein bestehendes Kompartiment handelt, mit dem COPII-Vesikel heterotypisch fusionieren (Bannykh and Balch, 1998). Da im ERGIC Membranproteine, welche zwischen ER und Golgi zyklisieren, mit COPI-Strukturen kolokalisieren, einige sekretorische Proteine jedoch nicht, wird angenommen, dass es sich hierbei um eine Sortierungsstelle zwischen retrogradem und anterogradem Transport handelt (Martinez-Menarguez et al., 1999; Scales et al., 1997). Die sekretorischen Proteine verlassen das ERGIC anschließend in anterograder Richtung und treten auf der cis-Seite des Golgi-Apparates ein.

1.3 Der Golgi-Apparat und die Rolle von COPI-Vesikeln

Als nächstes werden sekretorische und Membran-Proteine im Golgi-Apparat vollständig prozessiert und anschließend zu ihren Bestimmungsorten transportiert. Der Golgi-Apparat (benannt nach seinem Entdecker Camillo Golgi) besteht in Säugetierzellen aus ca. vier bis sechs abgeflachten Zisternen, die stapelförmig angeordnet sind und in der Nähe des Zellkerns (perinuklear) lokalisieren. Er lässt sich in drei Bereiche, dem *cis*-, *medialen*- und *trans*-Golgi einteilen, wobei sekretorische Proteine an der cis Seite in den Golgi eintreten und ihn auf der trans Seite verlassen. Dem Golgi-Apparat vorgelagert bzw. nachfolgend befinden sich noch die so genannten cis- bzw. trans-Golgi-Netzwerke (CGN bzw. TGN). Zellen

höherer Eukaryonten können bis zu 100 solcher Golgi-Stapel besitzen (Rambourg and Clermont, 1997). Während die Proteine von der cis zur trans-Seite wandern, werden sie weiter prozessiert. Dabei kommt es zur O-Glykosylierung, der Modifikation schon bestehender N-glykosidischer Seitenketten, oder auch zur Sulfatierung, wobei die einzelnen Schritte in einer festgelegten Reihenfolge von bestimmten Enzymen in den einzelnen Zisternen durchgeführt werden. Diese Golgi residenten Enzyme verändern, im Gegensatz zu Proteine die zwischen ER und Golgi zyklisieren (z.B. die p24 Protein, siehe unten), ihre Lokalisierung nicht, und können daher als Marker-Proteine verwendet werden. So lokalisieren z.B. die GlcNac-Phosphotransferase im cis-Golgi (Kornfeld and Kornfeld, 1985), die β1,2 N-Acetylglucosaminyltransferase I (NAGT I) und α1,3-1,6 Mannosidase II (Mann II) im medialen und trans Golgi, die β1,4 Galactosyltransferase (GalT) sowie die α2,6 Sialyltransferase (SialylT) hingegen ausschließlich im trans-Golgi und TGN (Rabouille et al., 1995).

Der bidirektionale Transport der Proteine durch den Golgi-Apparat sowie die Rückführung von Proteinen in das ER wird durch COPI-Vesikel vermittelt, die somit, im Gegensatz zu COPII-Vesikeln, Transport in bidirektionale Richtungen durchführen (Orci et al., 1997; Pelham and Rothman, 2000; Rothman and Wieland, 1996). In einer Reihe von Untersuchungen wurden verschiedene Typen von Vesikel identifiziert, die anterograde und/oder retrograde Fracht enthalten (Malsam et al., 2005; Nickel et al., 1998; Orci et al., 2000b). Die genaue Rolle der COPI-Vesikel wird jedoch, gerade im Hinblick auf die Theorie der Zisternenprogression, kontrovers diskutiert (Glick and Malhotra, 1998). Anterograder Transport erfolgt laut dieser Theorie, indem cis-Golgi-Zisternen durch Maturierung in trans-Golgi-Zisternen übergehen. COPI-Vesikel wären in diesem Modell lediglich für den retrograden Transport von Golgi residenten Proteinen innerhalb des Golgis, sowie von ER residenten Proteinen zurück zum ER zuständig. Elektronenmikroskopische Studien weisen jedoch auf eine Abreicherung verschiedener Golgi-residenter Proteine in COPI-Vesikel hin, was kontrovers zur Zisternenprogression steht (Orci et al., 2000a).

Die Bildung der COPI-Vesikel verläuft analog zu der COPII-Vesikelbiogenese. Sie wurden erstmals in einem zellfreien System, mit dem der Transport zwischen verschiedenen Golgi Zisternen untersucht wurde, nachgewiesen (Malhotra et al., 1989). Die Proteinhülle besteht aus der kleinen GTPase ARF1 (analog zu Sar1p) und dem heptameren Proteinkomplex Coatomer (Serafini et al., 1991; Waters et al.,

1991). Der 550 kDa schwere Coatomer setzt sich aus folgenden Untereinheiten zusammen: α-COP (138 kDa), β-COP (107 kDa), β'-COP (102 kDa), γ-COP (97 kDa), δ-COP (57 kDa), ε-COP (34 kDa) and ζ-COP (20 kDa). Kürzlich wurden für die γ- und ζ-Untereinheit zwei weitere Isoformen, γ2-COP und ζ2-COP, identifiziert (Blagitko et al., 1999; Futatsumori et al., 2000), wobei jeder Coatomer-Komplex nur eine γ- und eine ζ-Isoform enthält (Wegmann et al., 2004). Quantitative Untersuchungen ergaben, dass die vier möglichen Kombinationen γ1ζ1, γ1ζ2, γ2ζ1, und γ2ζ2 in einem Verhältnis von 53:16:26:5 im Cytosol vorliegen. Durch Immunfluoreszenz und elektronenmikroskopische Studien konnte eine differenzielle Lokalisierung dieser Coatomer-Subtypen beobachtet werden, was auf unterschiedliche Funktionen und der Existenz mehrere COPI-Vesikeltypen schließen lässt (Moelleken et al., 2007; Wegmann et al., 2004). Coatomer bindet an die cytoplasmatischen Domänen von Transmembranproteinen, die die ER-Rückführungssequenz KKXX bzw. KXKXX besitzen (Cosson and Letourneur, 1994). Diese Bindung ist wichtig, damit entsprechende Proteine in das ER zurück transportiert werden können (Letourneur et al., 1994). Die kleine GTPase ARF1 besitzt zusätzlich zu einer N-terminalen amphiphatischen Helix einen Myristoylrest, über den es stabil in die Membran eingelagert wird (Kahn et al., 1991). Zusammen mit Transmembranproteinen kann es in seiner aktiven GTP Form Coatomer binden. Obwohl Coatomer unter Hochsalzbedingungen in zwei Subkomplexe bestehend aus α,β´,ε bzw. β,γ,δ,ζ gespalten werden kann (Fiedler et al., 1996), wird er im Gegensatz zur COPII-Hülle *en bloc* rekrutiert (Hara-Kuge et al., 1994). Die genaue Vesikelbiogenese ist in Kapitel 2 beschrieben.

1.4 Transport vom Golgi zum Bestimmungsort: Clathrin-Vesikel

Nach vollständiger Prozessierung werden die sekretorischen Proteine im TGN sortiert und anschließend zu ihren Bestimmungsorten wie Endosomen, Lysosomen oder der Plasmamembran transportiert. Analog zum ERGIC/CGN stellt das TGN eine Schnittstelle sowie einen Sortierungspunkt zwischen Endozytose und sekretorischem Transportweg dar (Gu et al., 2001; Rodriguez-Boulan and Musch, 2005), wobei für den sekretorischen Prozess zwischen dem reguliertem und dem konstitutiven Mechanismus unterschieden wird. Der regulierte Prozess beschränkt sich dabei auf endokrine und neuroendokrine Zellen, die im wesentlichen Hormone über so

genannte sekretorische Granulen zur Plasmamembran transportieren (Tooze et al., 2001). Diese Vesikeltypen, für die bisher keine Hüllproteine beschrieben wurden, verschmelzen erst nach Stimulation mit der Plasmamembran, woraufhin sie ihre Ladung in den extrazellulären Raum entlassen.

Der konstitutive Transport zu Endosomen, Lysosomen und der Plasmamembran, der in allen Zelltypen vorkommt, wird durch Clathrin-umhüllte Vesikel (CCVs) vermittelt (Pearse, 1975). Die Proteinhülle dieser Vesikel wurde 1969 erstmals durch elektronenmikroskopische Untersuchungen beschrieben (Kanaseki and Kadota, 1969). Die beobachteten penta- und hexagonalen Strukturen entstehen durch Polymerisierung des Proteinkomplexes Clathrin. Dieser Komplex wiederum besteht aus drei leichten (25 kDa) und drei schweren (190 kDa) Ketten, die zusammen ein Triskelion bilden (Kirchhausen, 2000; Ungewickell and Branton, 1981). Durch Aneinanderlagerung der schweren Ketten, die an einem zentralen Punkt zusammenhängen, kommt es zur Polymerisierung und Ausbildung des Clathrinnetzwerks, wodurch die Membran gekrümmt wird. Neben dem Clathrin Triskelion sind die so genannten Adaptorproteine, die Clathrinnetzwerke mit der Vesikelmembran verknüpfen, an der Vesikel Bildung beteiligt (Owen et al., 2004). Zurzeit sind vier verschiedene Adaportporteinkomplexe (AP1-4) bekannt, die in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisieren und somit wahrscheinlich verschiedene Typen von Clathrinvesikeln definieren. Sie können an die cytoplasmatischen Domänen von Frachtproteinen binden und werden daher mit der Sortierung und Rekrutierung von Fracht in Verbindung gebracht (Ohno et al., 1995). AP1, AP3 und AP4 sind am sekretorischen Transport vom TGN zu späten Endosomen, Lysosomen oder der Plasmamembran beteiligt, wohingegen AP2 im retrograden Transport von der Plasmamembran zum Golgi involviert ist (Boehm and Bonifacino, 2001). An der Abschnürung der gebildeten Vesikel ist die GTPase Dynamin beteiligt, welche um den Hals der Membranausstülpung polymerisiert (Wang et al., 1995). Durch Hydrolyse des gebundenen GTPs kommt es zur Kontraktion der Polymere, wodurch das Vesikel von der Donormembran getrennt wird. Obwohl die Clathrinhülle bei dem im Cytosol vorherrschenden pH-Wert und der entsprechenden Ionenstärke stabil ist, kommt es kurz nach der Abknospung zur Depolymerisierung sowie Ablösung der Adapterproteine. An diesem Prozess ist wahrscheinlich das Chaperon Hsp70 beteiligt (Holstein et al., 1996).

2 COPI-Vesikel: Biogenese und Funktion

Die ca. 75 nm großen COPI-Vesikel vermitteln zum einen den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER, zum anderen sind sie im bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparats involviert. ER residente Membranproteine, welche durch COPII-vermittelten Transport das ER verlassen haben, besitzen die cytoplasmatische Signalsequenz KKXX oder KXKXX (Jackson et al., 1990), welche sie als Substrate für den retrograden Transport in das ER markiert. Luminale ER residente Protein, wie z.B. die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), enthalten die Signalsequenz KDEL oder HDEL. Über Bindung an den KDEL Rezeptor Erd2p, welcher wiederum eine KKXX Sequenz aufweist, werden diese Protein zurück in das ER transportiert (Majoul et al., 1998; Munro and Pelham, 1987). Auch der Rücktransport Golgi residenter Enzyme, wie z.B. α-Mannosidase II, innerhalb des Golgis, von trans- zu medialen-, bzw. cis-Zisternen wird durch COPI-Vesikel vermittelt. Neben diesen retrograden Transportprozessen vermitteln COPI-Vesikel auch den Transport in anterograder Richtung (Nickel et al., 1998; Orci et al., 2000b; Orci et al., 1997).

2.1 Biogenese von COPI-Vesikeln

In einem chemisch definierten *in vitro* Rekonstitutionssystem konnte die minimale Maschinerie für die Bildung von COPI-Vesikeln bestimmt werden. Unter Verwendung von Liposomen, deren Zusammensetzung der Golgi Membran entsprach, konnte dabei neben der schon erwähnten kleine GTPase ARF1 und dem heptameren Proteinkomplex Coatomer, der cytoplasmatische, C-terminale Schweif des Proteins p23 als notwendige Komponente charakterisiert werden (Bremser et al., 1999). p23 ist ein Vertreter der p24-Proteine (Sohn et al., 1996), bei denen es sich um eine hoch konservierte Familie von Typ-I Transmembranproteinen handelt, die im frühen sekretorischen Transportweg zyklisieren (Emery et al., 2000). Diese Proteinfamilie umfasst die sechs Mitglieder p23, p24, p25, p26, p27 sowie tp24 (siehe auch Kapitel 2.2). Obwohl p23 in dem *in vitro* Rekonstitutionssystem als notwendige Komponente charakterisiert wurde, konnten kürzlich zwei unterschiedliche Vesikelpopulationen isoliert werden, von denen nur eine p24-

Proteine enthielt (Malsam et al., 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass die p24-Familienmitglieder nicht die einzigen Transmembranproteine sind, die eine Vesikelbildung ermöglichen können.

Der initiale Schritt der Vesikelbildung ist die Rekrutierung der kleinen GTPase ARF1 in ihrer GDP gebundenen, löslichen Form an die Golgi-Membran (Abbildung 2). Dies geschieht über Bindung an die cytoplasmatischen Domänen der p24-Proteine. Kompetitionsexperimente und Plasmonenresonanz-Untersuchungen ergaben, dass ARF1-GDP nur von einigen Dimeren der p24-Proteine gebunden wird (Anderl, persönliche Mitteilung; Gommel et al., 2001; Heiss, 2004; Majoul et al., 2001). Neben den p24-Proteinen wurde auch das Golgi-SNARE Protein Membrin als ARF1-GDP Rezeptor beschrieben (Honda et al., 2005). Durch den Austausch des GDP zu GTP wird ARF1 anschließend aktiviert. Dieser Austausch wird durch so genannte *Guanine-Exchange-Factors* (GEF) vermittelt, die eine katalytische Sec7 Domäne besitzen (Chardin et al., 1996). Das für ARF1 an der Golgi Membran verantwortliche ARF-GEF ist wahrscheinlich GBF1, welches auf der cis-Seite des Golgi lokalisiert, und durch den Pilzmetaboliten Brefeldin A (BFA) inhibiert werden kann (Robineau et al., 2000; Zhao et al., 2002). Aufgrund dieses Austauschs dissoziiert ARF1 von den p24-Proteinen und erfährt eine Konformationsänderung, wodurch es über seine N-terminale amphiphatische α-Helix und den daran gebundenen Myristoylrest stabil in die Membran einlagert wird (Franco et al., 1995).

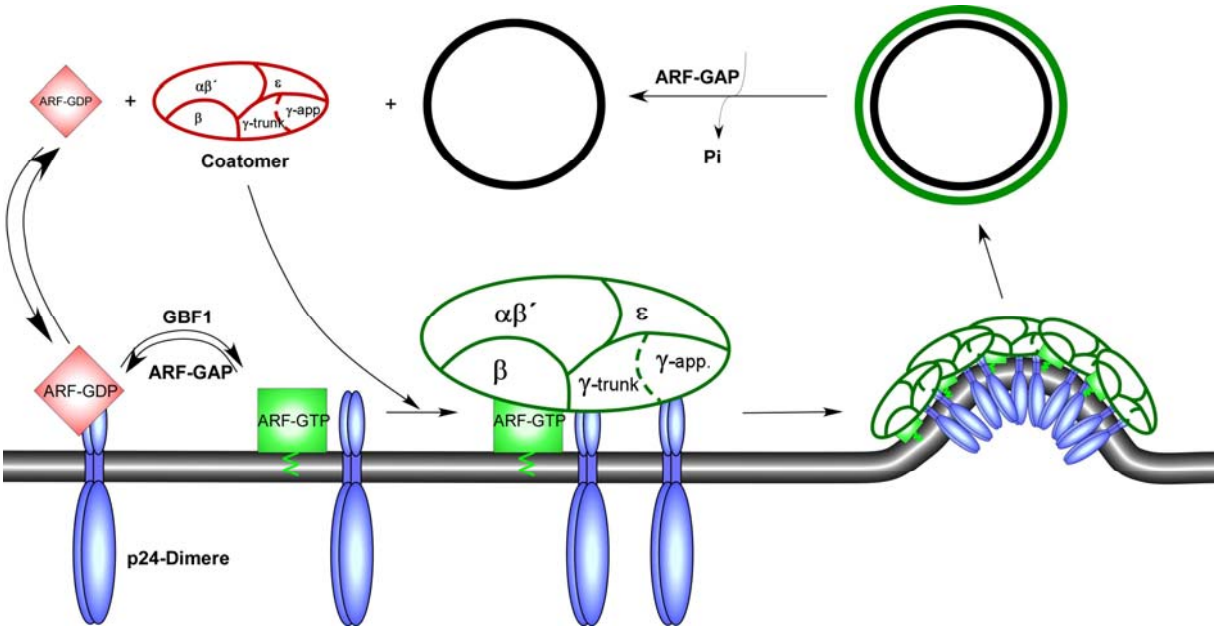


Abbildung 2: Mechanismus der COPI-Vesikelbiogenese. Erläuterung siehe Text. Die inaktiven, löslichen Komponenten sind in rot, die aktiven, gebundenen in grün gezeigt. Modifiziert nach (Nickel et al., 2002).

Das membrangebundene ARF1-GTP ist nun zusammen mit den p24 Proteinen in der Lage, den heptameren Proteinkomplex Coatomer zu binden. ARF1 bindet Coatomer dabei über die β-, β´-, δ-, sowie γ-Untereinheit (Sun et al., 2007; Zhao et al., 1997; Zhao et al., 1999). Alle Mitglieder der p24 Proteinfamilie binden Coatomer sowohl an der *trunk*- als auch an der *appendage*-Domäne von γ-COP, wobei die beiden Bindungsstellen unabhängig voneinander sind (Bethune et al., 2006a; Harter and Wieland, 1998). Die Bindung erfolgt dabei ausschließlich durch dimere p24-Proteine, wobei die Bindungskonstanten für die einzelnen Mitglieder mit ca. 10 µM relativ gering sind. Der Befund, dass die p24-Proteine als Dimere an zwei Bindungstellen in γ-COP binden, ist in Übereinstimmung mit der in Präzipitationsexperimenten gefundenen 4:1 Stöchiometrie von p23 zu Coatomer (Reinhard et al., 1999). p25, welches als einziger Vertreter eine klassische KKXX Sequenz aufweist, kann zusätzlich als Monomer an α- und β´-COP binden (Bethune et al., 2006a; Dominguez et al., 1998). ARF1-GTP alleine weist ebenfalls nur eine geringe Affinität zu Coatomer auf, und somit ist wahrscheinlich, dass eine effiziente und dauerhafte Bindung von Coatomer nur dann erfolgt, wenn ARF1-GTP und p24-Dimere benachbart sind. Durch limitierte Proteolyse und Einzelmolekül-FRET-Messungen konnte eine Konformationsänderung der Coatomerstruktur nach Bindung von p23- und p24-Dimeren beobachtet werden (Langer et al., submitted; Reinhard et al., 1999). Diese Konformationsänderung könnte analog zur Bindung der Sec13/31 Komplexe im COPII-System die nötige Energie zur Membrankrümmung liefern.

Damit das so gebildete COPI-Vesikel mit der Zielmembran fusionieren kann, muss es seine Proteinhülle verlieren. Dazu ist die Hydrolyse von GTP durch ARF1 notwendig (Tanigawa et al., 1993). Die relativ geringe intrinsische Aktivität von ARF1 wird mittels GTPase-aktivierende-Proteine (GAPs) erhöht (Cukierman et al., 1995; Reinhard et al., 2003). Die Hydrolyse von GTP ist jedoch nicht nur für die Depolymerisierung der Proteinhülle notwendig, sondern auch für die Aufnahme von Fracht in das entstehende Vesikel (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000).

2.2 Die p24 Proteinfamilie

Die p24 Proteinfamilie umfasst in Hefe acht und in Säugetierzellen sechs Vertreter integraler Typ-I Transmembranproteine, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie in vier Untergruppen eingeteilt werden. In Säugetierzellen gibt es dabei je einen Vertreter der p23, p24 und p25 Gruppe und drei der p26 Gruppe. In der Hefe sind zusätzlich zwei weiter Vertreter der p25 Gruppe bekannt. Je nach Nomenklatur werden die Untergruppen auch mit α (p25), β (p24), γ (p26) oder δ (p23) bezeichnet Tabelle 1.

Untergruppe	Säugetiere	Hefe
p23 / δ	p23	Erv25p
p24 / β	p24	Emp24p
p25 / α	p25	Erp1p, Erp5p, Erp6p
p26 / γ	p26, p27, tp24	Erp2p, Erp3p, Erp4p

Tabelle 1: Die Vertreter der vier p24 Untergruppen in Säugern und Hefe.

Die p24 Proteine zeigen große Homologien in ihrem Aufbau. So besitzen alle eine relativ große luminale Domäne, die zwei Cysteine an konservierten Stellen enthält, eine *coiled-coil* Struktur in der Nähe des Transmembran-Spans sowie einen relativ kurzen cytoplasmatischen C-Terminus. Die cytoplasmatischen Enden, auch Schweif genannt, weisen ein konserviertes Motiv mit der Sequenz $FFXXBB(X)_n$ auf, wobei $n \geq 2$ ist, und B eine der basischen Aminosäuren Arginin (R) oder Lysin (K) repräsentiert. Somit stellt dieses Motiv eine abgeänderte Version der ER-Rückführungssequenz KKXX dar, welche in der Lage ist, Coatomer zu binden (Cosson and Letourneur, 1994). Wie bereits oben erwähnt, besitzt lediglich p25 die klassische KKXX Sequenz, wobei XX hier Leucin (L) und Valin (V) sind.

Als erster Vertreter dieser Proteinfamilie wurde 1991 p25 im ER identifiziert (Wada et al., 1991). Erst durch Untersuchungen der Proteinzusammensetzung von COPI-Vesikeln und der Entdeckung von p23 und p24 wurde die Existenz einer Proteinfamilie beschrieben (Blum et al., 1996; Sohn et al., 1996; Stamnes et al., 1995). Wird p24 in einer Hefemutante, in der die Vesikelfusion unterbunden ist, ausgeschaltet, kommt es zu einer verringerten Anhäufung von Vesikeln. Zusätzlich wurde die cytoplasmatische Domäne von p23 als Komponente der minimalen

Maschinerie zur Bildung von Vesikeln in vitro identifiziert (Bremser et al., 1999). Dadurch wurde diesen Proteinen eine Rolle in der Vesikelbildung zugeschrieben. Durch weitere Studien wurden p26 und p27 als Mitglieder der p24-Proteinfamilie identifiziert, die wie die anderen Vertreter hauptsächlich im frühen Golgi lokalisieren (Blum et al., 1999; Dominguez et al., 1998; Fullekrug et al., 1999). Da p27 Modifikationen des späten Golgi aufweist, wird vermutet, dass es auch in den trans Golgi Bereich transportiert wird. Alle p24 Proteine zyklisieren im frühen sekretorischen Transportweg, wobei verschiedene Studien vermuten lassen, dass der Transport der einzelnen Mitglieder aneinander gekoppelt ist (Emery et al., 2000). Wird die ER-Rückführungssequenz von p25 mutiert, so lokalisiert nicht nur p25 sondern zum Teil auch andere Vertreter an der Plasmamembran (Emery et al., 2003). Dies wird auf eine Interaktion der einzelnen Mitglieder über ihre *coiled-coil* Motive zurückgeführt. Zusätzlich kann die starke Überexpression eines p24 Mitglieds zu Akkumulierung mehrerer Vertreter im ER führen. Durch simultane Überexpression mehrerer p24 Mitglieder konnte diese Akkumulierung zum Teil aufgehoben werden (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Fullekrug et al., 1999). Neben diesen *in vivo* Daten konnte die Ausbildung verschiedener Heterooligomere durch Coimmunopräzipitationen *in vitro* nachgewiesen werden (Fullekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999). Nähere Untersuchungen mittels Gelfiltrationsexperimenten ergaben, dass als höchster Oligomerisierungsgrad Dimere vorliegen (Jenne et al., 2002). Außer p26, welches ausschließlich als Monomer vorkommt, existieren alle p24 Proteine sowohl in monomerer als auch dimerer Form, wobei der Grad der Dimerisierung zwischen den einzelnen Vertreter als auch in den Organellen variiert. Es konnte jedoch, außer für das Heterodimer aus p23 und p24 (Majoul et al., 2001), keine spezifische Interaktion zwischen verschiedenen Vertreter *in vivo* nachgewiesen werden. Auch die Existenz von Homodimeren konnte bisher weder *in vitro* noch *in vivo* gezeigt werden.

Wie bereits erwähnt besitzen die p24 Proteine cytoplasmatische Schweife mit einer abgeänderten ER-Rückführungssequenz $FFXXBB(X)_n$, über die sie Coatomer binden können. Dabei erfolgt die Bindung an die beiden γ-COP Domänen ausschließlich in der dimeren Form, wohingegen ER residente Proteine mit klassischer KKXX Sequenz in monomerer Form an die N-Termini der α- und β´-Untereinheiten binden (Bethune et al., 2006a; Eugster et al., 2004). Für die Bindung an γ-COP ist nicht nur das dibasische Motiv „BB“ sondern auch die Diphenylalanin

Sequenz „FF“ notwendig (Dominguez et al., 1998; Goldberg, 2000; Sohn et al., 1996). Die p24 Protein, welche im frühen sekretorischen Transportweg zyklisieren, weisen somit verglichen mit ER residenten Proteine ein unterschiedliches Bindungsverhalten zu Coatomer auf. Zusätzlich sind die p24 Proteine im Gegensatz zu ER residenten Proteinen in der Lage, eine Konformationsänderung in Coatomer zu induzieren (Langer et al., submitted; Reinhard et al., 1999). Obwohl die Bindungskonstanten der einzelnen p24 Dimere zu γ-COP im gleichen Bereich liegen, wird diese Konformationsänderung jedoch nur durch p23 und p24, sowie p23/p24 Heterodimere bewirkt. Der dimere Charakter der p24 Proteine ist jedoch nicht nur für die Bindung zu Coatomer, sondern auch für die Rekrutierung der kleinen GTPase ARF1 entscheidend (Anderl, persönliche Mitteilung; Gommel et al., 2001; Heiss, 2004). Der oligomere Zustand der p24 Protein spielt somit eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von ARF1 und Coatomer an die Golgi-Membran, wodurch die Bildung von entsprechenden Homo- oder Heterooligomeren von Bedeutung für die COPI-Vesikelbiogenese ist.

Neben der Bindung von p24 Proteinen an die COPI-Hüllproteine wurde zusätzlich eine Interaktion mit Komponenten der COPII-Maschinerie berichtet (Belden and Barlowe, 1996; Belden and Barlowe, 2001; Dominguez et al., 1998). So binden alle p24 Mitglieder an die Sec23 Untereinheit, sowie p23 und p24 zusätzlich an den Sec13/31 Komplex. Darüber hinaus konnte eine Interaktion von p24 mit der GTPase Sar1p beobachtet werden. Es ist jedoch unklar, wie eine spezifische Rekrutierung von COPI-Komponenten an die Golgi-Membran und COP-II Komponenten an ER-Membranen reguliert wird, obwohl die p24 Proteine zwischen beiden Kompartimenten zyklisieren.

2.3 Modelle zur Frachtaufnahme

Damit ein effektiver Transport mittels Vesikel durchgeführt werden kann, muss die Aufnahme und Anreicherung von Ladung bzw. Fracht in das entstehende Vesikel gewährleistet werden. Zusätzlich zur Anreicherung muss eine Sortierung verschiedener Typen von Ladung vollzogen werden, damit es zu einem entgegen gesetztem Transport von anterograder und retrograder Fracht durch COPI-Vesikel kommen kann. Wie bereits erwähnt, ist für eine effiziente Frachtaufnahme die Hydrolyse von GTP durch ARF1 notwendig. Bei Verwendung des nur langsam

hydolysierbaren Analogons von GTP, GTPγS, konnte ein verringerte Frachtaufnahme sowohl *in vitro* (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998) als auch *in vivo* (Pepperkok et al., 2000) beobachtet werden. Da die intrinsische Aktivität von ARF1 relativ gering ist, ist somit eine Funktion der *GTPase-aktivierende-Proteine* (GAPs) während der Frachtaufnahme denkbar. Da GAP-Aktivität jedoch ebenfalls für die Depolymerisierung der Vesikelhülle benötigt wird, kommen diesem Prozess auf den ersten Blick zwei entgegengesetzte Funktionen zu. Es wurden mehrere Modelle aufgestellt, die diese scheinbare Diskrepanz zu erklären versuchen.

Bei der Untersuchung des Einflusses von GAP Proteinen auf die Aktivität von ARF1 konnten entgegengesetzte Effekte für Coatomer und p24 Proteine beobachtet werden. So war die Hydrolyseaktivität in Anwesenheit von Coatomer gesteigert, wohingegen die cytoplasmatischen Schweife von p23 und p24 die Aktivität verringerten. Diese Effekte konnten sowohl in Abwesenheit (Goldberg, 1999; Goldberg, 2000) als auch in Anwesenheit (Lanoix et al., 2001; Szafer et al., 2001) von Liposomen oder Golgi-Membranen beobachtet werden, wobei der Effekt für Coatomer an Golgi-Membranen geringer ausfiel. Auf Basis dieser Daten wurde ein kinetisches Modell zur Frachtaufnahme entwickelt (Abbildung 3).

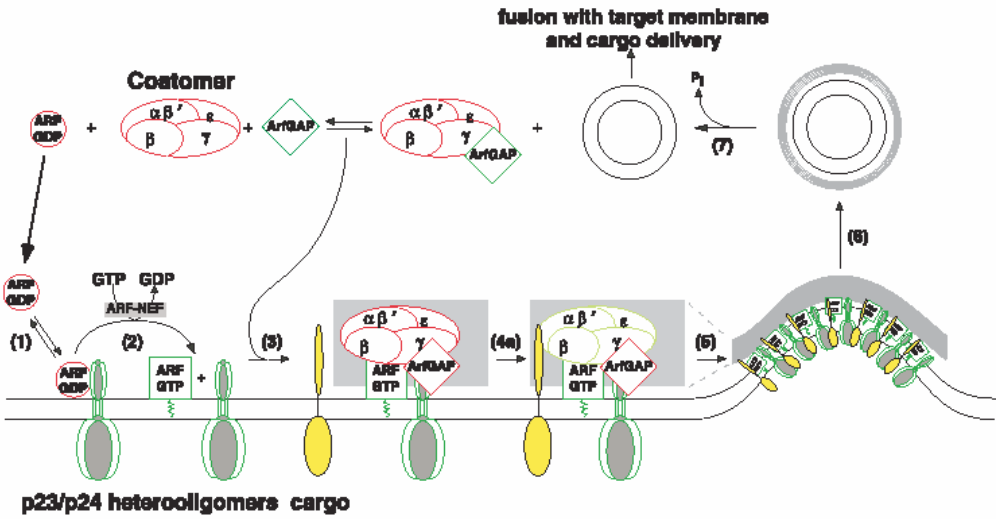


Abbildung 3: Kinetisches Modell zur Vesikelbildung: Nach Rekrutierung von ARF1-GDP durch p24 Oligomere (1) kommt es zum GEF-vermittelten Austausch (2) wodurch ARF1-GTP stabil an Membran rekrutiert wird. Binden nun ARF1 und p24 zusammen Coatomer (3) ist die GAP Aktivität inhibiert und Coatomer ist in der Lage, Frachtmoleküle zu binden (4). Dies führt anschließend zur Bildung einer Proteinhülle und schlussendlich zur Bildung des Vesikels (5+6). Bindet nur ARF1 alleine Coatomer kommt es zur GAP vermittelten GTP Hydrolyse und Coatomer und ARF1 dissoziieren von der Membran (Umkehrung von Schritt 3). Die Abbildung wurde übernommen aus (Bethune et al., 2006b).

Bindet Coatomer in Abwesenheit von p24 Oligomeren an ARF1, kommt es zu einer raschen Hydrolyse von GTP, vermittelt durch ARF-GAP, wodurch ARF1 und Coatomer wieder von der Membran abdissoziieren. In Gegenwart von p24 Oligomeren hingegen ist die GAP vermittelte GTP Hydrolyse inhibiert, wodurch Coatomer länger an der Membran gebunden bleibt. Dadurch kann Coatomer nun Ladung binden (Schritt 4a in Abbildung 3), und es kommt zur Bildung einer Hüllschicht, die schließlich zur Vesikelbildung führt. Obwohl diese Model die beobachteten Interaktionen zwischen den p24 Proteinen, ARF1 und Coatomer sowie die regulatorischen Effekte vereint, kann es nicht die Entstehung von Vesikel ohne p24 Proteine erklären (Malsam et al., 2005).

Kürzlich wurde eine Abhängigkeit der ARF-GAP1 vermittelten GTP Hydrolyse durch ARF1 von der Krümmung der Membranoberfläche berichtet (Bigay et al., 2005; Bigay et al., 2003). Die Konformationsänderung in ARF1, die durch Austausch von GDP zu GTP oder durch Hydrolyse entsteht, kann mittels Tryptophanfluoreszenz spektroskopisch verfolgt werden. Es zeigte sich, dass die Hydrolyseaktivität in Anwesenheit von kleinen Liposomen mit hoher Membrankrümmung, höher ist als in Anwesenheit von großen Liposomen. Kleine Liposomen haben eine weniger dicht gepackte Lipidoberfläche. ARF-GAP1 kann eine amphiphatische α-Helix in diese Lipidoberfläche inserieren, wodurch die Bindung an der Membranoberfläche stabilisiert wird (Bigay et al., 2005). An weniger stark gekrümmten Oberflächen ist die Lipidschicht dichter, wodurch die Bindung von ARF-GAP1 an die Membran geschwächt wird. Auf Basis dieser Daten zusammen mit *in vivo* Daten unter Verwendung von GFP markierter Komponenten wurde ein dynamisches Model zur Anreicherung und Sortierung von Fracht in das entstehende Vesikel aufgestellt (Liu et al., 2005) (Abbildung 4). Auf flacher Membran kommt es zur Bindung von Coatomer durch ARF1 und Transmembranproteine. Da diese Bindung, auf Grund geringer GAP Aktivität stabil ist, ist genügend Zeit gegeben, dass Coatomer Frachtmoleküle binden kann. Mehrere Komplexe, bestehend aus Coatomer, ARF1 und Transmembranproteinen initiieren nun die Bildung eines Vesikels. Durch die entstehende Krümmung wird die Bindung von ARF-GAP1 verstärkt und somit die Hydrolyseaktivität erhöht, so dass Coatomer und ARF1 von der Membran dissoziieren. Durch diesen Prozess kommt es zu einem Fluss von Hüllkomponenten von den Rändern zur Spitze des entstehenden Vesikel, wodurch schrittweise Fracht in das Vesikel transportiert wird. Da das gebildete Vesikel die maximale Krümmung

besitzt, kommt es sofort nach Abknospung von der Membran zur vollständigen Dissoziation der Proteinhülle, und das freie Vesikel kann mit der Zielmembran fusionieren. Ist die Hydrolyse von GTP durch Verwendung von z.B. GTPγS oder ARF-Mutanten inhibiert, kann die Anreicherung von Fracht somit nicht erfolgen, was die *in vitro* und *in vivo* beobachtet Effekte erklären würde (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000). Auf der anderen Seite kann dieses Modell nicht die Anreicherung von Fracht erklären, welche nicht mit Coatomer interagiert.

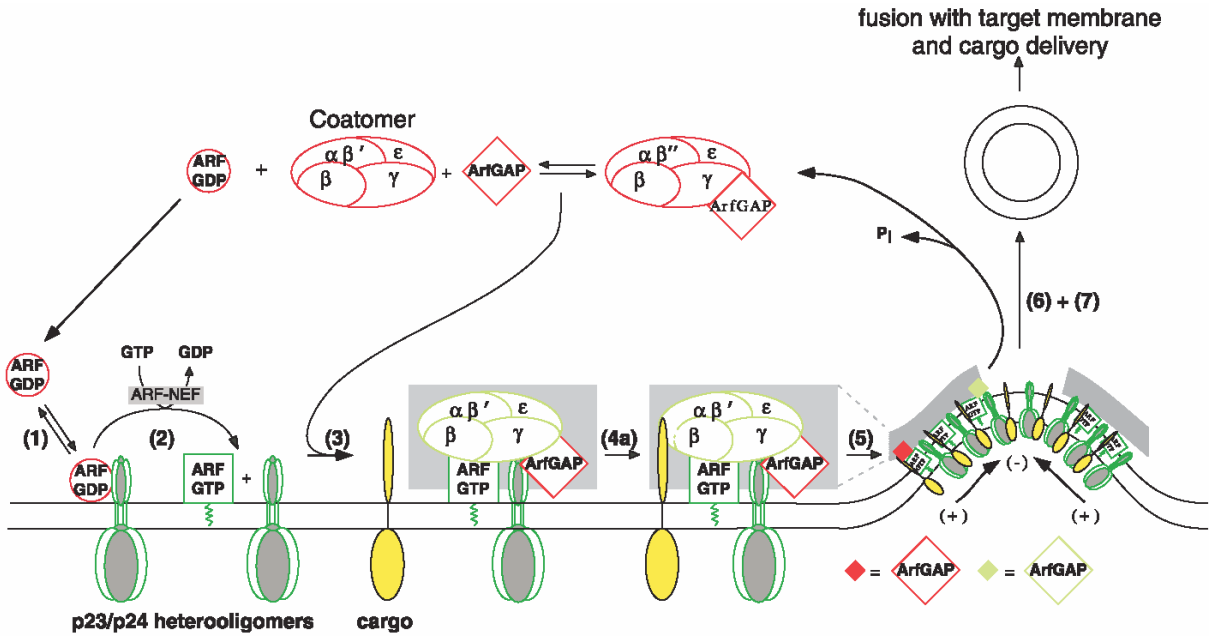


Abbildung 4: Dynamisches Modell zur Frachtaufnahme. Nach Bindung von Coatomer an der flachen Membran ist die ARF-GAP1 Aktivität zunächst gering (durch rote Symbole dargestellt). Erst wenn durch die Bildung eines Vesikels die Krümmung zunimmt, ist die ARF-GAP1 Aktivität hoch genug (durch grüne Symbole dargestellt), dass es zur GTP Hydrolyse und Ablösung von ARF1 und Coatomer kommt. Dadurch kommt es zu einem Fluss von Hüllkomponenten hin zum entstehenden Vesikel, und somit zur Anreicherung von Fracht die an Coatomer bindet. Die Abbildung wurde übernommen aus (Bethune et al., 2006b).

Wie schon beschrieben, binden alle p24 Proteine als Dimere sowohl an die *trunk*- als auch an die *appendage*-Domäne von γ-COP (Bethune et al., 2006a). Diese Bindung ist, genau wie die Interaktion zwischen ARF1 und Coatomer (Bremser et al., 1999), jedoch recht schwach. Coatomer wird somit erst durch Bindung zu mehreren Partnern stabil an die Membran gebunden. Dies wurde in einem weiteren Modell für die Bildung von COPI-Vesikel zusammengefasst (Bethune et al., 2006a). Nach dem Austausch von GDP zu GTP können ARF1 und p24-Dimere zusammen Coatomer binden. Coatomer hat nun die Möglichkeit entweder über die α- oder β´-Untereinheit Frachtmoleküle, oder über die γ-appendage Domäne ein weiteres p24 Dimer zu binden, wodurch die Bindung an der Membran weiter stabilisiert wird. Parallel dazu,

kann aber auch ARF-GAP über Bindung mit ARF1 oder der γ-Untereinheit rekrutiert werden (Eugster et al., 2004), wodurch die GTP Hydrolyse initiiert wird, und ARF1 von der Membran abdissoziiert. Geschieht dies, bevor die Coatomerbindung über Frachtmoleküle oder weitere p24 Dimere stabilisiert wurde, dissoziiert auch Coatomer wieder von der Membran. Dies hat zur Folge, dass Coatomer nur in Anwesenheit von mehreren p24 Dimeren und Frachtmolekülen stabil und über längere Zeit an der Membran gebunden bleibt. Mehrere stabil gebundene Coatomer Komplexe können anschließend die Proteinhülle bilden und die Vesikelbiogenese initiieren. Somit kommt es zu einer Anreicherung von sowohl Fracht als auch p24 Proteinen in dem entstehenden Vesikel. Ist die GTP Hydrolyse unterbunden, bindet Coatomer auch in Abwesenheit von Fracht stabil an der Membran, wodurch der Befund, dass GTP Hydrolyse für die Frachtaufnahme benötigt wird, erklärt wird.

Diesen Modellen gemeinsam ist, dass sowohl ARF1 als auch Coatomer durch Bindung an p24-Dimere an die Membran rekrutiert werden. Nach Austausch von GDP zu GTP ist das Zusammenspiel von ARF1 und p24 notwendig, damit Coatomer stabil und über einen ausreichenden Zeitraum an der Membran gebunden ist, sodass es zur Vesikelbildung kommen kann. Zu welchem Zeitpunkt sich die Dimere der p24 Proteine bilden, und wie dies reguliert wird, ist nicht bekannt. In einem weiteren Modell wurde postuliert, dass ARF1 durch mehrfaches Zyklisieren zwischen der inaktiven GDP und aktiven GTP Form den oligomeren Zustand der p24 Proteine so verändert, dass sie zur Rekrutierung von Coatomer befähigt sind (Nickel et al., 2002). Somit käme ARF1 eine regulatorische Funktion zu. Durch den ARF1 Zyklus würde ein Zeitfenster geöffnet, wodurch Coatomer in der Lage ist, Fracht zu binden und anzureichern. Erst nach Ausbildung bestimmter p24 Oligomere wäre die Bindung von Coatomer stabil genug, sodass es zur Bildung eines Vesikels kommt. Ein direkter Einfluss von ARF1 auf den Oligomerisierungsgrad konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden.

2.4 Transport von COPI-Vesikeln und die Fusion mit der Zielmembran

Nach der vollständigen Bildung knospt das Vesikel von der Donormembran ab und gelangt zur Zielmembran. COPI-Vesikel vermitteln, wie bereits erwähnt, sowohl den bidirektionalen Transport zwischen benachbarten Golgi-Zisternen als auch den retrograden Transport vom Golgi zum ER. Dafür müssen die Vesikel, besonders

beim Golgi ER Transport, über teilweise recht lange Strecken wandern. Der Golgi-Apparat lokalisiert perinukleär in der Nähe des *microtubule-organizing-center* (MTOC). In verschiedenen Studien wurden Mikrotubuli und Aktinfilamente sowie die Motorproteine Dynein, Kinesin und Myosin in Zusammenhang mit der Lokalisierung und dem Transport durch den Golgi Apparat gebracht (Allan et al., 2002). So hat eine Reihe von auf Aktin wirkenden Toxinen sowohl einen Einfluss auf die Golgi-Morphologie als auch auf den anterograden und retrograden Transport (Stamnes, 2002). In näheren Untersuchungen wurde eine Interaktion von Vesikel Hüll-Komponenten wie Coatomer mit Aktin regulierenden Proteinen beschrieben (Fucini et al., 2002). Aktin wäre demnach in der Abschnürung der entstehenden Vesikel und dem anschließenden Transport zur Zielmembran beteiligt, wodurch ein ineffizienter Transport unvollständiger Vesikel verhindert würde (Stamnes, 2002). Dynein, ein Motorprotein, welches zum Minusende von Mikrotubuli wandert, wurde in elektronenmikroskopischen und biochemischen Experimenten mit COPI-Vesikel assoziiert vorgefunden (Chen et al., 2005). Kinesin-2, das zum Plusende wandernde Pendant zu Dynein, zeigte in RNAi Experimenten wiederum eine Funktion im retrograden Golgi-ER Transport von COPI-Vesikeln, die den KDEL Rezeptor enthalten (Stauber et al., 2006). Inwieweit der Transport aller COPI-Vesikel durch Komponenten des Cytoskeletts und den entsprechenden Motorporteinen vermittelt wird, ist jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Nachdem die Vesikel ihre Zielmembran erreicht haben, sind zwei Proteinklassen für die spezifische Bindung und die anschließende Fusion verantwortlich. Dies sind zum einen die so genannten *Tether* Proteine, wie auch die Proteine der *SNARE* Familie (*soluble NSF attachment protein receptors*). Tether Proteine, die der Klasse der *coiled coil* Proteine angehören, stellen den ersten Kontakt des Vesikel mit der Zielmembran her. Sie werden auch als Golgine bezeichnet (Barr and Short, 2003). Bekannte Vertreter, die in den Vesikeln enthalten sind, sind Giantin sowie Golgin-84. Sie rekrutieren die Vesikel über Bindung an entweder p115 und GM130 (Giantin) oder an CASP (Golgin 84), an die Zielmembran. Ob die Vesikel für diese Bindung vorher ihre Proteinhülle verlieren müssen ist nicht bekannt.

Die anschließende Fusion mit der Zielmembran wird durch die SNARE Protein vermittelt. Dabei wird durch komplementäre Paare von SNARE Proteine auf dem Vesikel (v-SNARE), und an der Zielmembran (t-SNARE; von target) die Fusion eines

bestimmten Vesikeltyps mit seiner spezifischen Zielmembran gewährleistet (Weber et al., 1998). Während der Fusion bilden das v-SNARE, bestehend aus einer Helix, mit dem t-SNARE-Komplex, bestehend aus drei Helices, das so genannte *tetrahelical-bundle* (Parlati et al., 2000). Dieser Komplex ist äußerst stabil und kann nur unter ATP Verbrauch mit Hilfe von NSF sowie SNAP dissoziiert werden, sodass die Komponenten für eine weiter Runde aus Vesikelbildung und Fusion zu Verfügung stehen (Sollner et al., 1993). Damit Fracht effizient zu seinem Bestimmungsort transportiert werden kann, müssen schon während der Vesikelbiogenese die spezifischen Tether und SNARE Proteine selektiv aufgenommen werden.

2.5 Existenz unterschiedlicher COPI-Vesikeltypen

COPI Vesikel werden mit unterschiedlichen Transportprozessen in Verbindung gebracht. So vermitteln sie zum einen anterograden Transport, zum anderen retrograden Transport innerhalb des Golgi-Apparates, aber auch zurück zum ER. Diese unterschiedlichen Funktionen legen die Vermutung nahe, dass nicht nur ein, sondern verschiedene Typen an COPI Vesikeln existieren, die unterschiedliche Fracht in unterschiedliche Richtungen transportieren. Auch die Existenz verschiedener hoch selektiver v/t-SNARE Paare unterstützt diese Theorie. In ersten Untersuchungen konnte mittels Elektronenmikroskopie verschiedene COPI Vesikel identifiziert werden, die entweder anterograde Fracht wie Proinsulin und VSV-G, oder den für den Rücktransport ER residenter Proteine verantwortlichen KDEL-Rezeptor enthielten (Orci et al., 2000b; Orci et al., 1997). Zusätzlich konnte mit Gos28 ein v-SNARE identifiziert werden, das ausschließlich in Vesikeln lokalisierte, welche VSV-G enthielten, nicht jedoch in denen mit KDEL-Rezeptoren (Orci et al., 2000b). Durch weitere Studien konnten unterschiedliche COPI Vesikelpopulationen ermittelt werden, die entweder p24 Proteine oder Mannosidase II enthielten (Lanoix et al., 2001; Malsam et al., 2005). Diese wurden durch unterschiedliche Tether Faktoren definiert, wodurch eine gekoppelte Aufnahme spezifischer Fracht und Tether Faktoren postuliert wurde (Malsam et al., 2005). Die Entdeckung der Isoformen γ2-COP und ζ2-COP, sowie die dadurch resultierenden vier verschiedenen Coatomer Isotypen ließen zusätzlich die Existenz verschiedener COPI Vesikel Typen vermuten (Blagitko et al., 1999; Futatsumori et al., 2000; Wegmann et al., 2004). Tatsächlich konnte ein differentielle Lokalisierung der einzelnen Isotypen sowohl mittels

Immunfluoreszenz als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene beobachtet werden (Moelleken et al., 2007; Wegmann et al., 2004). Die Aufnahme verschiedener Typen von Fracht in Vesikel mit unterschiedlicher Hüllzusammensetzung konnte noch nicht ermittelt werden. Auch konnte bislang noch keine Korrelation zwischen der Transportrichtung und spezifischen Tether oder Coatomer Komplexen hergestellt werden. Analog zu Coatomer existieren neben ARF-GAP1 zwei weitere Vertreter, ARF-GAP2 und ARF-GAP3, die jeweils mit γ-COP interagieren (Watson et al., 2004). Diese sind ebenfalls an der Vesikelbiogenese beteiligt und können somit zur weiteren Diversifizierung der Aufnahme verschiedener Typen von Fracht beitragen.

3 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

3.1 Grundlagen des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers

Der Effekt des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) wurde erstmals 1948 von Förster beschrieben, weswegen er öfters auch als Förster Resonanz Energie Transfer bezeichnet wird (Förster, 1948). Bei diesem photophysikalischen Effekt handelt es sich um die strahlungslose Übertragung der Energie eines Fluorophores auf ein benachbartes zweites Fluorophor. Das erste Fluorophor, der so genannte Donor, besitzt dabei eine höhere Anregungsenergie als das zweite, Akzeptor Fluorophor. Da es sich um einen strahlungslosen Prozess handelt, sind verschiedenen Parameter für die Übertragungseffizienz entscheidend. Der wichtigste Faktor, und dadurch auch der Grund, warum FRET in der modernen Zellbiologie eingesetzt wird, ist der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren, der zwischen 2-10 nm liegen kann. Die Effizienz der Energieübertragung hängt von der 6. Potenz dieses Abstandes ab (Abbildung 5), und wird nach Gleichung 1 berechnet. R_0 ist der so genannte Förster Radius, der für ein bestimmtes Fluorophor-Paar unter gleich bleibenden Bedingungen eine Konstante ist. Der Förster Radius gibt den Abstand an, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50% beträgt, und kann durch Gleichung 2 ermittelt werden.

κ ist der Orientierungsfaktor zwischen beiden Fluorophoren, Φ die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, *J* das Überlappungsintegral und *n* der Brechungsindex.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_0^6}$$

Gleichung 1: Berechnung der FRET-

$$R_0^6 = 8{,}785 \times 10^{-5} \frac{\kappa^2 \Phi_D J}{n^4}$$

Gleichung 2: Berechnung des Förster

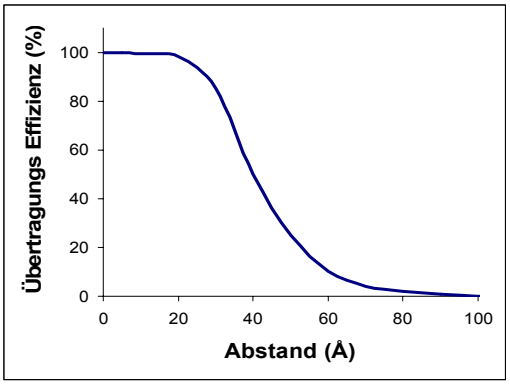


Abbildung 5: Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz

Da es sich bei FRET um Dipol-Dipol Wechselwirkungen handelt, ist die relative Orientierung der Dipolmomente beider Fluorophore zueinander entscheidend für die Energieübertragung. Sind beide Fluorophore in alle Raumrichtungen frei drehbar, wird für den Orientierungsfaktor κ^2 der Wert 2/3 angenommen. Das Überlappungsintegral *J* stellt den Teil des Emissionsspektrums des Donors dar, der mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlagert (Abbildung 6). Es sind somit nur solche Fluorophore als FRET-Paare geeignet, für die eine signifikante Überlappung der Emission des einen mit der Absorption des anderen gegeben ist.

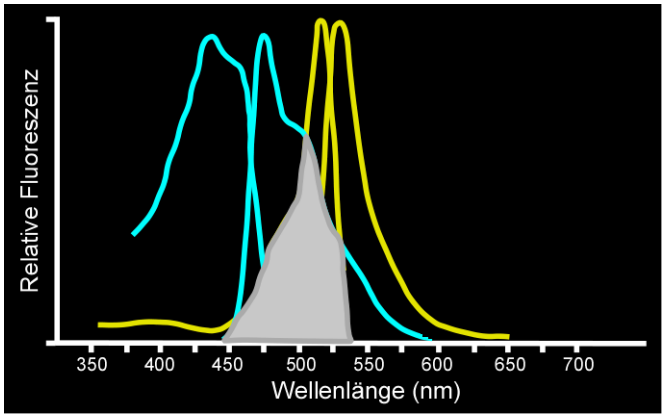


Abbildung 6: Überlappung der Donor Emission mit der Akzeptor Absorption am Beispiel der fluoreszierenden Proteine ECFP (blau) und EYFP (gelb). Der graue Bereich markiert den Teil der ECFP Emission, der zur Anregung von EYFP dienen kann.

Da der FRET-Prozess in erster Linie vom Abstand beider Fluorophore abhängig ist, kann er zur Messung der Interaktion verschiedener Partner, z.B. Proteine verwendet werden. Ist eine Interaktion vorhanden, kann nach Anregung des Donors und Übertragung der Energie, Fluoreszenz des Akzeptors detektiert werden. Gleichzeitig kommt es zu einer verringerten Emission des Donors. Sowohl die so

genannte *sensitized emission* des Akzeptors, als auch die verringerte Emission des Donors können zur Berechung der Übertragungseffizienz verwendet werden (Wouters et al., 2001). Die Anwendung von FRET zur Messung von Proteininteraktionen in der Zelle ist im folgenden Kapitel beschrieben.

3.2 Die Anwendung von FRET in der Zellbiologie

Die Entdeckung des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea-victoria* hat die moderne Zellbiologie entscheidend vorangetrieben. In wenigen Jahre wurde es zu einem der meist untersuchten und verwendeten Protein in der Biochemie sowie Zellbiologie (Shimomura et al., 1962; Tsien, 1998). Im Laufe der Jahre wurden durch sowohl zufällige als auch gezielte Mutationen eine Reihe neuer Varianten entwickelt, die zum einen verbesserte Eigenschaften bezüglich Stabilität und Sensitivität aufweisen, zum anderen aber auch ein breiteres Spektrum des sichtbaren Lichtes abdecken (Tsien, 1998). Zwei bekannte Beispiele sind ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) und EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) die ein zu kürzeren (ECFP) bzw. längeren (EYFP) Wellenlängen verschobenes Absorptions- und Emissionsspektrum aufweisen (Abbildung 7).

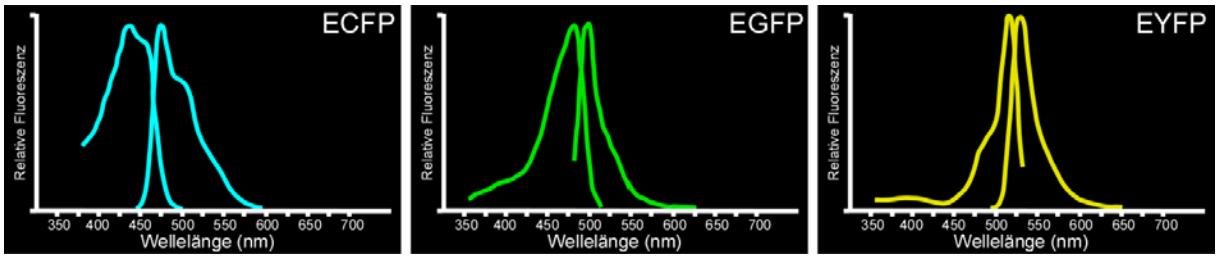


Abbildung 7: Absorptions- und Emissionsspektren von ECFP, EGFP und EYFP.

Auf Grund dieser Verschiebung der Spektren sind ECFP und EYFP mit einem Förster Radius von $R_0 = 49\text{-}52$ Å als FRET-Paar einsetzbar, wobei CFP den Donor und YFP den Akzeptor darstellt. Fluoreszierende Proteine wurden erstmals als so genannte *Cameleons* für FRET-Messungen in Zellen eingesetzt. Dabei handelt es sich um zwei als FRET-Paar geeignete GFP-Mutanten, die über Calmodulin miteinander verknüpft sind und somit als Ca^{2+} Sensoren dienen (Miyawaki et al., 1999; Miyawaki et al., 1997). Durch Bindung von Ca^{2+} kommt es zu einer Konformationsänderung in Calmodulin, wodurch der Abstand der beiden fluoreszierenden Proteine zueinander verringert wird. Diese Verringerung des

Abstandes führt somit zu einer erhöhten FRET-Effizienz. FRET kann aber auch zur Untersuchung der Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen, sowohl mikroskopisch als auch spektrofluorimetrisch, eingesetzt werden (Majoul et al., 2001; Wouters et al., 1998; Wouters et al., 2001). So konnte eine Dimerisierung des KDEL Rezeptors Erd2 während des retrograden Transports von Cholera Toxin mittels FRET nachgewiesen werden (Majoul et al., 2001).

Die Bestimmung der FRET-Effizienz, und somit die Identifizierung einer Interaktion kann, wie bereits erwähnt, sowohl über die *sensitized emission* des Akzeptors, als auch die verringerte Emission des Donors bestimmt werden. Wird der Akzeptor durch intensives Bleichen zerstört, kann er auch bei geringem Abstand nicht mehr die Energie des Donors übernehmen. Die Donor Moleküle, die vor diesem Bleichen ihre Energie auf benachbarte Akzeptormoleküle übertragen haben, sind dazu nun nicht mehr in der Lage, und geben die Energie daher über Emission eines Photons ab. Dies resultiert in einer verstärkten Donorfluoreszenz nach Bleichen. Durch Vergleichen der Fluoreszenzintensität des Donors vor und nach Bleichen kann somit die FRET-Effizienz nach Gleichung 3 berechnet werden. Hierbei ist F^D die Donorfluoreszenz vor und F_{pb}^D die nach Bleichen. Diese als Akzeptor-Photobleichen bezeichnete Methode stellt eine experimentell einfach durchzuführende Methode dar, die jedoch auf Grund der Zerstörung des Akzeptors nicht bei dynamischen Prozessen an lebenden Zellen angewendet werden kann.

$$E_D(i) = 1 - \frac{F^D(i)}{F_{pb}^D(i)}$$

Gleichung 3: Berechung der FRET Effizienz nach der Akzeptorphotobleichmethode.

Als Alternative dazu kann die FRET-Effizienz auch über die *sensitized emission* des Akzeptors nach Anregung des Donors bestimmt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass zum einen Akzeptorfluorophore durch die Anregungswellenlänge des Donors direkt angeregt werden können, zum anderen die Donoremission zu gewissen Teilen in die Akzeptoremission hineinreicht. Dadurch kann nach Anregung des Donors im Akzeptorkanal Fluoreszenz detektiert werden, die jedoch nicht aus einem FRET Prozess resultiert. Um diese Intensitätsanteile zu bestimmen, müssen daher äquivalente Bilder von Zellen, welche nur eines der beiden Fluorophore enthalten, aufgenommen werden. Diese Methode ist

experimentell aufwendiger als die Akzeptorphotobleichmethode, kann jedoch in lebenden Zellen angewendet, und daher für die Untersuchung von Dynamiken eingesetzt werden (für eine Übersicht siehe (Wouters et al., 2001).

4 Ziel der Arbeit

Die Mitglieder der p24-Protein-Familie sind in einer Reihe von Schritten während der COPI-Vesikelbiogenese beteiligt, wobei ihr oligomerer Zustand von großer Bedeutung ist. Obwohl die p24-Proteine im frühen sekretorischen Transportweg zyklisieren, erfolgt eine stabile Bindung und somit die Rekrutierung von Coatomer und ARF1 durch p24-Dimere ausschließlich an die Golgi-Membran. Die Bindung an Coatomer fällt für alle p24-Mitglieder gleich stark aus, es sind interessanterweise jedoch nur p23- und p24-Dimere in der Lage, eine Konformationsänderung von Coatomer, die als Initialisierung der Vesikelbildung postuliert wird, zu induzieren. Eine Reihe von Untersuchungen belegen die Bildung verschiedener Heterooligomere *in vitro*, die Existenz von Homooligomeren *in vivo* konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Bildung von Homooligomeren *in vivo* in den Kompartimenten des frühen sekretorischen Transportwegs zu untersuchen. Dies sollte durch FRET-Messungen durchgeführt werden, eine Methode, die aufgrund ihrer hohen Abstandsabhängigkeit die Untersuchung von Proteininteraktionen *in vivo* ermöglicht. Zusätzlich sollte mit Hilfe der FRET-Technik ein möglicher Einfluss von ARF1 auf den oligomeren Zustand der p24 Proteine erforscht werden.

Aufgrund der Akkumulierung der p24 Proteine im ER bei starker Überexpression war es bisher nicht möglich, Zelllinien herzustellen, die p24-Protein-Konstrukte stabil überexprimierten. Für weitere Untersuchungen der Funktion dieser Proteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stellen stabile Zelllinien jedoch ein wichtiges Werkzeug dar. Unter Verwendung des Tet-On Systems (Urlinger et al., 2000) sollten daher stabil exprimierende CHO Zelllinien generiert werden, deren Expressionsrate Doxicyclin-abhängig kontrollierbar ist. Dadurch sollte die physiologische Lokalisierung der überexprimierten p24-Konstrukte gewährleistet werden.

Einzelne COPI-Vesikel können aufgrund ihrer geringen Größe von 60-100 nm nicht in konventioneller oder auch konfokaler Mikroskopie, mit einer maximalen

Auflösung im Bereich von 200 nm, beobachtet werden. Um das Verhalten und die Funktion der COPI-Vesikel *in vivo* zu untersuchen, müssen daher entweder technisch aufwendige, elektronenmikroskopische, oder indirekte Methoden wie z.B. FRAP angewandt werden. Ein weiteres Projekt bestand daher in der Etablierung eines Systems zur direkten Untersuchung von COPI-Vesikeln *in vivo*. Dazu sollten fluoreszenzmarkierte COPI-Vesikel *in vitro* generiert und charakterisiert werden, die anschließend in Säugetierzellen mikroinjiziert werden können. Aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung wären sie somit als COPI-Vesikel *in vivo* zu identifizieren, wodurch sich ihr Verhalten und ihre Funktion eindeutig untersuchen lassen würden.

III. Ergebnisse

A Interaktion der p24 Familienmitglieder *In Vivo*

1 Der oligomere Zustand der p24 Proteine *in vivo*

1.1 Herstellung eukaryontischer Expressionsvektoren für die FRET-Analyse

Um mögliche Interaktionen der p24 Proteine in der Zelle mittels FRET Messungen zu untersuchen, wurden geeignete eukaryontische Expressionsvektoren hergestellt. Ausgegangen wurde dabei von den beiden Vektoren pECFP-p24 und pEYFP-p23, die freundlicher Weise von Dr. Irina Majoul zu Verfügung gestellt wurden. Diese basieren auf den Vektoren pECFP-N1 bzw. pEYFP-N1 der Firma Clontech, wobei das Signalpeptid von p23 C-terminal zum CFP bzw. YFP Gen kloniert wurde, und die kodierende DNA für das Ratten p23 bzw. humane p24 ohne die Signalpeptide N-terminal an die CFP bzw. YFP Gene angehängt wurde. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* wurden nun die Gene für p23 und p24 durch die DNA Fragmente für p25, p26 und p27 ersetzt, welche vorher mittels PCR so amplifiziert wurden, dass sie keine Sequenz für die entsprechenden Signalpeptide enthielten. Dadurch wurden Plasmide zur Expression der CFP und YFP Fusionsproteine aller p24 Familien Mitglieder erhalten. Diese wurden anschließend noch mittels Sequenzanalyse überprüft.

1.2 Expression der p24 Konstrukte in Vero Zellen

Die relative Konzentration der verschiedene p24 Proteine zu einander ist für deren korrekte Lokalisierung und Funktion essentiell. So wurde in verschiedenen Studien bereits berichtet, dass eine zu starke Überexpression nur eines der p24 Familien Mitglieder zu Misslokalisierung mehrerer führen kann (Dominguez et al., 1998; Fullekrug et al., 1999). Dies wurde sowohl bei der Überexpression von Wildtyp Formen als auch markierter Formen (z.B. *myc-tag*) beobachtet. Um solch eine Fehllokalisierung zu vermeiden, wurde die Expression möglichst gering gehalten,

jedoch hoch genug, um signifikante Fluoreszenzsignale im Mikroskop detektieren zu können. Zur Transfektion wurden die Zellen elektroporiert, da es sich hierbei um eine recht schnelle Methode handelt, bei der im Gegensatz zu Calcium- oder Lipid-basierten Methoden keine Modifikation der Lipid- bzw. Calcium-Konzentration innerhalb der Zelle auftritt. Als Zelllinie wurden Vero Zellen (*African green monkey kidney fibroblasts*) verwendet, die sich aufgrund ihrer Größe gut für mikroskopische Untersuchungen eignen. Um die beschriebenen Misslokalisierungen zu vermeiden, wurden die elektroporierten Zellen nach nur 6 Stunden fixiert bzw. für weitere Experimente eingesetzt.

1.3 Bestimmung der Interaktion mittels FRET-Messungen

Mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen p24 Mitgliedern wurden mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ermittelt. Dabei handelt es sich um die strahlungslose Übertragung von Energie von einem Fluorophor mit höherer Absorptionsenergie, dem so genannten Donor, zu einem zweiten Fluorophor mit niedriger Absorptionsenergie, dem Akzeptor. Bei den durchgeführten FRET Messungen *in vivo* wurden die beiden GFP Mutanten CFP (Donor) und YFP (Akzeptor) verwendet.

Die Bestimmung eines FRET-Prozesses und damit einer Interaktion kann dabei prinzipiell durch zwei unterschiedliche Methoden durchgeführt werden: Durch Messung der durch den Donor angeregten Emission des Akzeptors (die so genannte *sensitized emission*), oder durch die Bestimmung der Emission des Donors, die im Falle eines FRET-Prozesses verringert ist (Wouters et al., 2001). Durch Bleichen des Akzeptors wird dessen Chromophor photochemisch zerstört und dadurch eine Energie Übertragung unterbunden. Dies resultiert in einer verstärkten Emission des Donors, da dieser die durch Anregung erhaltene Energie nicht mehr auf den Akzeptor übertragen kann. Die in dieser Arbeit ermittelten FRET-Effizienzen wurden alle mit Hilfe der zweiten Methode bestimmt, die auch als Akzeptor-Photobleichen bezeichnet wird. Durchgeführt wurden die Messungen mittels konfokaler *Laser Scanning Mikroskopie*, die die für das Bleichen nötige Laser-Ausstattung enthält. Nachfolgend ist die Durchführung exemplarisch an Hand einer Vero Zelle erklärt, die das FRET Paar p23-YFP und p24-CFP expremiert. Für diese Kombination wurde

bereits ein FRET-Signal in Golgi-Strukturen im stationären Zustand beschrieben (Majoul et al., 2001).

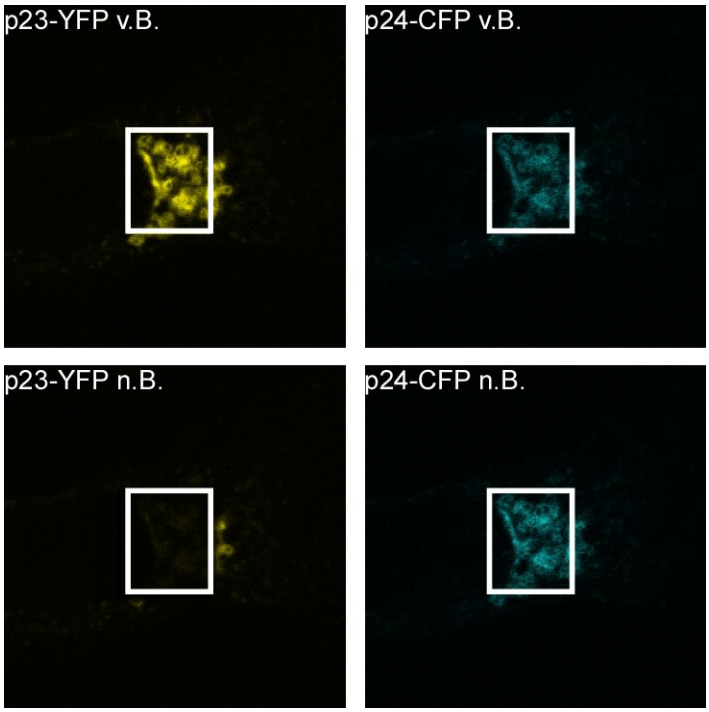


Abbildung 8: FRET-Messung mit Hilfe der Akzeptor Photobleich Methode. Innerhalb des weißen Rechtecks wurde mit einem 514 nm Laser das YFP Chromophor geblichen.

$$E_D(i) = 1 - \frac{F^D(i)}{F^D_{pb}(i)}$$

Gleichung 4: zur Bestimmung der FRET Effizienz normalisiert auf die Donor Intensität.

Abbildung 8 zeigt die Vorgehensweise zur Ermittlung der FRET-Effizienz durch Anwendung der Akzeptor-Photobleich-Methode. Als erstes wurde die Intensität der YFP und CFP Fluorophore in der Zelle vor dem Bleichen (v.B.) bestimmt (p23-YFP bzw. p24-CFP v.B.). Anschließend wurde das Chromophor des YFP innerhalb der angegebenen Region (weißes Rechteck) mit Hilfe des 514 nm Lasers geblichen und die Emission von CFP und YFP erneut bestimmt. Es ist klar zu erkennen, dass nach Bleichen das Fluoreszenzsignal des YFP vollständig verschwunden war (p23-YFP n.B.), wohingegen die Intensität des Donors (CFP) nach Bleichen (n.B.) erhöht war (p24-CFP n.B). Die Effizienz der Energie Übertragung wurde anschließend mit Hilfe von Gleichung 4 berechnet, wobei $F^D(i)$ die Fluoreszenzintensität des Donors vor dem Bleichprozess ist, $F^D_{pb}(i)$ die nach Bleichen. Dabei wurde die Intensität jedes Bildpunktes vor und nach Bleichen einzeln verglichen. Da bei dieser Methode nur die Intensitäten des Donors in die Gleichung eingehen, erhält man die FRET-Effizienz normalisiert auf die Maximalintensität des Donors. Nachfolgend soll die Methode zur Berechnung der FRET-Effizienz aus den durch Mikroskopie erhaltenen Bildern kurz näher beschrieben werden.

1.4 Berechnung der FRET-Effizienzen

Da die Intensität der Donorfluoreszenz während der Messung steigt, wurden die Einstellungen so gewählt, dass die Signale auch nach Bleichen noch innerhalb des Messbereichs lagen. Dies hatte zur Folge, dass die Signalintensitäten vor dem Bleichen relativ gering waren und teilweise ein recht hohes Signalrauschen auftrat. Um nur die Bildpunkte in die Rechnung mit einfließen zu lassen, die in den zu untersuchenden Strukturen lagen und kein Hintergrundsrauschen darstellten, wurde eine Maske erstellt. Die aufgenommen Bilder wurden anschließend mit der Maske multipliziert, wodurch Hintergrundpixel entfernt wurden (siehe auch Materialien und Methoden). Die so modifizierten Bilder wurden anschließend zur Berechung der FRET-Effizienz nach Gleichung 4 verwendet. Diese Vorgehensweise war insbesondere bei der Berechung der Effizienzen nach BFA-Behandlung (siehe III.A.2.1) nötig, da sich dort die Fluoreszenzsignale über die Zelle verteilten, wodurch die Intensität gegenüber unbehandelten Zellen verringert war.

Mit dieser Methode wurde die Verteilung der FRET-Effizienzen als Histogramm dargestellt. Durch Kurvenanpassung wurden die FRET-Signale (wiedergegeben durch eine Gauß-Verteilung) vom Rauschsignal (dargestellt durch eine logarithmische Normal-Verteilung) getrennt (Abbildung 9), wodurch die mittlere FRET-Effizienz einer Zelle ermittelt werden konnte.

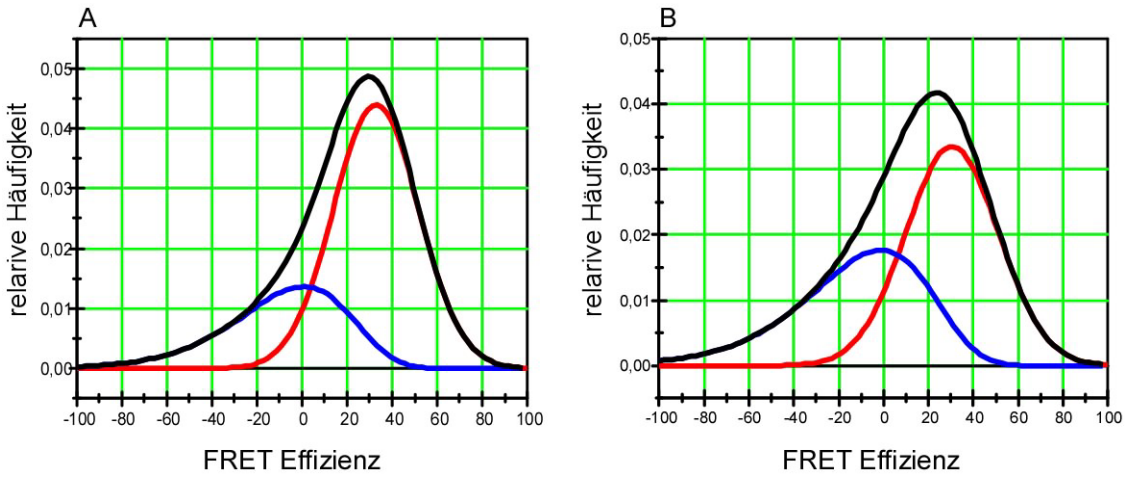


Abbildung 9: Die als Histogramm erhaltene Signalverteilung (schwarze Kurve) wird durch Kurvenanpassung in die FRET-Verteilung (rot) und Rauschverteilung (blau) getrennt. In Abb. A ist eine Zelle mit schwächerem Rauschen, in Abb. B eine mit einem stärkeren Rauschanteil gezeigt. Die FRET-Kurven haben jedoch sehr ähnliche Werte von 32% (A) bzw. 30% (B).

1.5 p23 und Galaktosyltransferase interagieren nicht miteinander

Da es sich bei den p24 Proteinen um Typ I Transmembranproteinen handelt, liegen diese in einer eher zwei- als dreidimensionalen Umgebung vor. Werden diese Proteine nun sehr stark überexpremiert, kann es zu einer lokal sehr hohen Konzentration kommen. Dies wiederum kann dazu führen, dass die mit CFP und YFP markierten Proteine so nah nebeneinander liegen, dass es zu einer Energie Übertragung kommt, obwohl keine Interaktion vorhanden ist. Um sicherzustellen, dass die gemessenen FRET-Signal auf einer echten Interaktion beruhen und nicht durch zu starke Überexpression hervorgerufen werden, wurde das FRET-Verhalten zwischen p23 und Galaktosyltransferase (GalT) untersucht. Da p23 hauptsächlich im *intermediate compartment* (IC) und dem frühen Golgi lokalisiert, GalT jedoch im mittleren und späten Golgi (Rabouille et al., 1995), ist eine Interaktion zwischen beiden auszuschließen.

Abbildung 10 zeigt eine p23-CFP und GalT-YFP überexprimierende Zelle, bei der deutlich zu erkennen ist, dass p23 und GalT in unterschiedlichen Strukturen lokalisiert ist. FRET Messungen, sechs Stunden nach Elektroporation ergaben mit einer Effizienz von 3,0±4,4%, dass p23 und GalT nicht miteinander interagieren. Dies zeigt, dass sechs Stunden nach Transfektion der Zellen die Überexpressionsrate so gering ist, dass es weder zu Misslokalisierung noch zu einem artifiziellen FRET-Signal kommt. Auf der anderen Seite sind die Fluoreszenzsignale stark genug, um die entsprechenden Messungen durchzuführen.

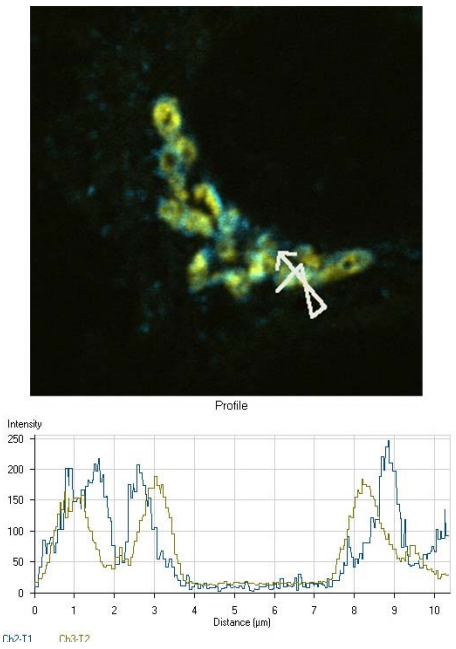


Abbildung 10: Vero Zelle transfiziert mit p23-CFP (blau) und GalT-YFP (gelb). Das Intensitäts-profil einer zufällig gewählten Linie (weiße Linie), zeigt deutlich, dass p23 und GalT differenziell lokalisieren.

Aufgrund der nicht vorhandenen Interaktion stellte die hier gemessene Signalverteilung die oben bereits erwähnte Rauschverteilung dar, die mathematisch mit einer logarithmischen Normalfunktion beschrieben werden kann.

1.6 Einige p24 Familien Mitglieder liegen *in vivo* im Golgi-Apparat als Homodimere vor

In vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen konnte für einige p24 Proteine die Bildung von Heterodimeren gezeigt werden (Jenne et al., 2002). Dazu wurden sowohl Gelfiltration sowie Koimmunopräzipitation als Methoden eingesetzt, wodurch jedoch die Existenz von Homodimeren nicht untersucht werden konnte. Es wurde jedoch gezeigt, dass die p24 Proteine an die γ-COP Untereinheit ausschließlich in der dimeren und nicht in der monomeren Form binden (Bethune et al., 2006a; Reinhard et al., 1999), sowie dass ARF1 ebenfalls nur mit p24 Dimeren interagiert (Anderl, persönliche Mitteilung; Gommel et al., 2001). Daher sollte nun mittels FRET-Messungen untersucht werden, welche p24-Proteine *in vivo* tatsächlich Homodimere in Golgi-Strukturen bilden.

Dazu wurden Vero Zellen mit den entsprechenden CFP und YFP Plasmiden elektroporiert und sechs Stunden später fixiert. Da für die Akzeptor-Photobleich-Methode ein höherer Level an YFP-markiertem gegenüber CFP-markiertem Protein vorteilhaft ist, wurde die doppelte Menge an YFP Plasmid eingesetzt. Eine Interaktion kann nur dann mittels FRET detektiert werden, wenn eine ausreichende Menge an markiertem gegenüber endogenem Protein vorliegt. Die Expressionsrate wurde daher mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 11).

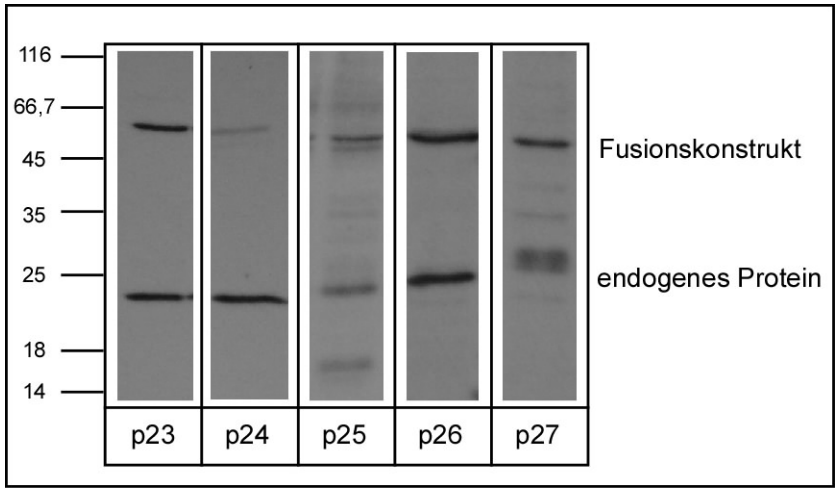


Abbildung 11: Expressionsrate der p24 Fusionskonstrukte. Es wurden jeweils 10% des Lysats der elektroporierten Zellen aufgetragen und mit Antikörpern gegen die entsprechenden p24-Proteine entwickelt. Die Transfektionseffizienz lag in allen Fällen bei ca. 50-60%.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, war das Verhältnis von endogenem Protein zum Fusionskonstrukt für all p24 Mitglieder außer für p24 gleich. Die geringere Menge der p24-XFP Konstrukte lag wahrscheinlich an einer stärkeren Degradationsrate diese Konstrukts in der Zelle. Die Messung und Berechnung der FRET-Effizienzen wurde anschließend, wie in den vorangegangen Kapitel beschrieben, bestimmt (Abbildung 12).

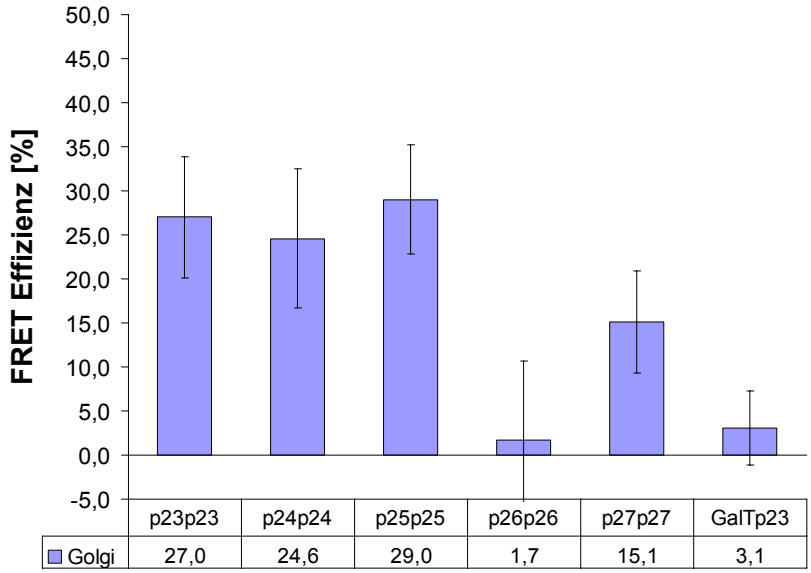


Abbildung 12: FRET Effizienzen der einzelnen p24-Homodimere im Golgi sechs Stunden nach Transfektion (bzw. 24 Stunden für p26). Es wurden jeweils 15-20 Zellen gemessen.

Wie aus Abbildung 12 zu entnehmen ist, bilden p23, p24 und p25 im Golgi Homodimere, was durch die hohe FRET-Effizienz von über 25% belegt wird. Die relativ geringe Expressionsrate der Fusionskonstrukte im Fall von p24 stellte dabei kein Problem dar.

Zellen, die mit p26-CFP und p26-YFP transfiziert wurden, zeigten selbst nach 24 Stunden keine signifikante FRET-Effizienz. Dies steht im Einklang mit den *in vitro* Untersuchungen, die postulierten, dass p26 ausschließlich als Monomer vorliegt (Jenne et al., 2002). Wie schon erwähnt wurde auch für das Paar p23-CFP und GalT-YFP kein FRET-Signal gemessen.

Die für p27 Homodimere gemessene FRET-Effizienz von nur 15,1% ist schwierig zu interpretieren. Die Signalverteilung wurde, wie oben beschrieben, mittels Kurvenanpassung in die Rausch- und die FRET-Verteilung zerlegt. Die erhaltenen Daten ergaben einen sehr starken Rauschanteil am Signal. Dies ist so zu interpretieren, dass p27 *in vivo* nur zu einem sehr geringen Anteil als Dimer im Golgi

vorliegt, was im Einklang mit den beschriebenen *in vitro* Daten steht (Jenne et al., 2002).

1.6.1 Validierung der gemessenen Interaktionen

Die Tatsache, dass keine FRET-Signal zwischen p23-CFP und GalT-YFP und besonders auch zwischen p26-CFP und p26-YFP zu detektieren waren, zeigte bereits, dass die gemessenen FRET-Effizienzen zwischen den anderen p24-Mitglieder auf physiologischen Interaktionen beruhen und nicht durch eine zu hohe Überexpression hervorgerufen wurden. Nichtsdestotrotz sollte die Spezifität der Interaktion durch Kompetitionsexperimente weiter untermauert werden. Dazu wurden Vero Zellen mit drei verschiedenen Plasmiden transfiziert, die für p23-CFP, p23-YFP sowie ein myc-markiertes p23 kodieren. Das myc-markierte p23 kompetiert nun mit den CFP- bzw. YFP-markierten p23-Proteinen um die Bindung. Dadurch wird der Anteil an Dimeren, die sowohl mit CFP als auch mit YFP markiert sind, reduziert, was zu einer Reduktion der FRET-Effizienz führt. Die durchgeführten FRET-Messungen ergaben eine Verringerung der FRET-Effizienz zwischen p23-CFP und p23-YFP von 27,0 ± 6,8% auf 14,2 ± 8,4% wenn zusätzlich myc-markiertes p23 expremiert wurde (Abbildung 13). Dies belegt weiter, dass die detektierten FRET-Signale auf einer spezifischen Interaktion beruhen, und nicht durch Überexpression hervorgerufen werden.

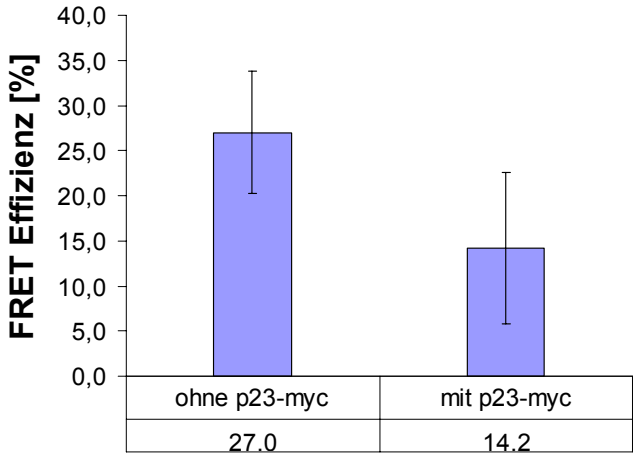


Abbildung 13: Verringerung der FRET-Effizienz durch Kompetition durch myc-markiertes p23.

1.7 Im ER bilden p24-Proteine *in vivo* keine Dimere

p24 Proteine rekrutieren als Homodimere ARF1 und Coatomer an die Golgi-Membran (Bethune et al., 2006a; Gommel et al., 2001; Reinhard et al., 1999). Da sie kontinuierlich zwischen ER und Golgi zyklisieren, stellte sich die Frage, warum ARF1

und Coatomer im ER nicht von p24-Proteinen gebunden und somit an die Membran rekrutiert werden. Daher sollte mittels FRET untersucht werden, in welchem oligomeren Zustand sich die p24-Protein im ER in vivo befinden. Bei einer normalen Expressionsrate ist die Fluoreszenzintensität im ER so gering, dass keine FRET Messungen durchgeführt werden konnten. Durch stärkere Überexpression konnten jedoch die p24-Proteine im ER akkumuliert werden, wodurch eine ausreichend hohe Intensität erhalten wurde. Vero-Zellen wurden daher wie oben beschrieben transfiziert und erst 24 Stunden später für Akzeptor-Photobleich-Messungen fixiert.

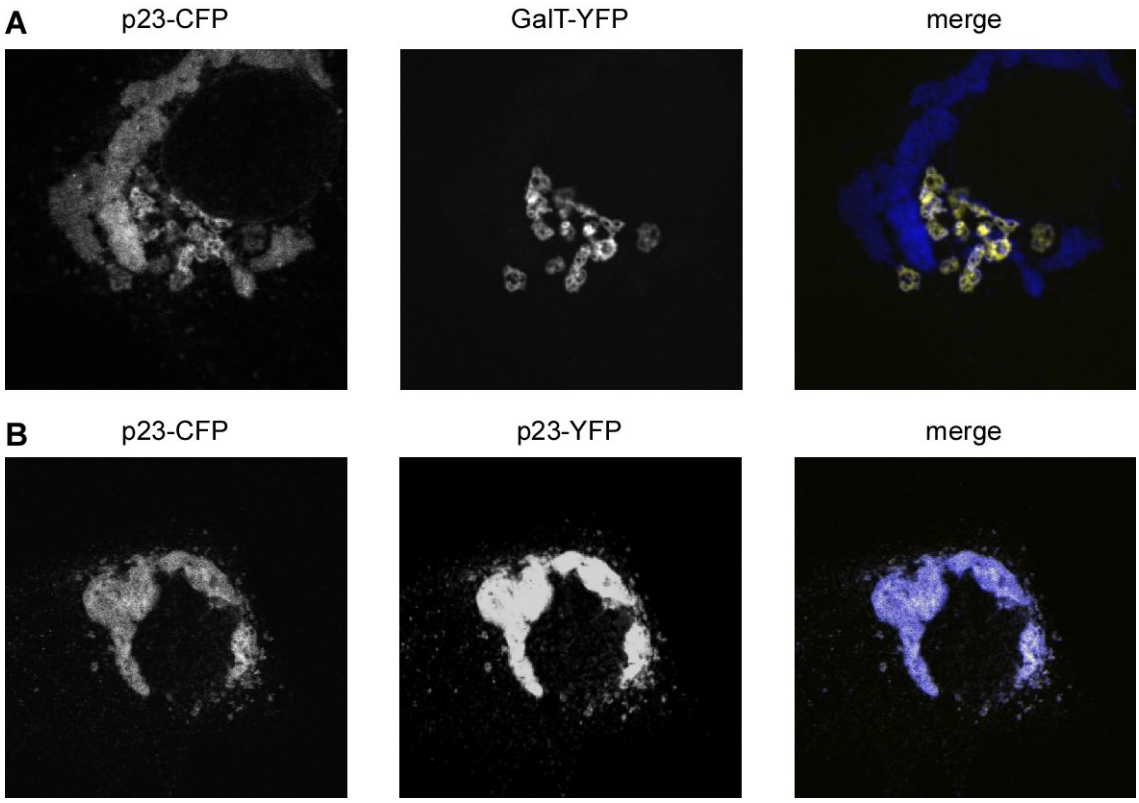


Abbildung 14: A) Eine Vero Zelle, die p23-CFP und GalT-YFP exprimiert, 24 Stunden nach Elektroporation. GalT lokalisiert immer noch in perinuklearen Golgi Strukturen, wohingegen p23 schon im ER akkumuliert. B) Eine Vero Zelle, die p23-CFP und p23-YFP expremiert. Beide Konstrukte sind vollständig im ER lokalisiert.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, beginnt p23 nach ca. 24 Stunden im ER zu akkumulieren, wohingegen einige Zellen noch eine normale Lokalisierung im Golgi-Apparat aufweisen. Galaktosyltransferase ist in der gezeigten Zelle noch normal in perinukleären Golgi-Strukturen lokalisiert. Bei noch stärkerer Überexpression misslokalisierte aber auch GalT in ER Strukturen. Dieser Effekt konnte sowohl für p23, als auch für p24 und für p25 beobachtet werden. Zellen, die sowohl p23-YFP

als auch p24-CFP expremierten, zeigten ebenfalls eine Akkumulierung der Fusionskonstrukte im ER, wobei der Effekt immer für beide Proteine gleichzeitig auftrat.

Um sicher zu stellen, dass die in den ER-Strukturen lokalisierten Fusionskonstrukte noch korrekt gefaltet sind, wurden die Spektren der fluoreszierenden Proteine untersucht. CFP und YFP weisen ihre charakteristischen Spektren nur dann auf, wenn sie vollständig und korrekt gefaltet sind (Tsien, 1998). Dies wurde mit Hilfe des „META-Moduls“ des konfokalen Mikroskops LSM-510-meta der Firma Zeiss durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen speziellen Detektor, mit dessen Hilfe das Spektrum von fluoreszierenden Strukturen innerhalb einer Zelle mit einer Auflösung von 10 nm aufgenommen werden kann (Abbildung 15).

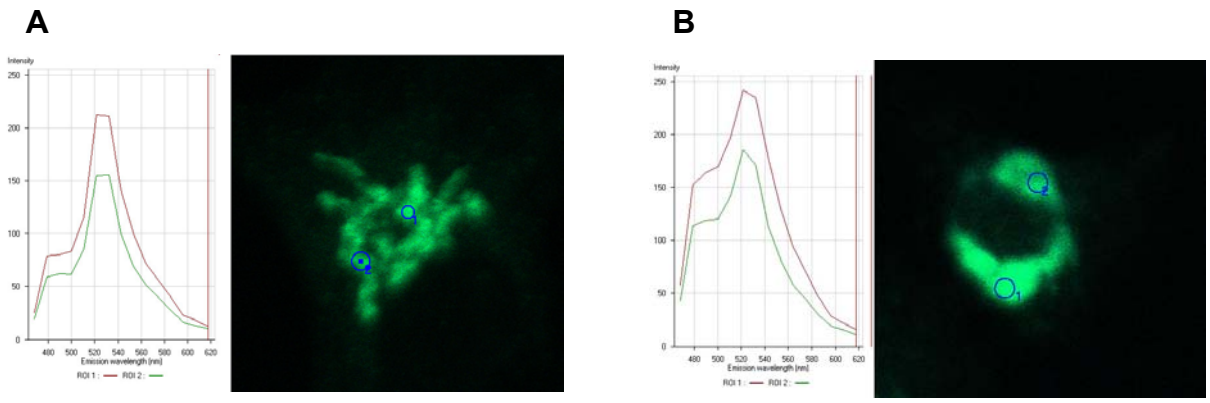
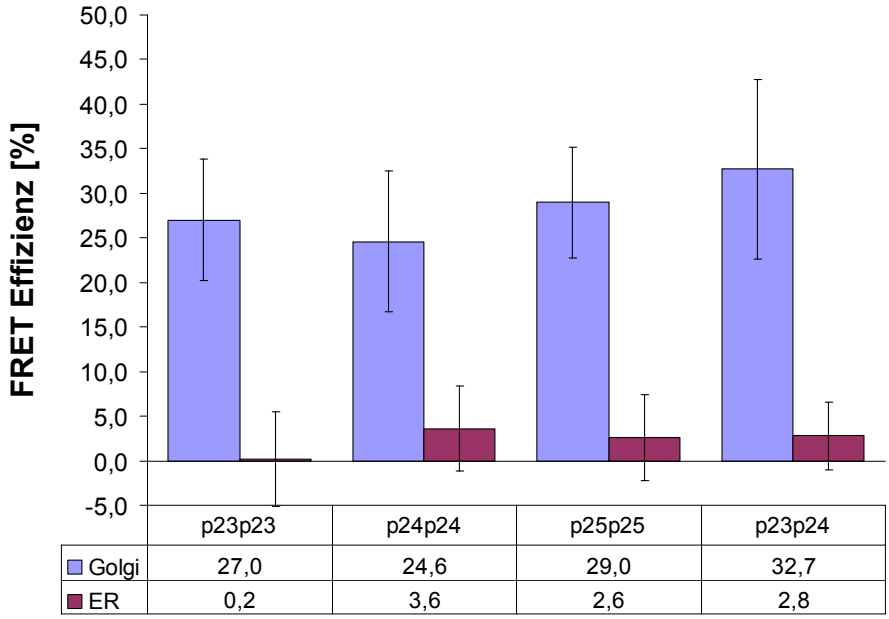


Abbildung 15: Die Spektren von p23-CFP und p23-YFP im Golgi (A) und ER Strukturen (B) nach Anregung mit 458 nm. Beide Spektren entsprechen denen in der Literatur beschriebenen Spektren. Die unterschiedliche Intensitäten von CFP und YFP sind durch das unterschiedliche FRET-Verhalten in Golgi und ER begründet.

Die Zellen wurden dazu mit der 458 nm Laserlinie angeregt und das Spektrum im Bereich von 462 nm bis 623 nm aufgenommen. Bei Anregung mit 458 nm werden sowohl CFP zum Teil aber auch YFP angeregt. Da zur FRET Messung ein höherer Level an YFP gegenüber CFP benötigt wurde, lag die YFP Emission höher als die von CFP. Wie beim Vergleich der Abbildung 15A und 15B deutlich wird, zeigen sowohl Zellen mit Golgi Lokalisierung als auch Zellen, in denen die Fusionskonstrukte im ER akkumulieren, ein Emissionsmaximum für YFP bei 520-530 nm (das in der Literatur beschriebene Maximum liegt bei 527 nm). Das Maximum der CFP Emission bei 480 nm, welches aufgrund der hohen YFP Intensität nur als Schulter zu erkennen ist, liegt ebenfalls im in der Literatur beschriebenen Bereich. Die FRET-Effizienzen in diesen sehr hellen ER-Strukturen wurden, wie oben

beschrieben, bestimmt und mit denen der physiologischen Situation verglichen (Abbildung 16).

Interessanterweise verschwanden die für p23, p24 und p25 im Golgi gemessenen FRET-Signale im ER vollständig. Auch das Heterodimer aus p23 und p24, für das bereits eine Interaktion mittels FRET im Golgi beschrieben wurde (Majoul et al., 2001), zeigte im ER keinerlei Energieübertragung mehr. Dies lässt den Schluss zu, dass die p24 Proteine im ER als Monomere vorliegen und erst nach Transport in den Golgi-Apparat dimerisieren.



	p23p23	p24p24	p25p25	p23p24
Golgi	27,0	24,6	29,0	32,7
ER	0,2	3,6	2,6	2,8

Abbildung 16: Die FRET Effizienzen zwischen verschiedenen p24 Protein im Golgi und ER

Die Tatsache, dass die p24-Proteine im Golgi als Dimere, im ER jedoch in monomerer Form vorliegen, würde erklären, warum ARF1 und Coatomer, welche ausschließlich durch die dimeren Formen der p24-Proteine gebunden werden, nur an die Golgi-Membran, nicht jedoch an das ER rekrutiert werden.

2 Der Effekt von ARF1 auf den oligomeren Zustand von p23 und p24

ARF1 liegt in seiner GDP gebundenen Form löslich im Cytosol vor. Durch Interaktion mit den cytoplasmatischen Schwänzen der p24 Proteine kann es an die Golgi-Membran gebunden werden (Chardin et al., 1996; Gommel et al., 2001; Robineau et al., 2000). Dort wird der Austausch von GDP zu GTP durch das Enzym GBF1 vermittelt, das als so genanntes ARF-GEF (*guanine exchange factor*) bezeichnet wird (Goldberg, 1998). Dieser Austausch hat zur Folge, dass ARF1 eine Konformationsänderung erfährt und von den p24 Proteinen abdissoziiert. Aufgrund dieser Konformationsänderung werden die N-terminale amphiphatische Helix sowie der Myristylrest des ARFs exponiert, wodurch ARF1 stabil in die Membran verankert wird (Goldberg, 1998). Die relativ geringe intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität von ARF1 wird durch GTPase aktivierende Proteine (ARF-GAPs) erhöht. Das entstandene ARF1-GDP dissoziiert von der Membran ab. ARF1-GTP ist zusammen mit p24 Proteinen in ihrer dimeren Form in der Lage, Coatomer stabil zu binden und so eine Vesikel Bildung zu initiieren (Bethune et al., 2006a). Des weiteren ist bekannt, dass die ARF1 GTP Hydrolyse nicht nur wichtig für die Freisetzung von Coatomer vom gebildete Vesikel ist, sondern auch für Frachtaufnahme in das Vesikel benötigt wird (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000; Reinhard et al., 2003). Diese Daten zusammen mit dem Befund, dass die p24 Proteine nur im Golgi als Homodimere vorliegen, legte die Vermutung nahe, dass ARF1 durch wiederholtes Zyklisieren zwischen seiner GDP und GTP Form die p24 Proteine umorganisiert, wodurch sie zusammen mit ARF1 fähig würden, Coatomer an die Membran zu rekrutieren. Daher sollte ein möglicher Effekt von ARF1 auf den oligomeren Zustand der p24 Proteine mittels FRET-Messungen *in vivo* untersucht werden.

2.1 Fixierung von ARF1 in seiner GDP Form durch BFA Behandlung hat keinen Einfluss auf die Interaktion von p23 mit p24

Um einen möglichen Effekt von ARF1 auf den oligomeren Zustand von p23 und p24 zu untersuchen, wurde es zuerst in seiner löslichen GDP Form fixiert. Dazu wurden die Zellen mit 5 µg/ml Brefeldin A (BFA), einem Metaboliten aus Pilzen, wie z.B. *Eupenicillium brefeldianum*, inkubiert. BFA fixiert einen frühen Übergangszustand des ARF1/GBF1 Komplexes und verhindert somit den Austausch von GDP zu GTP (Robineau et al., 2000). Dadurch verbleibt ARF1 in seiner inaktiven GDP Form und kann sich nicht mehr stabil in der Membran verankern. Als Folge wird Coatomer von der Membran freigeben und ein Großteil der Golgi-Membranen fusioniert mit dem ER. Im Gegensatz zu vielen Golgi residenten Enzymen wie der Galaktosyltransferase, die nach BFA Behandlung in das ER transportiert werden, verbleiben die p24 Protein in kleineren Golgi Fragmenten (Abbildung 17).

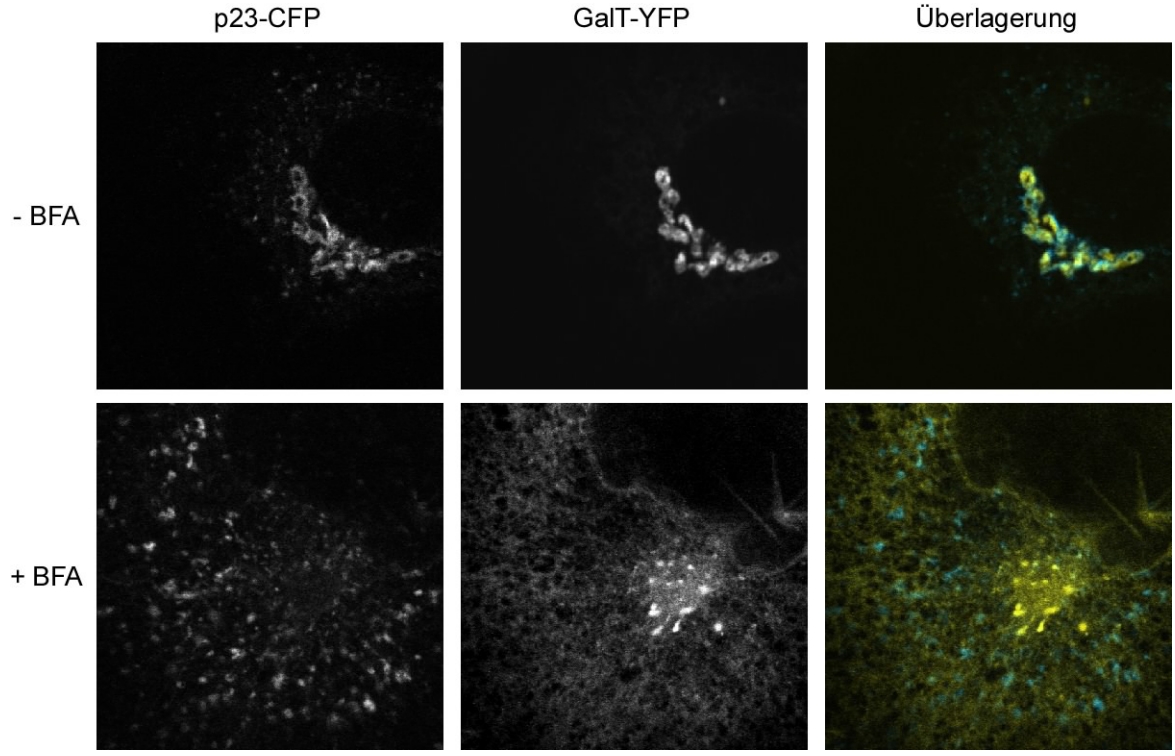


Abbildung 17: Vero Zellen, die p23-CFP und GalT-YFP überexprimieren, vor (-BFA) und 60 min nach (+BFA) Zugabe von 5 µg/ml BFA. GalT-YFP lokalisiert in retikulären ER Strukturen, wohingegen p23-CFP in kleineren Golgi Fragmenten zu finden ist.

p23-YFP und p24-CFP kolokalisieren auch nach BFA Behandlung in den Golgi-Matrix Fragmenten (Abbildung 18). Die Interaktion zwischen p23 und p24 wurde mittels FRET-Messungen vor Zugabe, sowie 15, 30 und 60 min nach Zugabe

von Brefeldin A bestimmt. Hierbei war es wichtig, dass das Hintergrundrauschen, wie unter Abschnitt III.1.4 erwähnt, mittels Erstellen einer Maske und Kurvenanpassung von den Signalen innerhalb der Golgi Fragmente abgetrennt wurde.

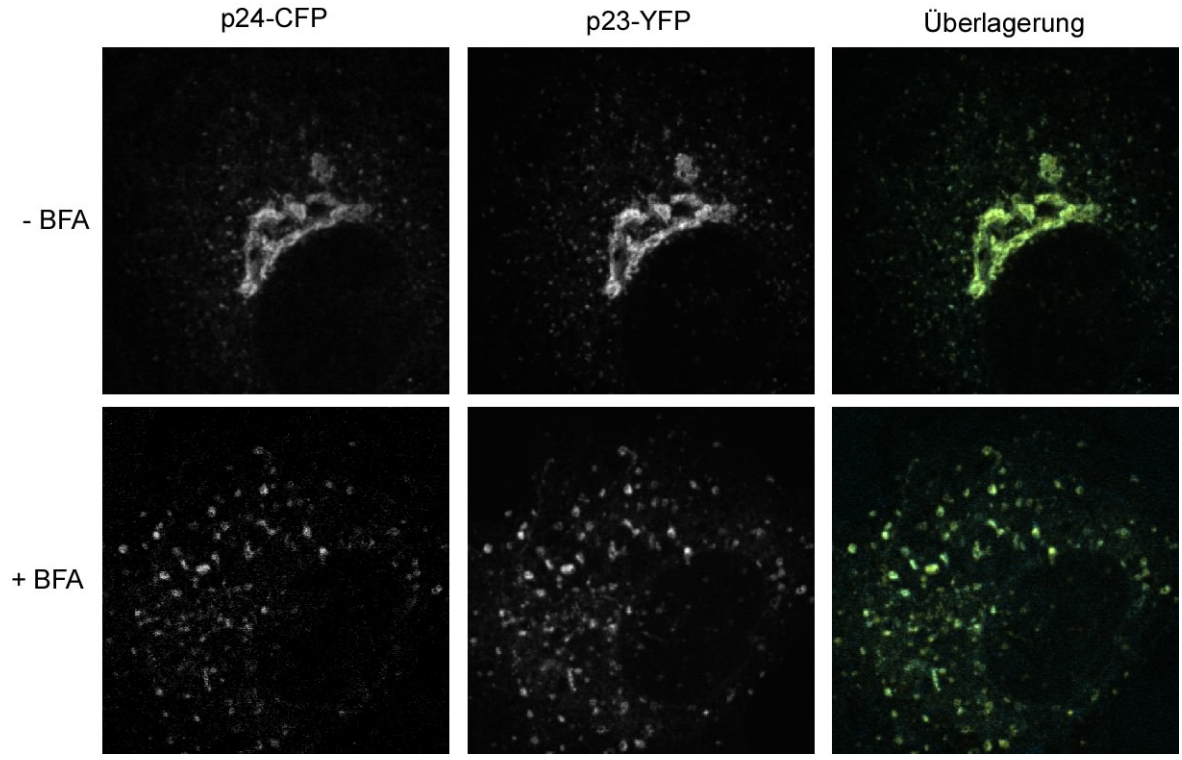


Abbildung 18: Vero-Zellen, die p23-YFP und p24-CFP überexprimieren, vor (-BFA) und 60 min nach (+BFA) Zugabe von 5 µg/ml BFA. Beide Proteine verhalten sich während der Behandlung gleich und kolokalisieren vollständig.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, konnte keine signifikante Änderung der FRET-Effizienz nach Zugabe von BFA detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Fixierung von ARF1 in seiner inaktiven GDP Form mittels BFA keinen Einfluss auf die Interaktion von p23 und p24 hat.

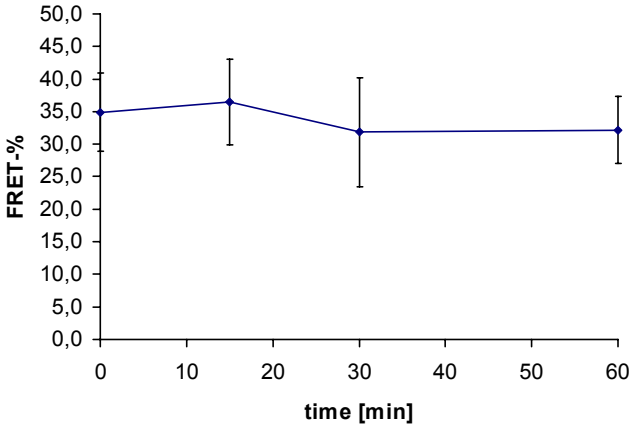


Abbildung 19: Effekt von BFA auf die Interaktion von p23-YFP und p24-CFP. Die Zellen wurde für 15, 30 und 60 min mit 5 µg/ml BFA bei 37°C inkubiert und anschließend die FRET Effizienz gemessen. Pro Zeitpunkt wurden jeweils 15-20 Zellen gemessen und ausgewertet.

2.2 Fixierung von ARF1 in seiner GTP Form durch AlF_4^- Behandlung hat keinen Einfluss auf die Interaktion von p23 mit p24

Im Gegensatz zu BFA fixiert AlF_4^- ARF1 in seiner aktiven GTP Form und führt somit zu einer verstärkten Rekrutierung von ARF1 und Coatomer an die Membran (Feng et al., 2003; Finazzi et al., 1994). Ein möglicher Einfluss von ARF1 auf den oligomeren Zustand von p23 und p24 sollte durch Fixieren von ARF1 in seiner GTP Form weiter untersucht werden. Dazu wurde die FRET-Effizienz vor sowie 15, 30 und 60 min nach Zugabe von AlF_4^- untersucht (Abbildung 20).

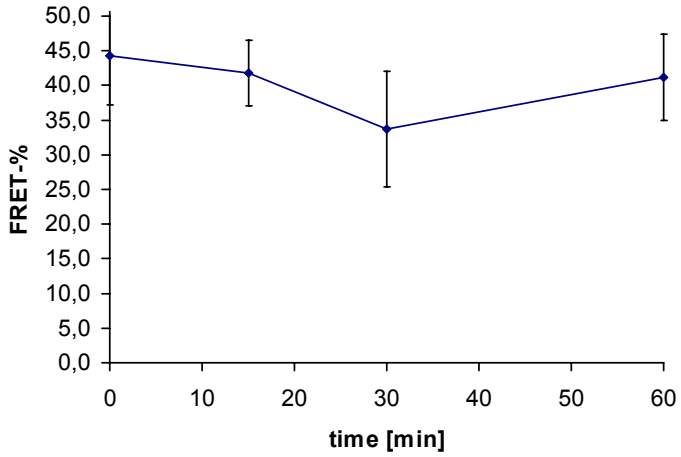


Abbildung 20: Effekt von AlF_4^- auf die Interaktion von p23-YFP und p24-CFP. Die Zellen wurden für 15, 30 und 60 min mit 30 mM NaF und 50 µM $AlCl_3$ bei 37°C inkubiert und anschließend die FRET Effizienz gemessen. Pro Zeitpunkt wurden jeweils 15-20 Zellen gemessen und ausgewertet

Wie im Fall der BFA Behandlung konnte keine Änderung der Interaktion zwischen p23 und p24 nach Zugabe von AlF_4^- beobachtet werden.

Um eine artifizielle Interaktion aufgrund zu starker Überexpression auszuschließen, wurde die Spezifität analog zu III.1.6.1 mittels Kompetition überprüft. Die Verringerung der FRET-Effizienz von 23,5% auf 14,9% in Gegenwart von p24-myc bestätigte die gemessenen Interaktionen (Abbildung 21).

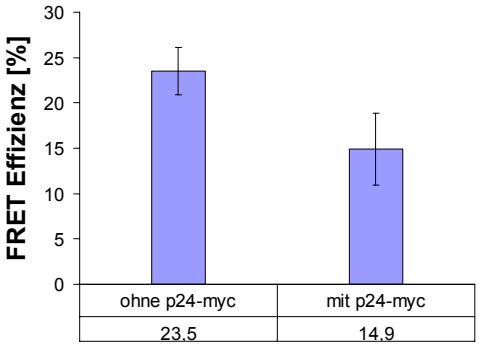


Abbildung 21: Verringerung der FRET Effizienz durch Kompetition durch myc-markiertes p24.

Zusammenfassend, konnte für die Proteine p23, p24 und p25 eine Homodimerisierung im Golgi mittels FRET in vivo nachgewiesen werden. Die relativ geringe FRET-Effizienz zwischen p27-CFP und p27-YFP deutet auf eine schwache Interaktion hin, wohingegen p26 nur als Monomer vorgefunden wurde. Im ER hingegen lagen alle Proteine im monomeren Zustand vor. Auch die für p23 und p24 im Golgi beschriebene Bildung von Heterodimeren konnte im ER nicht mehr nachgewiesen werden. Ein Einfluss von ARF1 auf den oligomeren Zustand von p23 und p24 im Golgi konnte weder nach BFA noch nach AlF_4^- Behandlung beobachtet werden.

B Generierung monoklonaler Zelllinien, welche CFP- und YFP-markierte p24-Proteine exprimieren

Wie in Abschnitt A mittels FRET-Untersuchungen herausgefunden wurde, liegen die verschiedenen p24-Proteine *in vivo* in unterschiedlichen oligomeren Zuständen vor. Dabei ist unklar, an welchem Punkt die Proteine ihren oligomeren Zustand ändern. Um die Dynamik dieser Umlagerung in Zukunft näher untersuchen zu können, sollten monoklonale Zelllinien hergestellt werden, welche verschiedene Paare an CFP- und YFP-markierten p24-Proteinen stabil exprimieren. Mit Hilfe von aus diesen Zelllinien isolierten Golgi-Membranen können die einzelnen Schritte der Vesikelbiogenese in einem *in vitro* Rekonstitutionsassay nachgestellt werden. Ein möglicher Einfluss eines Schrittes während der Vesikelbiogenese auf den Oligomerisierungszustand der p24-Proteine kann somit durch eine Änderung der FRET-Effizienz beobachtet werden.

Um ausreichende Mengen an Golgi-Membranen für die geplanten *in vitro* Untersuchungen zu erhalten, wurden CHO Zellen (*chinese hamster ovary*) als Zelllinien gewählt. Diese können sowohl adhärent als auch in Suspension und somit im großen Maßstab kultiviert werden. Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Misslokalisierungen der p24-Proteine mussten dabei verhindert werden. Daher sollte die Expression mit Hilfe des so genannten Tet-On-Systems kontrolliert werden (Urlinger et al., 2000). Hierbei handelt es sich um ein System, bei welchem durch konzentrations- und zeitabhängige Gabe von Doxicyclin (Dox) die Expression von exogenen Proteinen kontrolliert werden kann. Mittels retroviraler Transduktion wurde eine möglichst hohe Transfektionseffizienz sowie ein stabiler Einbau der Genfragmente gewährleistet. Da die p24-Proteine mit CFP und YFP markiert waren, konnten monoklonale, induzierbare Zelllinien mittels präparativer FACS-Vereinzelung generiert werden.

1.1 Herstellung geeigneter retroviral transduzierbarer Plasmide

Als Basisplasmid wurde der Vektor pRevTRE2-IRES, kurz pRTi, verwendet (Moelleken, 2005). Dieser besteht aus dem für die retrovirale Transduktion geeigneten Plasmid pRevTRE2 welches mit einem IRES Element (*internal ribosome*

entry site) versehen wurde. Dieses ermöglicht die Herstellung eines bicistronischen Vektors, mit dem die CFP- bzw. YFP-markierten p24-Proteine unter Kontrolle nur eines Promotors expremiert werden. Bei dem Promotor handelt es sich um einen Doxicyclin-abhängigen CMV Promotor (TRE/CMV). Das Plasmid enthält des Weiteren zwei multiple Klonierungsstellen vor (MCS-A) bzw. nach (MCS-B) dem IRES-Element (Abbildung 22).

Auf Basis dieses Vektors wurden nun das YFP-Gen in die dem IRES-Element vorgestellte MCS-A, das CFP-Gen in die dem IRES-Element nachfolgende MCS-B kloniert (Abbildung 22). Sowohl das CFP- als auch das YFP-Gen enthielten N-terminal die Sequenz für das Signalpeptid von p23, um die Einschleusung in die ER Membran zu gewährleisten. Das so erhaltenen Plasmid pRTiYC diente als Ausgangsplasmid zur Herstellung von Vektoren, die für verschieden p24-FRET-Paare kodieren.

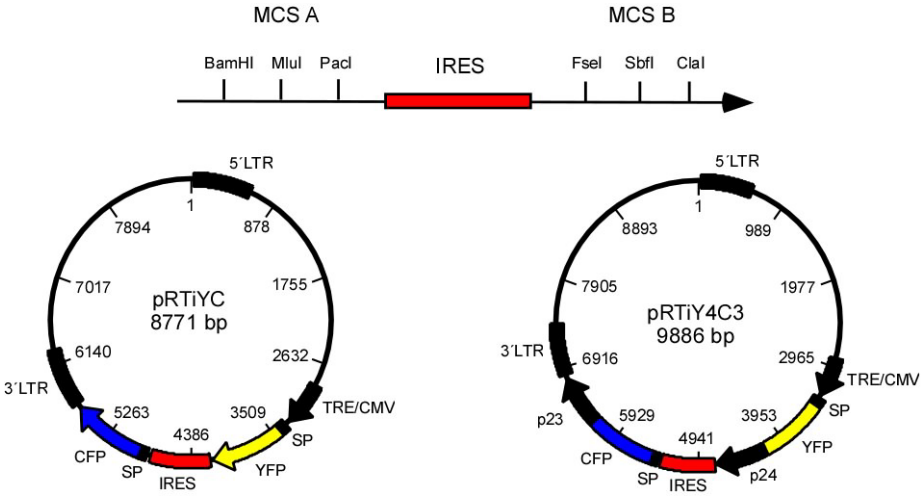


Abbildung 22: Plasmidkarte der zur retroviralen Transduktion verwendeten Vektoren. Das Plasmid pRTiYC wurde verwendet um die finalen Vektoren wie z.B. pRTiY4C3 herzustellen. Sie enthalten neben den über das IRES-Element gekoppelten CFP- und YFP-Konstrukte, den Doxicyclin-abhängigen TRE/CMV Promotor sowie die zur viralen Replikation notwendigen LTRs.

Für die geplanten *in vitro* Versuche wurden des Weiteren Zelllinien benötigt, welche nur ein p24-Fusionskonstrukt exprimieren. Dazu wurden ausgehend vom pRTi-Plasmid entsprechende Vektoren generiert, die Doxicyclin abhängig für nur ein Konstrukt kodieren. Das nicht benötigte IRES-Element wurde durch Restriktionsverdau entfernt.

1.2 Herstellung monoklonaler CHO-Zelllinien

Die generierten Plasmide wurden nun zur Herstellung der monoklonalen Zelllinien mittels retroviraler Transduktion verwendet. Dazu wurden zu erst mittels HEK293T-Zellen die entsprechenden Viren produziert. Diese wurden zur Transduktion von CHO-MCAT-TAM-CD2 verwendet (freundlicherweise von Dr. Walter Nickel zur Verfügung gestellt). Diese CHO-Zelllinie enthielt den für die retrovirale Transduktion notwendigen Maus Zelloberflächenrezeptor (MCAT) sowie die für die Doxicyclin-abhängige Expression notwendige Maschinerie (TAM). Der CD2 Rezeptor diente während der Herstellung dieser Zelllinie als Transfektionsmarker.

Zur Abtrennung nicht transduzierter Zellen, sowie zur Gewinnung monoklonaler Zelllinien wurden die Zellen mittels Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie (FACS) selektiert. Dazu konnte der fluoreszierende Charakter der exprimierten Konstrukte ausgenutzt werden. Um eine möglichst stringente Doxicyclinabhängigkeit sowie eine ausreichende Expressionsrate zu erhalten, wurden drei hintereinander geschaltete Sortierungsschritte durchgeführt (Abbildung 23).

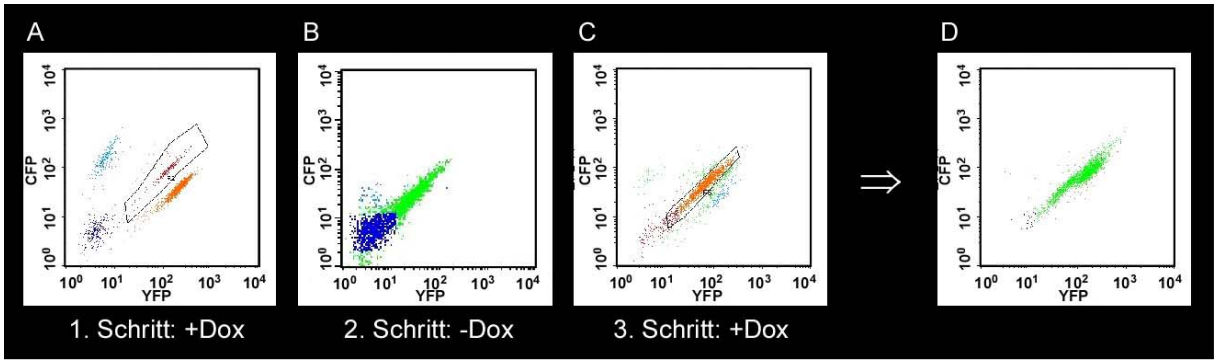


Abbildung 23: FACS-basierte Generierung monoklonaler Zelllinien am Beispiel p23-CFP und p24-YFP exprimierender Zellen. Nach Transduktion wurden die doppelt exprimierenden von nicht transduzierten und nur p23-CFP, oder nur p24-YFP exprimierenden Zellen getrennt (Kasten in Bild A). Im 2. Schritt wurden nur nicht exprimierende Zellen selektiert (blaue Region in Bild B). Im letzten Schritt wurden wieder nur doppelt exprimierende Zellen ausgewählt und ca. 100-200 Zellen vereinzelt. Bild D zeigt die Expression der monoklonalen doppelt exprimierenden Zelllinie Y4C3_15.

Im ersten Schritt wurden nach Induktion der Expression mit 1 µg/ml Doxicyclin nicht transduzierte und somit nicht fluoreszierende Zellen von transduzierten Zellen abgetrennt. Es war dabei möglich, gleichzeitig sowohl die CFP als auch die YFP Fluoreszenz zu überprüfen und dadurch nur doppelt exprimierende Zellen zu

selektieren. In manchen Fällen kann der Doxicyclin-abhängige TRE/CMV Promoter auch in Abwesenheit von Doxicyclin eine leichte Aktivität aufweisen. Um ausschließlich Zellen zu erhalten, die keinerlei Expression in Abwesenheit von Doxicyclin aufwiesen, wurden in einem zweiten Schritt nicht induzierte Zellen mittels FACS sortiert, wobei diesmal exprimierende Zellen entfernt wurden. Im dritten und letzten Schritt wurden die Zellen wieder nach Induktion sortiert, wodurch eine wiederholte Anschaltbarkeit der Expression gewährleistet werden sollte. Um monoklonale Zelllinien zu erhalten, wurden in diesem letzten Schritt ca. 100-200 einzelne Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät. Diese wurden zur weiteren Charakterisierung kultiviert, wobei ca. 20-40 Klone erhalten wurden.

Auf diese Weise wurden zum einen monoklonale Zelllinien erhalten, die die FRET Paare p23/p24 sowie p23/p23 exprimierten, zum anderen Zelllinien, die jeweils nur ein Fusionskonstrukt exprimierten. Die Expression war dabei stringent von der Induktion mittels Doxicyclin abhängig, so dass keinerlei Fluoreszenz in nicht induzierten Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 24).

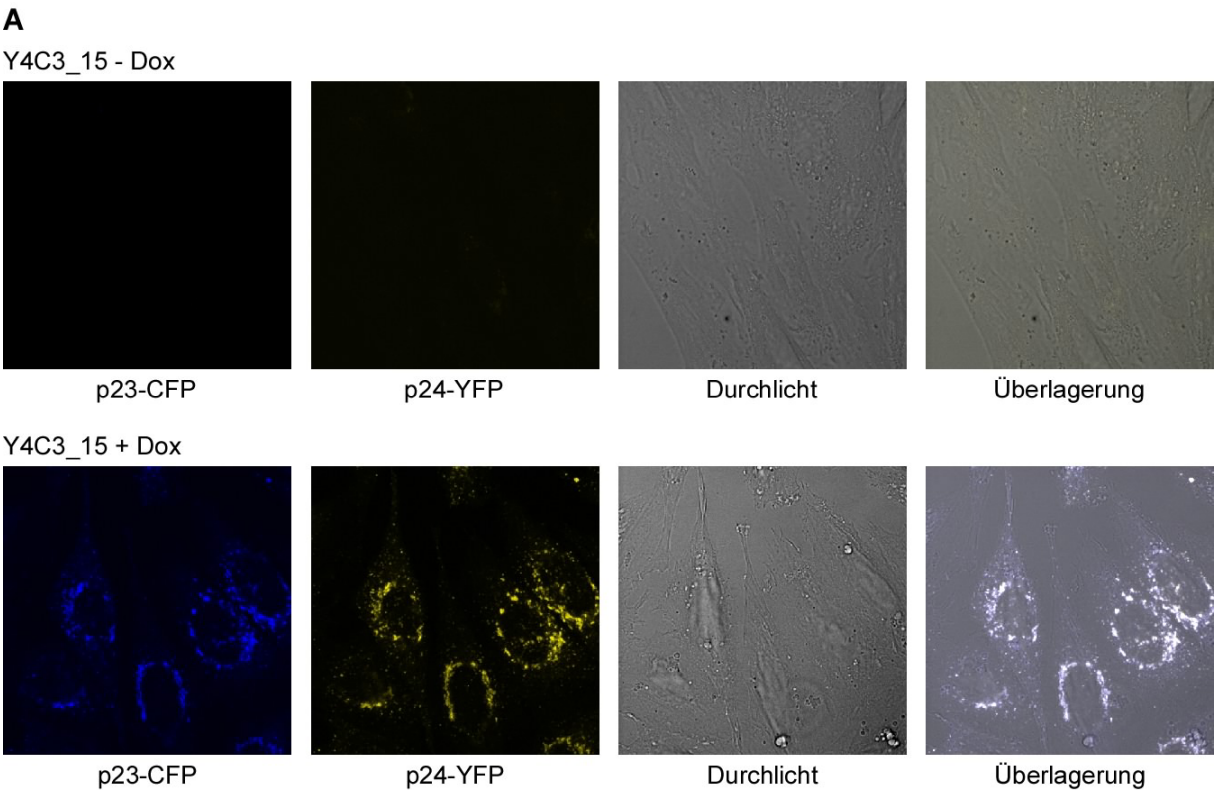


Abbildung 24: Analyse der finalen monoklonalen Zelllinien mittels konfokaler Mikroskopie. Zu erkennen ist eine stringente Doxicyclinabhängigkeit der Expression. Die Zellen wurden jeweils mit 1 µg/ml Dox für 24 h inkubiert. In A ist die Zelllinie Y4C3_15 gezeigt, die sowohl p23-CFP als auch p24-YFP exprimiert.

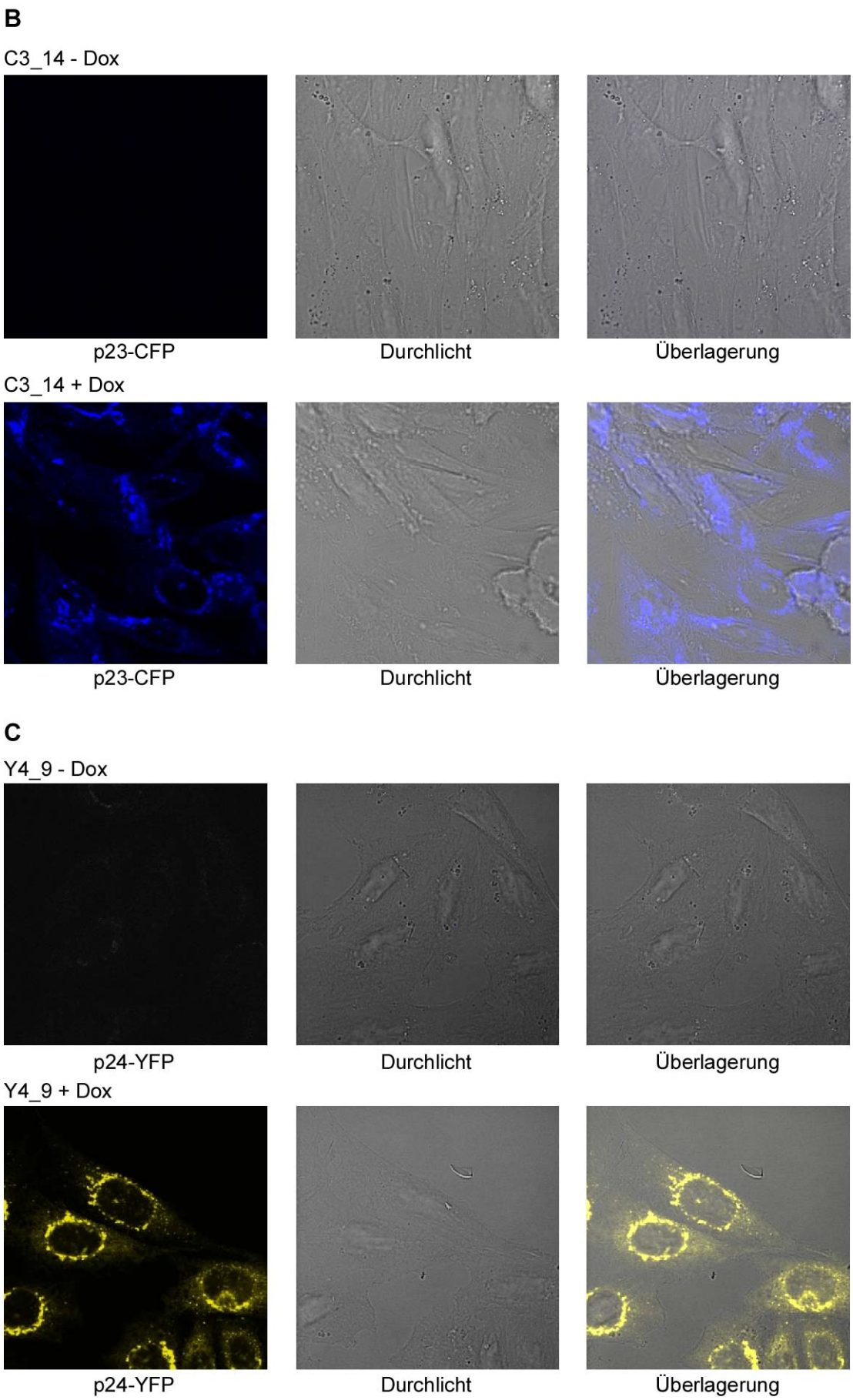


Abbildung 24 Fortsetzung: gezeigt sind exemplarisch zwei monoklonale Zelllinien, die nur p23-CFP (C3_14) in B bzw. p24-YFP (Y4_9) in C exprimieren.

1.3 Charakterisierung der generierten Zelllinien

Die geplanten *in vitro* Versuche sollten mit Golgi-Membranen unternommen werden, deren Zusammensetzung nicht durch die Überexpression der p24-Proteine verändert war. Daher sollte das Expressionsverhalten der Fusionskonstrukte in den einzelnen Zelllinien untersucht werden. Dies wurde sowohl auf Western-Blot Ebene als auch mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Die Zellen wurden dafür zum einen für unterschiedliche Zeiten mit 1 µg/ml Doxicyclin induziert, zum anderen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen induziert (Abbildung 25).

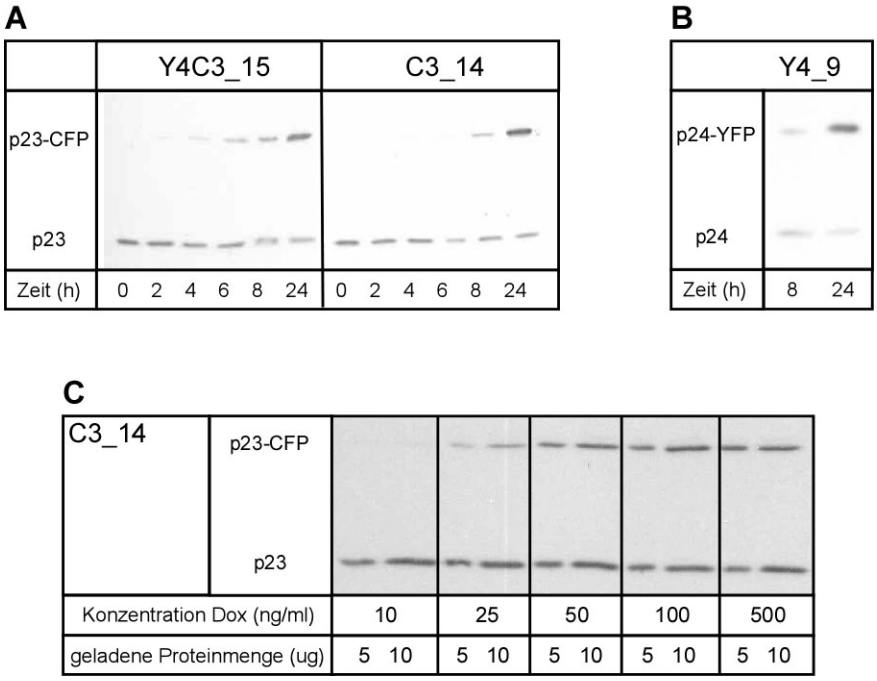


Abbildung 25: Western-Blot-Analyse der Expression der Fusionskonstrukte. In A und B ist jeweils die Expression der Proteine p23-CFP (A) bzw. p24-YFP (B) in verschiedenen Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion mit 1 µg/ml Doxicyclin gezeigt. C zeigt die konzentrationsabhängige Expression von p23-CFP in der Zelllinie C3_14, 24 Stunden nach Induktion. Es wurden jeweils 5 bzw. 10 µg Zelllysat aufgetragen.

Wie zu erkennen konnte ca. zwei Stunden nach Induktion mit 1 µg/ml Doxicyclin eine Expression der Fusionskonstrukte beobachtet werden. Je nach Zelllinie wurde ein 1:1 Verhältnis von endogenem zu überexpremiertem, markiertem Protein nach ca. 8-10 Stunden erreicht. 24 Stunden nach Induktion lag zum Teil mehr als 5-mal soviel markiertes wie endogenes Protein vor (z.B. bei Y4_9 Abbildung 22B). Bei der Analyse der Konzentrationsabhängigkeit ergab sich, dass 24 Stunden nach Induktion bei einer Konzentration von 50-100 ng/ml ein 1:1 Verhältnis von endogenem zu exogenem Protein erreicht wurde.

Die korrekte Lokalisierung der markierten p24-Proteine wurde anschließend mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie weiter untersucht (Abbildung 26). Dazu wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion mit Doxicyclin fixiert und GM130 als *cis*-Golgi Marker mit spezifischen Antikörpern angefärbt.

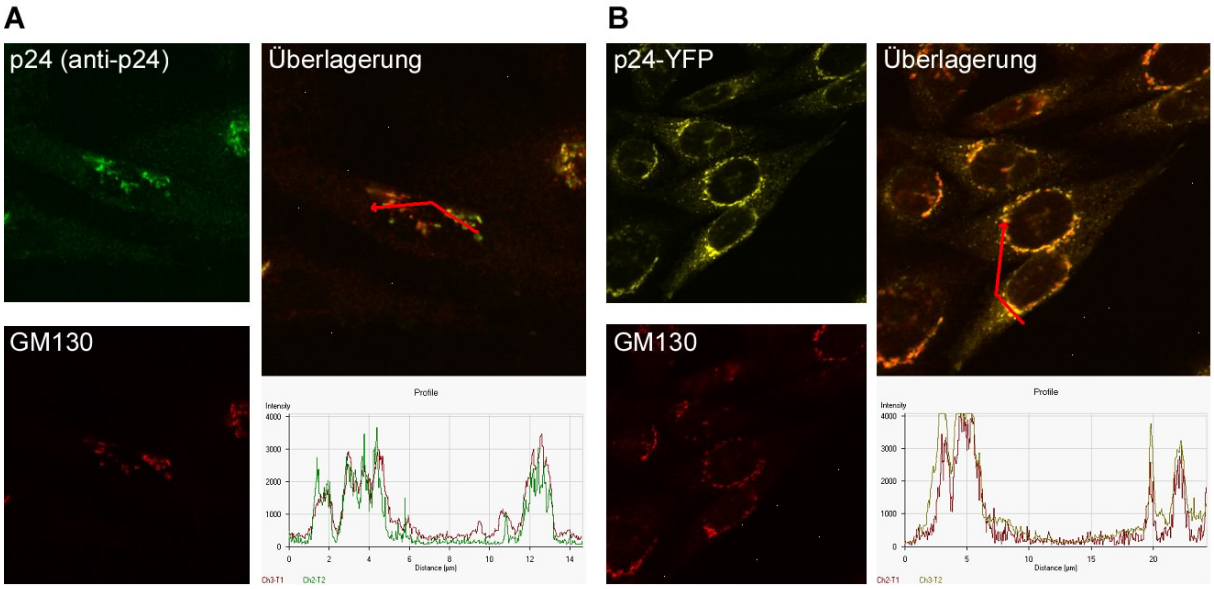


Abbildung 26: Lokalisierungsstudien der überexprimierten Konstrukte am Beispiel der Zelllinie Y4_9. In Abbildung A wurden Wildtyp-Zellen mit Antikörpern gegen p24 (in grün) sowie GM130 (in rot) angefärbt. Abbildung B zeigt Y4_9 Zellen die ebenfalls mit Antikörpern gegen GM130 (rot) gefärbt wurden. Die Profile zeigen die Fluoreszenzintensität von p24 und GM130 entlang einer zufällig gewählten Linie. Die Y4_9 Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 µg/ml Doxicyclin induziert.

Das Färbemuster der verschiedenen Zelllinien wurde mit dem von Wildtyp CHO-Zellen verglichen. Diese wurden dazu sowohl mit gegen GM130 als auch mit gegen endogenes p24 gerichteten Antikörpern angefärbt. Die beobachtete Kolokalisierung wurde mittels Fluoreszenzprofilen genauer analysiert. Dazu wurden die Intensitäten der p24- und GM130-Färbung entlang zufällig gewählter Linien verglichen. Es wird deutlich, dass selbst 24 Stunden nach Induktion mit 1 µg/ml Doxicyclin die Lokalisierung der überexpremierten p24-Proteine sich nicht von der endogener p24 Proteine in Wildtyp-Zellen unterschied. Eine Misslokalisierung, wie in Kapitel III.A.1.7 beschrieben, konnte wegen der kontrollierten Konzentration der ektopischen Proteine auch für die anderen monoklonalen Zelllinien nicht beobachtet werden. Somit waren die generierten Zelllinien für die geplanten Versuche verwendbar.

1.4 Veränderungen der spektralen Eigenschaften sowie der Expressionsraten der Fusionskonstrukte

Für die geplanten *in vitro* FRET-Experimente sollten Golgi-Membranen aus den generierten Zelllinien isoliert werden. Ähnlich wie für die *in vivo* Versuche mit transient transfizierten Vero Zellen ist dafür eine ausreichende Expressionsrate nötig, um ein möglichst hohen Anteil an p24-Dimeren, die sowohl mit CFP als auch mit YFP markiert sind, zu erhalten. Es sollte daher untersucht werden, bei welcher Überexpressionsrate für FRET-Messungen ausreichende Fluoreszenzintensitäten erhalten werden, ohne das es zur Akkumulierung der Proteine in ER kommt. Dazu wurden verschiedene doppelt exprimierende Zelllinien mit 1 µg/ml Doxicyclin induziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert. Die Zelllinien exprimierten entweder die Heterodimere bildenden Proteine p23 und p24 (sowohl in der Kombination p23CFP/p24YFP als auch p23YFP/p24CFP), oder das Homodimere bildende Paar p23CFP/p23YFP. Die Bestimmung der FRET-Effizienzen sollte anschließend mit der Akzeptor-Photobleich-Methode durchgeführt werden. Während der Untersuchungen kam es zu einer unerwarteten Beobachtung.

Alle Zelllinien wurden mit der beschriebenen FACS-Vereinzelung in drei Schritten hergestellt. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass nur Zellen, die sowohl CFP- als auch YFP-Konstrukte zu ähnlichen Teilen exprimieren, ausgewählt wurden. Trotzdem kam es in allen Fällen nach längerem Kultivieren dazu, dass einige Zellen nur noch eines der Konstrukte exprimierten (Abbildung 27).

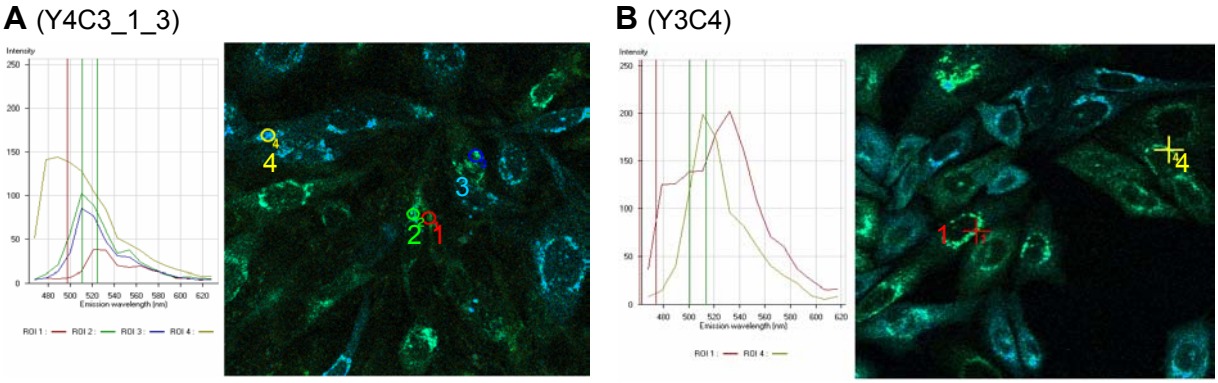


Abbildung 27: Spektrale Analyse der generierten Zelllinien. Der Großteil der Zellen exprimierte nach längerem Kultivieren nur noch eines der Konstrukte. So exprimierte Zelle 4 in Abbildung A nur noch p23-CFP, wohingegen Zelle 1 nur noch YFP-Fluoreszenz aufweist. Nur wenige Zellen, wie Zelle 1 in Abbildung B zeigten sowohl CFP- als auch YFP-Fluoreszenz. Der Großteil der Zellen wies hingegen weder eine CFP- noch eine YFP-Charakteristik auf, sondern besaß ein für GFP charakteristisches Emissionspektrum mit einem Maximum bei ca. 515 nm (Zellen 2 und 3 in Abb. A und 4 in Abb. B). Beide Abbildungen wurden mit 458 nm angeregt, und im Bereich von 462-623 nm detektiert.

Dies war insbesondere deswegen verwunderlich, als in allen Fällen beide Konstrukte, gekoppelt durch das IRES-Element, unter Kontrolle eines Promotors exprimiert wurden. Als mögliche Erklärung dieses Effekts könnte ein sehr rascher Abbau oder die Unterdrückung der Expression eines Konstruktes dienen.

Neben diesem Phänomen wurde des Weiteren beobachtet, dass der Großteil der Zellen weder CFP- noch YFP-Fluoreszenz aufwies, sondern ein Protein mit einer GFP-Signatur exprimiert. Dies ist bei genauer Betrachtung der in Abbildung 24 gezeigten Spektren zu erkennen, die mit Hilfe des „META-Moduls“ des konfokalen Mikroskops LSM-510-Meta (Carl Zeiss) aufgenommen wurden. Der Großteil der Zellen wies ein Emissionsmaximum bei ca. 515 nm auf, das dem von GFP entspricht. CFP hingegen hat ein Emissionsmaximum bei 475 nm, YFP bei 527 nm, was durch Vergleich mit Zelllinien, die nur p23-CFP (C3_30) bzw. p23-YFP (Y3_9) exprimieren, deutlich wird (Abbildung 28). Diese Maxima entsprechen der in der Literatur beschriebenen Signatur (Abbildung 29B).

A (C3_30) **B** (Y3_9)

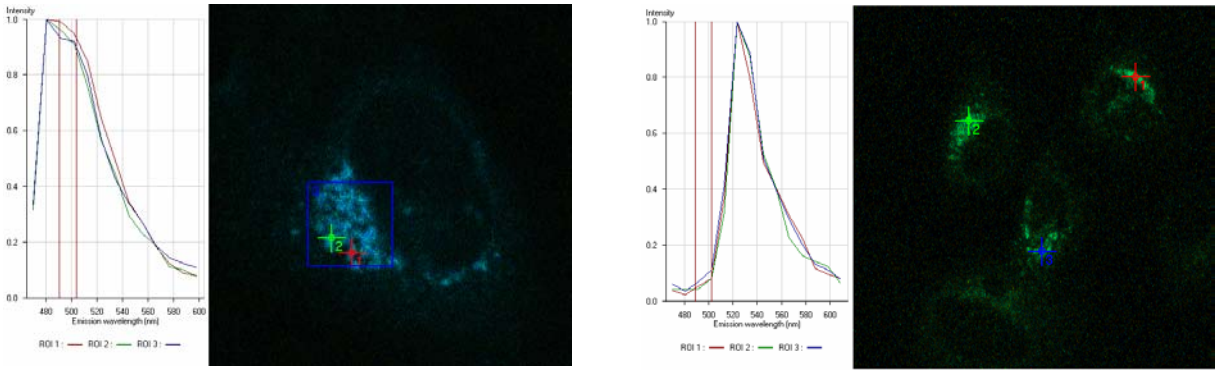
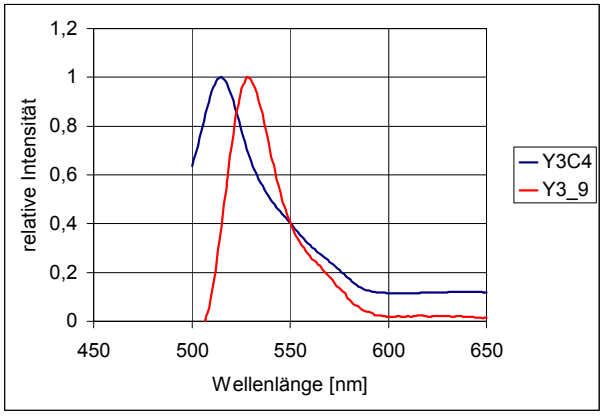


Abbildung 28: Spektrale Analyse der fluoreszierenden Proteine in den Zelllinien C3_30 und Y3_9. In beiden Fällen wurde mit 458 nm angeregt und das Spektrum im Bereich von 462-623 nm aufgenommen.

Durch weitere Untersuchungen mittels eines Spektrofluorimeters wurde dieser Befund auf Einzelzellebene auch für den gesamten Zellpool beobachtet (Abbildung 29A). Das Emissionsspektrum der Gesamtheit aller Zellen der eigentlich doppelt exprimierenden Zelllinie ist, verglichen zum Literaturwert, um über 10 nm zu niedrigeren Wellenlängen verschoben. Für die ausschließlich p23-YFP exprimierende Zelllinien Y3_9, sowie für die anderen einfach exprimierende Zelllinien, konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden.

A



B

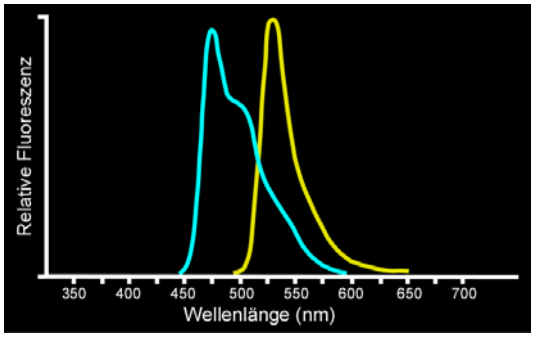


Abbildung 29: Spektral Analyse mittels Spektrofluorimeter. Im Vergleich zur einfach exprimierenden Zelllinien Y3_9 ist das Emissionsspektrum der Gesamtheit alles Zellen der doppelt exprimierenden Zelllinie Y3C4 zu kürzeren Wellenlänge hin verschoben (A). Bild B zeigt die in der Literatur beschriebenen Emissionsspektren von CFP (blau) und YFP (gelb).

Dieses Phänomen konnte nur für die retroviral stabil transduzierten Zellen, nicht aber bei transient transfizierten Vero-Zellen beobachtet werden (siehe Abschnitt III.A.1.7). Der Grund für diesen Effekt ist unklar, insbesondere, da es sich um monoklonale Zelllinien handelt. Darüber hinaus trat er fast ausschließlich bei doppelt exprimierenden Zellen auf. Nur in sehr seltenen Fällen (unter 0,5%) konnte in einigen einfach exprimierenden Zellen spektrale Veränderungen beobachtet werden. Diese traten jedoch nur in Zellen auf, in denen das Fluoreszenzsignal nicht in Golgi Strukturen, sondern über die gesamte Zelle verteilt war (Abbildung 30).

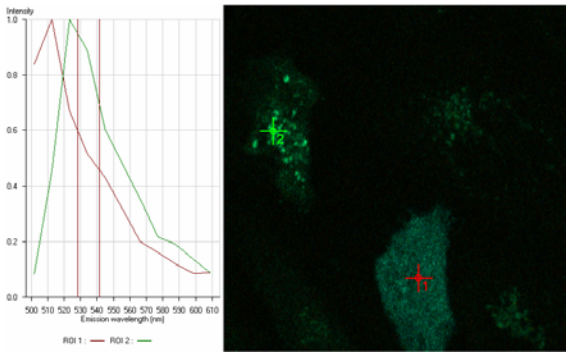


Abbildung 30: Spektren der YFP Signale in p23-YFP exprimierenden Zellen (Y3_9). Nur in solchen Zellen, in denen keine physiologische Golgi-Lokalisierung auftrat (Zelle 1) wurden GFP ähnliche Spektren bestimmt.

Aufgrund der relative geringen Sensitivität des „Meta-Moduls“ und der dadurch bedingten geringen räumlichen Auflösung konnte nicht ermittelt werden, ob es sich um retikuläre ER Strukturen handelt, oder ob das fluoreszierende Protein im Cytosol lokalisiert. In manchen Fällen wurde auch eine Kernlokalisierung der GFP ähnlichen Fluoreszenz beobachtet (nicht gezeigt).

Trotz der unerwarteten Veränderungen der spektralen Eigenschaften sowie der Beobachtung, dass nur ein sehr geringer Anteil der Zellen der eigentlich doppelt exprimierenden Zelllinien sowohl CFP- als auch YFP-Fluoreszenz aufwiesen, konnten in einigen Zellen FRET-Messungen durchgeführt werden. So wurde mit Hilfe der Akzeptor-Photobleich-Methode bis zu 45% FRET-Effizienz nachgewiesen (Abbildung 31).

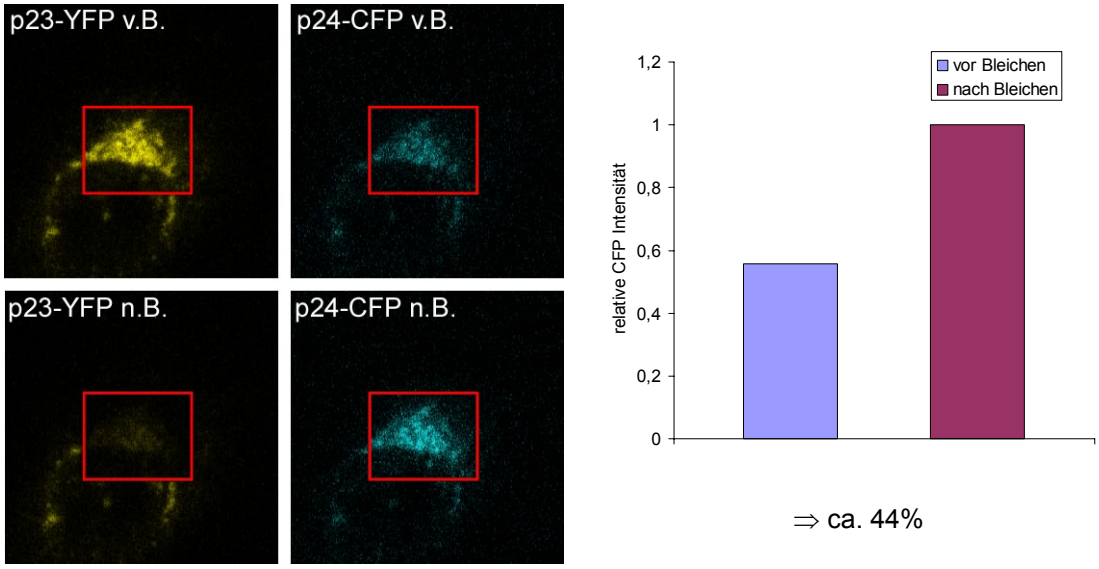


Abbildung 31: FRET Messung in der stabil exprimierenden Zelllinie Y3C4.

1.5 Isolierung fluoreszierender Golgi-Membranen

Wie oben beschrieben, wiesen die einfach exprimierenden Zellen sowohl eine korrekte Lokalisierung der überexprimierten Proteine als auch die in der Literatur beschriebenen Fluoreszenzsignatur auf. Diese Zelllinien waren daher geeignet, um fluoreszierende Golgi-Membranen zu isolieren.

Um ausreichende Mengen an Zellen zu erhalten, wurden die CHO-Zelllinien dafür in Suspensions-Flaschen kultiviert, bis ca. 10-12 Liter mit einer Zelldichte von $1*10^5$-10^6 Zellen/ml erhalten wurden. Die Expression der Fusionskonstrukte wurde 24 Stunden vor Isolierung der Membranen mit 1 µg/ml Doxicyclin induziert. Aus 10-12 Litern konnten anschließend ca. 2-5 mg Golgi-Membranen isoliert werden. Diese wurden anschließend spektroskopisch und mittels Western-Blot analysiert.

Es konnten fluoreszierende Golgi-Membranen aufgereinigt werden, die die charakteristischen Fluoreszenzspektren für CFP oder YFP aufwiesen (Abbildung 32A, beispielhaft an Hand der Zelllinien C3_14 und Y4_9).

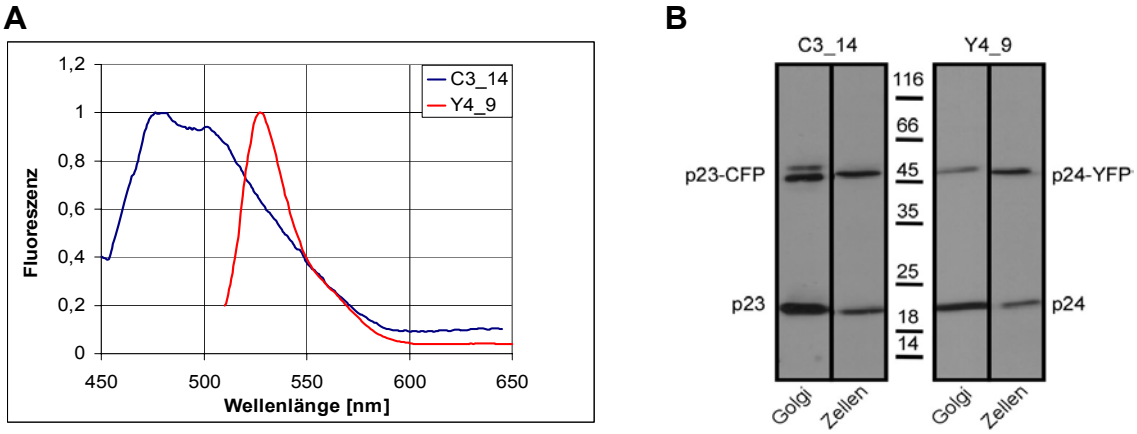


Abbildung 32: A) spektroskopische Analyse der isolierten Golgi-Membranen. Die Signatur der Spektren entspricht den in der Literatur beschriebenen, mit einem Maximum für CFP bei 475 nm und für YFP bei 527 nm. Jeweils 50 µl Golgi (ca. 0.5 µg/ml) wurden mit 436 nm (für CFP) bzw. 488 nm (für YFP) angeregt und die Emission im Bereich von 450-650 nm (CFP) bzw. 510-650 nm (YFP) gemessen. B) Western Blot Analyse der isolierten Membranen. Es wurden jeweils 5 µg der Zellen vor Lyse sowie der isolierten Golgi-Membranen aufgetragen.

Bei Analyse der Golgi-Membranen mittels Western-Blot ergab sich, dass in den Golgi-Membranen weniger markierte Proteine relativ zu endogenen Proteine detektiert wurde, als dies für die Ausgangszellen der Fall war (Abbildung 32B). Obwohl unter diesen Bedingungen keine Akkumulierung der Fusionskonstrukte im ER im Mikroskop zu erkennen war, lokalisierten die markierten p24 Proteine somit stärker im ER als im Golgi. Um die Konzentration an Doxicyclin zu bestimmen, bei der die exogenen, markierten p24-Proteine gleich lokalisieren wie die endogenen, wurden eine Reihe von Golgi-Präparationen nach Induktion mit unterschiedlichen Doxicyclin Mengen durchgeführt. Dadurch wurde ein Bereich von 100-500 ng/ml als optimale Konzentration bestimmt.

Es konnten zusammenfassend 5 monoklonale Zelllinien generiert werden die unter Kontrolle des Tet-On Systems die Fusionsproteine p23-CFP, p23-YFP, p24-CFP oder p24-YFP exprimierten (C3_14 und C3_30, Y3_9, C4_53, Y4_9). Die korrekte Lokalisierung der überexprimierten Konstrukte wurde sowohl mikroskopisch als auch biochemisch überprüft. Aufgereinigte Golgi-Membranen aus diesen Zelllinien wiesen die in der Literatur beschriebenen Spektren auf. Somit konnte ein monoklonales Expressionssystem etabliert werden, welches die nähere Untersuchung der Rolle der p24-Proteine in der Vesikelbiogenese erlaubt. Die Expression in doppelt transduzierten Zelllinien konnte ebenfalls mittels des Tet-On Systems kontrolliert werden. Aufgrund der spektralen Veränderungen sowie dem Verlust der Expression eines Fusionskonstrukts, waren sie jedoch nicht zur Gewinnung von Golgi-Membranen geeignet.

C Etablierung eins Systems zur Untersuchung von COPI-Vesikel *in vivo*

COPI-Vesikel sind mit einer Größe von ca. 60-100 nm zu klein, um in konventioneller Lichtmikroskopie als individuelle Partikel erkannt zu werden. Selbst mit der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie kann nur eine maximale Auflösung von ca. 200 nm in xy-Ebene bzw. 500 nm in z-Richtung erreicht werden. Diese Auflösung ist jedoch zu gering um COPI-Vesikel *in vivo* von z.B. Golgi Zisternen oder dem Endoplasmatischen Retikulum zu unterscheiden. Um einzelne Vesikel und deren Lokalisierung genau zu untersuchen, müssen daher technisch aufwendige elektronenmikroskopische Methoden benutzt werden, die jedoch nicht in lebenden Zellen angewendet werden können. In vielen Prozessen wird aufgrund dieser Problematik die Existenz und Funktion von COPI-Vesikel kontrovers diskutiert. So ist z.B. die Funktion der COPI-Vesikel im bidirektionalen, besonders im anterograden, intra-Golgi Transport umstritten (Pelham and Rothman, 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Bedeutung des so genannten *mitotic haze* während der Zellteilung. Einige Studien belegen, dass es sich hierbei um COPI-Vesikel handelt (Axelsson and Warren, 2004; Jokitalo et al., 2001), andere hingegen interpretieren diese Strukturen als mit dem ER fusionierte Golgi Membranen (Altan-Bonnet et al., 2006). Aufgrund der geringen Auflösung können jedoch im Cytosol frei vorliegende COPI-Vesikel nicht vom ER unterschieden werden, wodurch diese Fragestellung mit Hilfe indirekter Experimente wie z.B. FRAP-Messungen untersucht wurden (Axelsson and Warren, 2004). Auch die Art und Weise, wie die Vesikel vom Ort ihrer Entstehung zur Zielmembran gelangen, ist noch nicht vollständig verstanden.

Zielsetzung war es daher, ein System zu entwickeln, welches es erlaubt, COPI-Vesikel einwandfrei in der Zelle zu visualisieren, und somit deren Funktion und Verhalten bei verschiedenen Prozessen besser verfolgen zu können. Dazu sollten fluoreszierende COPI-Vesikel in einem *in vitro* Ansatz hergestellte werden, und anschließend in Säugetierzellen mikroinjiziert werden. Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung und vorheriger Charakterisierung wäre es somit möglich, das Verhalten der COPI-Vesikel *in vivo* zu verfolgen.

1 Isolierung und Charakterisierung fluoreszierender COPI-Vesikel

1.1 Generierung fluoreszierende COPI-Vesikel

COPI-Vesikel können in einem in vitro Rekonstitutionsverfahren von aufgereinigten Golgi-Membranen generiert werden (Malhotra et al., 1989; Satoh et al., 2005). Dazu werden die Membranen entweder mit Cytosol, oder in einem biochemisch mehr definierten System, mit rekombinanten ARF1 und Coatomer, welches aus Kaninchen Leber gewonnen wird, inkubiert. Um die für die geplanten Mikroinjektionsexperimente benötigten fluoreszierenden Vesikel zu erhalten, wurden die Golgi-Membranen vor der Vesikelherstellung gefärbt. Dazu wurden sie mit einem Succinimidyl-Ester des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa-Fluor-488 (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert, wodurch der Farbstoff kovalent an die primären Amine von Lysinseitenketten koppelte. Nach Abstoppen der Reaktion mit Ammoniumchlorid und Abtrennen von freiem Farbstoff wurde der gefärbte Golgi für die Vesikelreaktion eingesetzt.

Die Membranen wurden mit rekombinanten ARF1 und Coatomer in Gegenwart von GTP für 10 min bei 37°C inkubiert, und anschließend die Donor Membranen durch kurze Zentrifugation bei 14000 g abgetrennt. Die im Überstand (Load) enthaltenen Vesikel wurden dann mittels eines Saccharose-Dichte-Gradienten weiter aufgereinigt (Abbildung 33). Protein-umhüllte COPI-Vesikel werden typischerweise in Fraktionen mit einer Dichte von 39-45% gefunden (Malhotra et al., 1989), wohingegen nackte (Protein-freie) Vesikel nicht isoliert werden können, da sie eine ähnliche Dichte wie die so genannten *remnants* besitzen. Dabei handelt es sich um kleinere Golgi Fragmente, die *in vitro* durch die Vesikelproduktion entstehen, und sich im Bereich von 30-35% Sucrose befinden.

Damit ausreichende Mengen an Vesikel mikroinjiziert werden konnten, mussten sie weiter ankonzentriert werden. Dazu wurden die vereinten Vesikelfraktionen auf eine Saccharose-Konzentration von ca. 12% verdünnt und durch einen weiteren Gradienten in einem Kissen aus drei mal je 5 µl 38%, 45% und 50% Sucrose gesammelt. Dabei war es wichtig, dass die einzelnen Schichten scharf von einander getrennt waren.

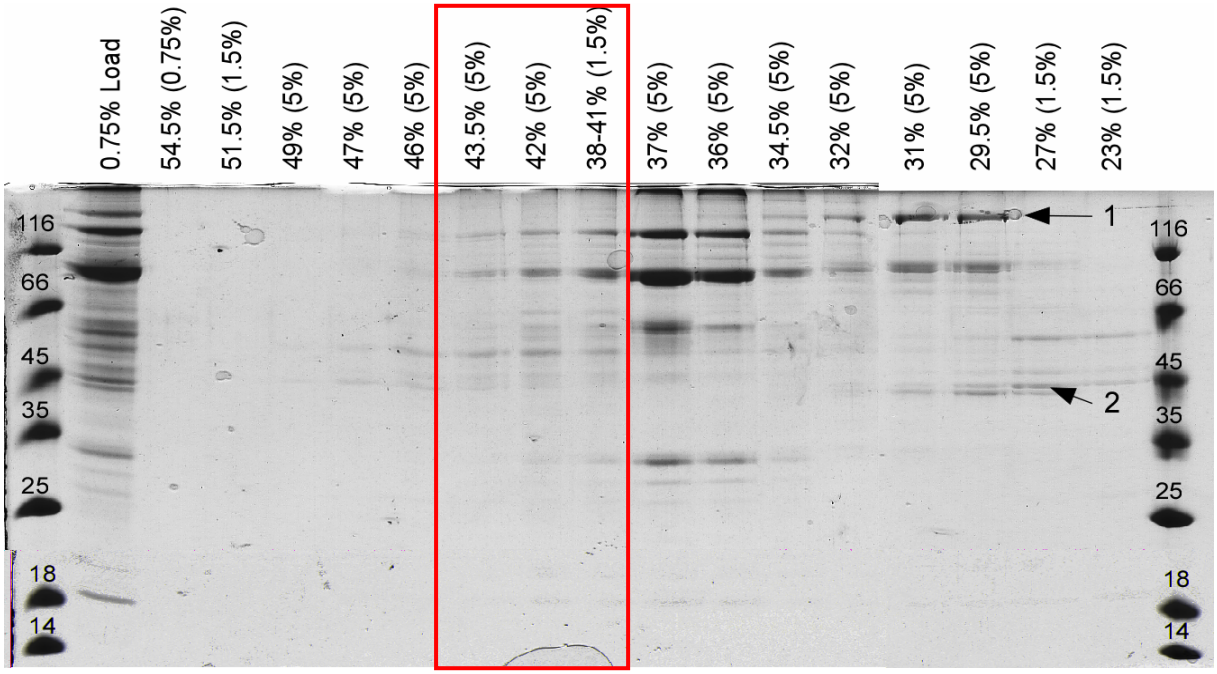


Abbildung 33: Isolierung der fluoreszierenden Vesikel. Protein umhüllte Vesikel befinden sich im Bereich von 38-45% Sucrose (roter Kasten) Die Prozentangaben in Klammern beziehen sich auf die Fraktionsgröße. Es wurden jeweils 7.5 µl pro Fraktion geladen. Bande 1 und 2 wurden mittels MALDI als Myosin, bzw. Aktin identifiziert.

Trotz der geringen intrinsischen Aktivität von ARF1 kommt es partiell zur Dissoziation der Proteinhülle. Um ein Aggregieren von nicht umhüllten Vesikeln zu verhindern, wurde die Ankonzentrierung in Anwesenheit von 1 mg/ml BSA und 150 mM KCl durchgeführt. Nach dem Ankonzentrieren war ein schmaler Ring fluoreszierender Vesikel innerhalb der 45% Saccharose Schicht sichtbar. Die Vesikel wurden in einem möglichst kleinen Volumen aufgenommen, 1:1 mit 1 mg/ml BSA und 150 mM KCl verdünnt und resupendiert. Ein Aliquot der verdünnten Vesikelprobe wurde anschließend elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 34)

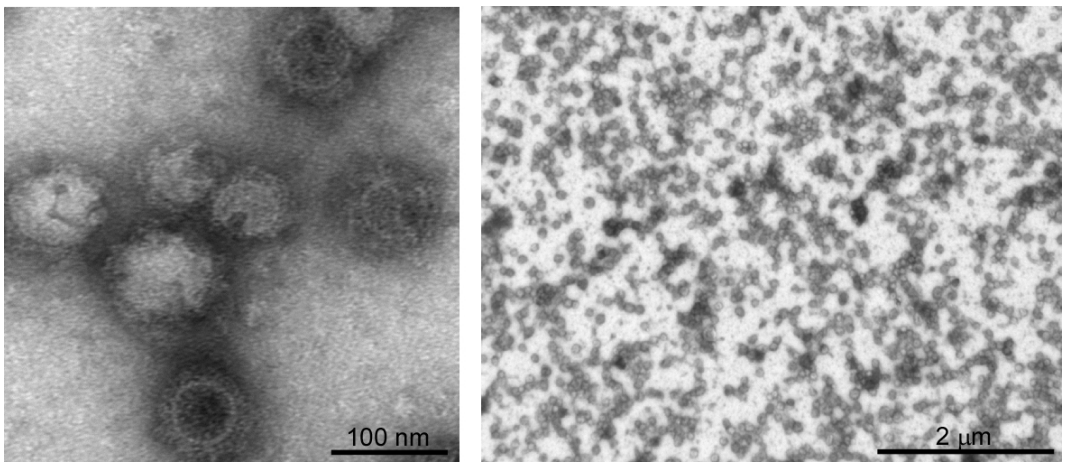
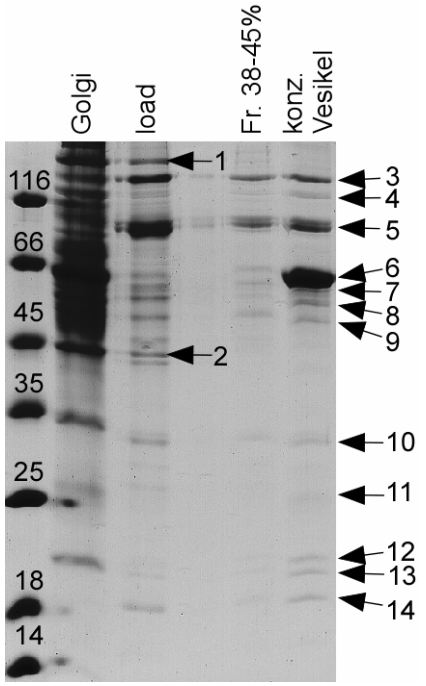


Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahme der isolierten Vesikel. Ein Tropfen einer 1:10 Verdünnung der konzentrierten Vesikel wurde direkt auf das Gitter gegeben und mit Uranylacetat angefärbt.

1.2 Charakterisierung der Zusammensetzung der Vesikel

Die hergestellten Vesikel wurden zusätzlich mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft (Abbildung 35).



1	Myosin
2	Aktin
3	α-COP
4	α–Mannosidase II
5	β,β´,γ-COP
6	BSA
7	δ-COP
8	ERGIC-53
9	p54/NEFA
10	ε-COP
11	p25
12	p24
13	p23
14	ARF1

Abbildung 35: Coomassie Färbung der Analyse der Vesikelherstellung. Es wurden jeweils Proben des eingesetzten Golgi, des Überstandes nach der Vesikelreaktion (Load), der vereinten Fraktionen (38-45%) sowie 10% der konzentrierten Vesikel untersucht. Die mit Pfeilen markierten Banden wurden mittels MALDI Analyse identifiziert. Bei der prominenten Bande 6 handelt es sich um das zugesetzte BSA.

Zur weiteren Charakterisierung der erhaltenen Vesikel wurden einige der stärksten Proteinbanden mittels MALDI-TOF analysiert (FG Dr. Johannes Lechner, BZH). Wie auch schon im Gradienten sichtbar (Abbildung 33) werden die Proteine Myosin und Aktin, die im Überstand nach der Vesikelherstellung vorhanden sind (Bande 1 und 2) klar von den Vesikel getrennt. Die sieben Untereinheiten von Coatomer sowie ARF1, die zusammen die Vesikelhülle bilden, machen einen großen Teil der Vesikelproteine aus (Banden 3, 5, 7, 10 und 14). ζ-COP und ARF1 laufen in einem 12% Gel auf gleicher Höhe (Abbildung 36). Interessanterweise wurden in Bande 14 jedoch hauptsächlich ARF1-Peptide gefunden. Dies legt die

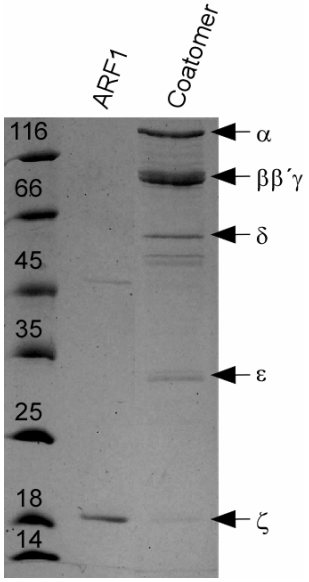


Abbildung 36: Coomassie Färbung eines 12% Gels von ARF1 und Coatomer

Vermutung nahe, dass mehrere ARF1 Proteine pro Coatomer auf den Vesikeln vorkommen. Unterstützt wird dieser Befund durch die, verglichen zu den anderen Coatomer Untereinheiten, relativ starke Intensität dieser Bande.

Zusätzlich zu den Hüllproteinen wurden die Coatomerrezeptoren p23, p24 und p25 (Banden 11, 12 und 13) identifiziert. α-Mannosidase II konnte als Vertreter eines medialen Golgi residenten Enzyms detektiert werden (Bande 4), wohingegen mit dem Lectin ERGIC-53 (Bande 8) ein Protein gefunden wurde, das im *intermediate compartment* und frühen Golgi lokalisiert. Neben diesen Transmembranproteinen stellte eine der prominentesten Banden das lösliche, luminale Proteine p54/NEFA dar (Bande 9), für welches bereits mittels Elektronenmikroskopie beschrieben wurde, dass es in Vesikel lokalisiert (Morel-Huaux et al., 2002).

Neben der Coomassie- und MALDI-Analyse wurde die Zusammensetzung der Vesikel mittels Western Blot weiter untersucht. Dazu wurden die einzelnen Fraktionen des präparativen Gradienten auf unterschiedliche Proteine hin analysiert (Abbildung 37). Die Transmembranproteine p23, p24, sowie α-Mannosidase II sind verglichen zu den *remnants* in den Vesikelfraktionen von 38-45% angereichert. Das Tether Protein GM130 hingegen, welches über Interaktion mit p115 Vesikel an ihre Zielmembran rekrutiert (Sonnichsen et al., 1998), ist hauptsächlich in den *remnant*-Fraktionen zu finden und in Vesikeln stark abgereichert. Coatomer ist aufgrund der großen Masse und sehr hohen Zentrifugationskräften von 400000 g über den gesamten Bereich des Gradienten zu finden, wie durch Gradienten, welche nur Coatomer enthielten, ermittelt wurde (nicht gezeigt).

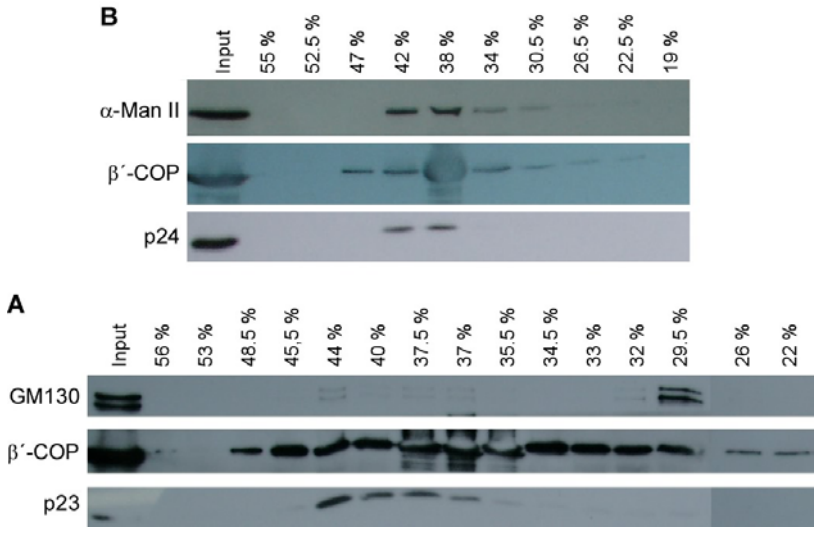


Abbildung 37: Western Blot Analyse der präparativen Gradienten. Die einzelnen Fraktionen zweier Gradienten wurden auf die angegebenen Proteine hin untersucht. Die Fraktionsgröße betrug im ersten Gradienten (A) ca. 500 µl. Im Bereich von 29.5-48,5% Sucrose im zweiten Gradienten (B) wurden jedoch kleinere Fraktionen von 150 µl gesammelt.

Die in den Vesikelfraktionen detektieren Signale stellen somit eine Mischung aus freiem und an Vesikel gebundenen Coatomer dar. Der Großteil wandert als wahrscheinlich lösliches Protein in dem Bereich von 36-37% (siehe auch Abbildung 33).

1.3 Analyse der Fluoreszenzmarkierung

Der zur Färbung der Golgi-Membranen eingesetzte Succinimidyl-Ester des Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor-488 reagiert präferenziell mit primären Aminen. Als mögliche Reaktionspartner können sowohl die Lysinseitenketten der Golgi Proteine als auch die freien Aminogruppen des Phosphatidylethanolamins (PE) dienen. Um zu ermitteln, ob mögliche Fluoreszenzsignale nach der Mikroinjektion, Vesikelproteine oder Membranen darstellen, wurden die Reaktionspartner des Fluoreszenzfarbstoffs massenspektrometrisch und mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

Mit Hilfe quantitativer ESI-Massenspektrometrie wurde eine mögliche Markierung von Phosphatidylethanolamin überprüft, indem der PE-Gehalt von Golgi-Membranen vor und nach der Färbung gemessen wurde. Dabei wurde weder eine Verringerung des endogenen PE-Gehalts gemessen, noch konnte das Auftreten einer modifizierten PE-Spezies mit entsprechend höherer Masse beobachtet werden (Abbildung 38). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass geringe Mengen an PE markiert werden, deren Konzentration unterhalb des Detektionslimits liegt.

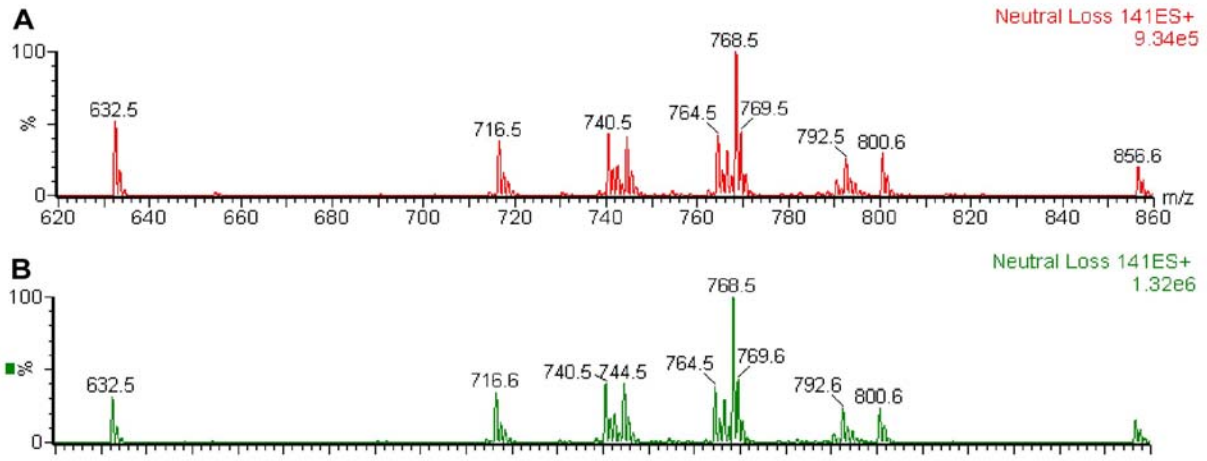


Abbildung 38: Massenspektrometrische Bestimmung des PE-Gehalts von Golgi-Membranen vor (A) und nach (B) Färbung mit Alexa-Fluor-488. Folgende PE-Spezies wurden identifiziert. PE-768: 38:4 (Masse: Summe aus C-Atomen in beiden FS : Summe aus Doppelbindungen in beiden FS. Dabei handelt es sich Hauptsächlich um 18:0/20:4), 764: 38:6; 792: 40:6; 740: 36:4; 744: 36:2, 716: 34:2. Es konnte keine Veränderung des Profils nach Färbung beobachtet werden. Auch modifizierten PE-Spezies mit entsprechend höherer Masse von +514 konnten nicht identifiziert werden

Die Modifizierung von Golgi Proteinen und deren Aufnahme in Vesikel wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analyse, unter Verwendung eines spezifisch gegen den Farbstoff Alexa Fluor-488 gerichteten Antikörpers, untersucht (Abbildung 39A).

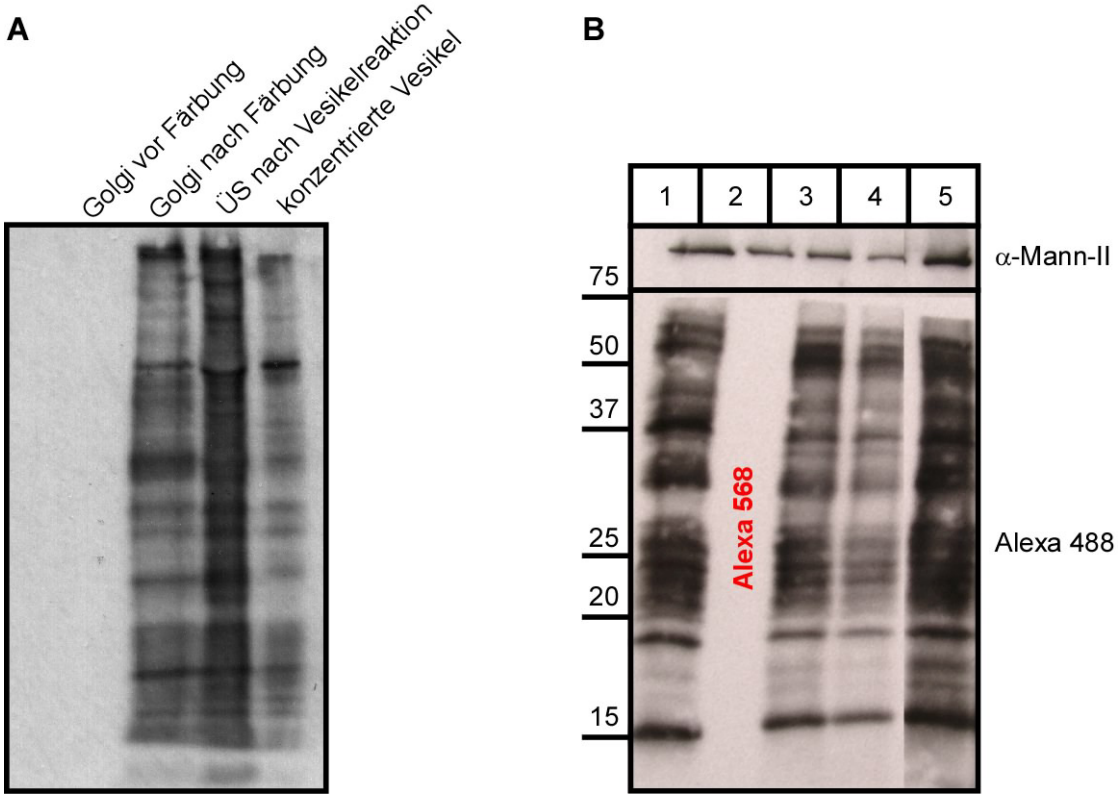


Abbildung 39: Western Blot Analyse der Markierung von Golgi-Proteinen. Bild A zeigt die Aufnahme der markierten Golgi Proteine in die gebildeten Vesikel. Durch Vergleich der Intensität von α-Mannosidase II mit den Alexa-488 Signalen in fünf verschiedenen Vesikelproben (B) konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Markierung stets gleich blieb. Die Vesikel in Spur 2 wurden mit dem Farbstoff Alexa-568 gefärbt. Das vollständige Ausbleiben von Signalen belegt die Spezifität des verwendeten Antikörpers.

Es zeigte sich, dass eine Reihe verschiedener Proteine durch den Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, von denen einige in die Vesikel aufgenommen werden. Beim Vergleich unterschiedlicher Vesikelproben wurde deutlich, dass das Markierungsmuster sowie das Ausmaß der Markierung sich kaum unterschieden, sodass jeweils der gleiche Satz an Proteinen markiert wurde (Abbildung 39B).

2 Mikroinjektion fluoreszierender COPI-Vesikel

Damit Transportvesikel mit ihrer Zielmembran fusionieren können, müssen die Hüllproteine entfernt werden. Im Fall von COPI-Vesikel erfolgt die Ablösung von Coatomer nach der Hydrolyse von GTP durch ARF1. Daher konnten die Vesikel nicht unter Verwendung des nur sehr langsam hydolysierbaren GTP-Analogs, GTPγS generiert werden, welches häufig zur Gewinnung großer Mengen an Vesikel eingesetzt wird. Trotz der relativ geringen intrinsischen Aktivität von ARF1 kommt es während der Herstellung und Verwendung der Vesikel kontinuierlich zur Ablösung der Hüllproteine, wodurch eine Mischung aus bedeckten und nicht bedeckten Vesikel vorliegt. Diese formen größere Aggregate, die zur Verstopfung der Mikroinjektionsnadel führen können. Daher wurden die Vesikel in Anwesenheit von 1 mg/ml BSA und 150 mM KCl ankonzentriert und anschließend durch Verdünnen noch resupendiert. Durch Verdünnen der Vesikelprobe wurde zusätzlich die Saccharose-Konzentration verringert und somit starke osmotische Veränderungen nach Mikroinjektion verhindert. Um mögliche Aggregate zu entfernen, wurden die Vesikel kurz vor ihrer Verwendung bei 12000 g zentrifugiert und sofort eingesetzt. Die Oberfläche der Mikroinjektionsnadeln war vorher mit einer Lösung aus 45% Sucrose, mit 1,5 mg/ml BSA und 150 mM KCl passiviert worden, um eine Absorption der Vesikel zu verhindern. Zusätzlich wurde vorsichtig die Spitze abgebrochen um eine größere Öffnung zu erhalten.

2.1 Mikroinjizierte COPI-Vesikel fusionieren mit dem Golgi-Apparat

Nach erfolgter Mikroinjektion wurden die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert, um die Fusion mit der Zielmembran zu gewährleisten und anschließend endogene Golgi Marker wie z.B. Giantin oder GM130 mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Abbildung 40 zeigt repräsentative Bilder mikroinjizierter Fibroblasten der grünen Meerkatze (Zelllinie: BSC-1). Anstelle des grünen Farbstoffs Alexa-488 wurde ebenfalls der rote Farbstoff Alexa-568 zur Färbung des eingesetzten Golgis verwendet. Entsprechenden Vesikel konnten somit in BSC-1 Zellen mikroinjiziert werden, welche als Golgi Marker die mit GFP markierte beta1,4-N-

Acetylgalactosaminyltransferase-2 (GalNAcT2-GFP) stabil exprimierten (Zelllinie: YT2) (Abbildung 40B).

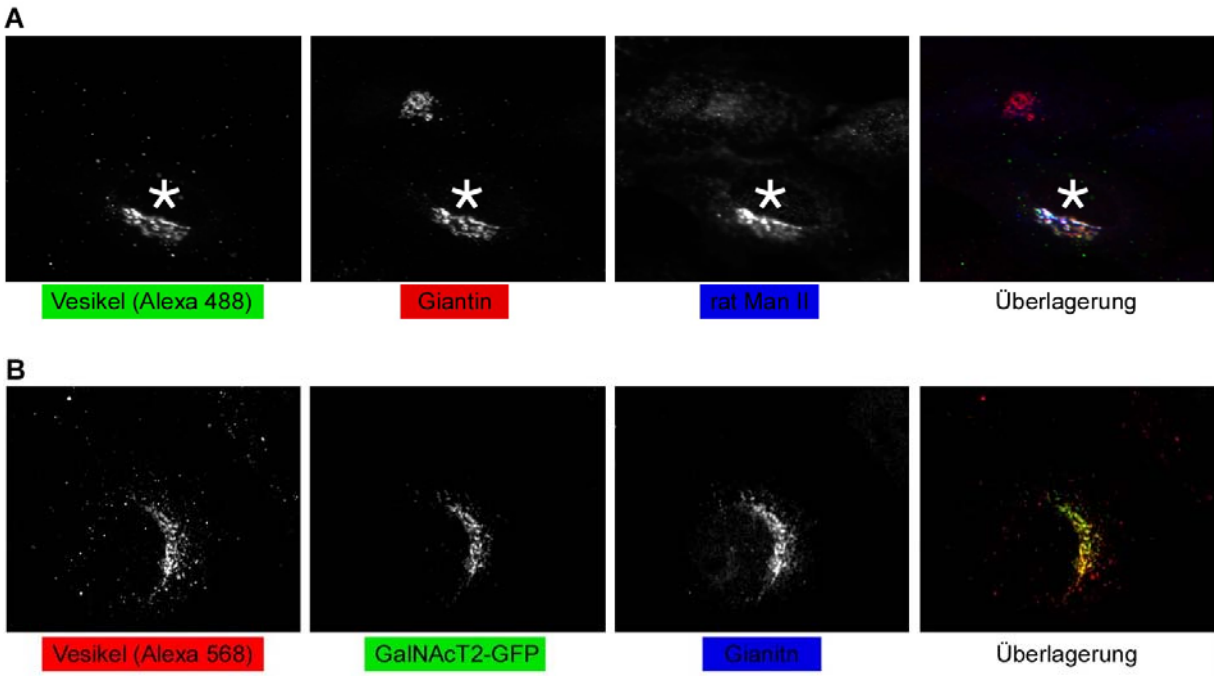


Abbildung 40: COPI-Vesikel mikroinjiziert in BSC-1 Zellen. Abbildung A wurde mit einem Epifluoreszenz Mikroskop aufgenommen. Neben dem endogenen Golgi Marker Giantin (rot) wurde die aus den Vesikel stammenden Ratten α-Mannosidase II (blau) mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Abbildung B, aufgenommen mit einem konfokalen Mikroskop, zeigt rote Vesikel (Alexa-568), welche in die GalNAcT2-GFP überexprimierende Zelllinien YT2 injiziert wurden. Die Überlagerung zeigt in diesem Fall die Kolokalisierung der Vesikel (rot) mit GalNAcT2-GFP (grün).

Wie in Abbildung 40 zu erkennen ist, kolokalisierten 30 min nach Injektion der Vesikel Alexa Signale mit endogenen Golgi Markern wie Giantin (ein Tether Protein) oder auch GalNAcT2-GFP. Durch die beschriebenen Western Blot und MALDI Analysen wurde festgestellt (siehe III.C.1.3), dass überwiegend Golgi Proteine und keine Lipide angefärbt wurden. Daher repräsentierten die beobachteten Alexa Signal markierte Proteine welche aus den mikroinjizierten Vesikeln stammen. Der monoklonale Mausantikörper 53FC3 erkennt ausschließlich Ratten α-Mannosidase II, nicht jedoch das Affen Homolog. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte ein spezifisches Membranprotein mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, welches über die mikroinjizierten Vesikel in die Zelle gelangte. Die beobachtet Kolokalisierung der Alexa Signal mit verschiedene endogenen Golgi Markern sowie die Anwesenheit von Ratten α-Mannosidase II in den selben Strukturen weisen darauf hin, dass intakte und aktive Vesikel mikroinjiziert wurden, die nach 30 min mit dem Golgi assoziieren und fusionieren.

Zusätzlich zu den mit endogenen Golgi Markern kolokalisierenden Strukturen wurden einige helle punktierte Strukturen sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zellen beobachtet. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um aggregierte Vesikelcluster, die nicht mehr aktiv sind.

In einem weiteren Experiment sollte festgestellt werden, ob die Vesikel tatsächlich mit dem Golgi-Apparat fusionierten, oder ob die beobachteten Kolokalisierung lediglich Vesikel darstellen, die an die Golgi-Membran binden ohne zu fusionieren. Dazu wurden die Zellen 30 min nach der Mikroinjektion mit 5 µg/ml BFA versetzt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen für verschiednen Golgi Marker durchgeführt (Abbildung 41).

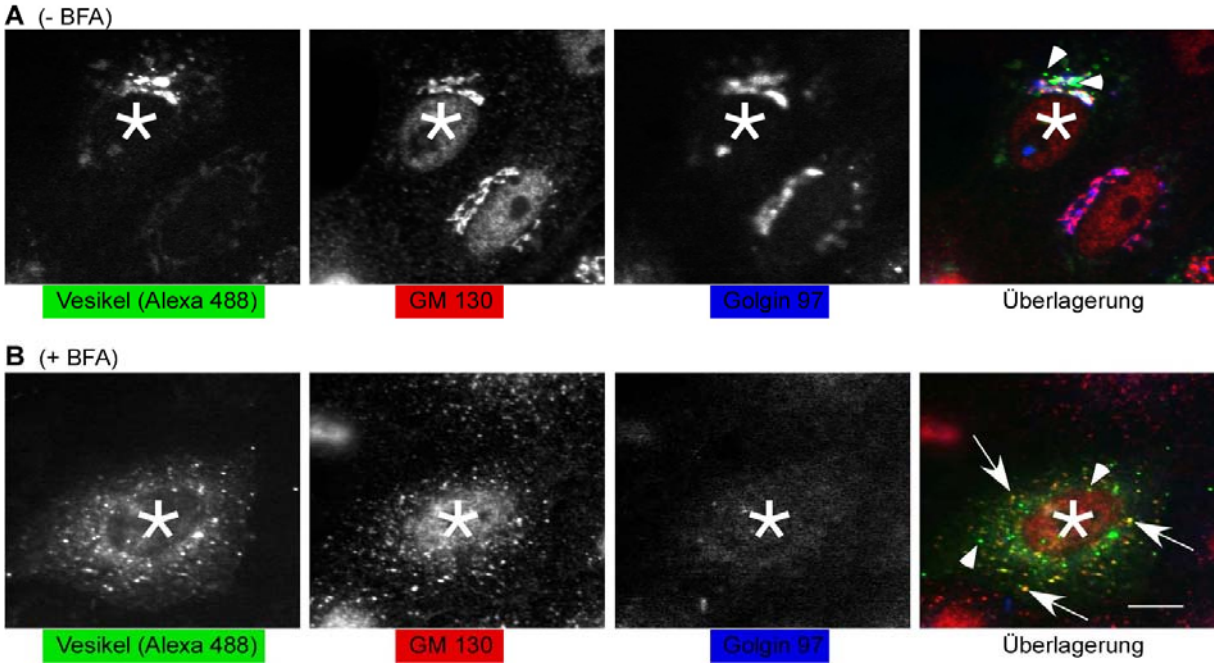


Abbildung 41: Epifluoreszenz Mikroskopie Aufnahmen von mikroinjizierten BSC-1 Zellen (mit einem Stern markiert) vor (A) und nach (B) Behandlung mit 5 µg/ml BFA. Die Zellen wurden anschließend für den frühen Golgi Marker GM130 (rot) sowie dem späten Golgi Marker Golgin 97 (blau) gefärbt. Inaktive Vesikelcluster sind mit einer Pfeilspitze markiert.

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, kolokalisierten die mikroinjizierten Vesikel sowohl mit dem frühen Golgi Marker GM130 als auch mit dem späten Golgi Marker Golgin 97. Nach Inkubation der Zellen mit 5 µg/ml BFA zerfiel der Golgi, wobei das Golgi Matrix Protein GM130 in kleineren Golgi Fragmenten lokalisierte, der späte Golgi Marker Golgin 97 hingegen in das ER umlagerte. Die Alexa-488 Signale konnten nach BFA Behandlung zum Teil in ER Strukturen wieder gefunden werden, andere jedoch kolokalisierten weiterhin mit GM130 in den Golgi Matrix Fragmenten (Pfeile in Abbildung 41B). Diese Beobachtung zeigte, dass einige von den

mikroinjizierten Vesikeln stammende Proteine sich wie Golgi Matrix Proteine verhielten, wobei andere wie Golgi residente Enzyme reagierten. Die Tatsachen, dass Vesikelproteine sich nach BFA Behandlung wie endogene Proteine verhielten, unterstrich zusätzlich, dass die Vesikel mit der Golgi Membran fusionierten.

Trotz der signifikanten Golgi Färbung durch Vesikelproteine und der Beobachtung, dass sich diese Protein wie endogene Golgi Proteine verhielten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Vesikel mit dem ER fusionierten, und die markierten exogenen Proteine anschließend mit Hilfe der COPII Maschinerie zum Golgi transportiert wurden. Daher sollte untersucht werden, ob die mikroinjizierten COPI-Vesikel direkt mit dem Golgi fusionierten oder ausschließlich mit dem ER. Dazu wurde vor Injektion der Vesikel die dominant negative Mutante von Sar1 (Sar1dn) in die Zellen mikroinjiziert. Dies bewirkt einen vollständigen Block des COPII-abhängigen Transports vom ER zum Golgi (Aridor et al., 1995).

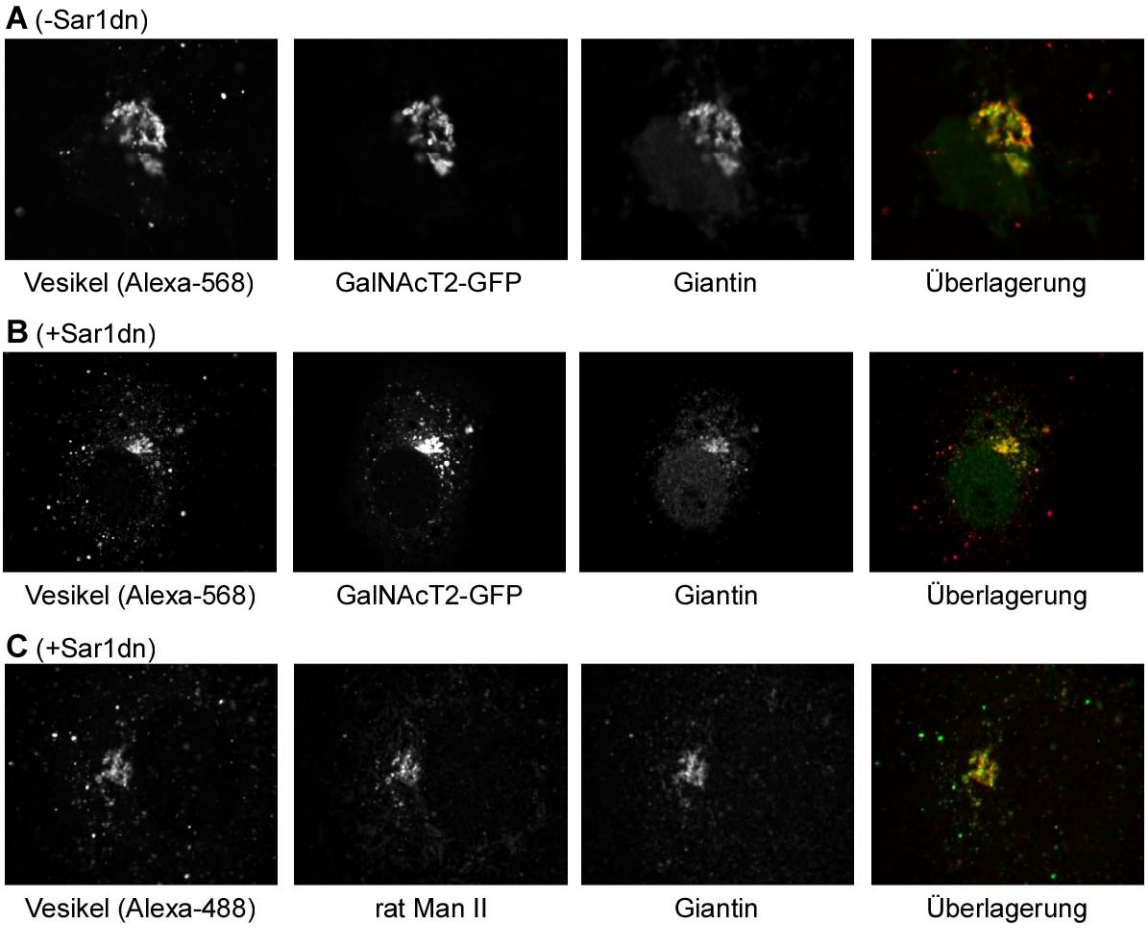


Abbildung 42: Vesikelinjektion in Abwesenheit (A) bzw. Anwesenheit (B und C) von Sar1dn. In Bild A und B wurden jeweils rote (Alexa-568) Vesikel in YT2 Zellen mikroinjiziert. In Bild C grüne (Alexa-488) Vesikel in Wildtyp BSC-1 Zellen. Die Kolokalisierung der Alexa Farbstoffe mit den Giantin Strukturen ist jeweils in den Überlagerungen gezeigt. In A und B sind die Vesikel in rot und Giantin in grün gezeigt, in C hingegen die Vesikel in grün und Giantin in rot.

Wie in Abbildung 42 zu erkennen ist, kolokalisierten die Alexa Signale auch in Anwesenheit von Sar1dn noch mit dem Golgi Marker Giantin, wodurch deutlich wird, dass die mikroinjizierten Vesikel direkt mit dem Golgi fusionieren können. Kürzlich wurde die Existenz von unterschiedlichen COPI-Vesikel gezeigt, von denen einige α-Mannosidase II enthielten, andere jedoch nicht (Malsam et al., 2005). Das auch die exogene Ratten α-Mannosidase II in Anwesenheit von Sar1dn im Golgi lokalisiert (Abbildung 42C), verdeutlich, dass insbesondere die α-Mannosidase II-haltigen Vesikel direkt mit dem Golgi fusionieren.

2.2 Mikroinjektion permanent bedeckter Vesikel

Aufgrund der relativ geringen intrinsischen Aktivität von ARF1 verlieren nur wenige Vesikel ihre Hülle und der Großteil der mikroinjizierten Vesikel ist noch bedeckt. Die im Cytosol vorhandenen ARF-GAPs aktivieren jedoch ARF1, so dass es rasch zur Ablösung von ARF1 und Coatomer kommt. Dies ist notwendig, damit die Vesikel mit ihrer Zielmembran fusionieren können. Es ist jedoch nicht bekannt, ob bedeckte Vesikel bereits durch Bindung über entsprechende Tether Paare an die Membran rekrutiert werden können. Die ARF Mutante ARFQ71L ist selbst in Anwesenheit der ARF-GAPs nicht mehr in der Lage GTP zu hydrolisieren. Um zu untersuchen, ob die Ablösung der Hüllproteine für die Rekrutierung und Bindung von Vesikeln an die Membran erforderlich ist, wurde daher diese Mutante ARFQ71L eingesetzt, um permanent umhüllte Vesikel zu generieren.

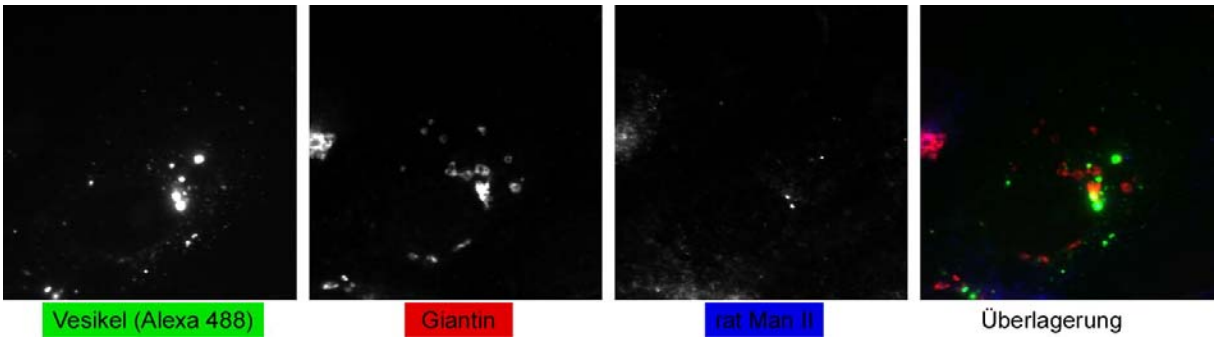


Abbildung 43: Epifluoreszenz Aufnahme von BSC-1 Zellen nach Mikroinjektion von ARFQ71L-Vesikel.

Analog zu den vorherigen Experimenten wurden die Zellen nach Mikroinjektion für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend der endogene Golgi

Marker Giantin sowie die exogene Ratten α-Mannosidase II mittels Immunfluoreszenz angefärbt.

Trotz Injektion unter Verwendung verschiedener Parameter konnte keine Kolokalisierung der Alexa Signale mit dem endogenen Golgi Marker Giantin beobachtet werden. Bei genauer Betrachtung von Abbildung 43 wurde deutlich, dass es sich bei den hellen Alexa-488 Strukturen eher um inaktive Vesikelcluster, als um mit dem Golgi fusionierte Vesikel handelte. Der Großteil dieser Alexa-488 Strukturen kolokalisierte nicht mit den Golgi Strukturen. Aufgrund dieses Befundes liegt die Vermutung nahe, dass COPI-Vesikel ihre Hüllproteine verlieren müssen, damit sie an die Zielmembran binden können. Jedoch wurde auch bei Injektion von Vesikeln hergestellt mit Wildtyp ARF1 teilweise nur helle Cluster und keine echte Kolokalisierung mit dem Golgi beobachtet. Daher ist nicht ausgeschlossen, dass zu wenige aktive ARFQ71L Vesikel injiziert wurden, um eine signifikante Golgi-Färbung zu erhalten.

2.3 Beteiligung von Mikrotubuli am Vesikeltransport

Da COP I Vesikel den Transport zwischen verschiedenen Golgi Zisternen sowie in retrograder Richtung zurück zum ER vermitteln, könnten sie teilweise über größere Strecken wandern. Ob sie dabei frei ohne an die Donor oder Zielmembran gebunden vorkommen und wie sie längere Distanzen zurücklegen, ist nicht genau bekannt. Kinesin 2, einem Motor Protein, welches zum Plus-Ende von Mikrotubuli wandert, wurde z.B. eine Funktion im retrograden Transport von COPI-Vesikeln zugeschrieben (Stauber et al., 2006). In den beschriebenen Experimenten wurden die fluoreszierenden Vesikel in die Peripherie der Zellen mikroinjiziert und verteilen sich dadurch zuerst im Cytosol. Innerhalb von 30 min waren sie jedoch in der Lage zum Golgi zu gelangen und zu fusionieren.

In weiteren Experimenten sollte daher untersucht werden, ob COPI-Vesikel entlang von Mikrotubuli transportiert werden müssen, um zur Golgimembran zu gelangen. Dazu wurden die Zellen vor der Vesikelinjektion für 30 min mit 0,2 µg/ml Nocodazol inkubiert, wodurch die Mikrotubuli depolymerisiert wurden. Die Mikroinjektion sowie die anschließende Inkubation wurden ebenfalls in Anwesenheit von Nocodazol durchgeführt.

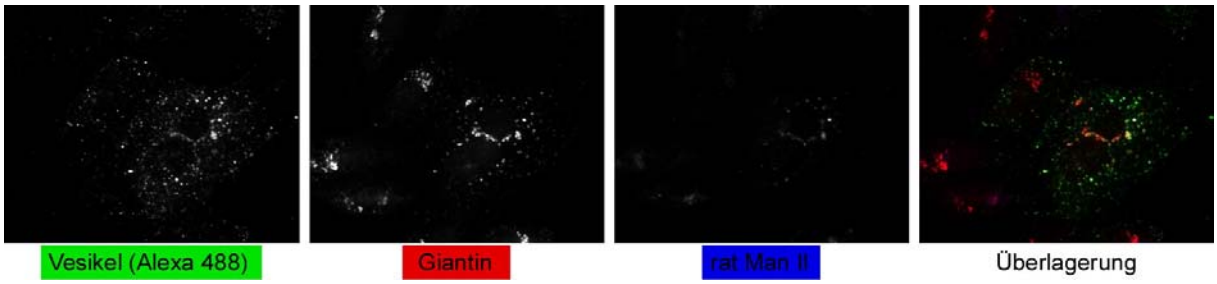


Abbildung 44: Epifluoreszenz Aufnahme einer BSC-1 Zellen mikroinjiziert mit Alexa-488 Vesikel in Gegenwart von 0,2 µg/ml Nocodazol. Helle Alexa-488 Strukturen, die nicht mit dem Golgi Marker Giantin kolokalisieren, stellen inaktive Vesikelcluster dar.

Durch Behandlung der Zellen mit Nocodazol zerfällt der Golgi Apparat in kleinere Fragmente. 30 min nach Mikroinjektion von fluoreszierenden Vesikeln kolokalisierten die Alexa-Signal mit dem endogenen Golgi Marker Giantin. Auch die exogene Ratten α-Mannosidase II konnte in diesen Golgi Fragmenten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass COPI-Vesikel, welche frei im Cytosol vorliegen, unabhängig von Mikrotubuli innerhalb von 30 min durch Diffusion zum Golgi gelangen und mit ihm fusionieren können.

Zusammenfassend wurde ein System entwickelt, mit dessen Hilfe fluoreszenzmarkierte COPI-Vesikel in Säugetierzellen mikroinjiziert werden können, wodurch anschließend ihr dynamisches Verhalten in vivo untersucht werden kann. Vesikel, die α-Mannosidase II sowie weiter markierte Proteine enthielten, fusionierten innerhalb von 30 min direkt mit dem Golgi, auch wenn der COPII-abhängige ER-Golgi Transport durch Sar1dn blockiert wurde. Die exogenen, markierten Vesikelproteine verhielten sich nach BFA Behandlung wie endogene Proteine. Die Vesikel gelangten dabei durch Diffusion zum Golgi Apparat und zwar unabhängig vom aktiven Transport entlang von Mikrotubuli.

IV. Diskussion

A Das dynamische Verhalten der p24-Proteine *in vivo*

Die p24-Proteine treten konserviert in allen Eukaryonten von Hefe bis Säugetieren auf und stellen mit einer Masse von ca. 25 kDa eine Familie integraler Typ-I Transmembranproteine dar. Sie liegen in den Organellen des frühen sekretorischen Transportwegs in hohen Konzentrationen vor und können aufgrund ihrer Sequenzhomologie in vier verschiedene Unterklassen eingeteilt werden, die je nach Spezies unterschiedlich viele Vertreter umfassen (Carney and Bowen, 2004; Dominguez et al., 1998). Trotz einer Vielzahl an Untersuchungen sind ihre physiologische Funktion und ihr Verhalten nicht vollständig verstanden, so dass ihre Rolle im vesikulären Transport zwischen Golgi und ER kontrovers diskutiert wird (Carney and Bowen, 2004; Kaiser, 2000). Ähnlich wie der KDEL-Rezeptor Erd2 oder das Lektin ERGIC-53, zyklisieren sie zwischen den Organellen des frühen sekretorischen Transportwegs, wobei ihr Transport aneinander gekoppelt ist (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Fullekrug et al., 1999; Jenne et al., 2002). Das relative Expressionsniveau ist für die korrekte Lokalisation und Funktion der einzelnen Vertreter von Bedeutung. Diese Befunde, zusammen mit biochemischen Studien, wiesen auf die Ausbildung verschiedener Heterooligomere zwischen den p24-Proteinen hin, die je nach Vertreter und Kompartiment variieren können (Fullekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999; Jenne et al., 2002). Durch Untersuchungen der molekularen Mechanismen der COPI-Vesikelbiogenese konnte dem oligomeren Zustand der p24-Proteine eine entscheidende Funktion zugeschrieben werden. Es zeigte sich, dass die p24-Proteine nur in ihrer homodimeren Form, nicht jedoch in ihrer monomeren Form in der Lage sind, ARF1 und Coatomer an die Golgimembran zu binden (Anderl, persönliche Mitteilung; Bethune et al., 2006a; Gommel et al., 2001; Heiss, 2004; Reinhard et al., 1999). Somit stellen Homodimere im Bezug auf die COPI-Vesikelbiogenese eine aktive Form der p24-Proteine dar. Auch eine Interaktion der p24-Proteine mit Komponenten der COPII-Hülle wurde beschrieben, wobei nicht bekannt ist, in welchem oligomeren Zustand der p24-Proteine diese Bindung erfolgt (Belden and Barlowe, 1996; Belden

and Barlowe, 2001; Dominguez et al., 1998). Bisher wurde ausschließlich die Bildung von Heterooligomeren durch *in vitro* Experimente wie Gelfiltration oder Koimmunopräzipitation nachgewiesen. Lediglich die Existenz des Heterooligomers aus p23 und p24 wurde auch *in vivo* mittels FRET-Messungen gezeigt (Majoul et al., 2001). Die biochemischen Untersuchungen zur Interaktion zwischen den p24-Proteinen und ARF1 sowie Coatomer erfolgt jedoch unter Verwendung von Homodimeren.

Um die Rolle der p24-Proteine in der COPI-Vesikelbiogenese und ihr Verhalten während des Zyklisieren zwischen ER und Golgi besser verstehen zu können, wurde in der vorliegende Arbeit die Bildung und Existenz von Homooligomeren *in vivo* mit Hilfe von FRET-Messungen untersucht. Die Technik des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers wurde gewählt, da sie als einzige Methode die Möglichkeit bietet, Proteininteraktionen *in vivo* in ihren physiologischen Lokalisierungen zu untersuchen. Die beiden GFP-Mutanten ECFP und EYFP stellen dabei das am häufigsten verwendete FRET-Paar dar, und wurden daher auch hier eingesetzt. Sie wurden über einen 12 Aminosäuren langen Linker an die N-Termini der p24-Proteine angehängt. Unter Annahme, dass die fluoreszierende Protein dadurch in alle Raumrichtungen frei beweglich sind, besitzt dieses FRET-Paar einen Förster Radius von 49-52 Å (Tsien, 1998). GFPs kristallisieren antiparallel als Dimer und der Abstand der beiden Chromophore in solch einem Dimer beträgt 25 Å (Tsien, 1998). Aufgrund der flexiblen Linker zwischen den p24-Proteinen und den fluoreszierenden Proteinen und der dadurch bedingten freien Beweglichkeit, kann jedoch im zeitlichen Mittel ein größerer Abstand zwischen den beiden Chromophoren bei einer Interaktion der p24-Proteine angenommen werden. In den hier durchgeführten Experimenten lag das Verhältnis von endogenem zu markiertem, exogenem Protein bei ca. 1:1 bis 1:2 (Abbildung 11). Ein mit CFP markiertes p24-Protein hat somit die Möglichkeit, mit einem CFP-, einem YFP-, oder einem nicht-markierten p24-Protein zu interagieren. Zur Ermittlung der FRET-Effizienz mit Hilfe der Akzeptor-Photobleich-Methode wird ausschließlich die Änderung der CFP-Fluoreszenz gemessen. Diese Änderung ist dann maximal, wenn möglichst alle CFP-markierten p24-Proteine mit YFP-markierten interagieren. Daher wurde zur Transfektion der Vero-Zellen ein Überschuss an YFP gegenüber CFP kodierenden Plasmiden eingesetzt. Die so ermittelte FRET-Effizienz ist normiert auf die Maximalintensität von CFP und abhängig vom dem Anteil an CFP-markierten p24-

Proteinen die mit YFP-markierten interagieren (Wouters et al., 2001). Aufgrund der Mischung aus markierten und nicht markierten Proteinen war dieser Anteil jedoch nicht bekannt. Somit konnte nur eine qualitative Aussage über eine Interaktion getroffen werden, nicht jedoch ein quantitative Bestimmung des Ausmaßes der Wechselwirkung. Dies verhinderte weiterhin die Bestimmung des Abstandes zwischen beiden Chromophoren. Bei gleich bleibenden Expressionsverhältnissen war jedoch die Bestimmung einer Änderung im Grad der Oligomerisierung eines p24-Paars möglich.

1 Einige p24-Proteine bilden Homodimere im Golgi-Apparat

Durch Koimmunopräzipitationsexperimente wurde in vorangegangenen Studien die Bildung von p24-Heterooligomeren im Golgi Apparat beschrieben. So koimmunopräzipitierte ein für p27 spezifischer Antikörper ebenfalls p23, p24 und p25, ein Antikörper gegen p24 ebenfalls p23 und p25 (Fullekrug et al., 1999; Jenne et al., 2002). Die Größe dieser Komplexe wurde mit Hilfe von Gelfiltration untersucht, wobei je nach Durchführung unterschiedliche Daten erhalten wurden. Unter Verwendung von Octylglucosid als Detergens, sowie Eichung der Gelfiltrationssäule mit Membranproteinen anstelle von löslichen Proteinen, wurden Dimere als größte Aggregate identifiziert (Jenne et al., 2002). Dabei lagen p23, p24, p25 und p27 sowohl als Monomer, als auch als Dimer vor, lediglich p26 wurde ausschließlich in monomerer Form identifiziert. Es ist jedoch weder bekannt, zu welchen Ausmaßen die einzelnen Vertreter in den beobachteten Kombinationen interagieren, noch ob sie ebenfalls als Homooligomere auftreten. Die Existenz des Heterodimers aus p23 und p24 konnte zusätzlich *in vivo* mit Hilfe von FRET-Messungen nachgewiesen werden (Majoul et al., 2001). Analog dazu wurde in der hier vorliegenden Studie die Bildung von Homooligomeren im Golgi-Apparat durch FRET-Messungen untersucht. Die erhaltenen Daten zeigten dabei Parallelen zu den Ergebnissen der Gelfiltrationsstudien *in vitro* auf. So bilden p23, p24 und p25 mit FRET-Effizienzen zwischen 25-30 % in signifikanten Maßen Homodimere *in vivo* im Golgi-Apparat (Abbildung 12). In Akzeptor-Photobleich-Messungen unter Verwendung eines FRET-Kontroll-Konstrukts wurden Effizienzen von 30-50 % bestimmt (nicht gezeigt), wodurch diese Signifikanz weiter unterstrichen wird. Dieses Kontroll-Konstrukt

besteht aus einem CFP welches über 12 Aminosäure direkt mit YFP verbunden ist und somit eine maximale Energieübertragung gewährleistet. Durch Kompetitionsexperimente unter Verwendung von myc-markiertem p23 und p24 konnte die Spezifität der Dimerbildung untermauert werden (Abbildung 13 und 21). Es ist daher auszuschließen, dass die beobachteten FRET-Signale durch zu starke Überexpression der p24-Fusionskonstrukte hervorgerufen wurde. Im Gegensatz zu p23, p24 und p25 konnte für p26 kein FRET-Signal gemessen werden. Es bildet somit keine Homodimere *in vivo*, was mit den in Gelfiltrationsstudien beobachteten Ergebnissen übereinstimmt. Da die Überexpressionsrate für alle p24-Proteine gleich war (Abbildung 11), unterstreichen die Daten für p26 zusätzlich die Spezifität der gemessenen Interaktionen von p23, p24 und p25. Die FRET-Effizienz von p27 war mit 15,1 % relativ gering, jedoch signifikant über der von p26. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass p27 nur zu geringen Maßen Homodimere bildet. Dies ist ebenfalls im Einklang mit den *in vitro* Beobachtungen durch Gelfiltration (Jenne et al., 2002). Es bildet somit jeweils ein Vertreter der vier verschiedenen p24-Untergruppen Homodimere *in vivo* im Golgi Apparat.

In ELISA-basierten Bindungsstudien zwischen der γ-COP Untereinheit und Homodimeren der p24-Proteinen wurden für alle Vertreter eine Bindungskonstante von ca. 10 µM ermittelt (Bethune et al., 2006a). Obwohl p26 kein FRET-Signal aufweist, bindet sein cytoplasmatischer Schweif offensichtlich als Dimer mit gleicher Affinität an Coatomer wie p23, p24, p25 und p27. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass in den durchgeführten ELISA-Studien die cytoplasmatischen Schweife von p26 durch Disulfidbindungen in einer dimeren Form fixiert wurden (Bethune et al., 2006a), die so *in vivo* nicht vorliegt. p26 zyklisiert jedoch wie alle p24-Proteine zwischen ER und Golgi (Emery et al., 2000) und muss somit in COPI-Vesikel aufgenommen werden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass p26 während der Vesikelbiogenese für kurze Zeit Dimere bildet, die dann analog zu den anderen Vertretern über Bindung an Coatomer in die Vesikel aufgenommen werden. p25 weist als einziger Vertreter eine klassische KKXX-Sequenz auf. Wird diese mutiert, wird nicht nur p25, sondern zum Teil auch p23 und p26 zur Plasmamembran und Endosomen transportiert (Emery et al., 2003). p25 kann mit seiner klassischen KKXX-Sequenz zusätzlich zu γ-COP auch als Monomer an α- oder β´-COP, oder als Dimer an α- und β´-COP simultan binden (Bethune et al., 2006a). Die Bindung zu α- und β´-COP als Dimer ist dabei mit einer

Bindungskonstante von 0.35 µM wesentlich stärker als die Bindung zu γ-COP. Da p25 im Golgi-Apparat im beträchtlichen Ausmaß Homodimere bildet, wäre ein möglicher Mechanismus zur Aufnahme von monomeren p26 in COPI-Vesikel die Dimerisierung mit p25, welche wiederum an α- oder β´-COP. Diese Interaktion kann jedoch ebenfalls nur transient auftreten, da weder in Koimmunopräzipitations-, noch in Gelfiltrationsstudien Heterooligomere für p26 beschrieben wurden (Fullekrug et al., 1999; Jenne et al., 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete ausgeprägte Bildung von p23- und p24-Homodimeren im Golgi-Apparat *in vivo* unterstreicht ihre Sonderstellung gegenüber den anderen Vertretern. Sie sind als Einzige in der Lage, nach Bindung an die *γ-trunk*-Domäne eine Konformationsänderung zu induzieren, die zur Aggregation von Coatomer führt (Bethune, 2006; Langer et al., submitted; Reinhard et al., 1999). Drüber hinaus rekrutieren sie ausschließlich als Dimere ARF1 in seiner löslichen GDP-Form an die Golgi-Membran (Anderl, persönliche Mitteilung; Gommel et al., 2001; Heiss, 2004). Die Bildung von Dimeren im Golgi-Apparat stellt somit eine Basis für die erfolgreiche Rekrutierung und Bindung von ARF1 und Coatomer dar. Sie kann jedoch nicht die Entstehung von COPI-Vesikel erklären, die keine p24-Proteine enthalten (Malsam et al., 2005).

2 p24-Homodimere dissoziieren im ER

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die p24-Proteine zwischen den Organellen des frühen sekretorischen Transportwegs zyklisieren (Blum et al., 1999; Emery et al., 2000; Fullekrug et al., 1999; Jenne et al., 2002). Ihr Transport wird dabei über COPI- und COPII-Vesikel vermittelt. Wird z.B. die COPII-Vesikelbiogenese durch Mikroinjektion einer dominant negativen Mutante von Sar1p (Sar1H79G) blockiert, so relokalisieren die p24-Proteine in das ER (Emig, 2001). Neben der Bindung von ARF1 und Coatomer wurden für p24-Proteine auch Interaktionen mit Komponenten der COPII-Hülle beschrieben. Demnach binden alle p24-Proteine die Sec23 Untereinheit der inneren COPII-Hülle, wobei diese Bindung von dem Di-Phenylalanin-Motiv FF der cytoplasmatischen Schweife abhängig ist (Dominguez et al., 1998). Zusätzlich wurde eine Bindung von p23 und p24 zum Sec13/31 Komplex, der äußeren Hülle von COPII, sowie von p24 zu Sar1p berichtet

(Belden and Barlowe, 2001). Die Bindungen waren mit Dissoziationskonstanten von K_D= 120-600 µM jedoch relativ schwach. Ob die Bindung der p24-Proteine zu den Komponenten der COPII-Hülle eine Dimerisierung erfordert, ist nicht bekannt. Es stellte sich nun die Frage, wie eine selektive Bindung von COPI-Komponenten an der Golgi-Membran, bzw. COPII-Komponenten an der ER-Membran, durch die p24-Proteine gewährleistet wird. Eine Schlüsselfunktion kann hier dem oligomeren Zustand der p24-Proteine zukommen.

Um den oligomeren Zustand der p24-Proteine *in vivo* im ER zu untersuchen, wurden ebenfalls FRET-Messungen durchgeführt. Bei Expressionsraten, wie sie zur Messung im Golgi verwendet wurden, sind die Signalintensitäten im ER jedoch zu gering, um verlässliche Daten zu erhalten. Demgegenüber akkumulieren bei stärkerer Überexpression die p24-Proteine im ER (Emery et al., 2000; Fullekrug et al., 1999), wodurch für FRET-Messungen ausreichende Intensitäten erhalten wurden. 24 Stunden nach der Elektroporation begannen die p24-Proteine in einigen Zellen im ER zu akkumulieren, wohingegen der Großteil der Zellen noch eine normal Golgi-Lokalisierung aufwies (Abbildung 14). Interessanterweise konnten weder für p23, noch für p24 oder p25 FRET-Signale in diesen ER-Strukturen beobachtet werden (Abbildung 16). Zellen mit Golgi-Lokalisierung wiesen jedoch auch nach 24 Stunden noch die oben beschriebenen FRET-Effizienzen auf. Eine unvollständige Faltung der Proteine kann aufgrund der Überprüfung der spektralen Signatur von CFP und YFP ausgeschlossen werden (Abbildung 15). Diese Proteine erhalten ihre fluoreszierende Eigenschaft erst nach korrekter Faltung und Oxidation der am Chromophor beteiligten Aminosäuren (Tsien, 1998). Die spektrale Verschiebung von YFP gegenüber GFP wird hauptsächlich durch π-π-Wechselwirkungen eines zusätzlichen Phenolatrings in Position 203 hervorgerufen (T203Y) und ist somit besonders von der korrekten Struktur des Proteins abhängig (Tsien, 1998). Diese Beobachtung belegt somit, dass p23, p24 und p25 im Gegensatz zum Golgi im ER keine Homodimere bilden. Durch Gelfiltration wurde für p23 jedoch ein hauptsächlich dimerer Charakter im ER beschrieben (Jenne et al., 2002), wobei nicht zwischen Hetero- und Homodimeren unterschieden werden konnte. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnen *in vivo* Daten kann es sich dabei nicht um p23-Homodimere handeln. Es zeigte sich jedoch, dass auch das Heterodimer aus p23 und p24, welches im Golgi *in vivo* interagiert (Majoul et al., 2001), im ER ebenfalls keine FRET-Signale aufweist (Abbildung 16). Dies ist in Übereinstimmung mit Koimmunopräzipitations-

experimenten aus aufgereinigten ER-Membranen (Jenne et al., 2002). Da auch p27 eine verringerte Interaktion mit p23 im ER zeigt (Jenne et al., 2002), kommen als Interaktionspartner für p23 im ER nur p25 oder p26 in Frage. Auch für p24 und p25 wurde die Bildung von Dimeren im ER beschrieben (Jenne et al., 2002), bei denen es sich aufgrund der hier gewonnen *in vivo* Daten jedoch nicht um Homodimere handeln kann.

Die FRET-Messungen im ER konnten nur aufgrund höherer Überexpression durchgeführt werden. Der Befund, dass p23, p24 und p25 im ER keine FRET-Signale aufweisen, belegt somit zusätzlich, dass die gemessenen FRET-Effizienzen im Golgi durch eine Interaktion der p24-Proteine hervorgerufen werden, nicht jedoch durch starke Überexpression.

Wie bereits erwähnt, nehmen p23 und p24 eine Sonderstellung ein, da sie zum einen sowohl als Homodimere, als auch als p23/p24 Heterodimer ARF1-GDP binden (Gommel et al., 2001; Heiss, 2004) und zum anderen die einzigen p24-Proteine sind, die als Dimere ein Konformationsänderung und somit Aggregation von Coatomer induzieren können (Bethune et al., 2006a; Langer et al., submitted; Reinhard et al., 1999). Der Befund, dass sie nur im Golgi, nicht jedoch im ER als Homodimere bzw. p23/p24 Heterodimere vorliegen, würde somit erklären, warum sie ARF1 und Coatomer exklusiv an die Golgi-Membran binden.

Inwieweit die Bindung von COPII-Komponenten durch die p24-Proteine die Ausbildung spezieller Oligomere erfordert, ist nicht bekannt. Die Bindung zu COPII ist dabei, analog zur Bindung an COPI, von den Di-Phenylalanin-Motiv FF der p24-Schweife abhängig (Belden and Barlowe, 2001; Dominguez et al., 1998). Es kann somit vermutet werden, dass die Bindung zu COPII durch Monomere oder Heterooligomere erfolgt, die COPI nur schlecht oder gar nicht binden und nur im ER, nicht aber im Golgi vorkommen.

3 Der Effekt von ARF1 auf den oligomeren Zustand von p23 und p24

Ähnlich wie für die p24-Proteine wurde auch für andere zyklisierende Proteine eine Dimerisierung im Golgi beschrieben. So bildet das Lektin ERGIC-53 *in vivo* Oligomere (Schweizer et al., 1988) und bindet wie die p24-Proteine ausschließlich in

dimerer Form an die beiden γ-COP Domänen (Bethune et al., 2006a). Auch der KDEL-Rezeptor Erd2 bildet Oligomere im Golgi-Apparat (Aoe et al., 1997). Durch FRET-Messungen konnte weiter gezeigt werden, dass bei verstärktem retrogradem Transport von Cholera-Toxin, welches eine KDEL-Sequenz trägt, die Oligomerisierung von Erd2 noch verstärkt wird (Majoul et al., 2001). Demnach kann die Bindung eines Frachtproteins an seinen Transportrezeptor dessen Oligomerisierung induzieren. In diesen Studien hatte der verstärkte retrograde COPI-Transport durch Cholera-Toxin jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen p23 und p24.

Aufgrund der Bindung von p24-Dimeren an ARF1 und Coatomer sowie der ermittelten 4:1 Stöchiometrie von p23 zu Coatomer (Reinhard et al., 1999), wurde ein Einfluss von ARF1 auf den oligomeren Charakter der p24-Proteine postuliert (Nickel et al., 2002). Demnach führt der Zyklus von ARF1 zwischen seiner GDP und GTP Form zur Ausbildung von p24-Heterooligomeren, die anschließend Coatomer rekrutieren. Dies wurde in dieser Arbeit durch FRET-Messungen zwischen p23-YFP und p24-CFP vor und nach Behandlung der Zellen mit AlF_4^- oder BFA untersucht. Dabei wird ARF1 in seiner aktiven GTP- (AlF_4^-), bzw. inaktiven GDP- (BFA) Struktur fixiert. Es konnte jedoch keine signifikante Änderung der FRET-Effizienz beobachtet werden (Abbildung 17 und 20), sodass ein Einfluss von ARF1 auf den oligomeren Zustand von p23 und p24 unwahrscheinlich ist. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die p24-Proteine durch Bildung von Dimeren die Rekrutierung von ARF1 an die Golgimembran regulieren und somit eine Vesikelbildung initiieren. Interessanterweise werden p23 und p24 jedoch nach Mikroinjektion von Sar1H79G unterschiedlich schnell zum ER zurück transportiert (Emig, 2001). Dies erklärt auf der einen Seite die unterschiedlichen FRET-Verhalten von p23/p24-Heterodimeren im Golgi und im ER, wirft auf der anderen Seite aber die Frage auf, zu welchem Zeitpunkt des Rücktransports die Dimeren dissoziieren. Es ist somit weiterhin unklar, wie die Dimerisierung der p24-Proteine reguliert wird. Einen möglichen Einfluss auf die Dimerisierung der p24-Proteine, aber auch anderer zyklisierender Proteine wie Erd2 oder ERGIC-53, könnten die unterschiedliche pH-Werte in ER und Golgi ausüben. So wird für das ER ein pH-Wert von 7,2±0,2 und für den Golgi von 6,4±0,3 angenommen (Wu et al., 2000).

4 Modell zur Zyklisierung der p24-Proteine

Auf Basis der in dieser Arbeit gewonnen *in vivo* Daten lässt sich ein Modell entwickeln, dass die Zyklisierung der p24-Proteine zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER beschreibt (Abbildung 45).

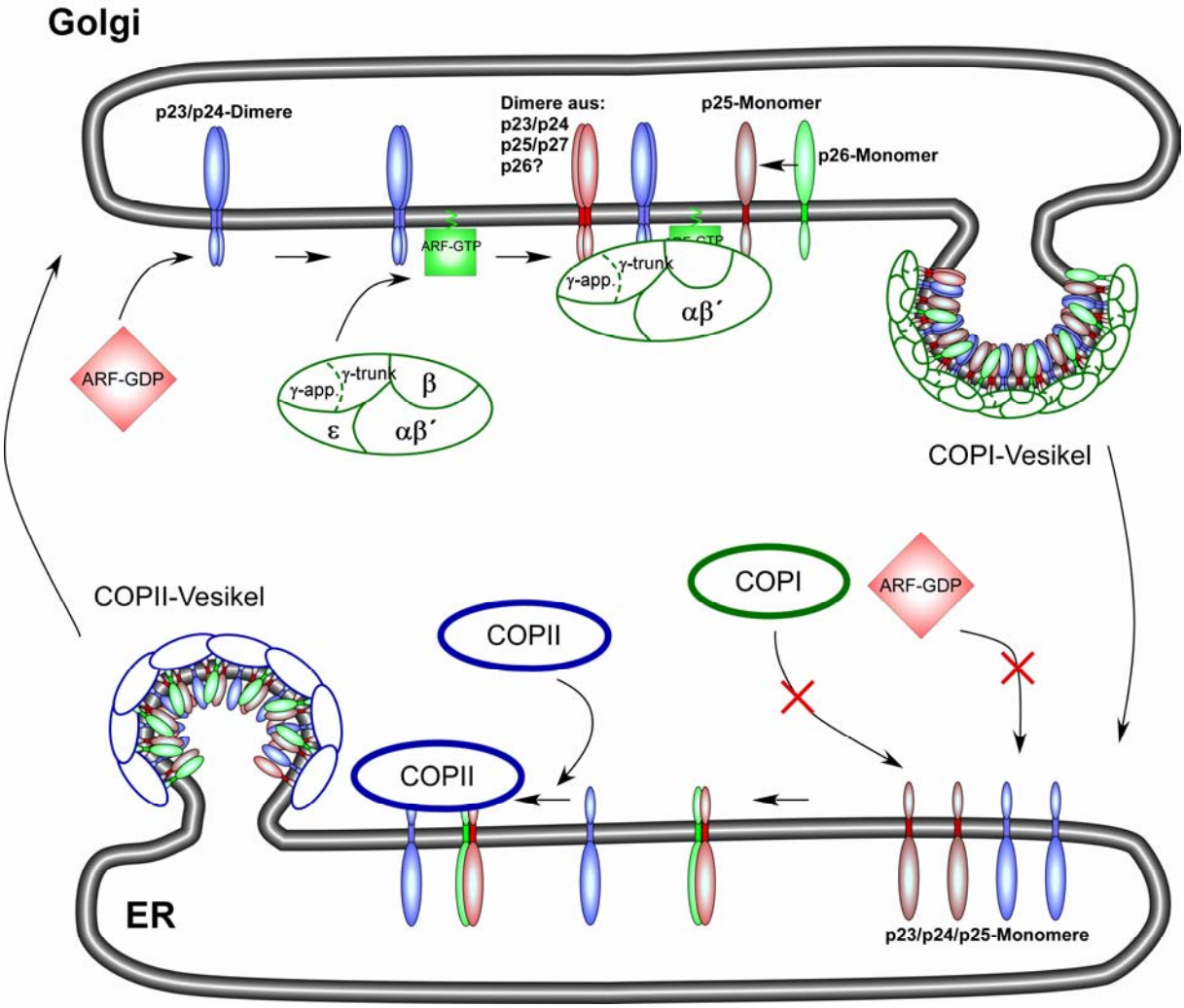


Abbildung 45: Modell zur Zyklisierung der p24-Proteine zwischen Golgi und ER. Erklärung siehe Text.

p23 und p24 bilden im Golgi sowohl Homo- als auch Heterodimere. Diese sind in der Lage, ARF1 und Coatomer an die Membran zu rekrutieren und eine Konformationsänderung in Coatomer zu induzieren. Wird die Bindung von Coatomer durch weitere Dimere stabilisiert (Bethune et al., 2006), kommt es zur Ausbildung einer Hüllschicht. p25-Homodimere binden aufgrund der höheren Affinität zu α- und β´-COP (Bethune et al., 2006a) wahrscheinlich an diese, p27-Homodimere möglicherweise an die *appendage*-Domäne von γ-COP, da die *trunk*-Domäne bereits

durch p23 und/oder p24 belegt ist. Die Aufnahme von p26 in das Vesikel erfolgt entweder als transiente Dimere, die ebenfalls an γ-COP binden, durch Wechselwirkung mit p25, oder unsignalisiert, da p26 die höchste Konzentration der p24-Proteine im Golgi aufweist (Jenne et al., 2002). Die einzelnen p24-Proteine werden nun mittels COPI-Vesikel zum ER transportiert. Dort dissoziieren die Homodimere aus p23, p24 und p25, sowie p23/p24-Heterodimere. Inwieweit diese nun als Monomere vorliegen oder mit anderen Vertretern Heterodimere bilden, muss noch näher untersucht werden. Entscheidend ist jedoch, dass ARF1 nun nicht mehr durch p23 und p24 Homo- bzw. Heterodimere rekrutiert werden kann. Da dies die Vorraussetzung für die Bindung von Coatomer ist (Palmer et al., 1993), kann auch Coatomer nicht an die ER-Membran rekrutiert werden. Der Transport der p24-Proteine zurück zum Golgi erfolgt über Interaktion mit Komponenten der COPII-Hülle. In welchen oligomeren Zustand diese Interaktion erfolgt, ist noch unklar. Es können jedoch Homodimere aus p23, p24 und p25, sowie p23/p24 Heterodimere ausgeschlossen werden. Bei den Untersuchungen zur Interaktionen mit COPII wurden die einzelnen Vertreter jeweils exklusiv betrachtet (Belden and Barlowe, 2001; Dominguez et al., 1998). Da die untersuchten Bindungen jedoch relativ schwach waren (K_D=120-600 µM) ist es denkbar, dass der Transport zum Golgi über bestimmte Heterooligomere erfolgt.

Dieses Modell würde die exklusive Bindung von COPI-Komponenten an die Golgimembran, sowie von COPII-Komponenten an die ER-Membran durch p24-Proteine erklären. Es ist jedoch, gerade im Hinblick auf die Bildung und Funktion von Heterooligomeren, sowie die Interaktion mit den COPII-Komponenten, spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen.

B Generierung induzierbarer p24-Zelllinien

Die beschriebene Akkumulierung der p24-Proteine bei starker Überexpression machte bislang die Generierung stabil exprimierender Zelllinien unmöglich. In der vorliegenden Arbeit gelang es nun, unter Verwendung der Tet-On Systems (Urlinger et al., 2000), monoklonale CHO-Zelllinien zu generieren, die stabil mit CFP und YFP markierte p23- oder p24-Fusionsproteine exprimierten. Die Expression konnte sowohl zeitlich, als auch mengenmäßig durch Induktion mit unterschiedlichen

Doxicyclinkonzentrationen reguliert werden (Abbildung 25), sodass eine Akkumulierung im ER auch bei längerer Expression vermieden werden konnte (Abbildung 26). Die korrekte Lokalisierung der p24-Fusionskonstrukte wurde dabei nicht nur mikroskopisch, sondern auch biochemisch durch subzelluläre Fraktionierung festgestellt. Die CHO-Zelllinien eigneten sich weiterhin zur Kultivierung großer Zellmengen, wodurch fluoreszierende Golgi-Membranen in präparativen Mengen isoliert werden konnten (Abbildung 32). Sie stellen somit ein wichtiges Werkzeug zur weiteren Untersuchung der Funktion und des Verhaltens der p24-Proteine dar und erlauben dabei zukünftig sowohl *in vivo* Experimente über längere Zeiträume, als auch fortgeschrittene, spektroskopische oder biochemische *in vitro* Studien unter Verwendung der isolierten, fluoreszierenden Golgi-Membranen.

Neben der Herstellung einfach exprimierender Zelllinien gelang ebenfalls die Generierung monoklonale Zelllinien, welche zwei p24-Proteine markiert mit CFP und YFP exprimierten. Obwohl während der FACS-basierten Herstellung nur doppelt exprimierende Zellen selektiert wurden, kam es nach mehreren Zellpassagen jedoch zum unerwarteten Verlust der Expression eines Fusionskonstrukts. Möglicherweise wurde die Expression nur eines Konstrukts unterdrückt, oder es kam zu einem sehr schnellen Abbau eines der exprimierten Proteine. Alternativ ist auch vorstellbar, dass die Zellen einen Teil des bicystronischen Konstrukts entfernten, obwohl es als ganzes über die LTRs stabil in das Zellgenom eingebaut wurde. Darüber hinaus wies der Großteil der Zellen weder ein CFP noch ein YFP Spektrum auf, sondern exprimierte ein Protein mit GFP-Signatur. Möglicherweise handelte es sich hierbei um Zellen, die nur noch das YFP-Konstrukt exprimierten. Die spektrale Verschiebung hin zur GFP-Signatur könnte durch eine unkorrekte Faltung des fluoreszierenden Proteins hervorgerufen werden. Dadurch könnte die π-π-Wechselwirkungen des Chromophors mit dem Phenolatring in Position 203 gestört sein, die für die Signatur der YFP-Fluoreszenz entscheidend ist (Tsien, 1998). Obwohl in einzelnen Zellen FRET-Messungen durchgeführt werden konnten, eigneten sich die doppelt exprimierenden Zelllinien aufgrund der veränderten Expressionsverhalten und spektralen Verschiebungen nicht zur Isolierung von Golgi-Membranen. Der genaue Grund für diese Beobachtung ist unklar.

C Etablierung eines Systems zur Untersuchung von COPI-Vesikeln *in vivo*

Die Existenz von COPI-Vesikeln als eine neue Vesikelklasse, die nicht Clathrin als Hüllproteine enthält, wurde erstmals 1989 beschrieben (Malhotra et al., 1989). Obwohl seither eine Vielzahl an Untersuchungen über ihre Zusammensetzung, Bildung und Funktion durchgeführt wurden, wird ihre Rolle in vielen Fragestellungen nach wie vor kontrovers diskutiert. So wird z.B. in der Theorie der Zisternenprogression eine Involvierung von COPI-Vesikel im anterograden Transport sekretorischer Proteine angezweifelt (Glick and Malhotra, 1998). In anderen Studien konnte jedoch eine Anreicherung von anterograder Fracht wie VSVG oder Proinsulin (Nickel et al., 1998; Orci et al., 2000b; Orci et al., 1997), sowie eine Abreicherung von Golgi-residenten Enzymen in COPI-Vesikeln beobachtet werden (Orci et al., 2000a). Dies lässt sich nicht mit einer Zisternenprogression erklären und schreibt COPI-Vesikeln daher eine Funktion im anterograden Transport zu. Darüber hinaus lässt die Existenz mehrerer COPI-Vesikelpopulationen eine Funktion über den retrograden Transport hinaus vermuten (Malsam et al., 2005; Moelleken et al., 2007; Wegmann et al., 2004). Auch die Rolle von COPI-Vesikeln in der Mitose eukaryontischer Zellen wird kontrovers diskutiert. Warren und Kollegen beschreiben, dass der Golgi-Apparat während der Mitose in größere Fragmente, die so genannten *mitotic-golgi-cluster* (MGC), und COPI-Vesikel zerfällt, die somit den *mitotic-haze* bilden (Axelsson and Warren, 2004). Diese sind nach der Zellteilung in der Lage, neue Golgi-Apparate zu bilden. Gerade die Existenz des *mitotic-haze* wird jedoch angezweifelt. So stellt dieser nach Meinung anderer Gruppen keine COPI-Vesikel dar, sondern mit dem ER fusionierte Golgi-Membranen (Altan-Bonnet et al., 2006). In beiden Studien wurde das dynamische Verhalten des *mitotic-haze* mit Hilfe von FRAP-Experimenten untersucht, wobei die ermittelten Kinetiken jedoch unterschiedlich interpretiert werden.

Diese Beispiele beschreiben eine Problematik bei der Untersuchung von COP-I Vesikeln *in vivo*. Aufgrund ihrer geringen Größe von nur 60-100 nm können sie, gerade bei schwachen Fluoreszenzsignalen, mit lichtmikroskopischen Methoden nur schwer von anderen Strukturen unterschieden werden. Zur Visualisierung werden daher häufig technisch aufwendige elektronenmikroskopische Methoden eingesetzt, die jedoch nicht in lebenden Zellen durchgeführt werden könne. Indirekte

Untersuchungsmethoden wie z.B. FRAP sind auf der anderen Seite häufig nur schwer zu interpretieren. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein System entwickelt, das die zweifelsfreie Visualisierung von COPI-Vesikeln *in vivo* erlaubt und somit die Möglichkeit bietet, ihr dynamisches Verhalten in der Zelle näher zu untersuchen. Dazu wurden COPI-Vesikel *in vitro* generiert, ihre Reinheit und Zusammensetzung charakterisiert und anschließend in eukaryontische Zellen mikroinjiziert. Da sie mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa-488 oder Alexa-568 markiert waren, konnten sie in der Zelle mikroskopisch verfolgt werden.

1 Die Generierung fluoreszenzmarkierter COPI-Vesikel

Eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung dieses Systems bestand in der Herstellung aktiver und fluoreszenzmarkierter COPI-Vesikel im präparativen Maßstab. In der Vergangenheit wurde zur Herstellung größerer Menge proteinumhüllter Vesikel das nur sehr langsam hydrolysierbare GTP Analogon, GTPγS verwendet. Da diese Vesikel jedoch ihre Proteinhülle nicht mehr verlieren können und somit auch nicht fähig sind, mit Zielmembranen zu fusionieren, konnten solche GTPγS-Vesikel für die geplanten *in vivo* Studien nicht verwendet werden. Um die benötigten Mengen zu erhalten, mussten in dieser Arbeit daher sehr hohe Konzentrationen an Ausgangsmaterial eingesetzt werden. Die gewünschte Fluoreszenzmarkierung der generierten COPI-Vesikel wurde durch vorherige Färbung des Golgi mit Hilfe von Succinimidyl-Estern der Farbstoffe Alexa-488/568 erreicht. In ähnlichen Studien konnten so bereits biotinylierte Vesikel erhalten werden, die sich jedoch nicht für Untersuchungen in lebenden Zellen eignen (Satoh et al., 2005). Im Gegensatz zur Biotinylierung, welche ausschließlich Golgin-84 markierte, führte die Inkubation mit Succinimidyl-Estern der Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung einer Reihe verschiedener Proteine (Abbildung 39). Eine zusätzliche Markierung von Phosphatidylethanolamin (PE) konnte durch ESI-Massenspektrometrie nicht nachgewiesen werden (Abbildung 38). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein nicht nachweisbarer Anteil der Succinimidyl-Ester mit PE reagierte.

Die Reinheit und Zusammensetzung der isolierten Vesikel wurde elektronenmikroskopisch und biochemisch kontrolliert, wobei ausschließlich

proteinumhüllte Vesikel verwendet wurden, um eine Kontamination durch *remnants* zu vermeiden (Abbildung 34). Durch MALDI-Analyse konnten die prominentesten Proteine der generierten Vesikel identifiziert werden (Abbildung 35). Aus den erhaltenen Daten lässt sich schließen, dass mehrere ARF1 Moleküle pro Coatomer auf einem Vesikel vorhanden sind. Durch Vergleich der Intensitäten der auftretenden Banden lässt sich ebenfalls ein Überschuss an p23 und p24 gegenüber Coatomer ableiten, was in Übereinstimmung mit der gefundenen 4:1 Stöchiometrie ist (Reinhard et al., 1999; Sohn et al., 1996). Neben den Komponenten der Proteinhülle, sowie verschiedenen Membranproteinen, stellt das Protein p54/NEFA als einziger Vertreter der prominentesten Bestandteile der Vesikel ein lösliches, luminales Protein dar. Dieses Calcium-bindende, Golgi-residente Protein kolokalisiert mit α-Mannosidase II in medialen Zisternen, wird aber in der Mitose und nach BFA Behandlung von diesem Enzym separiert (Morel-Huaux et al., 2002). Damit weist es ein ähnliches Verhalten wie Matrix-Proteine oder die p24-Proteine auf, wobei seine genaue Funktion noch nicht bekannt ist.

2 Das Verhalten mikroinjizierter COPI-Vesikel *in vivo*

Die Mikroinjektion der fluoreszierenden Vesikel stellte im Vergleich zur Mikroinjektion von Proteinen oder DNA eine technische Herausforderung dar. Trotz der geringe intrinsischen GTPase-Aktivität von ARF1 kam es während der Benutzung der Vesikel zur partiellen Hydrolyse von GTP und somit Freisetzung der Proteinhülle. Die so erhaltene Mischung aus bedeckten und freien Vesikeln zeigte eine hohe Tendenz zur Aggregation und führte somit zur Verstopfung der Injektionsnadel. Um dies zu verhindern, wurden die Vesikel zum einen in Anwesenheit von höheren Salz und BSA-Konzentrationen gewonnen. Zum andern wurde die Spitze der Mikroinjektionsnadel abgebrochen um eine größere Öffnung zu erhalten und die Verwendung geringerer Injektionsdrücken zu ermöglichen. Die vorherige Anwendung von hohen Drücken, z.B. zur Reinigung verstopfter Nadeln, erwies sich als schädlich für die Stabilität der Vesikel. Möglicherweise entstehen dadurch starke Scher- oder Expansionskräfte die zur Beschädigung der Vesikel führen und somit eine Aggregation fördern, die schließlich in einer Inaktivierung der Vesikel resultieren kann. Zusätzlich erwies sich die Passivierung der Oberfläche der Injektionsnadel mit

einer BSA-Lösung als förderlich für die Stabilität und Ausbeute an aktiven Vesikeln. Durch diese Vorgehensweise gelang es aktive, fluoreszierende Vesikel in das Cytosol von Fibroblasten aus der Niere grüner Meerkatzen zu injizieren. Obwohl die Injektion in die Peripherie der Zelle gesetzt wurde, konnte innerhalb von 30 min perinukleär in der Golgi Region Alexa-Fluoreszenz beobachtet werden (Abbildung 40). Auf Basis der Western-Blot und ESI-Untersuchungen repräsentierte diese Fluoreszenz ektopische, über die Vesikel in die Zellen eingebrachte Proteine des eingesetzten Ratten Leber Golgis. Dies zeigte, dass COPI-Vesikel in der Lage sind, über längere Strecken durch das Cytosol hin zum Golgi zu wandern und nicht dauerhaft über *Tether*-Proteine an die Donor- oder Zielmembran gebunden sein müssen. Der spezifische Nachweis der ektopischen Ratten α-Mannosidase II ist ein weiterer Beleg dafür, dass die beobachtete Fluoreszenz Golgi-Proteine darstellt, die über COPI-Vesikel in die Zelle eingebracht wurden, und weist ferner auf einen COPI vermittelten intra-Golgi Transport hin. Da es sich hierbei um ein Golgi-residentes Enzym handelt, ist es unwahrscheinlich, dass Ratten α-Mannosidase II enthaltende COPI-Vesikel zuerst mit dem ER fusionierten und anschließend über COPII-Vesikel zum Golgi transportiert wurden. Diese Vermutung wurde durch Mikroinjektion in Sar1dn behandelten Zellen weiter erhärtet (Abbildung 42). Da hierbei der COPII vermittelte ER-Golgi Transport inhibiert war, konnte die beobachtete Kolokalisierung der Ratten α-Mannosidase II mit endogenen Golgi Markern nur durch direkte Fusion der COPI-Vesikel mit dem Golgi-Apparat zustande gekommen sein. Darüber hinaus wurden eine Reihe weiterer, noch nicht näher identifizierter, Alexa-markierter Proteine direkt zum Golgi transportiert. Aufgrund der Tatsache, dass α-Mannosidase II hauptsächlich im medialen und trans Golgi lokalisiert (Rabouille et al., 1995), ist es denkbar, dass sie in Vesikel, die von der cis Seite in anterograde Richtung wandern, aufgenommen wurde. Andere Studien weisen jedoch darauf hin, dass α-Mannosidase II im Gegensatz zu den p24-Proteinen in Vesikel aufgenommen werden, die mit Golgin-84 und CASP ein *Tether*-Paar enthalten, das im retrograden Transport involviert ist (Malsam et al., 2005).

Die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa-488 und Alexa-568 haben einen hydrophilen Charakter und werden daher wahrscheinlich nur Proteine auf der Golgioberfläche markieren, nicht jedoch im Lumen. Die markierten Proteine lassen sich dabei im Bezug auf ihr Verhalten nach BFA Behandlung in zwei Klassen unterteilen. Eine Klasse wird, analog zu Golgi-residenten Enzymen wie Galaktosyltransferase oder α-

Mannosidase II, in das ER transportiert. Die andere verbleibt, wie z.B. die p24-Proteine (Abbildung 17), in kleineren Golgi-Fragmenten, die positiv für Matrix-Proteine wie GM130 sind (Abbildung 41). Dass sich die ektopischen Proteine wie verschiedene Klassen endogener Proteine verhalten, belegt somit die Fusion der Vesikel mit der Golgi-Membran. Des weitern ist dies ein starker Hinweis, dass eine Mischung verschiedener COPI-Vesikel Populationen generiert und mikroinjiziert wurden (vergleiche auch (Malsam et al., 2005).

Damit Vesikel mit ihrer Zielmembran fusionieren können, müssen sie ihre Proteinhülle verlieren. Es ist jedoch nicht bekannt, wann dies genau passiert und ob die Ablösung der Hüllproteine ebenfalls für die Rekrutierung an die Membran über *Tether*-Proteine wichtig ist. Die Mikroinjektion permanent bedeckter Vesikel (Abbildung 43) lässt vermuten, dass die Ablösung der Proteinhülle nicht nur für die Fusion benötigt wird, sondern bereits Voraussetzung für die Rekrutierung der Vesikel an ihre Zielmembran ist.

In einer Reihe von Studien wurde eine aktive Funktion von Komponenten des Cytoskeletts im Transport der Vesikeln vom Ort ihrer Entstehung zur Zielmembran beschrieben (Allan et al., 2002). So assoziiert z.B. das Motorprotein Dynein, welches zum Minusende von Mikrotubuli wandert, mit COPI-Vesikel (Chen et al., 2005). Durch RNAi Experimente wurde Kinesin 2, das zum Plusende wandernde Pendant zu Dynein, eine Rolle im retrograden COPI-Transport des KDEL-Rezeptors vom Golgi zum ER zugesprochen (Stauber et al., 2006). In den hier durchgeführten Mikroinjektionsexperimenten fusionierten die COPI Vesikel ebenfalls in Anwesenheit des Mikrotubuli-depolymerisierenden Reagenz Nocodazol mit dem Golgi (Abbildung 43). Dies zeigt, dass COPI-Vesikel unabhängig von Mikrotubuli zum Golgi-Apparat wandern können, schließt jedoch einen durch Motorproteine vermittelt, aktiven Transport von Vesikeln nicht aus.

Zusammenfassend konnte ein System zur Mikroinjektion fluoreszenz-markierter, aktiver COPI-Vesikel in Säugetierzellen entwickelt werden. Diese können frei im Cytosol wandern und fusionieren schlussendlich mit endogenen Golgi-Membranen. Dieses System bietet somit erstmals die Möglichkeit, COPI-Vesikel *in vivo* zweifelsfrei zu visualisieren und dadurch ihr Verhalten und ihre Funktion in vielen Fragestellungen eingehender zu untersuchen. In Kombination mit der seit kurzem möglichen Herstellung von Isotypen-reinem rekombinanten Coatomer (Sahlmüller et al., in Vorbereitung), wäre es nun erstmals möglich, die Funktionen

verschiedener COPI-Vesikel-Typen wie z.B. ihre Wanderungsrichtung *in vivo* zu verfolgen. Anstelle von Ratten Leber Golgi kann ebenfalls Golgi aus Zelllinien isoliert werden (siehe z.B. Abbildung 32). Unter Verwendung diese Golgis können somit COPI-Vesikel generiert werden, die nur ein fluoreszenzmarkiertes Protein enthalten, wie z.B. p24-YFP, wodurch deren Funktion in vivo näher untersucht werden kann. Auch die Natur und Funktion des *mitotic-golgi-haze* könnte durch Mikroinjektion der fluoreszenzmarkierten COPI-Vesikel in mitotische Zellen eingehender beleuchtet werden.

V. Materialien und Methoden

1 Materialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), BioRad (München), BD Biosciences/Clontech (Ludwigshafen), Calbiochem (Läufelfingen), Gibco/BRL (Eggenstein), Invitrogen/Molecular-Probes (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), sowie Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen). Soweit nicht anderes angeben, wurde für alle wässrigen Lösungen Millipore™-Wasser verwendet.

1.1 Nährmedien

1.1.1 Eukaryontische Nährmedien

Medium	Zusammensetzung/Zusätze	Vertreiber
Dubellco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	10% fötales Kälberserum (FCS) Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie PAA Laboratories GmbH (Linz, AU)
Alpha Minimum Essential Medium (αMEM)	10% fötales Kälberserum FCS) Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie PAA Laboratories GmbH (Linz, AU)

1.1.2 Prokaryontische Nährmedien

Medium	Zusammensetzung/Zusätze	Vertreiber
LB-Medium (Luria Bertani)	1% Bacto™-Trypton 0,5% Bacto™-Yeast-Extract 0,5% NaCl je nach eingesetztem Plasmid: 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin	Difco, Augsburg Difco, Augsburg
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Bacto™-Agar je nach eingesetztem Plasmid: 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin	Difco, Augsburg
SOC	20 g Bacto™-Trypton 5g Bacto™-Yeast-Extract 0,5 g NaCl 0,2 g KCl in einem Liter Nach Autoklavieren Zugabe von 10 mM Mg2Cl 20 mM Glucose	Difco, Augsburg Difco, Augsburg
NZCYM Broth	21,98 g Medium pro Liter; je nach eingesetztem Plasmid: 100 µg/ml Ampicillin und/oder 50 µg/ml Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie

1.2 Antikörper

1.2.1 Primärantikörper

Reaktivität Epitop	Name	Spezies (Isotyp)	Quelle	Bemerkung
p23	p23-Henriette final bleed	Kaninchen	FG Wieland	1:10000 (WB)
p23	p23-HAC344 affi. gereinigt	Kaninchen	FG Wieland	1:10 (IF)

p24	p24-Elfriede Nr. 6	Kaninchen	FG Wieland	1:10000 (WB)
p24	p24-Frida final bleed	Kaninchen	FG Wieland	1: 100 (IF)
p25	p25-1708 rabbit 2	Kaninchen	FG Wieland	1:10000 (WB)
p26	p26-2088 guinea pig; 140 iT	Meerschwein	FG Wieland	1:500 (WB)
p27	p27-2087 rabbit 2; 140 iT	Kaninchen	FG Wieland	1:5000 (WB)
GM130	α-GM130 monoklonal	Maus	(Nakamura et al., 1995)	1:1000 (IF) 1:1000 (WB)
Myc-Epitop	mMyc monoklonal	Maus	Covance, San Diego, USA	1:500 (WB)
α-Mannosidase -II	anti-native-Man-II	Kaninchen	K. Moremen	1:2000 (WB)
Ratten α-Mannosidase-II	53FC3 monoklonal	Maus	A. Satoh/ G. Warren	1:30 (IF) (erkennt nur Ratte)
β´-COP	Nr. 899	Kaninchen	FG Wieland	1:5000 (WB)
Alexa-488	α-Alexa-Fluor®-488 IgG fraction	Kaninchen	Invitrogen (Karlsruhe)	1:1000 (WB)
Giantin	FH2	Kaninchen	A. Satoh/ G. Warren	1:500 (IF)
Golgin-97	α-Golgin-97	Kaninchen	A. Satoh/ G. Warren	1:500 (IF)

1.2.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	gekoppelt an	Quelle	Verdünnung
Ziege α-Maus	Alexa-Fluor® 488; 546; 633	Invitrogen (Karlsruhe)	je 1:1000 (IF)
Ziege α-Kaninchen	Alexa-Fluor® 488; 546; 633	Invitrogen (Karlsruhe)	je 1:1000 (IF)
Ziege α-Maus	Meerrettich-Peroxidase	Dianova Hamburg	1:5000 (WB)
Ziege α-Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	BioRad München	1:5000 (WB)

Esel α-Meerschwein	Meerrettich-Peroxidase	Dianova Hamburg	1:5000 (WB)

1.3 Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle	Resistenz
pECFP-p23	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p23-CFP	diese Arbeit	Kanamycin
pECFP-p24	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p24-CFP	Dr.Irina Majoul (Majoul et al., 2001)	Kanamycin
pECFP-p25	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p25-CFP	diese Arbeit	Kanamycin
pECFP-p26	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p26-CFP	diese Arbeit	Kanamycin
pECFP-p27	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p27-CFP	diese Arbeit	Kanamycin
pEYFP-p23	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p23-YFP	Dr.Irina Majoul (Majoul et al., 2001)	Kanamycin
pEYFP-p24	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p24-YFP	diese Arbeit	Kanamycin
pEYFP-p25	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p25-YFP	diese Arbeit	Kanamycin
pEYFP-p26	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p26-YFP	diese Arbeit	Kanamycin
pEYFP-p27	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p27-YFP	diese Arbeit	Kanamycin
pEYFP-GalT	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von GalT-YFP	Dr. Rainer Duden	Kanamycin
pmyc-p23	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p23-myc	diese Arbeit	Kanamycin
pmyc-p24	eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von p24-myc	diese Arbeit	Kanamycin
pRTi	MMLV basierter Expressionsvektor für die bicistronische eukaryontische Expression	Dr. Jörg Moelleken (Moelleken, 2005)	Ampicillin Hygromycin
pRTYC	MMLV basierter Expressionsvektor für die bicistronische eukaryontische Expression von YFP- und CFP-Proteinen	diese Arbeit	Ampicillin Hygromycin

Name	Beschreibung	Quelle	Resistenz
pRTY3C4	MMLV basierter Expressionsvektor für die bicistronische eukaryontische Expression von p23-YFP und p24-CFP	diese Arbeit	Ampicillin Hygromycin
pRTY4C3	MMLV basierter Expressionsvektor für die bicistronische eukaryontische Expression von p24-YFP und p23-CFP	diese Arbeit	Ampicillin Hygromycin
pRTY3C3	MMLV basierter Expressionsvektor für die bicistronische eukaryontische Expression von p23-YFP und p23-CFP	diese Arbeit	Ampicillin Hygromycin
pRTC3	MMLV basierter Expressionsvektor zur eukaryontische Expression von p23-CFP	diese Arbeit	Ampicillin Hygromycin
pRTY3	MMLV basierter Expressionsvektor zur eukaryontische Expression von p23-YFP	diese Arbeit	Ampicillin Hygromycin
pRTC4	MMLV basierter Expressionsvektor eukaryontische Expression von p24-CFP	diese Arbeit	Ampicillin Hygromycin
pRTY4	MMLV basierter Expressionsvektor zur eukaryontische Expression von p24-YFP	diese Arbeit	Ampicillin Hygromycin
pVPack-Eco	env-exprimierend	Stratagene Heidelberg	Ampicillin
pVPack-GP	gag-pol-exprimierend	Stratagene Heidelberg	Ampicillin
pRSF-Duet-NMT/hARF#2	prokaryontische simultane Expression von ARF1 und NMT	Dr. Julien Bethune (FG Wieland)	Kanamycin
pARFQ71L	prokaryontische Expression von ARFQ71L	Ayano Satoh/Jörg Malsam	Ampicillin
pBB 131 NMT	prokaryontische Expression der N-Myristoyl-Transferase (aus Hefe)	Sylvia Rieger (FG Wieland)	Kanamycin
pET11d-Sar1a(H79G)	prokaryontische Expression von His-Sar1H79G ($Sar1^{DN}$)	Ayano Satoh/ W.E. Balch (Aridor et al., 1995)	Ampicillin

1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron (Dreieich) bezogen.

1.4.1 PCR- und Hybridisierungs-Primer

Name	Sequenz	PCR-Bedingung
p23_for_SbfI	CGTTACCTGCAGGTATCTCCTTCCATCTGCCC	5x 40°C/30x 60°C
p23_rev_ClaI	GAGCCATCGATGGTTACTCAATCAATTTCTTGGCC	5x 40°C/30x 60°C
p23_for_MluI	TTACGACGCGTATCTCCTTCCATCTGCC	5x 40°C/30x 60°C
p23_rev_PacI_rat	TCACCTTAATTAAGGTTACTCTATC AACTTCTTGGCCTTGAAGAAGCGA	5x 40°C/30x 60°C
p24_for_MluI	TTCCGACGCGTGGCTATTTCGTTAGCATCGAC	5x 40°C/30x 60°C
p24_rev_PacI	TCACCTTAATTAAGGTTAAACAACTC TCCGGACTTCAAAAAATCTCTTC	5x 40°C/30x 60°C
p24_rev_ClaI	GAGCCATCGATGGTTAAACAACTCTCC GGACTTCAAAAAATCTCTTC	5x 40°C/30x 60°C
p25_for_EcoRI 2	CCGGAATTCTCTCTACTTTCACATCGGAGAGACG	5x 40°C/30x 60°C
p26-p24b-human _for_EcoRI 2	CCGGAATTCTGAGCTCACCTTCGAGCTG	5x 40°C/30x 60°C
p27_for_wosp_EcoRI	CGGAATTCTGAGATCACCTTCGAGCTTCCTGAC	5x 40°C/30x 60°C
p25_rev_BamHI_2	GCGGATCCCTACACAAGCTTCTTGGCTTCAAA	5x 40°C/30x 60°C
p26_p24b_human _rev_BamHI_2	GGGGATCCCTAGGAGTGGACTGCCCTGC	5x 40°C/30x 60°C
p27_rev_BamHI	CGGGATCCTTATGATCCAACACGAGTTGTGG	5x 40°C/30x 60°C
SPCFP_for_FseI _modif	TGTAGGCCGGCCGCCGCCACCATGTCTG GTTTGTCTGGACCACCAG	5x 40°C / 30x 78;76;74;72°C
SPCFP_rev_SbfI _ClaI_modif	GACCCCATCGATGGCCTGCAGGCTTGTAC AGCTCGTCCATGCCTAGAGT	5x 40°C / 30x 78;76;74;72°C
SPYFP_for_BamHI _modif	TTATCGGGATCCGCCGCCACCATGTCTGG TTTGTCTGGACCACCAT	5x 40°C / 30x 78;76;74;72°C
SPYFP_rev_MluI _PacI	CTCCCCTTAATTAAGGCGACGCGTCTTGTA CAGCTCGTCCATGCCGAGAGT	5x 40°C / 30x 78;76;74;72°C
SP_p23_for_AgeI	GCTACCGGTGCGCACCATGT	5x 40°C/30x 60°C
SP_p23_rev_SacI	CTTGAGCTCGGCAAGGACCAATCT	5x 40°C/30x 60°C
HindIII_myc-tag _EcoRI_sense	AGCTTATGGAGCAGAAACTCATCTCTGAAGA GGATCTGACCTTCCGG	
HindIII_myc-tag _EcoRI_antisense	AATTCCGGAAGGTCAGATCCTCTTCAGAGAT GAGTTTCTGCTCCATA	

Die angegebenen PCR-Bedingungen beziehen sich auf die Anlagerungstemperatur der Primer, sowie die Anzahl der Zyklen. Sind mehrere Werte angegeben, wurde die Anlagerungstemperatur schrittweise erniedrigt, wobei jede Temperatur für eine Minute gehalten wurde. Die CFP und YFP Primer können aufgrund ihrer identischen Sequenzen an Anfang und Ende der Gene für alle fluoreszierenden Proteine verwendet werden.

1.4.2 Sequenzier-Primer

Name	Sequenz	Position	Leserichtung (Insert)
p23_for_45_seq	GGAGATTCACAAGGACCTGCTAG	45	sense
p23_for_20_seq	TGAACTCTCGCAAGTGTCTCC	20	sense
p23_for_28_seq	CGCAAGTGCCTCCGTGAGG	28	sense
p23_rev_20_seq	GGAGACACTTGCGAGAGTTCA	20	antisense
p23_rev_68_seq	CTCGTACGCGCCCGTAA	68	antisense
p23_rev_134_seq	ATCTTGAGGTGGCTGCGCA	134	antisense
p23_rev_521_seq	CCTGCCAGGTAGCTAGTCCAATG	521	antisense
p24_for_48_seq	GCGGGTCACCTCGGGC	48	sense
p24_rev_514_seq	GGTAGTAGATCTGTCCCAATGTCATGG	514	antisense
p25_for_8_seq	TTCACATCGGAGAGACGGAGAAG	8	sense
p25_rev_574_seq	AGAAGCTCTTGAGGTGCCGC	574	antisense
p26_for_48_seq	GGAGGTGGAGCAGGGCGT	48	sense
p26_rev_534_seq	GAAGAAGCTTTTCAACAGTAGCACC	534	antisense
p27_for_48_seq	GGACATCGCTCAGGGCACC	48	sense
p27_rev_514_seq	GAAATACCTGCCCTATGCTAACC	514	antisense
pGFP2_for160	CCTGTTCCATGGCCAAGACTTG	160	sense
pGFP2_for_306	GGACGACGGCAACTACAAGACC	306	sense
pGFP2_rev_417	CCAGGATGTTGCCGTCCTCC	417	antisense
pGFP2_rev532	GTTGAACGCTTCCATCTTCAATG	532	antisense
MCS A 5´	CCACGCTGTTTTGACCTCCA	3251 (pRTi)	sense
MCS A 3´	CTTCGGCCAGTAACGTTAGG	3415 (pRTi)	antisense
MCS B 5´	GAACCACGGGGACGTGGTTTTC	3929 (pRTi)	sense
MCS B 3´	CTACAGGTGGGGTCTTTCATTC	4040 (pRTi)	antisense

Die GFP2 Primer wurden so gewählt, dass sie in konservierten Regionen anlagern und somit für alle CFP und YFP Konstrukte einsetzbar waren.

1.5 Zelllinien

1.5.1 Prokaryontische Zelllinien

Zelllinie	Bedingungen	Herkunft
DH5α	LB/LB-Agar-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21 Star One Shot	NZCYM-Medium	Invitrogen (Karlsruhe)

1.5.2 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Bedingungen
BSC-1	Nierenzelle der grünen Meerkatze	DMEM
CHO-MCAT-TAM-CD2	Ovarien-Zellen des chinesischen Hamsters. (expremieren einen MCAT Rezeptor, die TAM-Maschinerie, sowie einen CD2-Rezeptor; Freundlich Gabe von Dr. Walter Nickel, BZH-Heidelberg)	αMEM
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen, die T-Version exprimiert zusätzlich das „SV40 large T-Antigen“	DMEM (kollagenisierte Platten)
Vero	Nierenzelle der grünen Meerkatze	DMEM
YT2	BSC-1, welche stabil GalNAcT-YFP überexprimieren	DMEM + G418 (0,8 µg/ml)

Die Zellen wurden jeweils bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 in Brutschränken der Firme Haereus (Hanau) kultiviert. Alle Waschschritte wurden mit PBS_{tc} durchgeführt. Zum Umsetzten der Zellen wurden sie mit einer Lösung aus 0,2% (w/v) Trypsin und 0,08% (w/v) EDTA inkubiert. Zum Kollagenisieren der Platten wurde pro 10 cm Schale 1 ml einer Lösung aus 2 mg/ml Kollagen-R (Serva, Heidelberg) (in sterilem Wasser gelöst) eingetrocknet. Die Platten wurden bis zu einem Monat bei 4°C gelagert.

1.6 Protein-Molekulargewichtstandards

Zur Bestimmung der Proteinmolekulargewichte wurden entweder der BMW- (*broad molecular weight*) von PaqLab (Erlangen), oder der *Precision-Prestained*-Marker von BioRad (München) verwendet.

BMW-Marker		Precision-Prestained-Marker	
Protein	Größe (in kDa)		Größe (in kDa)
β-Galaktosidase	116		250
Rinderserumalbumin	66,7		150
Ovalbumin	45		100
Laktat-Dehydrogenase	35		75
RE Bsp981 (E.coli)	25		50
Laktoglobulin	18		37
Lysozym	14		25
			15
			10

1.7 DNA-Größenstandards

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden die 100 bp-, sowie 1 kb-Leiter der Firma New England Biolabs (Beverly, USA) verwendet.

100 bp DNA-Leiter	Größe	1 kb DNA-Leiter	Größ (in kb)
1	1517	1	10
2	1200	2	8
3	1000	3	6
4	900	4	5
5	800	5	4
6	700	6	3
7	600	7	2
8	517	8	1,5
9	400	9	1
10	300	10	0,5
11	200		
12	100		

1.8 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in den Kapiteln der entsprechenden Methoden aufgeführt.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Transformation von Plasmiden in *E.coli*

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden *E.coli* des DH5α-Stamms, zur Proteinaufreinigung der *E.coli*-Stamm BL21 Star verwendet. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock. 50 µl der Bakterien-Stämme wurden mit 0,5-1 µg des Plasmids (maximal jedoch 5 µl) für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 30 sec bei 37°C (DH5α) bzw. 42°C (BL21 Star) und anschließend wurden die Zellen weitere 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium ohne Antibiotika wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von bis zu 30 µg DNA wurden 5-10 ml LB-Medium mit einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus 100 ml wurden bis zu 100 µg gewonnen, und zur Herstellung über 100 µg DNA mit Konzentrationen über 0,5 µg/ml wurden 250 ml Medium angeimpft. Die Isolierung erfolgte unter Verwendung der Mini, bzw. Midi NucleoSpin® Plasmid Kits von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers (Stand März 2002). Die für die Elektroporation von Vero Zellen (V.2.3.3) benötigten Endotoxin-freien DNA Proben mit hohen Konzentrationen

wurden unter Verwendung der QIAfilter® Plasmid Maxi Kits von Qiagen (Hilden), ebenfalls nach Angaben des Herstellers gewonnen (Stand August 2003).

2.1.3 Umpufferung von DNA-Fragmenten und Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Einstellung besonderer Salzkonzentrationen, sowie die Aufreinigung von PCR-Produkten wurden über das NucleoSpin® Extract-Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Je nach DNA-Menge erfolgte die Elution in 20-50 µl H_20.

2.1.4 Präparative und analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Reinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden, sowie die Analyse von PCR-Reaktionen oder eines Restriktionsverdaus wurde mit Hilfe von Agarose-Gelekrophorese durchgeführt. Je nach Fragmentgröße wurden dafür 0,6-1,4% (w/v) Agarose-Gele (Invitrogen, Karlsruhe) in 1xTAE-Puffer unter Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei 200 V durchgeführt. Die Proben wurden dazu mit 5x Probenpuffer vorbereitet. Die Aufreinigung präparativer DNA-Fragmente wurde unter Verwendung des Gel Extraction® Kit von Macherey Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

50x TAE-Puffer
2 M Tris/HCl pH 7,0
1 M Essigsäure
50 mM EDTA

5x Probenpuffer
50 mM Tris pH 8,0
4 M Harnstoff
25% (w/v) Saccharose
0,1% (w/v) Bromphenolblau
100 mM EDTA

2.1.5 Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation von DNA

Die Reinigung und Sterilisation von DNA wurde durch Phenol-Extraktion und Ethanol-Präzipitation durchgeführt. Dazu wurden 50 µl der DNA-Lösung 1:1 mit einer Mischung aus Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) gemischt und 5 min

bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 350 µl H_20, 40 µl 3M Natriumacetat und 1 ml Ethanol gemischt, und für drei Stunden bei -80°C gelagert. Danach wurde die DNA 5 min bei 16000 g sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Zur weiteren Verwendung wurde die DNA in 10 µl H_20 aufgenommen.

2.1.6 Bestimmung von Reinheit und DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch mit Hilfe des Nanodrop, ND-1000 Spektralphotometers der Firma Peqlab (Erlangen). Die Reinheit wurde durch das Verhältnis der Adsorptionen bei 260 und 280 nm überprüft.

2.1.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von Genfragmenten mittels PCR wurden die PfuTurbo® DNA-Polymerase von Stratagene (Heidelberg) eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie die Schrittfolge sind im Folgenden aufgelistet.

Komponente	Volumen (µl)
10x Pfu Turbo Puffer	10
dNTP Mix (je 10 mM)	2
sense primer (100 nM)	1,25
antisense primer (100 nM)	1,25
Template (ca. 100 ng)	
+/- DMSO	5
PfuTurbo Polymerase	1
H20	ad 100 µl

Zeit	Temperatur (°C)	Zyklen
5 min	95	1x
1 min	95	30x
1 min	variierte	
1 min/1000bp	72	
10 min	72	1x
∞	4	

Die hier verwendete Methode erzeugte DNA-Abschnitte mit stumpfen Enden. Die Anlagerungstemperatur variierte je nach verwendeten Primer und ist im Abschnitt V.1.3.1 angegeben. Wurden Primer mit großen Überhängen eingesetzt, wurde vor den hier angegeben 30 Zyklen noch 5 Weitere mit einer Anlagerungstemperatur von 40°C durchgeführt.

2.1.8 Restriktionsverdau von Plasmiden und PCR-Produkten

Der Restriktionsverdau von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgt prinzipiell nach dem gleichen Schema. Die spezifischen Enzyme sind in den entsprechenden Abschnitten angegeben und wurden alle von der Firma New England Biolabs (New England, USA) bezogen. 1-3 µg der zu verdauenden DNA wurden mit 3-10 U des benötigten Enzyms und 2 µl des empfohlenen 10x Puffers gemischt. Je nach Enzym wurden zusätzlich noch 2 µl BSA (1 mg/ml) zugegeben, und der Ansatz anschließend auf 20 µl mit H_2O aufgefüllt. Der Verdau erfolgt bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für 90 min, und wurde anschließend durch einen 20-minütigen Hitzeschock bei 80°C gestoppt. Die überhängenden Enden wurden durch 30-minütige Inkubation bei 37°C mit einer Alkalischen Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Dazu wurden 2 µl direkt zum Ansatz gegeben. Die Aufreinigung der gewünschten DNA-Fragmente erfolgt wie unter V.2.1.4 beschrieben.

2.1.9 Ligation der DNA-Fragmente

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit Plasmid-Fragmenten wurde mit Hilfe des DNA-Ligation Kit Ver. 2 der Firma TAKARA (Otsu, Japan) durchgeführt. Ein 10facher Überschuss an Insert wurde mit dem Plasmid gemischt (meist ca. 0,03-0,1 pmol), auf 10 µl mit H_2O gebracht und mit 10 µl der TAKARA-Lösung I gemischt. Der Ansatz wurde entweder über Nacht bei 4°C oder für vier Stunden bei 16°C inkubiert, und anschließend zur Transformation wie unter V.2.1.1 eingesetzt.

2.1.10 Generierung neuer Plasmide

A) Klonierung der Plasmide zur transienten Expression von p24-Fusionskonstrukten

Alle Konstrukte zur transienten Expression von p24-Fusionskonstrukten in Vero Zellen wurden auf Basis der zwei Vektoren pECFP-p24 bzw. pEYFP-p23 generiert. Diese wurde freundlicherweise von Dr. Irina Majoul (Royal Holloway University, London) zur Verfügung gestellte, und basieren wiederum auf den

kommerziell erhältlichen Plasmiden pECFP-N1 bzw. pEYFP-N1 von BD Biosciences/Clontech (Ludwigshafen). C-terminal zu den CFP bzw. YFP Genen wurde über die AgeI Schnittstelle das Signalpeptid von p23 kloniert. Die Gene für p23 bzw. p24 ohne die entsprechenden Signalsequenzen wurden über die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI der multiplen Klonierungsstelle (MCS) in das Plasmid eingebracht (Majoul et al., 2001).

Zur Herstellung der übrigen Konstrukte wurde die Gene für p23 und p24 durch Restriktionsverdau mit EcoRI und BamHI entfernt. Die Gene für die verschiedenen p24 Mitglieder wurden mittels PCR so amplifiziert, dass sie Schnittstellen für EcoRI und BamHI enthielten. Nach Restriktionsverdau mit diesen Enzymen und anschließender Aufreinigung wurden sie durch Ligation in die linearisierten pECFP bzw. pEYFP Plasmide eingeführt.

Die Plasmide zur Expression von myc-markiertem p23 und p24 wurden nach folgendem Schema kloniert. Unter Verwendung der Primer SP_p23_for_AgeI und SP_p23_rev_SacI sowie dem Plasmid pECFP-p23 wurde das Signalpeptid von p23 mit den Schnittstellen AgeI und SacI mittels PCR generiert. Anschließend wurde sowohl dieses PCR-Produkt als auch die Vektoren pECFP-p23 und pEYFP-p24 mit den Enzymen AgeI und SacI verdaut, wodurch sowohl das Signalpeptid als auch die Gene für CFP bzw. YFP aus den Plasmiden entfernt wurden. Das PCR-Produkt wurde nun in den Vektor legiert, und der so erhaltene Vektor mit den Enzymen HindIII und EcoRI wieder linearisiert. Die beiden Oligonukleotide HindIII_myc-tag_EcoRI_sense und HindIII_myc-tag_EcoRI_antisense wurden hybridisiert, und in diesen linearisierten Vektor legiert. Die so erhaltenen Vektoren kodierten für das Signalpeptid von p23 gefolgt von einem myc-tag sowie p23 bzw. p24, und wurden als pmyc-p23 bzw. pmyc-p24 bezeichnet.

B) Klonierung der Plasmide zur retroviralen Transduktion von CHO Zellen

Die zur retroviralen Transduktion verwendeten Plasmide wurde alle auf Basis des pRTi Vektors generiert (Moelleken, 2005). Dieser besitzt eine multiple Klonierungsstelle mit den Schnittstellen BamHI, MluI und PacI vor dem IRES-Element, und eine multiple Klonierungsstelle mit den Schnittstellen FseI, SbfI und ClaI dahinter (siehe auch Abbildung 29). Unter Verwendung der Primer SPYFP_for_BamHI, SPYFP_rev_MluI_PacI, SPCFP_for_FseI und SPCFP_rev_

SbfI_ClaI sowie den Plasmiden pECFP-p23 und pEYFP-p24 wurden die Gene für CFP und YFP mit den entsprechenden Schnittstellen mittels PCR generiert. Nach Verdau mit BamHI und PacI bzw. FseI und ClaI wurden die PCR-Produkte schrittweise in den pRTi Vektor legiert. Der so erhaltene Vektor pRTYC diente als Ausgangsvektor für die Generierung der Vektoren pRTY3C3, pRTY3C4 und pRTY4C3. Die einzelnen p24 Proteine wurde nach PCR-Amplifikation entweder über die Restriktionsschnittstellen MluI und PacI an YFP oder über SbfI und ClaI an CFP angehängt.

Zur Generierung der monocystronischen Vektoren pRTC3 und pRTY4 wurden die Gene für CFP und YFP, analog zu oben, über BamHI und PacI in den Vektor pRTi inseriert. Die Gene für p23 bzw. p24 wurden anschließend ebenfalls analog zu oben über die Restriktionsschnittstellen MluI und PacI eingefügt. Die Vektoren pRTC4 und pRTY3 wurden wie folgt generiert. Ausgehend von den Vektoren pECFP-p24 bzw. pEYFP-p23 wurde, unter Verwendung der Primer SPYFP_for_BamHI und p24_rev_ClaI bzw. p23_rev_ClaI, die Gene für die gesamten Fusionskonstrukte mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde das IRES-Element des pRTi Vektors durch Verdau mit BamHI und ClaI entfernt, und die ebenfalls verdauten PCR-Produkte in diesen linearisierten Vektor legiert.

2.1.11 Sequenzierung von DNA-Konstrukten

Nach erfolgter Klonierung neuer Konstrukte wurden deren korrekte Sequenz mittels Sequenzierung durch die Firma GATC (Konstanz) überprüft. Die dazu verwendeten Primer sind in Abschnitt V.1.4.2 aufgelistet.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-denaturierte Proteine wurden abhängig von ihrer Masse durch diskontinuierliche Gelelektrophorese unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen nach Laemmli getrennt (Laemmli 1970). Die Trennung erfolgte dabei unter Verwendung des Mini-Protean®-3-Systems der Firma BioRad (München) bei einer konstanten Spannung von 200 V in 1x SDS-Laufpuffer. Die in dieser Arbeit eingesetzten Gele bestanden aus einem Trenngel mit 12% Acrylamid und einem Sammelgel mit 4% Acrylamid. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit 4x-SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die zur Herstellung der Gele verwendeten Reagenzien und Puffer sind im Folgenden aufgeführt.

	H20 [ml]	1,5 M Tris pH 8,8 [ml]	0,5 M Tris pH 6,8 [ml]	Acrylamid (37,5:1) [ml]	10% SDS (w/v) / [µl]	10% APS (w/v) / [µl]	TEMED [µl]
Trenngel (12%)	3,35	2,5	-	4	50	100	5
Sammelgel (4%)	6,1	-	2,5	1,4	50	100	10

10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris
1,92 M Glycin
1% (w/v) SDS

4x SDS-Probenpuffer:

200 mM Tris/HCl pH 6,8
12% -Mercaptoethanol (v/v)
8% SDS
40% Glycerin (v/v)
0,2% Bromphenolblau (w/v)

Je nach Fragestellung wurde der BMW- (*broad molecular weight*) von PaqLab (Erlangen), oder der *Precision-Prestained*-Marker von BioRad (München) als Größenstandard verwendet.

2.2.2 Coomassie-Färbung

Zur Färbung der Gesamtproteinverteilung wurden die SDS-PAGE-Gele für 30-60 min bei Raumtemperatur in einer Coomassie-Färbe-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele bis zum gewünschten Kontrast ebenfalls bei Raumtemperatur entfärbt.

Coomassie-Färbe-Lösung:	Entfärbe-Lösung:
40% Ethanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v) 0,25% Coomassie Blue R250 (w/v)	20% Ethanol (v/v) 5% Essigsäure (v/v)

2.2.3 Western-Blot (WB)

Zum spezifischen Nachweiß bestimmter Proteine wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Proteine einer Probe erst mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend im *semi-dry* Verfahren auf eine Immobilon-P-PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) transferiert.

Dazu wurden zwei mit Anoden-I-Puffer getränkte Whatman-3-mm-Filterpapiere auf die untere Elektrodenplatte gelegt, und zwei weiter Filterpapiere, getränkt in Anoden-II-Puffer, darüber gestapelt. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol konditioniert, anschließend in Anoden-II-Puffer getränkt und auf den Filterpapierstapel gelegt. Darauf wurde nun das in Anoden-II-Puffer getauchte Gel gelegt und mit drei Filterpapieren, welche in Kathoden-Puffer getränkt waren, überschichtet. Eventuell vorhandenen Luftblasen wurden ausgerollt, und nach Aufsetzen der Kathode die Protein bei einer Spannung von 24 V für 90 min transferiert. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran kurz in Ponceau-S-Lösung geschwenkt, um die Banden des Proteinmarkers einzuzeichnen, und anschließend die Ponceau-S-Lösung mit PBS-T vollständig entfernt.

Anoden-Puffer I	Anoden-Puffer II:
300 mM Tris pH 10,4 20% Methanol (v/v)	25 mM Tris pH 10,4 20% Methanol (v/v)

Kathoden-Puffer

25 mM Tris pH 9,4
40 mM 6-Aminocapronsäure
20% Methanol (v/v)

Ponceau-S-Lösung

0,8% Ponceau-Rot (w/v)
4% Trichloressigsäure (w/w)

PBS-T

35,7 mM Na_2HPO_4
14,3 mM KH_2PO_4
136 mM NaCl
3 mM KCl
0,05% Tween 20 (v/v)

2.2.4 Immunochemischer Nachweis auf PVDF-Membranen

Durch Immunreaktion mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine nach dem Transfer auf die PVDF-Membran detektiert. Dazu wurden die Membranen erst mit einer Lösung aus 5% Magermilchpulver in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach 10-minütigen Waschen der Membran mit PBS-T wurde sie für 45 min bei Raumtemperatur mit den spezifischen Primärantikörpern inkubiert. Diese wurde wie unter V.1.2.1 angegeben mit einer Lösung aus 1% BSA in PBS-T verdünnt. Unspezifisch oder nicht gebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 10 min mit PBS-T entfernt, und die Membran anschließend 45 min bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Diese wurden wie in Abschnitt V.1.2.2 angegeben in einer Lösung aus 1% Magermilchpulver in PBS-T verdünnt. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit PBS-T wurde der Blot unter Verwendung des ECL-Systems von Pharmacia (Freiburg) nach Angaben des Herstellers zur Detektion vorbereitet. Die Röntgen-Filme *Medical-X-ray-RP-new* der Firma CEA (Strängnäs, Schweden) wurden in der Entwicklermaschine SRX-101A von Konika-Minolta (Tokio, Japan) entwickelt.

2.2.5 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) unter Verwendung des Systems der Firma BioRad (München) durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden dazu mit H_20 auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl des Bradford-Reagenz gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als

Eichgerade wurden BSA-Proben mit Konzentrationen von 0 bis 25 µg/ml verwendet. Die Absorptionen wurden bei 620 nm gemessen.

2.2.6 Isolierung von Coatomer aus Kaninchenleber

Die Aufreinigung von Coatomer aus Kaninchenleber erfolgte nach einem abgeänderten Protokoll von J. Pavel (Pavel et al., 1998). Alle Schritte wurden soweit nicht anderes angegeben bei 4°C durchgeführt.

A) Gewinnung von Cytosol

Einen Tage vor der Präparation wurden drei Kaninchen auf Hunger gesetzt, um den Gehalt an Leberglykogen zu verringern. Die Leber wurden sofort nach Schlachtung (ca. 160-200 g) auf Eis gelegt, anschließend mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten, und direkt in einen Warring Blender mit 200 ml eiskaltem Puffer HP-1 gegeben. Die Homogenisierung erfolgt durch einen *low-speed* Puls für 30 s und nach 2-minütigem Kühlen auf Eis einem weitern *high-speed* Puls für ebenfalls 30 s. Nach Zentrifugation für eine Stunde bei 10000 g in einem SLC-4000-Rotor der Firma Sorvall/Thermo Scientific (Langenselbold), wurde der Überstand durch vier Lagen Verbandsmull dekantiert. Weitere unlösliche Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation für zwei Stunden bei 100000 g in einem Beckman TFT-50.38-Rotor abgetrennt. Die entstanden feste Lipidschicht wurde vorsichtig abgesaugt, der restliche Überstand durch vier Lagen Verbandsmull dekantiert und anschließend 1:2 mit Puffer HP-2 verdünnt.

B) Ammoniumsulfatpräzipitation (35%)

Das Volumen des gewonnen Cytosols wurde mit einem Messzylinder genau bestimmt, und pro 100 ml exakt 19,4 g Ammoniumsulfat fein pulverisiert. Die Ammoniumsulfatkonzentration wurde nun langsam in kleine Portionen innerhalb von 45 min auf 35% eingestellt, und die Suspension anschließend weitere 45 min auf Eis eingerührt. Das Präzipitat wurde 30 min bei 10000 g mittels eines Sorvall SLC-4000 Rotors (Langenselbold) pelletiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 100 ml RP-1 Puffer resuspendiert und mittels eines Douncer homogenisiert. Anschließend wurde die Probe zweimal für eine Stunde und schließlich über Nacht gegen 5 Liter IEX-1 Puffer dialysiert. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Dialysat für 45 min bei 100000 g (Beckman TFT-50.38-Rotor) zentrifugiert und der Überstand filtriert (Millipore HV Durapore Membrane, 0.45 µm).

C) DEAE-Anionenaustauscherchromatorgraphie

Eine XK-50-Säule mit 300 ml DEAE-FF (GE Healthcare, München) wurde mit einem Liter IEX-2-Puffer und einem Liter IEX-1-Puffer bei einer Flussrate von 10 ml/min equilibriert, und anschließend das gefilterte Dialysat mit einer Flussrate von 5 ml/min geladen. Durch Waschen mit IEX-1 Puffer wurden nicht gebundene Proteine eluiert, bis die Absorption bei 280 nm wieder den Basiswert erreicht hatte (ca. 1,5-2 Säulenvolumen). Gebundene Protein wurden isokratisch mit einer Mischung aus 50% IEX-1 und 50% IEX-2 bei einer Flussrate von 5 ml/min eluiert und der Proteinpeak gesammelt. Durch Dialyse zweimal für eine Stunde und schließlich über Nacht gegen 5 Liter IEX-1 Puffer wurde die Leitfähigkeit auf den Puffer IEX-1 eingestellt. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Dialysat erneut filtriert (Millipore HV Durapore Membrane, 0.45 µm).

D) Source15Q-Anionenaustauscherchromatographie

Eine XK-16 Säule mit 15 ml Source15Q (GE Healthcare, München) wurde mit 200 ml IEX-2 und 200 ml IEX-1-Puffer equilibriert, und anschließend der dialysierte DEAE-Pool mit einer Flussrate von 1,5 ml/min geladen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit IEX-1 Puffer eluiert, bis die Absorption bei 280 nm wieder den Basiswert erreicht hatte (ca. 1,5-2 Säulenvolumen). Gebunden Protein wurden durch einen linearen Gradienten von 100% IEX-1 zu 100% IEX-2 in 200 ml bei einer Flussrate von 1,5 ml/min eluiert und Fraktionen von 3 ml gesammelt. Pro Fraktion wurden 2,5 µl durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft, und die Coatomer-enthaltenden Fraktionen gesammelt. Analog zu C wurde mittels Dialyse die Leitfähigkeit von Puffer IEX-1 eingestellt.

E) Ankonzentration des Coatomer mittels einer 1 ml ResourceQ-Säule

Eine 1-ml-ResourceQ-Säule (GE Healthcare, München) wurde mit 20 ml IEX-2 und 20 ml IEX-1-Puffer equilibriert, und anschließend der dialysierte Source15Q-Pool mit einer Flussrate von 0,25 ml/min geladen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit IEX-1 Puffer eluiert, bis die Absorption bei 280 nm wieder den Basiswert erreicht hatte (ca. 1,5-2 Säulenvolumen). Gebunden Protein wurden durch einen linearen Gradienten von 100% IEX-3 zu 100% IEX-4 in 8 ml bei einer Flussrate von 0,25 ml/min eluiert und Fraktionen von 300 µl gesammelt. Pro Fraktion wurden 0,5 µl durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft, und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Die Fraktionen wurden so vereint,

dass eine Konzentration von nicht unter 10 mg/ml erhalten wurde. Aliquots von 700 µg wurde bei -80°C gelagert.

Homogenisationspuffer HP-1:

Tris-HCl pH 7.4 @ 4°C	25 mM
KCl	500 mM
Saccharose	250 mM
EGTA-KOH	2 mM
DTT	1 mM
Roche Prot.Inhib.Tab	1/50 ml

Homogenisationspuffer HP-2:

Tris-HCl pH 7.4 @ 4°C	25 mM
EGTA-KOH	2 mM
DTT	1 mM
Roche Prot.Inhib.Tab	1/50 ml

Resuspensionspuffer RP-1:

Tris-HCl pH 7.4 @ 4°C	25 mM
KCl	200 mM
DTT	1 mM
Roche Prot.Inhib.Tab	1/50 ml

IEX-1:

Tris-HCl pH 7.4 @ 4°C	25 mM
KCl	200 mM
DTT	1 mM
Glycerin	10% (w/v)

IEX-2:

Tris-HCl pH 7.4 @ 4°C	25 mM
EGTA-KOH	1000 mM
DTT	1 mM
Glycerin	10% (w/v)

IEX-3:

Hepes-KOH pH 7.4 @ 4°C	25 mM
KCl	100 mM
DTT	1 mM
Glycerin	10% (w/v)

IEX-3:

Hepes-KOH pH 7.4 @ 4°C	25 mM
EGTA-KOH	1000 mM
DTT	1 mM
Glycerin	10% (w/v)

Die Complete-Proteaseinhibitor (EDTA-frei) Tabletten von Roche (Mannheim) wurden jeweils kurz vor Verwendung der Puffer zugegeben.

2.2.7 Präparation von humanem myristoylierten ARF1

A) Expression von hARF1

BL21-Star Zellen wurden mit dem Plasmid pRSF-Duet-NMT/hARF#2 transformiert und auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Zweimal 1 Liter NZCYM-Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und für neun Stunden bei 37°C

inkubiert, sodass sich die Zellen dauerhaft in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (OD_{600} unter 1). Mit dieser Vorkultur wurden sechs mal 2 Liter NZCYM-Medium mit je 330 ml angeimpft und bei 27°C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Nun wurden pro Liter Medium 10 ml der bei 37°C vorinkubierten Myristinsäurelösung zugegeben, und nach 5 min die Expression durch Zugabe von 3 ml 0.1M IPTG pro Liter Medium (0.3 mM final) induziert. Die Zellen wurden bei 27°C weiter bis zu einer OD_{600} von etwa 1,8 kultiviert (ca. 4 Stunden), und anschließen bei 5000 g für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die erhaltenen Pellets mit PBS gewaschen, in flüssigem Stichstoff schockgefroren und bis zur weitern Verarbeitung bei -80°C gelagert.

B) Präparation: (alle Schritte wurden soweit nicht anders angegeben bei 4°C durchgeführt)

1) Gewinnung des Bakterienlysats:

Die gefrorenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in 50 ml Aufschlusspuffer A resuspendiert. Die Homogenisierung erfolgt mittels EmulsiFlex C5 (Avestin, Mannheim) bei 8000-12000 psi in 4-8 Passagen, bis ein helles dünnflüssiges Lysat erhalten wurde. Zur Abtrennung der Membranen wurde das Homogenat 10 min bei 20000 g zentrifugiert (SS-34 Rotor von Sorvall, Langenselbold), und anschließend der Überstand für 60 min bei 160000 g ultrazentrifugiert (Beckman 50.2 Ti Rotor). Der klare Überstand wurde mit Puffer B auf genau 200 ml gebracht.

2) Ammoniumsulfatpräzipitation (35%) (ASP)

Unter leichtem Rühren auf Eis wurde die Ammoniumsulfatkonzentration innerhalb von 45 min langsam auf 35% eingestellt. Dazu wurden für 200 ml genau 38,8 g $(NH_4)_2SO_4$ fein pulverisiert, und die ersten 50% innerhalb von 15 min, der Rest innerhalb von 30 min zugegeben. Anschließend wurde noch eine weitere Stunde auf Eis gerührt, wodurch eine bräunlich trübe Suspension entstand. Das Präzipitat wurde für 20 min bei 8000 g pelletiert (SLC-1500 Rotor von Sorvall) und je nach Größe des erhaltenen Pellets in Puffer C so resuspendiert, dass das Endvolumen 5-10 ml betrug. Die Leitfähigkeit wurde nun mit Hilfe von PD-10 Säulen (GE Healthcare, München) auf unter 2 mS/cm gebracht. Dazu wurden die PD-10 Säulen mit je 25 ml PD-10 Puffer D equilibriert und pro Säule 2,5 ml des resuspendierten ASP-Pellets geladen. Die gebundenen Proteine wurde pro Säule mit 3,5 ml PD-10 Puffer D eluiert

und pro 7 ml Eluat weitere 3 ml H_20 zugegeben. Vor der weiteren Verwendung wurde die Leitfähigkeit überprüft.

3) DEAE-Anionenaustauschchromatographie:

Eine 5 ml HiTRAP-DEAE-FF Säule (Amersham/GE Healthcare, München) wurde mit 15 ml Puffer-E, gefolgt von 25 ml PD-10 Puffer-D, 25 ml Puffer-F und abschließend 25 ml PD-10 Puffer-D bei einer Flussrate von 0,5 ml/min equilibriert, bis die Leitfähigkeit stabil unter 2 mS/cm und der pH Wert bei 8 lagen. Das Eluat der PD-10-Säulen wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min geladen, wobei pro Durchlauf nicht mehr als 10 ml geladen wurden. Nicht gebundene Proteine wurden mit 3-5 Säulenvolumen PD-10 Puffer-D von der Säule gewaschen bis die Absorption bei 280 nm wieder den Basiswert erreicht hatte. Gebundene Proteine wurden durch einen linearen Gradienten von 100% PD-10 Puffer-D zu 100% Puffer-F in 50 ml bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert und Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. Pro Fraktion wurden 5 µl durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft, und die hARF1-enthaltenden Fraktionen gesammelt. Das in den ersten 8-10 Fraktionen eluierende hARF1 hatte mit einer Konzentration von ca. 1 mg/ml eine Reinheit von über 90% und eine Myristoylierungsrate von 80-95%. Aliquots von 70 µg wurden bei -80°C gelagert.

Lösungen und Puffer:

IPTG:	0,1M (0.3mM final)
Na-Myristat: (Sigma-Aldrich)	0,25 g in 10 ml 37°C warmes H_2O geben und zum lösen auf 50°C bringen.
100x Myristat/BSA Lsg:	124,5 ml H_2O auf 37°C erwärmen. Zugabe von 18 ml 30% fettsäurefreie BSA Lösung (Sigma). 7,5 ml der 50°C warmen Na-Myristat Lösung zugeben. Die Lösung nie unter 37°C kommen lassen.

Aufschlusspuffer A:

Tris-HCl pH 8 @ 4°C	50 mM
DTT	1 mM
$MgCl_2$	1 mM
GDP	1 mM
PMSF	1 mM
Pepstatin A	0,4 µg/ml
Roche Prot.Inhib.Tab	1/50 ml

Puffer B:

Tris-HCl pH 8 @ 4°C	50 mM
DTT	1 mM
$MgCl_2$	1 mM

PD-10 Puffer D:

Tris-HCl pH 8 @ 4°C	10 mM
DTT	1 mM
$MgCl_2$	1 mM

Equilibrierungspuffer E:

Tris-HCl pH 8 @ 4°C	250 mM
DTT	1 mM
$MgCl_2$	1 mM

Elutionspuffer F:

Tris-HCl pH 8 @ 4°C	10 mM
DTT	1 mM
$MgCl_2$	1 mM
KCl	1 M

2.2.8 Aufreinigung von His_6-Sar1H79G

Die Aufreinigung erfolgt prinzipiell wie in Aridor et al., 1995 beschreiben.

A) Expression von His_6-Sar1H79G:

BL21-Star Zellen wurden mit dem Plasmid pET11d-Sar1a(H79G) transformiert und auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. 5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 250 ml LB-Medium wurden mit diesen 5 ml inokuliert, bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert, und anschließende die Expression durch Zugabe von 0,1 mM (final) IPTG induziert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen bei 5000 g für 20 min pelletiert, der Überstand verworfen, und das Pellet mit PBS gewaschen.

B) Lyse und Aufreinigung:

Die gewaschenen Zellpellets wurden in 25 ml Lysepuffer resupendiert und mittels EmulsiFlex C5 (Avestin, Mannheim) bei 8000-12000 psi in 4-8 Passagen lysiert. Zur Abtrennung der Membranen wurde das Homogenat 30 min bei 30000 g zentrifugiert (SS-34 Rotor von Sorvall, Langenselbold). Der Überstand wurde mit 0,5 ml Ni-NTA beads (HisTrap HP, Amersham biosciences, Freiburg), welche mit Lysepuffer equilibriert waren, für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die beads wurden 10 min bei 1000 g pelletiert, dreimal mit 40 ml Waschpuffer gewaschen und in eine 5 ml Einmalsäule von BioRad (München) gegeben. His_6-Sar1H79G wurde durch Zugabe von Elutionspuffer eluiert und in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Unter Verwendung von PD-10 Säulen wurden die vereinten Sar1H79G Fraktionen nach Herstellerangaben in PBS-G umgepuffert.

Lysepuffer (pH 7,4):

Na2HPO4	35,7 mM
KH2PO4	14,3 mM
NaCl	286 mM
KCl	3 mM
DTT	1 mM
GDP	1 mM
Imidazol	20 mM
Roche Prot.Inhib.Tab	1/50 ml

Waschpuffer (pH 7,4):

Na2HPO4	35,7 mM
KH2PO4	14,3 mM
NaCl	286 mM
KCl	3 mM
DTT	1 mM
GDP	1 mM
Imidazol	50 mM

Elutionspuffer (pH 7,4):

Na2HPO4	35,7 mM
KH2PO4	14,3 mM
NaCl	286 mM
KCl	3 mM
DTT	1 mM
GDP	1 mM
Imidazol	350 mM

PBS-G (pH 7,4):

Na2HPO4	35,7 mM
KH2PO4	14,3 mM
NaCl	136 mM
KCl	3 mM
GDP	10 µM

2.2.9 Isolierung von Golgi aus Ratten Leber

Die Isolierung von Golgi aus Ratten Leber erfolgte nach einem Protokoll von Hui et al. (Hui et al., 1998). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Sechs männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von durchschnittlich 200 g wurden für sechs Stunden auf Hunger gesetzt. Nach Narkotisierung mit Diethylether wurden sie durch zervikale Dislokation getötet, ausgeblutet und die Lebern entfernt. Nachdem diese zweimal mit Puffer A gewaschen wurden, wurden sie mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten, erneut mit Puffer A gewaschen und anschließend der Puffer durch Verbandsmull möglichst quantitativ abgegossen. Die Homogenisierung erfolgt mit Hilfe eines Stahlsiebs mit einem Maschendurchmesser von 150 µm. Die Leberstücke wurden dazu unter leichtem Druck auf dem Sieb zerrieben und währenddessen kontinuierlich mit insgesamt 25 ml Homogenisierungpuffer gemischt. Je 13 ml Homogenat wurden auf Gradienten von 7,5 ml 38% Saccharose und 13 ml 26,5% Saccharose gelegt und anschließend mit 3 ml 9% Saccharose überschichtet. Durch Zentrifugation für eine Stunde bei 100000 g (SW-28 Rotor, Beckman) wurde der Golgi in der Interphase von 26,5% Saccharose und der ehemaligen Homogenatschicht gesammelt und abgenommen. Durch Mischen mit Puffer B wurde die Saccharose Konzentration der gewonnen Interphase auf 9-10% eingestellt und anschließend je ¼ über einen zweiten

Gradienten mit folgender Zusammensetzung geschichtet: 500 µl 38%; 150 µl 26,5% und 750 µl 12%. Nach Zentrifugation für 20 min bei 6000 g in einem SW41-Rotor (Beckman) wurde eine weiße Schicht aus Golgi in sehr hoher Konzentration von 5-7 mg/ml in der Interphase zwischen 26,5% und 12% Saccharose gesammelt. Dieser wurde vorsichtig abgenommen, in Aliquots von 1,5 mg in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Puffer A (pH 6,7):

Kaliumphosphatpuffer	0,1 M
Saccharose	0,5 M
$MgCl_2$	5 mM

Homogenisierungspuffer (pH 6,7):

Kaliumphosphatpuffer	0,1 M
Saccharose	0,5 M
$MgCl_2$	5 mM
PMSF	1 mM
Pepstatin A	4 µg/ml
Roche Prot.Inhib.Tab	1/50 ml

Puffer B (pH 6,7):

Kaliumphosphatpuffer	0,1 M
$MgCl_2$	5 mM

9% Saccharoselösung (pH 6,7):

Kaliumphosphatpuffer	0,1 M
Saccharose	0,25 M
$MgCl_2$	5 mM

12% Saccharoselösung (pH 6,7):

Kaliumphosphatpuffer	0,1 M
Saccharose	0,36 M
$MgCl_2$	5 mM

26,5% Saccharoselösung (pH 6,7):

Kaliumphosphatpuffer	0,1 M
Saccharose	0,86 M
$MgCl_2$	5 mM

38% Saccharoselösung (pH 6,7):

Kaliumphosphatpuffer	0,1 M
Saccharose	1,3 M
$MgCl_2$	5 mM

2.2.10 Isolierung von Golgi aus CHO-Zellen

Zur Isolierung von Golgi aus den CHO Zelllinien, welche p24-Fusionskonstrukte expremierten, wurden 12 Liter Spinnerkultur mit einer Zelldicht von ca. 5-10x10^5 Zellen/ml eingesetzt. Die Zellen wurden für 20 min bei 500 g pelletiert, der Überstand verworfen, und die Zellpellets zweimal mit PBS und einmal mit Aufschlusspuffer gewaschen. Vor der Homogenisierung wurden die Zellpellets im vierfachen Volumen Aufschlusspuffer resupendiert und durch Rühren für 30 min bei 4°C die Zellen weiter vereinzelt. Die Homogenisierung erfolgt mit einem Balch-

Homogenisator und wurde durch Anfärben der Proben mit Trypanblau im Mikroskop überprüft. War ein Aufschluss von 90% der Zellen erfolgt, wurde die Saccharose-konzentration des Homogenats mit Hilfe einer 62%igen-Saccharoselösung auf 37% erhöht. Zusätzlich wurde durch Zugabe einer 100 mM EDTA-Lösung eine EDTA-Konzentration von 0,1 mM eingestellt. 11 ml des Homogenats wurden in SW28-Zentrifugenröhrchen mit 15 ml einer 35%igen-Saccharoselösung und 9 ml eine 29%igen-Saccharoselösung überschichtet. Durch 2,5-stündige Zentrifugation bei 100000 g (SW28 und SW32.1 Ti Rotoren, Beckman) wurde der Golgi in der Interphase zwischen der 35% und 29% Saccharoseschicht gesammelt. Die gezapften, golgiangereicherten Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

PBS (pH 7,4):

Na2HPO4	35,7 mM
KH2PO4	14,3 mM
NaCl	136 mM
KCl	3 mM

Aufschlusspuffer (pH 7,4):

Tris-HCl pH 7,4 @ 4°C	25 mM
Saccharose	250 mM

Alle Saccharoslösungen waren mit 25 mM Tris-HCl pH 7,4 gepuffert.

2.2.11 Herstellung fluoreszenzmarkierter COPI-Vesikel

A) Färbung der Golgi Membranen

Zur Färbung der Golgi Membranen wurden ca. 300 µl Golgi (1,5 mg) mit 60 µl 0,5 M Hepes-Puffer pH 7,4 und 15 µl einer Alexa-Fluor®-488-NHS-Ester Lösung (Invitrogen, Karlsruhe, #A2000; 10 mg/ml in DMSO) versetzt und der Reaktionsansatz für eine Stunde auf Eis vor Licht geschützt inkubiert. Freie, nicht reagiert NHS-Ester wurden durch 10-minütige Inkubation mit 50 mM NH_4Cl (finale Konzentration) abgefangen und anschließend die Salzkonzentration durch Zugabe von 75 µl 3 M KCl auf 500 mM erhöht. Durch Verdünnen mit 750 µl Puffer A wurde die Saccharose-Konzentration auf 9% verringert und die Membranen durch einen Gradienten von freiem Farbstoff getrennt. Dazu wurden die Lösung über einen Gradienten folgender Zusammensetzung geschichtet: 150 µl 12%, 20 µl 17%, 20 µl 20%, 10 µl 23%, 5 µl 25% und 5 µl 30% Saccharose. Der Gradient wurde für 10 min bei 12000 rpm in einem TLS 55 Rotor (Beckman) unter Verwendung von TLA 45

Röhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, mit 500 µl 12% Saccharose vorsichtig ersetzt und wieder verworfen, um sämtlichen freien Farbstoff abzutrennen. Die gefärbten Membranen wurden in 12% Saccharose resupendiert und auf ein Volumen von 200 µl gebracht.

B) Vesikelreaktion

Die 200 µl gefärbter Golgi wurden im folgenden Ansatz zur Vesikelgeneration eingesetzt.

- 50 µl 10x Assaypuffer (250 mM Hepes/KOH, pH 7.0; 25 mM MgAc)
- 50 µl ATP regenerierendes System (10 mM ATP, 10 mM DTT, 40 mM Kreatin Phosphat, 0,2 mg/ml Kreatine-Kinase)
- 25 µl 2 M Saccharose
- 6 µl 100 mM GTP
- 5.3 µl 3 M KCl
- 23,7 µl H_2O
- 70 µl Coatomer (ca. 700 µg)
- 70 µl ARF (ca. 70 µg)
- 200 µl gefärbter Golgi (1.5 mg)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 500 µl und enthielt 100 mM KCl, 1.2 mM GTP, 9% Saccharose, 25 mM Hepes pH 7,0, 2,5 mM MgAc, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 4 mM Kreatine-Phosphate sowie 0,02 mg/ml Kreatine-Kinase. Nach Inkubation für 10 min bei 37°C wurde durch Zugabe von 500 µl eiskaltem Puffer B die Reaktion gestoppt und die Salzkonzentration auf 250 mM erhöht.

C) Aufreinigung der fluoreszierenden Vesikel

Der verdünnte Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 14000 g zentrifugiert, um die Golgi-Membranen zu pelletieren, und der Überstand in einem VTi 65.1 Röhrchen auf eine Gradienten folgender Zusammensetzung gelegt: 2 ml 55%; 0,25 ml 50%; 0,25 ml 37,5%; 1,5 ml 35% und 1,5 ml 30%. Das Röhrchen wurde mit Puffer C gefüllt, zugeschweißt und der Gradient bei 400000 g für 2,5 Stunden in einem Vertikalrotor VTi 65.1 zentrifugiert. Zum Sammeln der Fraktionen wurde das Röhrchen vorsichtig unten angestochen und mit einer Pumpe langsam von oben mit H_20 gefüllt. Die ersten 1,5 ml wurden dabei in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und anschließend pro Fraktion drei Tropfen (ca. 100-150 µl) gesammelt. Die Fraktionen zwischen 38-45% Saccharose wurden zur Ankonzentrierung vereint (ca. 500-700 µl).

D) Ankonzentrierung der Vesikel

Die vereinten Vesikelfraktionen wurden mit 1 ml Assaypuffer der 150 mM KCl und 1,5 mg/ml BSA enthielt verdünnt und in einem TLA 45 Röhrchen mit jeweils 5 µl der 50%, 45% und 38% Saccharoselösungen unterschichtet, die ebenfalls 150 mM

KCl und 1 mg/ml BSA enthielten. Für eine effiziente Ankonzentrierung war es dabei entscheidend, dass die einzelnen Schichten scharf voneinander getrennte waren. Dieser Gradient wurde anschließend für eine Stunde bei 100000 g in einem SW55 Rotor zentrifugiert, wodurch sich die Vesikel zwischen der 38% und 45% Schicht ansammelten. Der nach der Zentrifugation sichtbare Ring an fluoreszierenden Vesikel wurde mit einer langen Ladepipettenspitze in einem möglichst kleinen Volumen abgenommen (ca. 5 bis max. 10 µl), mit Assaypuffer, welcher 1 mg/ml BSA und 150 mM KCl enthielt, 1:1 verdünnt und in 5 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weitern Verwendung wurden die Vesikelproben bei -80°C gelagert.

Alternative zum angegeben Farbstoff Alexa-Fluor®-488-NHS-Ester konnte auch der Farbstoff Alexa-Fluor®-568-NHS-Ester (Invitrogen, Karlsruhe; Nr. A20003) zur Färbung der Golgi-Membran verwendet werden.

Verdünnungspuffer A:

Hepes pH 7,0	25 mM
KCl	500 mM
MgAcetat	2,5 mM

Stoppuffer B:

Hepes pH 7,0	25 mM
KCl	400 mM
MgAcetat	2,5 mM
Saccharose	9 %

Füllpuffer C:

Hepes pH 7,0	25 mM
KCl	250 mM
MgAcetat	2,5 mM
Saccharose	9 %

Die Saccharoselösungen zum Abtrennen des freien Farbstoffs von den Golgi-Membranen enthielten jeweils 25 mM Hepes pH 7,0, 2,5 mM Mg-Acetat und 100 mM KCl. Die übrigen Saccharoselösungen enthielten 25 mM Hepes pH 7,0, 2,5 mM Mg-Acetat sowie 150 mM KCl.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Allgemeine Puffer und Bedingungen

Alle Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO2 in Brutschränken der Firme Haereus (Hanau) kultiviert. Zum Umsetzten der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS_{tc} gewaschen und pro 10 cm Schale 1-2 ml einer Lösung aus 0,2% (w/v) Trypsin und 0,08% (w/v) EDTA zugegeben. Die Zellen wurden solange mit Trypsin inkubiert, bis sie sich von der Schale ablösten und anschließend mit 9 ml Medium aufgenommen. Die Verdünnung der neu ausgesäten Zellen hing von den durchgeführten Experimenten ab und lag zwischen 1:3 bis 1:20.

PBS_{tc} (pH 7,4):

Na_2HPO_4	8,1 mM
KH_2PO_4	1,1 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM

2.3.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zellen einer ca. 80% konfluenten 10 cm Schale wurden trypsiniert und in 9 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie 5 min bei 500 g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 1,35 ml Medium welches 20% FCS enthielt resuspendiert. Die Zellsupension wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und mit 150 µl DMSO (10% v/v finale Konzentration) gemischt. Diese wurden nun für vier Stunden bei 4°C gelagert und anschließend in einer Kryobox zu -80°C überführt. Sollten die Zellen für mehr als 3 Monate gelagert werden, wurden sie nach 2 Tagen weiter in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie im 37°C Wasserbad rasch aufgetaut und in 20 ml Medium überführt. Nach Pelletieren für 5 min bei 500 g wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine 10 cm Schale überführt.

2.3.3 Elektroporation von Vero-Zellen

Die Elektroporation der Vero Zellen erfolgte nach eine abgeänderten Protokoll von Dr. Irina Majoul (Majoul et al., 2001). Dazu wurden Zellen einer konfluenten 10 cm Schale trypsiniert, in 10 ml PBS_{tc} aufgenommen und dreimal mit PBS_{tc} gewaschen. Anschließend wurde das PBS_{tc} möglichst quantitativ entfernt und die Zellen vorsichtig in 300 µl IM-Puffer resuspendiert. 7,5-15 µg der jeweiligen Plasmid-DNA wurden in einer 4 mm Elektroporationsküvette der Firma BioRad (München) vorgelegt und mit der Zellsuspension vermischt. Die Elektroporation erfolgt mit Hilfe des Gene Pulser® II Systems der Firma BioRad (München). Bei der Verwendung einer Spannung von 600 V und eine Kapazität von 50 µF kam es zu Elektroporationspulsen von 1,8 bis 2,2 msec. Nachdem die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur ruhten, wurden sie in eine 10 cm Schale mit Deckgläsern überführt. Üblicherweise resultierte diese Durchführung in Überlebensraten von 30-70% und Transfektionseffizienzen von 50 bis 90%.

IM-Puffer (pH 7,2):

K_2HPO_4	10 mM
K-Glutamat	100 mM
EGTA	2 mM
$MgCl_2$	5 mM
$CaCl_2$	0,15 mM
Hepes	25 mM
ATP	0,2 mM (frisch dazu geben)

2.3.4 Retrovirale Transduktion von CHO-Zellen

Die retrovirale Transduktion der CHO-MCAT-TAM-CD2 Zellen wurde unter Verwendung des pVPack-Vector®-Systems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Jeweils 10 µg der Plasmide pVPack-GP, pVPack-Eco sowie des entsprechenden pRTi-basierenden Plasmids wurden zusammen wie unter V.2.1.5 beschreiben gereinigt und sterilisiert. Anschließend wurden HEK293T Zellen mit diesen Plasmiden unter Verwendung des „MBS-Mammalian-Transfection-Kit®“ von Stratagene (Heidelberg) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Das zu Beginn verwendete MBS-haltige Medium enthielt zusätzlich 25 µM Chloroquin und wurde nach dreistündiger Inkubation mit FCS-haltigem Medium, welches ebenfalls 25 µM

Chloroquin enthielt ausgetauscht. Nach weiteren 6-7 Stunden wurde dieses wiederum gegen Chloroquin-freies Medium ausgetauscht und die Zellen über Nacht inkubiert. Nach erneutem Austausch des Mediums wurden die HEK293T Zellen zur Virusproduktion für 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

Der Virus-enthaltende Überstand wurde abgenommen, mittels eines 0,45 µm Filters von Zellresten gereinigt und eine finale Konzentration von 10 µg/ml DEAE-Dextran eingestellt. Eine 30% konfluente 10 cm Schale mit CHO-MCAT-TAM-CD2 Zellen, wurde von Medium befreit und mit PBS_{tc} gewaschen. Diese Zellen wurden anschließend mit 1,5 ml des Virus-enthaltenden Überstandes versetzt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 8,5 ml von αMEM/10%FCS wurden die Zellen vor der weiteren Verwendung für mindestens 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.3.5 Präparative FACS-Sortierung

Die Expression der Fusionskonstrukte in den transduzierten Zellen wurde einen Tag vor der FACS-Sortierung mit 1 µg/ml Doxicyclin induziert. Zur weiteren Vorbereitung der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS_{tc} gewaschen und durch 10-minütige Inkubation mit 1 ml CDB-Puffer (Gibco BRL, Eggenstein) bei 37°C abgelöst. Alle weitern Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 500 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Sortierungs-Medium resuspendiert und zur Anfärbung toter Zellen mit 1 µl Propidium-Iodid (1 mg/ml) versetzt (Invitrogen, Karlsruhe). Nachdem diese Suspension durch *cell-strainer-cups* in die FACS-Röhrchen überführt war, wurde die Sortierung der Zellen mit dem Gerät FACS-Vantage® von Becton-Dickinson (Heidelberg) durchgeführt. Pro Sortierungsschritt wurden 10000-100000 Zellen in 6-well-Schalen gesammelt. Zur Generierung monoklonaler Zelllinien wurden individuelle Zellen in 96-well-Schalen vereinzelt. Die Anregung des CFP erfolgt mit Hilfe der 406 nm Laserlinie, die von YFP durch die 488 nm Linie des Argonlasers.

Sortierungs-Medium:

α-MEM (ohne FCS) +
5% (v/v) CDB-Puffer

2.3.6 Immunfluoreszenz

Die mit den Zellen bewachsenen Deckgläser wurden kurz dreimal in PBS_{tc} gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur mit 3% PFA in IF-PBS fixiert. Wurde keine weitere Anfärbung mit Antikörpern durchgeführt, folgten zwei Waschschritte für 10 min mit IF-PBS, worauf die Proben kurz mit H_2O gespült und mit Mowiol eingedeckelt wurden. (pro 13 mm Deckglas 6 µl Mowiol)

Zum Anfärben mit Antikörpern wurden die Zellen nach der Fixierung für 5 min mit 0,5% Trition X-100 in IF-PBS permeabilisiert und anschließend 15 min mit 5% BSA in IF-PBS blockiert. Die so vorbereiteten Proben wurden nun mit den entsprechenden Primärantikörpern für 30 min inkubiert. Die Verdünnung mit 5% BSA in IF-PBS richtete sich nach dem Antikörper und ist in Abschnitt 1.2.1 angegeben. Zur Anfärbung mehrerer Proteine wurden die Proben mit den Antikörpern einzeln und nacheinander inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurden die Zellen jeweils zweimal für 10 min mit IF-PBS gewaschen. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern welche ebenfalls mit 5% BSA in IF-PBS verdünnt waren. Nach abschließendem zweimaligem Waschen für 10 min in IF-PBS wurden die Proben kurz mit H_2O gespült und mit Mowiol eingedeckelt.

5x IF-PBS:

Na_2HPO_4	455 mM
NaH_2PO_4	45 mM
NaCl	750 mM
KCl	12,5 mM

Mowiol:

Glycerol	6 g
Mowiol 4-88	2,4 g
in 6 ml H2O	2 h bei RT
+ 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5	1h bei 53°C

20 min Zentrifugation bei 5000 g
Überstand bei -20°C lagern

2.3.7 Brefeldin A Behandlung

Vero Zellen einer konfluenten 10 cm Schalen wurden mit je 15 µg der beiden Plasmide pECFP-p24 und pEYFP-p23 elektroporiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Nach vier Stunden wurden tote und nicht adherierte Zellen durch Wechsel des Mediums entfernt und die übrigen Zellen weitere zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden das Medium durch Reaktionsmedium ersetzt, die Zellen für 15, 30 und 60 min bei 37°C inkubiert und wie unter V.2.3.6 fixiert und zur

Messung der FRET-Effizienzen eingedeckelt. Das Reaktionsmedium enthielt 5 µg/ml BFA (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) sowie 10 µg/ml Cycloheximid (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) um die weiter Expression der p24-Konstrukte zu stoppen.

2.3.8 AlF_4^- Behandlung

Vero Zellen einer konfluenten 10 cm Schalen wurden mit je 15 µg der beiden Plasmide pECFP-p24 und pEYFP-p23 elektroporiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Nach vier Stunden wurden tote und nicht adherierte Zellen durch Wechsel des Mediums entfernt und die übrigen Zellen weiter zwei Stunden inkubiert. Zur Präparation der 10x AlF_4^- Lösung wurden eine 1 mM $AlCl_3$- und eine 600 mM NaF- Lösung kurz vor der Zugabe zum Medium 1:1 gemischt. Die finale Konzentration betrug somit 30 mM NaF und 50 µM $AlCl_3$ respektive 50 µM AlF_4^-. Durch Zugabe von Cycloheximid (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) in einer finalen Konzentration von 10 µg/ml wurde zusätzlich die Expression der p24-Konstrukte gestoppt. Die Zellen wurden für 15, 30 und 60 min bei 37°C inkubiert und wie unter V.2.3.6 fixiert und zur Messung der FRET-Effizienzen eingedeckelt.

2.3.9 Nocodazol Behandlung

30 min vor Mikroinjektion wurden die Zellen mit Nocodazol in einer finalen Konzentration von 0,2 µg/ml versetzt und bei 37°C inkubiert. Das Nocodazol (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) war mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml in DMSO gelöst, so dass die finale DMSO Konzentration bei nur 0,1% lag. Die Mikroinjektion sowie anschließende Inkubation erfolgten ebenfalles in Anwesenheit von 0,2 µg/ml Nocodazol.

2.3.10 Mikroinjektion von Sar1H79G

Zu 50 µl einer 2,5 mg/ml enthaltenden Sar1H79G-Lösung (Sar1dn) wurden 2 µl Dextran-Cascade-blue (Invitrogen, Karlsruhe) (50 mg/ml) in einer finalen

Konzentration von 2 mg/ml gegeben. Diese Lösung wurde für 20 min bei 100000 g zentrifugiert (45000 rpm; TLA 45 Rotor der Firma Beckman). Die Mikroinjektion erfolgte unter Verwendung der Femtotips II (Eppendorf, Hamburg) mit Hilfe des Microinjector 5242 sowie dem Micromanipulator 5171 von Eppendorf (Hamburg). Der konstante Druck P3 betrug dabei je nach Injektionsnadel ca. 30-50 mbar, der Injektionsdruck P2 ca. 80-100 mbar. Nach erfolgter Mikroinjektion wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivität des Sar1dn wurde durch Immunfluoreszenz gegen p23 überprüft, welches dadurch in das ER relokalisiert (siehe auch Emig, 2001).

2.3.11 Mirkoinjektion von COPI-Vesikeln

A) Vorbereitung der Mikroinjektionsnadel.

Eine 12% Saccharoselösung wurde mit BSA in einer finalen Konzentration von 2 mg/ml versetzt und für 30 min bei 100000 g zentrifugiert (TLA 45 Rotor, Beckman). Ca. 5 µl des Überstandes wurden in eine Femtotip II Mikroinjektionsnadel (Eppendorf, Hamburg) geladen und die Spitze dieser, vorsichtig durch Aufsetzten auf die Deckglasoberfläche, abgebrochen. Die Funktionalität der abgebrochenen Spitze, sowie der nun benötigte Injektionsdruck wurden durch Probeinjektionen in BSC-1 Zellen überprüft. Anschließend wurde die Nadel leer geblasen und bis zur weitern Verwendung vorsichtig gelagert.

B) Vorbereitung der Deckgläser.

Zur besseren Lokalisierung des injizierten Bereichs wurde mit einem Diamantstift ein Rechteck auf die Deckgläser geritzt. Die Zelldichte auf diesen betrug zwischen 40 und 70%.

C) Injektion der Vesikel.

Die gefrorenen Vesikel wurden rasch aufgetaut und anschließend auf Eis gelagert. Eine 200 µl Pipettenspitze wurde in der Bunsenbrennerflamme an der Spitze zugeschweißt. 2,5 µl der Vesikelprobe wurden in diese Pipettenspitze gegeben und für eine Minute bei 12000 rpm in einem TLS 55-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wurde in die vorbereitete Injektionsnadel gegeben. Die Injektion erfolgte mit Hilfe des Microinjector 5242 sowie dem Micromanipulator 5171 von Eppendorf (Hamburg), wobei die verwendeten Drück von der Nadel abhingen und unter A bestimmt wurden. Pro Deckglas wurden ca. 100 Zellen innerhalb ca.

15 min injiziert. Vor einer weitern Behandlung der Zellen wurden diese für 30 min bei 37°C inkubiert.

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Mikroskopie

Soweit nicht anders angegeben wurden alle mikroskopischen Bilder mit dem konfokalen Mikroskop LSM-510-meta der Firma Zeiss (Oberkochen) aufgenommen. Die Epifluoreszenz Bilder wurden an dem inversen Mikroskop Axiovert 200 M unter Verwendung der Kamera AxioCam MR sowie der Software Axiovision 4.6 der Firma Zeiss (Oberkochen) aufgenommen.

2.4.2 FRET-Messungen

Die Durchführung der FRET Messung mittels der Akzeptor-Photobleich-Methode am Mikroskop LSM-510-meta erfolgt nach folgendem Prinzip. Verwendet wurde das 40x Ölobjektiv, bei einem 4-fachen Zoom sowie einer Framegröße von 512x512 Bildpunkten. Die Bestimmung der optimalen Bildebene, des Zoombereichs und der zu bleichenden Region wurde unter Belichtung des Akzeptors YFP durchgeführt. Zur Aufnahme der Bilder wurden die einzelnen Bildlinien je viermal gescannt um den Rauschanteil zu minimieren. Der Bleichprozess erfolgt unter maximaler Laserleistung mit der Argon-Laserlinie 514 nm bei 48-facher Wiederholung in der vorher definierten Region. Zur späteren Berechnung der FRET-Effizienz im geblichenen Bereich wurden sowohl von CFP als auch YFP vor und nach Bleichen je eine Aufnahme gemacht. Um Schwankungen der Laserleistung zu vermeiden wurde dieser für mindestens 30 min vor der Messung bei 5,9 A betrieben.

2.4.3 Bestimmung der FRET-Effizienz

Die Bildbearbeitung zur Auswertung der FRET-Effizienzen erfolgte mit Hilfe des Programms Image J, in der Version der *Wright Cell Imaging Facility* (Toronto, Kanada; http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/). Mit Hilfe des *ROI Managers* wurde zuerst aus den YFP Bildern die geblichene Region bestimmt und anschließend das CFP-Bild *nach-Bleichen* zur Erstellung einer Maske dupliziert. Dieses wurde durch einen *Median-Filter* mit einem Radius von zwei Bildpunkten geglättet, und anschließend durch Anwendung eines *Thresholds* die zu untersuchenden Strukturen vom Hintergrund abgetrennt. Die Hintergrundsbildpunkte dieser Maske hatten somit einen Wert von 0, die Bildpunkte der Strukturen einen Wert von 1. Die unveränderten CFP-Bilder *vor-* und *nach-Bleichen* wurden mit dieser Maske multipliziert, und die Hintergrundsbildpunkte durch einen weiteren *Threshold* als nicht definiert (NaN) gesetzt. Nun wurde das Bild *vor-Bleichen* von dem *nach-Bleichen* subtrahiert und das resultierende Bild durch das *nach-Bleichen* dividiert. Das so erhaltene Bild stellte die FRET-Effizienzen der einzelnen Bildpunkte dar. Die Verteilung der FRET-Effizienzen in der geblichenen Region (*ROI*) wurde als Histogramm mit einer bin-Größe von 66 im Bereich von -99% bis 100% dargestellt. Die erhaltenen Werte wurden zur weiteren Berechung verwendet.

Die Trennung der Rauschverteilung von der FRET-Verteilung erfolgt mit dem Programm Origin 6.0 der Firma Microcal (Northampton MA, USA). Die Rauschverteilung wird durch eine logarithmische Normal-Verteilung nach Gleichung 1, die FRET-Verteilung durch eine Gauß-Verteilung nach Gleichung 2 beschrieben.

$$y_n(x) = y_0 + \frac{A_n}{\sqrt{2\pi}\sigma_n x} e^{-\ln(\frac{x}{\bar{x}})^2 / 2\sigma_n^2}$$

Gleichung 1: die Rauschverteilung

$$y_s(x) = y_n(x) + \frac{A_s}{\sqrt{\pi/2}\sigma_s} e^{-2\frac{(x-\bar{x})^2}{\sigma_s^2}}$$

Gleichung 2: die FRET-Verteilung

Die Trennung der beiden Anteile wurde durch nicht lineare Kurvenanpassung durchgeführt. Die Signifikanz der Anpassung wurde durch den R^2 Faktor überprüft, der einen Wert von über 0,99 betragen musste.

VI. Literaturverzeichnis

Abeijon, C., and C.B. Hirschberg. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*. 17:32-6.

Allan, V.J., H.M. Thompson, and M.A. McNiven. 2002. Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol*. 4:E236-42.

Altan-Bonnet, N., R. Sougrat, W. Liu, E.L. Snapp, T. Ward, and J. Lippincott-Schwartz. 2006. Golgi inheritance in mammalian cells is mediated through endoplasmic reticulum export activities. *Mol Biol Cell*. 17:990-1005.

Anderl, F. persönliche Mitteilung.

Aoe, T., E. Cukierman, A. Lee, D. Cassel, P.J. Peters, and V.W. Hsu. 1997. The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *Embo J*. 16:7305-16.

Aridor, M., S.I. Bannykh, T. Rowe, and W.E. Balch. 1995. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol*. 131:875-93.

Axelsson, M.A., and G. Warren. 2004. Rapid, endoplasmic reticulum-independent diffusion of the mitotic Golgi haze. *Mol Biol Cell*. 15:1843-52.

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

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.

Barr, F.A., and B. Short. 2003. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*. 15:405-13.

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*. 271:26939-46.

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

Bethune, J. 2006. The coat protein complex coatomer discriminates between ER-resident and constitutively cycling proteins. *Dissertation, Univeristät Heidelberg*.

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

Bethune, J., F. Wieland, and J. Moelleken. 2006b. COPI-mediated transport. *J Membr Biol*. 211:65-79.

Bi, X., R.A. Corpina, and J. Goldberg. 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*. 419:271-7.

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

Bigay, J., P. Gounon, S. Robineau, and B. Antonny. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature*. 426:563-6.

Blagitko, N., U. Schulz, A.A. Schinzel, H.H. Ropers, and V.M. Kalscheuer. 1999. gamma2-COP, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome. *Hum Mol Genet*. 8:2387-96.

Blobel, G., and B. Dobberstein. 1975a. 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*. 67:835-51.

Blobel, G., and B. Dobberstein. 1975b. Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*. 67:852-62.

Blobel, G., and V.R. Potter. 1967a. Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. I. Distribution as related to total cellular RNA. *J Mol Biol*. 26:279-92.

Blobel, G., and V.R. Potter. 1967b. Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. II. Interaction of ribosomes and membranes. *J Mol Biol*. 26:293-301.

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*. 271:17183-9.

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 (Pt 4):537-48.

Boehm, M., and J.S. Bonifacino. 2001. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell*. 12:2907-20.

Bonifacino, J.S., and B.S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116:153-66.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

Bremser, M., 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.

Bukau, B., and A.L. Horwich. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92:351-66.

Carney, G.E., and N.J. Bowen. 2004. p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: Drosophila melanogaster provides insights and opportunities. *Biol Cell*. 96:271-8.

Caro, L.G., and G.E. Palade. 1964. Protein Synthesis, Storage, and Discharge in the Pancreatic Exocrine Cell. an Autoradiographic Study. *J Cell Biol*. 20:473-95.

Chardin, P., S. Paris, B. Antonny, S. Robineau, S. Beraud-Dufour, C.L. Jackson, and M. Chabre. 1996. A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*. 384:481-4.

Chen, J.L., R.V. Fucini, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and M. Stamnes. 2005. Coatomer-bound Cdc42 regulates dynein recruitment to COPI vesicles. *J Cell Biol*. 169:383-9.

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

Cukierman, E., I. Huber, M. Rotman, and D. Cassel. 1995. The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science*. 270:1999-2002.

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.

Emery, G., R.G. Parton, M. Rojo, and J. Gruenberg. 2003. The trans-membrane protein p25 forms highly specialized domains that regulate membrane composition and dynamics. *J Cell Sci*. 116:4821-32.

Emery, G., M. Rojo, and J. Gruenberg. 2000. Coupled transport of p24 family members. *J Cell Sci*. 113 (Pt 13):2507-16.

Emig, E.M. 2001. Funktionelle Charakterisierung von Mitgliedern der p24 Proteinfamilie. *Dissertation, Univeristät Heidelberg*.

Eugster, A., G. Frigerio, M. Dale, and R. Duden. 2004. The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell*. 15:1011-23.

Fath, S., J.D. Mancias, X. Bi, and J. Goldberg. 2007. Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell*. 129:1325-36.

Feng, Y., S. Yu, T.K. Lasell, A.P. Jadhav, E. Macia, P. Chardin, P. Melancon, M. Roth, T. Mitchison, and T. Kirchhausen. 2003. Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:6469-74.

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.

Finazzi, D., D. Cassel, J.G. Donaldson, and R.D. Klausner. 1994. Aluminum fluoride acts on the reversibility of ARF1-dependent coat protein binding to Golgi membranes. *J Biol Chem*. 269:13325-30.

Förster, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys*. 2:57-75.

Franco, M., S. Paris, and M. Chabre. 1995. The small G-protein ARF1GDP binds to the Gt beta gamma subunit of transducin, but not to Gt alpha GDP-Gt beta gamma. *FEBS Lett*. 362:286-90.

Friedlander, R., E. Jarosch, J. Urban, C. Volkwein, and T. Sommer. 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2:379-84.

Fucini, R.V., J.L. Chen, C. Sharma, M.M. Kessels, and M. Stamnes. 2002. Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol Biol Cell*. 13:621-31.

Fullekrug, 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*. 10:1939-55.

Futatsumori, M., K. Kasai, H. Takatsu, H.W. Shin, and K. Nakayama. 2000. Identification and characterization of novel isoforms of COP I subunits. *J Biochem (Tokyo)*. 128:793-801.

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

Glick, B.S., and V. Malhotra. 1998. The curious status of the Golgi apparatus. *Cell*. 95:883-9.

Goldberg, J. 1998. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*. 95:237-48.

Goldberg, J. 1999. Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis. *Cell*. 96:893-902.

Goldberg, J. 2000. Decoding of sorting signals by coatomer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell*. 100:671-9.

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*. 447:179-85.

Gommel, D.U., A.R. Memon, A. Heiss, F. Lottspeich, J. Pfannstiel, J. Lechner, C. Reinhard, J.B. Helms, W. Nickel, and F.T. Wieland. 2001. Recruitment to Golgi membranes of

ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *Embo J*. 20:6751-60.

Gu, F., C.M. Crump, and G. Thomas. 2001. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci*. 58:1067-84.

Hammond, A.T., and B.S. Glick. 2000. Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Mol Biol Cell*. 11:3013-30.

Hara-Kuge, S., O. Kuge, L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, F.T. Wieland, and J.E. Rothman. 1994. En bloc incorporation of coatomer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J Cell Biol*. 124:883-92.

Harter, C., and F.T. Wieland. 1998. A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatomer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:11649-54.

Hauri, H.P., F. Kappeler, H. Andersson, and C. Appenzeller. 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci*. 113 (Pt 4):587-96.

Heiss, A. 2004. Charakterisierung der Interaktion von ARF1 mit der p24-Familie. *Dissertation, Univeristät Heidelberg*.

Holstein, S.E., H. Ungewickell, and E. Ungewickell. 1996. Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin. *J Cell Biol*. 135:925-37.

Honda, A., O.S. Al-Awar, J.C. Hay, and J.G. Donaldson. 2005. Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE. *J Cell Biol*. 168:1039-51.

Hui, N., N. Nakamura, P. Slusarewicz, and G. Warren. 1998. Purification of rat liver Golgi stacks. *In "Cell Biology: A Laboratory Handbook" (J. Celis, ed.). Academic Press*.

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*. 9:3153-62.

Jamieson, J.D., and G.E. Palade. 1966. Role of the Golgi complex in the intracellular transport of secretory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 55:424-31.

Jenne, N., K. Frey, B. Brugger, and F.T. Wieland. 2002. Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *J Biol Chem*. 277:46504-11.

Jokitalo, E., N. Cabrera-Poch, G. Warren, and D.T. Shima. 2001. Golgi clusters and vesicles mediate mitotic inheritance independently of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 154:317-30.

Kahn, R.A., F.G. Kern, J. Clark, E.P. Gelmann, and C. Rulka. 1991. Human ADP-ribosylation factors. A functionally conserved family of GTP-binding proteins. *J Biol Chem*. 266:2606-14.

Kaiser, C. 2000. Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3783-5.

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.

Kanaseki, T., and K. Kadota. 1969. The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J Cell Biol*. 42:202-20.

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

Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 54:631-64.

Langer, J., C. Roth, J. Bethune, E. Stoops, B. Brugger, D. Herten, and F. Wieland. submitted. A conformational change in the alpha-subunit of coatomer induced by ligand binding to gamma-COP revealed using single-pair FRET.

Lanoix, J., J. Ouwendijk, A. Stark, E. Szafer, D. Cassel, K. Dejgaard, M. Weiss, and T. Nilsson. 2001. Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J Cell Biol*. 155:1199-212.

Letourneur, F., E.C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S.D. Emr, H. Riezman, and P. Cosson. 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*. 79:1199-207.

Liu, W., R. Duden, R.D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz. 2005. ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells. *J Cell Biol*. 168:1053-63.

Majoul, I., K. Sohn, F.T. Wieland, R. Pepperkok, M. Pizza, J. Hillemann, and H.D. Soling. 1998. KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J Cell Biol*. 143:601-12.

Majoul, I., M. Straub, S.W. Hell, R. Duden, and H.D. Soling. 2001. KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell*. 1:139-53.

Malhotra, V., T. Serafini, L. Orci, J.C. Shepherd, and J.E. Rothman. 1989. Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*. 58:329-36.

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*. 462:267-72.

Malsam, J., A. Satoh, L. Pelletier, and G. Warren. 2005. Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles. *Science*. 307:1095-8.

Martinez-Menarguez, J.A., H.J. Geuze, J.W. Slot, and J. Klumperman. 1999. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell*. 98:81-90.

Matsuoka, K., L. Orci, M. Amherdt, S.Y. Bednarek, S. Hamamoto, R. Schekman, and T. Yeung. 1998. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. 93:263-75.

Miller, E.A., T.H. Beilharz, P.N. Malkus, M.C. Lee, S. Hamamoto, L. Orci, and R. Schekman. 2003. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*. 114:497-509.

Miyawaki, A., O. Griesbeck, R. Heim, and R.Y. Tsien. 1999. Dynamic and quantitative Ca2+ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:2135-40.

Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J.M. McCaffery, J.A. Adams, M. Ikura, and R.Y. Tsien. 1997. Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 388:882-7.

Moelleken, J. 2005. Funktionelle Charakterisierung und Ultrastrukturelle Lokalisierung der Isotypen des Hüllprotein-Komplexes Coatomer. *Dissertation, Univeristät Heidelberg*.

Moelleken, J., J. Malsam, M.J. Betts, A. Movafeghi, I. Reckmann, I. Meissner, A. Hellwig, R.B. Russell, T. Sollner, B. Brugger, and F.T. Wieland. 2007. Differential localization of coatomer complex isoforms within the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:4425-30.

Morel-Huaux, V.M., M. Pypaert, S. Wouters, A.M. Tartakoff, U. Jurgan, K. Gevaert, and P.J. Courtoy. 2002. The calcium-binding protein p54/NEFA is a novel luminal resident of medial Golgi cisternae that traffics independently of mannosidase II. *Eur J Cell Biol*. 81:87-100.

Munro, S., and H.R. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 48:899-907.

Nickel, W., B. Brugger, and F.T. Wieland. 2002. Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J Cell Sci*. 115:3235-40.

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 (Pt 20):3081-90.

Ohno, H., J. Stewart, M.C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J.S. Bonifacino. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*. 269:1872-5.

Orci, L., M. Amherdt, M. Ravazzola, A. Perrelet, and J.E. Rothman. 2000a. Exclusion of golgi residents from transport vesicles budding from Golgi cisternae in intact cells. *J Cell Biol*. 150:1263-70.

Orci, L., M. Ravazzola, A. Volchuk, T. Engel, M. Gmachl, M. Amherdt, A. Perrelet, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 2000b. Anterograde flow of cargo across the golgi stack potentially mediated via bidirectional "percolating" COPI vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:10400-5.

Orci, L., M. Stamnes, M. Ravazzola, M. Amherdt, A. Perrelet, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 1997. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell*. 90:335-49.

Owen, D.J., B.M. Collins, and P.R. Evans. 2004. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:153-91.

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.

Parlati, F., J.A. McNew, R. Fukuda, R. Miller, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 2000. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature*. 407:194-8.

Pavel, J., C. Harter, and F.T. Wieland. 1998. Reversible dissociation of coatomer: functional characterization of a beta/delta-coat protein subcomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:2140-5.

Pearse, B.M. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol*. 97:93-8.

Pelham, H.R., and J.E. Rothman. 2000. The debate about transport in the Golgi--two sides of the same coin? *Cell*. 102:713-9.

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 (Pt 1):135-44.

Rabouille, C., N. Hui, F. Hunte, R. Kieckbusch, E.G. Berger, G. Warren, and T. Nilsson. 1995. Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides. *J Cell Sci*. 108 (Pt 4):1617-27.

Rambourg, A., and Y. Clermont. 1997. Three-dimentional structure of the golgi apparatus in mammalian cells. In The Golgi Apparatus. J.Roth, E.G.B.a., editor. Birkenhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.:37-61.

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*. 96:1224-8.

Reinhard, C., M. Schweikert, F.T. Wieland, and W. Nickel. 2003. Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8253-7.

Robineau, S., M. Chabre, and B. Antonny. 2000. Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:9913-8.

Rodriguez-Boulan, E., and A. Musch. 2005. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta*. 1744:455-64.

Rothman, J.E., and F.T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272:227-34.

Satoh, A., J. Malsam, and G. Warren. 2005. Tethering assays for COPI vesicles mediated by golgins. *Methods Enzymol*. 404:125-34.

Scales, S.J., R. Pepperkok, and T.E. Kreis. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell*. 90:1137-48.

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*. 107:1643-53.

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.

Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*. 59:223-39.

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.

Sollner, T., M.K. Bennett, S.W. Whiteheart, R.H. Scheller, and J.E. Rothman. 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75:409-18.

Sonnichsen, B., M. Lowe, T. Levine, E. Jamsa, B. Dirac-Svejstrup, and G. Warren. 1998. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol*. 140:1013-21.

Stamnes, M. 2002. Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol*. 14:428-33.

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*. 92:8011-5.

Stauber, T., J.C. Simpson, R. Pepperkok, and I. Vernos. 2006. A role for kinesin-2 in COPI-dependent recycling between the ER and the Golgi complex. *Curr Biol*. 16:2245-51.

Sun, Z., F. Anderl, K. Frohlich, L. Zhao, S. Hanke, B. Brugger, F. Wieland, and J. Bethune. 2007. Multiple and stepwise interactions between coatomer and ADP-ribosylation factor-1 (Arf1)-GTP. *Traffic*. 8:582-93.

Szafer, E., M. Rotman, and D. Cassel. 2001. Regulation of GTP hydrolysis on ADP-ribosylation factor-1 at the Golgi membrane. *J Biol Chem*. 276:47834-9.

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.

Tooze, S.A., G.J. Martens, and W.B. Huttner. 2001. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol*. 11:116-22.

Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman, and P. Walter. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101:249-58.

Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 67:509-44.

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

Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M.T. Hasan, H. Bujard, and W. Hillen. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:7963-8.

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*. 266:19599-610.

Walter, P., and G. Blobel. 1981a. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol*. 91:557-61.

Walter, P., and G. Blobel. 1981b. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 91:551-6.

Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 91:545-50.

Wang, L.H., T.C. Sudhof, and R.G. Anderson. 1995. The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem*. 270:10079-83.

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.

Watson, P.J., G. Frigerio, B.M. Collins, R. Duden, and D.J. Owen. 2004. Gamma-COP appendage domain - structure and function. *Traffic*. 5:79-88.

Weber, T., B.V. Zemelman, J.A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. 92:759-72.

Wegmann, D., P. Hess, C. Baier, F.T. Wieland, and C. Reinhard. 2004. Novel isotypic gamma/zeta subunits reveal three coatomer complexes in mammals. *Mol Cell Biol*. 24:1070-80.

Wild, K., M. Halic, I. Sinning, and R. Beckmann. 2004. SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol*. 11:1049-53.

Wilkinson, B.M., M. Regnacq, and C.J. Stirling. 1997. Protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol*. 155:189-97.

Wouters, F.S., P.I. Bastiaens, K.W. Wirtz, and T.M. Jovin. 1998. FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *Embo J*. 17:7179-89.

Wouters, F.S., P.J. Verveer, and P.I. Bastiaens. 2001. Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol*. 11:203-11.

Wu, M.M., J. Llopis, S. Adams, J.M. McCaffery, M.S. Kulomaa, T.E. Machen, H.P. Moore, and R.Y. Tsien. 2000. Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin. *Chem Biol*. 7:197-209.

Yoshihisa, T., C. Barlowe, and R. Schekman. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*. 259:1466-8.

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.

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

VII. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF1	ADP-Ribosylierungsfaktor 1
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaar
BMW	*broad molecular weight* (Proteinmarker)
BSA	bovines Serumalbumin
CCV	*Clathrin coated vesicle*
CDB	Zell-Dissoziationspuffer
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CGN	cis Golgi Netzwerk
CMV	Cytomegalovirus
COP	*coat protein*
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	*Dulbecco's modified eagle's medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DOC	Desoxycholat
Dox	Doxicyclin
DTT	Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	*ER-associated degradation*
ERGIC	ER-Golgi-intermediäres Kompartiment
FACS	*fluorescence activated cell sorting*
FCS	fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
g	Gramm
GalT	Galactosyltransferase
GAP	GTP-Hydrolyse aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanosinnukleotid-Austauschfaktor
GFP	grün fluoreszierenden Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPγS	Guanosin-5´-3-O-(thio)-triphosphat
h	Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunoglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid

IRES	*internal ribosomal entry side*
KDELr	KDEL Rezeptor
LB Medium	Luria Bertani Medium
LTR	*long terminal repeat*
Mann I, Mann II,	Mannosidase I, Mannosidase II
MBS	*modified bovine serum*
MCAT	*murine cationic aminoacid transporter*
MCS	multiple Klonierungsstelle
MEM	minimal essential medium
MMLV	*moloney murine leukemia virus*
MW	Molekulargewicht
NAGT I	N-Acetylglucosaminyltransferase I
NSF	*NEM sensitive factor*
NTP	Nukleotid-Triphosphat
OD	optische Dichte
PFA	Paraformaldehyd
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
pRTi	pRevTRE2-IRES
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SialylT	Sialyltransferase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	*soluble NSF attachment protein*
SNARE	SNAP Rezeptor
SRP	*signal recognition particle*
T	Temperatur [°C]
Tet	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tER	*transitional-endoplasmic-reticulum*
TEV	*tobacco etch virus*
TGN	trans Golgi Netzwerk
TRE	*Tetracycline-responsible element*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether)
U	*unit* (Enzymaktivität) Endonucleasen [µg verdaute DNA/h bei empfohlener T] Polymerasen [Einbau von 10 nmol dNTP/30 min bei 70°C] Ligasen [50% Ligation von *Hind*III-Fragmenten
UPR	*unfolded protein response*
UTR	untranslatierter DNA Bereich, der die kodierende Sequenz umgibt
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewicht/Volumenverhältnis [100 g/ml]

w/w	Gewichtsverhältnis
WB	Western Blot
x g	Erdbeschleunigung
YFP	*yellow fluorescent protein*

Einbuchstabencode der Aminosäuren.

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Einbuchstabencode der Nukleinsäuren.

A	Adenosin	G	Guanosin
C	Cytosin	T	Thymidin

VIII. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Professor Dr. Felix Wieland für die interessante Themenstellung, die Freiheit in der Gestaltung meiner Arbeit, sowie für das Vertrauen und die stets großzügige Unterstützung während der vergangenen Jahre.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Professor Dr. Graham Warren sowie Dr. Ayano Satoh für die hervorragende Zusammenarbeit, sowie die mir dadurch gegebene Möglichkeit einen Teil dieser Arbeit an der Yale Universität in den USA durchzuführen.

Herrn Professor Dr. Michael Brunner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Rainer Pepperkok und Dr. Timo Zimmermann (EMBL, Heidelberg) danke ich für die Anleitung und Einführung in die Welt des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers. Ein ebenfalls großes Dankeschön geht an Dr. Dirk Peter Herten (PCI, Heidelberg) für die unermüdliche Geduld und Hilfe bei der Auswertung meiner FRET-Experimente.

Dr. Britta Brügger, Dr. Julien Bethune, Dr. Matthijs Kol und Dr. Jörg Moelleken danke ich für die vielen intensiven Diskussionen, sowie motivierenden und konstruktiven Ratschläge während meiner Doktorarbeit.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung während der längsten Zeit meiner Doktorarbeit bin ich der Peter und Traudl Engelhorn Stiftung zu tiefstem Dank verpflichtet.

Für das sehr schnelle und gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Dr. Britta Brügger, Dr. Jörg Moelleken, Dr. Oliver Schmidt sowie Dr. Sandra Zitzler.

Bei Ingrid Meißner und Ingeborg Reckmann möchte ich mich für die große technische Unterstützung bedanken. Ein großer Dank geht ebenfalls an Gabi Weiß für die immer perfekte Hilfe in der Zellkultur.

Dr. Jörg Malsam danke ich für die Unterstützung bei der Herstellung der fluoreszierenden Vesikel.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wieland, sowie den Mitstreitern des 2. und 3. Stockwerks danke ich für die hervorragende Atmosphäre, die stets konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen sowie die Hilfsbereitschaft, aber auch für die vielen lustigen Parties, Skitrips und Thanners-Besuche.

Mein größter Dank geht schließlich an meine Familie, sowie an meine Freundin Sandra für die unermüdliche Unterstützung und Motivation sowohl während meines Studiums und vor allem meiner Doktorarbeit, als auch in allen privaten Bereichen. Danke.