

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Eva-Maria Emig
aus Mannheim
Tag der mündlichen Prüfung:

Funktionelle Charakterisierung von Mitgliedern der p24 Proteinfamilie

Gutachter: Prof. Dr. Felix Wieland

Dr. Sigrid Berger-Seidel

1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	4
2.1. Der Intrazelluläre Transport	4
2.2. Die Exozytose.....	4
2.3. Der vesikuläre Transport innerhalb der Zelle.....	5
2.4. Molekulare Mechanismen der COPI Vesikelbildung.....	6
2.5. Molekulare Mechanismen der COPII Vesikelbildung	8
2.6. Die Funktion der COP Vesikel im intrazellulären Transport	9
2.7. Die p24 Proteine	10
2.8. Aufgabenstellung und Ziele der Doktorarbeit.....	11
3. Ergebnisse.....	12
3.1. Die Lokalisation von p24 Mitgliedern.....	12
3.1.1. Die zellulären Lokalisationen von p24 Mitgliedern sind voneinander abhängig.....	12
3.1.2. Lokalisationsstudien mit p23 Chimären	14
3.1.2.1. p24 Proteine interagieren über ihre luminalen Domänen miteinander.....	15
3.2. Die Expression einer dominant negativen p23-Mutante in HeLa Zellen	17
3.2.1. Die Expression einer dominant negativen p23-Mutante ist toxisch.....	17
3.3. Einfluß der p24 Mitglieder auf den intrazellulären Protein Transport	19
3.3.1. Die Expression von p24 Konstrukten hemmt den anterograden Transport von VSV-G Protein zur Zelloberfläche	20
3.3.2. Die Injektion von Antikörpern, welche gegen die zytoplasmatischen Domänen von p23 und p25 gerichtet sind, hemmen den Transport von VSV-G zur Zelloberfläche.....	22
3.3.3. Fab-Fragmente, welche gegen die C-Termini von p23, p24, p25, p26 und p27 gerichtet sind, hemmen den Transport von VSV-G zur Zelloberfläche.....	25
3.4. Hemmt man den Export aus dem ER, werden p24 Proteine in zwei verschiedenen Kinetiken vom Golgi zum ER umverteilt.....	28
4. Diskussion.....	33
4.1. Lokalisation und Komplexbildung von p24 Proteinen im frühen Sekretionsweg.....	33
4.2. Hefe versus Zellkultur	34
4.3. Einfluß der p24 Mitglieder auf den intrazellulären Transport.....	35
4.4. Molekulare Mechanismen der COPI-Vesikelbildung	38
5. Material und Methoden	40
5.1. Material.....	40
5.1.1. Antikörper.....	40
5.1.2. Chemikalien.....	41
5.2. Molekularbiologische Methoden.....	42
5.2.1. PCR.....	42
5.2.2. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
5.2.3. Verwendete Bakterien und deren Kultivierung.....	43

5.2.4. Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	44
5.2.5. Transformation von Bakterien.....	45
5.2.6. Plasmid-Minipräparation.....	45
5.2.7. Plasmid-Maxipräparation.....	46
5.2.8. PEG-Fällung von DNA.....	47
5.2.9. Konzentrationsbestimmung einer DNA Lösung.....	47
5.2.10. Ligation von DNA Fragmenten.....	47
5.2.11. Agarose-Gelelektrophorese.....	48
5.2.12. DNA Sequenzierung.....	48
5.2.13. Restriktionsanalyse von Plasmid DNA.....	49
5.2.14. Klonierung verschiedener cDNAs.....	49
5.3. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen.....	50
5.3.1. Zelllinien.....	50
5.3.2. Kultivieren von Zellen.....	51
5.3.3 Einfrieren von Zellen.....	51
5.3.4 Auftauen von Zellen.....	51
5.3.5. Transfektion mittels CaPO ₄ Präzipitation.....	52
5.3.6. Selektion stabiler Transfektanden.....	52
5.3.7. Immunfluoreszenzanalyse.....	53
5.3.8. Mikroinjektion.....	54
5.3.9. Bildgewinnung und Signalquantifizierung.....	54
5.3.10. VSV- Assay.....	55
5.3.11. Konfokale Mikroskopie.....	55
5.4. Biochemische Methoden.....	56
5.4.1. Proteinbestimmung.....	56
5.4.2. Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	56
5.4.3. Die Erzeugung von Fab-Fragmenten aus IgG-Molekülen.....	58
6. Literatur.....	60
Abkürzungen.....	70

1. Zusammenfassung

p24 Proteine bilden eine neuentdeckte, konservierte Familie von integralen Membranproteinen mit Typ I Topologie. Alle Mitglieder dieser Familie lokalisieren in den Organellen des frühen Sekretionsweges. Aufgrund ihrer Abundanz in COPI und COPII Vesikeln und des Nachweises von spezifischen Interaktionen einiger Mitglieder mit COP-Hüllproteinen, werden p24 Proteine als strukturelle Komponenten der COP Vesikel angesehen.

Schwerpunkt der vorliegenden Studie war deshalb eine funktionelle Analyse dieser Proteine *in vivo*. Dazu wurden zuerst verschiedene p24-Konstrukte in Säugerzellen exprimiert. Nach Überexpression eines p24 Proteins mißlokalisierte dieses zusammen mit endogenen Mitgliedern in ER Membranen. Da p24 Proteine miteinander heterooligomere Komplexe bilden und innerhalb des frühen Sekretionsweges zyklisieren, ist die beobachtete Umverteilung sehr wahrscheinlich Folge einer *in vivo* Interaktion zwischen p24 Proteinen. Diese Interaktion findet vermutlich in einem Bereich nahe der Transmembrandomäne statt, für den Strukturvorhersagen die Ausbildung von *coiled coils* annehmen.

Die Expression eines p23 Konstruktes, mit mutierter zytoplasmatischer Domäne (p23tail*) in HeLa Zellen wirkte toxisch. Dies spricht für eine essentielle Funktion von p23 in Säugerzellen und weist darüberhinaus auf eine fundamentale Verschiedenheit zum Hefesystem hin, da hier der achtfache Knockout aller p24 Mitglieder vital ist. Außerdem bewirkte die Expression von p23tail* eine fast 80%-ige Transporthemmung des VSV-G Proteins zur Zelloberfläche, während die Expression eines Membranproteins von vergleichbarer Größe, im selben System, den Transport von VSV-G kaum beeinträchtigte. Zudem hemmte die Mikroinjektion von Antikörpern, welche gegen die zytoplasmatischen Domänen von p24 Proteinen gerichtet sind, beziehungsweise ihrer Fab-Fragmente spezifisch den Transport von VSV-G Protein zur Zelloberfläche. Deshalb wird für alle untersuchten p24 Proteine eine Funktion im vorwärtsgerichteten Transport von Membranproteinen postuliert.

Die Immunfluoreszenz Analyse des retrograden Transport von p24 Proteinen vom Golgi zum ER offenbarte zwei distinkte Subpopulationen von p24 Proteinen. Die Signale von p23 und p25 erscheinen dabei ungefähr 30 Minuten früher im ER als diejenigen von p24, p26 oder p27. Dabei gleicht die Kinetik des Rücktransportes von p23 oder p25 der von ERGIC-p53. Da p53 wahrscheinlich unter Umgehung des Golgi Apparates retrograd vom IC zum ER transportiert wird, ist anzunehmen, daß auch p23 und p25, womöglich als Komplex, den gleichen Transportweg nutzen. Die vorgelegten Daten weisen somit erstmalig auf eine funktionelle Auftrennung von p24 Proteinen *in vivo* hin.

2. Einleitung

2.1. Der Intrazelluläre Transport

Eine kernhaltige Zelle gleicht in ihrer Organisation einer Stadt, in der die unterschiedlichsten Ereignisse im koordinierten Nebeneinander stattfinden. Trotz ihrer Komplexität liegt allen höheren Zellen, vom einfachen Hefepilz bis hin zur menschlichen Zelle, ein gleiches innerzelluläres Organisationsprinzip zugrunde: Ihre Zellen untergliedern sich in durch Lipidmembranen voneinander getrennte Funktionsräume, sogenannte Kompartimente oder auch Organellen. Zwischen den Organellen findet ein reger Stofftransport statt, welcher immer auch mit einem Fluß von Membranen verbunden ist. Trotz dieses kontinuierlichen Membranflusses muß die Integrität der Zelle zu jedem Zeitpunkt erhalten bleiben. Dies erfordert ein hohes Maß an Regulation und Kontrolle. Am Beispiel des Transportes sekretorischer Proteine, der Exozytose, soll dies veranschaulicht werden.

2.2. Die Exozytose

Zellen synthetisieren neben den Proteinen, die sie für ihren eigenen Aufbau und Stoffwechsel benötigen, auch andere, welche für den Export bestimmt sind. Beispiele hierfür ist die Insulinsekretion durch die β -Zellen des Pankreas oder aber die Sekretion von Serumalbumin. Der Transport sekretorischer Proteine, ausgehend von ihrem Synthesort bis hin zur Ausschüttung an der Plasmamembran, umfaßt mehrere Stationen [Palade, 1975; Yokota und Fahimi, 1981]:

Noch während ihrer Herstellung (Translation) an den Ribosomen erfolgt die Translokation neusynthetisierter Proteine in das Innere des Endoplasmatischen Reticulums (ER) [Blobel und Dobberstein, 1975]. Dort werden Proteine richtig gefaltet und modifiziert. Einige werden durch Übertragung von Kohlenhydratketten auf bestimmte Aminosäurereste glykosyliert (*Core Glykosylierung*), bei anderen bilden sich Disulfidbrücken aus. Beide Prozesse werden katalysiert und kontrolliert von ER residenten Proteinen.

Die nächste Station des Sekretionsweges bilden flache Zisternen, welche in einem oder mehreren Stapeln übereinandergeschichtet sind und in ihrer Gesamtheit Golgi-Apparat genannt werden. In den Zisternen des Golgis werden dann vorhandene Glykosylierungen modifiziert und erweitert [Kornfeld und Kornfeld, 1985]. An der Austrittsseite des Golgis, dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), werden Proteine nach ihrem Bestimmungsort sortiert und an ihre Zielorganellen verteilt.

Virale Membranproteine wie das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G Protein) benutzen die gleichen Transportwege zur Plasmamembran wie zelluläre Proteine und werden deshalb häufig als Markerproteine zur Analyse des intrazellulären Transportes herangezogen [Balch, 1994; Griffiths, 1985; Orci, 1986; Orci 1997; Wandinger, 1990; Kreis, 1986; Strous und Lodish, 1980; Pepperkok, 1998]

Zwischen ER und Golgi wird die Existenz eines weiteren Kompartiments diskutiert, dem sogenannten ER-Golgi-Intermediärem Kompartiment (ERGIC oder auch nur IC). Zur Abgrenzung des ICs existieren mindestens vier verschiedene Ansichten:

Manche definieren es als Subkompartiment, welches physikalisch mit dem ER verbunden ist und den cis Golgi mit einschließt [Sitia und Meldolesi, 1992; Krijnse-Locker, 1994]. Eine andere Vorstellung vom IC ist, daß es mit der ersten Zisterne des Golgi Stapels zusammenhängt, welches in der Benennung Cis-Golgi-Netzwerk zum Ausdruck gebracht wird [Huttner und Tooze, 1989; Hsu, 1991; Mellman und Simons, 1992]. Wieder andere sehen das IC als eine transiente Struktur, welche durch Fusion von Vesikeln entsteht, die dem ER entstammen [Saraste und Svensson, 1991; Bannynkh und Balch, 1997]. Letztendlich könnte es sich beim IC auch um ein eigenständiges Kompartiment handeln, welches mit ER und Golgi über innerzelluläre Transportvorgänge kommuniziert [Pelham, 1989].

2.3. Der vesikuläre Transport innerhalb der Zelle

Die Transportbehälter, die Proteinfracht zwischen den Organellen befördern, wurden 1969 erstmalig von George E. Palade beschrieben, der 1974 für seine Arbeit den Nobelpreis für Medizin erhielt. Palade sah unter dem Elektronenmikroskop kleine, membranumschlossene Bläschen, welche im Fachjargon Vesikel genannt werden. Vesikel schnüren sich durch Knospung der Membran von einem Organell ab und wandern zielgerichtet zur Empfängermembran, mit der sie verschmelzen und so ihren Inhalt entleeren [Palade, 1975]. Bisher wurden drei verschiedene Vesikeltypen charakterisiert, die sich in Aufbau und in ihrer Verteilung in der Zelle unterscheiden [einen Überblick gibt Robinson, 1997].

Die ersten proteinumhüllten Vesikel, die entdeckt wurden, zeichnen sich durch eine Proteinhülle miteinander verzahnter Clathrinmoleküle (lat. *clathri*, Gitter) aus. Clathrin besteht aus jeweils drei schweren und drei leichten Ketten, die sich zu einer dreischenkigen Struktur, dem Triskelion, zusammenlagern. Es bindet an die Membran über seine Interaktion mit membranständigen Adaptoren. Diese komplexieren ihrerseits mit Rezeptoren (z.B. Rezeptoren für LDL, M6P oder EGF) und sortieren sie auf diese Weise in die neuentstehenden Clathrin Vesikel ein [Pearse, 1988; Glickman 1989; Sorkin, 1993]. Clathrin Vesikel schnüren sich von zwei verschiedenen Kompartimenten der Zelle ab, der

Plasmamembran und dem Trans Golgi Netzwerk (TGN) und vermitteln den Transport zu Endosomen und Lysosomen [Robinson 1994].

Heute kennt man noch zwei weitere Vesikeltypen, welche eine Proteinhülle besitzen: COPI [Orci, 1986] und COPII Vesikel [Barlowe, 1995; Barlowe, 1994]. COPI Vesikel entstehen *in vitro* aus Golgi Membranen, wenn man diese mit einem schwerhydrolysierbaren GTP-Analogon (GTP γ S) und unter Zugabe von Zytosol zur Vesikelbildung anregt [Malhotra, 1989; Orci, 1986]. Im Gegensatz dazu schnüren sich COPII Vesikel vom ER ab, von wo sie Proteine zum Golgi transportieren [Barlowe, 1994]. Frachtproteine verlassen das ER in COPII Vesikeln, welche, bevor sie den Golgi erreichen, ihre Hülle abwerfen und in einem intermediärem Kompartiment fusionieren. Ab dem IC übernehmen dann COPI Vesikel den weiteren Transport der Fracht hin zum Golgi und innerhalb des Golgis [Aridor, 1995; Rowe, 1996; Scale, 1997].

Einen Überblick über die verschiedenen Transportvorgänge und die daran beteiligten Vesikel gibt Abbildung 1.

2.4. Molekulare Mechanismen der COPI Vesikelbildung

Nach der Entdeckung der COPI Vesikel im Jahre 1986 [Orci, 1986], bemühen sich Wissenschaftler weltweit intensiv, die molekularen Mechanismen der Bildung von proteinumhüllten Vesikeln aufzuklären. Durch die Wahl geeigneter sogenannter zellfreier Systeme (*in vitro*) [Balch, 1984], das bedeutet die Simulation zellulärer Prozesse im Reagenzglas, wurde es möglich, die Entstehung der Vesikel zu durchleuchten.

Seit 1989 weiß man, daß sich die Proteinhülle von COPI Vesikeln aus zwei Komponenten aufbaut [Malhotra, 1989]: Coatomer (nach eng. *coat* und griechisch *meros* für Teil), einem 600kDa großen Proteinkomplex [Waters, 1991], der im Zellplasma als vorgefertigter, stabiler Komplex vorkommt und aus sieben Proteinen (den COPs nach engl. *coat* und *protein*) zusammengesetzt ist und ARF1 (für eng. *ADP ribosylation factor1*), einer kleinen GTPase der Ras Familie [Serafini, 1991]. ARF1 wurde erstmalig als Kofaktor in einer von Cholera Toxin katalysierten ADP-Ribosylierung trimerer G-Proteine entdeckt [Kahn und Gilman, 1986] und kommt in der Zelle in zwei unterschiedlichen Aktivierungszuständen vor: ARF1 in seiner GDP-Form ist inaktiv und zytosolisch. Durch Austausch von GDP gegen GTP wird ARF1 aktiviert und bindet an die Golgimembran. Die Bindung von ARF1 an die Membran ist sättigbar, was die Existenz eines ARF-Rezeptors wahrscheinlich macht [Helms, 1993].

Wie bei allen kleinen GTPasen, benötigt der GTPase Zyklus von ARF1 einen Guanin Nucleotid Austauschfaktor (GEF) [Helms, 1992; Chardin, 1996; Morinaga, 1996], um die Aktivierung von ARF1 zu katalysieren, beziehungsweise ein GTPase aktivierendes Protein (GAP), um seine Inaktivierung herbeizuführen [Cukierman, 1995].

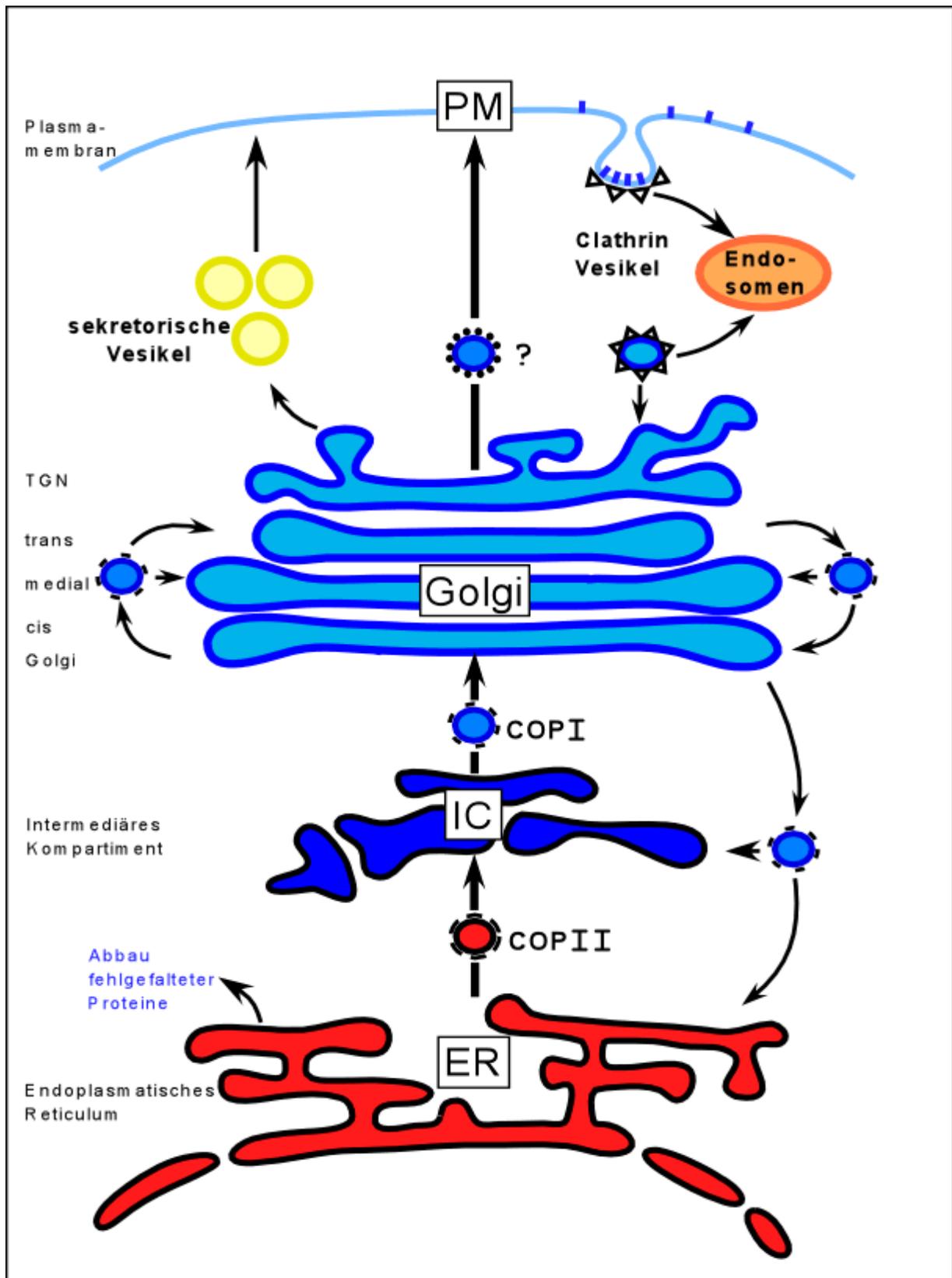


Abb.1: Vesikulärer Transport zwischen den Organellen des sekretorischen Transportweges

Bilden sich nun COPI umhüllte Vesikel, bindet zunächst ARF1 in seiner GTP Form an die Membran und rekrutiert dann Coatomer aus dem Zytosol [Donaldson, 1992; Palmer 1993;

Orci, 1993]. Die Aggregation von Coatomer an der Membran induziert eine Krümmung der vorher flachen Lipidmembran und es kommt zum Abknospen eines Vesikelbläschen [Orci, Palmer, Amherdt 1993].

Bevor das neugebildete Vesikel mit der Donormembran verschmelzen kann, muß es seine Proteinhülle abwerfen, um andere, membranständige Fusionsproteine zugänglich zu machen [Rothman, 1994 Nature]. Dieser Zyklus von Anlagerung und Abwerfen der Hülle kann durch Toxine, wie das Pilzgift Brefeldin A (BFA), gestört werden. Der Austauschfaktor für ARF1 ist sensitiv für BFA, da er eine Sec7 Domäne besitzt, an die BFA binden kann. Geschieht dies, wird ein trimerer Komplex zwischen ARF1, seinem GEF und BFA stabilisiert und so das GEF dem zellulärem Pol entzogen [Peyroche, 1999; eine Übersicht gibt Chardin, 1999]. Dies hat zur Folge, daß ARF1 innerhalb der Zelle überwiegend in seiner inaktiven Form vorliegt und deshalb auch kein Coatomer an die Membran gebunden werden kann. Deshalb dissoziiert nach BFA Behandlung der gesamte Coatomer von der Golgimembran ab, der Golgi kollabiert und fusioniert mit dem ER [Daschner und Balch, 1994; Sciaky, 1997].

2.5. Molekulare Mechanismen der COPII Vesikelbildung

1994 wurde eine weitere Proteinhülle an Vesikeln entdeckt, die dem ER entstammen und aufgrund ihrer Ähnlichkeiten zu COPI, COPII benannt [Barlowe, 1994].

Die COPII Hülle in Hefe besteht aus drei Komponenten: einem 400kDa großen Sec23p/Sec24p Komplex [Hicke und Schekman, 1989; Hicke, 1992], einem Komplex, welcher sich aus Sec13p (34kDa) und Sec31p (150kDa) zusammensetzt [Pryer, 1993; Salama, 1993] und Sar1p, einer kleinen GTPase [Nakano und Muramatsu, 1989]. Dieses Set löslicher Proteine ist ausreichend um *in vitro* aus ER Membranen funktionelle COPII Vesikel herzustellen [Barlowe, 1994]. Der prinzipielle Mechanismus ihrer Entstehung ist weitgehend verstanden. Analog der Bildung von COPI Vesikeln, rekrutiert die durch Nukleotidaustausch aktivierte GTPase die übrigen Komponenten der Hülle an die Membran, die vorher flache Membran wölbt sich aus und ein Vesikel schnürt sich ab. [Barlowe, 1994]. Eine GEF-Aktivität ist notwendig bei der Bildung der COPII Vesikel [Barlowe und Schekman, 1993; Kuge, 1994], und GTP-Hydrolyse ist Vorbedingung für die Fusion der COPII Vesikel mit der Akzeptormembran [Barlowe, 1994; Yoshihisa, 1993].

2.6. Die Funktion der COP Vesikel im intrazellulären Transport

Der erste Hinweis für eine Rolle der COPII Vesikel im ER – Golgi Transport kam durch die Beobachtung in Hefe, daß Mutationen des Sec23 Gens die Vesikelbildung inhibieren und sich *core* - glykosylierte Proteinen innerhalb des ERs anhäufen [Hicke, 1989]. Mutationen anderer COPII Hüllproteine zeigten einen ähnlichen Phenotyp [Nakano, 1989; Nakano, 1988; d'Enfert, 1991; Pryer, 1993]. Eine Funktion von COPII im ER Export wird außerdem durch den Befund unterstrichen, daß in Hefe Sar1p, Secp23/24 und Sec p13/31 ausreichen, um *in vitro* aus ER Membranen funktionelle COPII Vesikel herzustellen, welche Prepro- α -Faktor transportieren [Barlowe, 1994]. Außerdem ist in Säugerzellen COPII notwendig für den ER-Export des Glykoproteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G Protein) [Kuge, 1994]. Die Lokalisation von COPII an Pre-Golgi Membranen [Aridor, 1995; Barlowe 1994; Scale, 1997] steht mit seiner postulierten Funktion in Einklang.

Im Gegensatz zu COPII sind COPI Vesikel nicht so klar einer Lokalisation oder Transportrichtung zuzuordnen. Die Beteiligung von COPI Vesikel im intra Golgi Transport wird durch Studien nahegelegt, in denen in einem zellfreien Assay [Balch, 1984] der Transport zwischen den Golgi Zisternen rekonstruiert wurde [Whiteheart, 1994; Orci, Malothra, 1989 Cell]. Zudem hemmen Antikörper gegen β -COP den Transport von VSV-G Protein zwischen ER und Golgi [Pepperkok, 1993], was für eine Funktion von COPI im Transport zwischen diesen Kompartimenten spricht. Die Suche nach Sekretionsmutanten führte zur Identifikation von Hefestämmen, welche Mutationen in Genen tragen, die für die COPI Proteine kodieren [Duden, 1994].

Zusammengenommen legen diese Daten eine Funktion von COPI im Transport zwischen ER und Golgi nahe. Für eine Beteiligung von COPI Vesikeln im rückwärtsgerichteten (retrograden) Transport vom Golgi zum ER sprechen zwei Befunde: Zum einen wurde gezeigt, daß Coatomer *in vitro* spezifisch mit dem C-terminalen Dilysin-Motiv K(X)KXX interagiert [Cosson und Letourneur, 1994], einem Sortiersignal ER residenter Membranproteine, welches ihren Rücktransport ins ER sicherstellt, falls sie dieses verlassen sollten [Jackson, 1993; Nilsson, 1989]. Zum anderen fand man heraus, daß Hefemutanten mit Mutationen in unterschiedlichen Genen für Coatomer-Untereinheiten Dilysin-Proteine nicht mehr effektiv zum ER zurücktransportieren können [Cosson, 1996; Letourneur, 1994]. Eine Vorstellung, wie sich die Funktionsbereiche zwischen COPI und COPII voneinander abgrenzen, bekam man durch *in vitro* Experimente, die nahelegten, daß zwischen Golgi und ER die COPII Hülle gegen COPI ausgetauscht wird [Rowe, 1996]. Experimente *in vivo* bestätigten diese zeitliche und räumliche Abfolge in der Wirkungsweise von COPII und COPI in Säugern [Scales, 1997].

Es ergibt sich demnach folgendes Bild für die Funktionen von COP Vesikeln: ER Export wird von COPII Vesikeln vermittelt, die bis zum IC transportieren. Den weitere Transport zum Golgi besorgen COPI umhüllte Vesikel. COPI Vesikel sind zudem im Intra-Golgi-Transport beteiligt sowie am Rücktransport vom Golgi in Richtung ER. Eine Funktion von COPI Vesikeln in unterschiedlichen Transportrichtungen wird ebenfalls durch Ergebnisse von Lelio Orci unterstützt, welcher Preproinsulin und KDEL-Rezeptor in zwei distinkten Populationen von COPI Vesikeln fand [Orci, 1997].

2.7. Die p24 Proteine

Die p24 Proteine gehören zu einer konservierten Familie von Typ-I-Transmembranproteinen, mit Homologen in allen Eukaryoten von Hefe bis hin zu Säugern. In Hefe wurden acht p24 Proteine identifiziert und in Säugern existieren mindestens sechs. Allen Mitgliedern gemeinsam ist ein ähnliche strukturelle Organisation:

Eine N-terminale, luminalen Domäne, in welcher ein *coiled-coil* Motiv vorhergesagt wird [Sohn, 1996; Stamnes, 1995]. *Coiled coils* werden in Zusammenhang mit der Ausbildung von Protein – Protein Interaktionen gebracht [Lupas, 1996; Lupas, 1991]. Tatsächlich konnten in Hefe heterooligomere Komplexe zwischen p24 Proteinen nachgewiesen werden [Belden und Barlowe, 1996]. Der luminalen Domäne schließen sich eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne an.

In der Sequenz des C-Terminus fallen zwei konservierte Motive auf: Zwei Phenylalanine (FF) und zwei basische Aminosäurenreste (bb). Die Motive sind durch zwei Aminosäurenreste voneinander getrennt (FFXXbb). *In vitro* konnte für einige p24 Proteine die Interaktion mit Coatomer gezeigt werden, wobei beide Motive zur Coatomer Bindung beitragen [Fiedler, 1996; Sohn, 1996]. Da außerdem alle bisher untersuchten Mitglieder der p24 Familie zwischen den Organellen des frühen Sekretionsweges zyklisieren [Nickel, 1997; diese Arbeit, Teile veröffentlicht in Gommel, 1999] und sie in COPI und COPII Vesikeln in großer Zahl vorhanden sind [Belden und Barlowe, 1996; Schimmöller, 1995; Sohn, 1996], werden sie als Rezeptoren der COP Hüllen gehandelt.

Weitere Hinweise auf die Beteiligung der p24 Proteine im vesikulärem Transport kommt aus genetischen Studien mit Hefemutanten. Werden p24 Gene in Hefe ausgeknockt, kommt es zu einer verzögerten Reifung von Invertase und Gas1 Proteinen, wohingegen der Transport von Carboxypeptidase Y und Pro- α Faktor unbeeinflusst zu sein scheint. Weiterhin unterdrückt der Knockout von p24 den letalen Effekt der Deletion eines essentiellen COPII Gens, Sec23 [Elrod-Erickson und Kaiser, 1996].

2.8. Aufgabenstellung und Ziele der Doktorarbeit

Zu Beginn dieser Doktorarbeit fehlten Daten zur Funktion der p24 Proteine im intrazellulären Transport von Säugerzellen. Es war unklar, ob p24 Proteine auch in Säugerzellen miteinander interagieren und die Effekte, welche nach Knockout von p24 Genen in Hefe beobachtet wurden, auf das Säugersystem übertragen werden können. Da Hefezellen im Vergleich zu Säugern ein viel einfacher strukturiertes Endomembransystem haben, ist es denkbar, daß gerade im Transport zwischen den Organellen des Sekretionsweges deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Organismen bestehen könnten. Obwohl der Knockout eines p24 Proteins in Hefe vital ist, könnten p24 Proteine in höheren Eukaryonten essentiell sein. Des weiteren ist unklar, warum mehrere p24 Mitglieder innerhalb einer Art vorkommen. Da in Hefe p24-Heterooligomere nachgewiesen werden konnten, wäre es vorstellbar, daß der Grad ihrer Oligomerisierung und / oder die Zusammensetzung der Oligomere entscheidend für die Funktion der p24-Komplexe sind. Ein unterschiedlicher Oligomerisierungsstatus, abhängig von der zellulären Lokalisation, müßte experimentell überprüfbar sein.

Aus den oben angeführten Argumenten sollte eine funktionelle Analyse von p24 Proteinen in Säugerzellen durchgeführt werden. Dies sollte unter anderem durch die Analyse der Expression verschiedener p24 Konstrukte und unter Anwendung geeigneter Transportassays erreicht werden.

3. Ergebnisse

3.1. Die Lokalisation von p24 Mitgliedern

3.1.1. Die zellulären Lokalisationen von p24 Mitgliedern sind voneinander abhängig

P24 Proteine stellen eine konservierte Familie kleiner, integraler Membranproteine dar, mit Homologen in allen Eukaryoten von Hefe bis hin zum Menschen. Da sie in großen Mengen in COPI und COPII Vesikeln vorkommen [Belden und Barlowe, 1996; Schimmöller, 1995; Stamnes, 1995; Sohn, 1996], sind sie schon seit ihrer Entdeckung als strukturelle Komponenten der Vesikelhülle im Gespräch.

Die Lokalisation auf Immunfluoreszenzebene war zum Zeitpunkt dieser Studie nur für p23 veröffentlicht, welches in NRK Zellen kompakte, perinukleäre Strukturen markiert, die mit Coatomer kolokalisieren [Sohn, 1996]. Diese Immunlokalisation von p23 konnte auch in HeLa Zellen betätigt werden, wo es mit Coatomer und KDEL-Rezeptor kolokalisiert (Abb. 2A-C).

Da die vorhandenen Antikörper gegen p23 und p24 beide aus der selben Spezies sind, wurden, um eine Doppelmarkierung durchführen zu können, zwei p23-Wildtyp-Konstrukte hergestellt. Bei dem ersten p23-Konstrukt wurde dem N-Terminus des reifen Proteins ein myc-Epitop zugefügt (p23myc). Das zweite p23 Konstrukt ist homolog mit Wildtyp-p23 (p23wt) und dient als Kontrolle für das erste Konstrukt.

Nach transienter Überexpression dieser beiden Konstrukte in HeLa Zellen findet man überraschend p23wt und p23myc nicht zusammen mit Coatomer (Abb. 2D-F,G-I) oder KDEL-Rezeptor Signalen (Abb. 2J-L), sondern in sackartigen Membranen, welche frei von Coatomer und KDEL-Rezeptor sind. Da diese Strukturen nicht in Wildtyp HeLa Zellen vorhanden sind, ist es wahrscheinlich, daß sie durch die Überexpression von p23 induziert wurden.

Die nähere Untersuchung dieser Membranstrukturen offenbarte, daß sie dem ER entstammen, da sie positiv für Calreticulin markieren (Abb.3). Die Analyse der Lokalisation von endogenen p24 ergab, daß p23myc-haltige Membranen ebenfalls für p24 positiv sind (Abb. 2M-O). Da unser Labor p24 in Wildtyp Zellen dem Golgi zuordnen konnte [Gommel, 1999], scheint die Überexpression von p23 endogenes p24 umzuverteilen. Darüber hinaus wurden mittels Immunpräzipitation p23-p24-Komplexe aus Golgi Membranen und COPI Vesikelpräparationen nachgewiesen [Gommel, 1999]. Deshalb ist die Umverteilung von p24 sehr wahrscheinlich auf eine *in vivo* Interaktion mit p23 zurückzuführen.

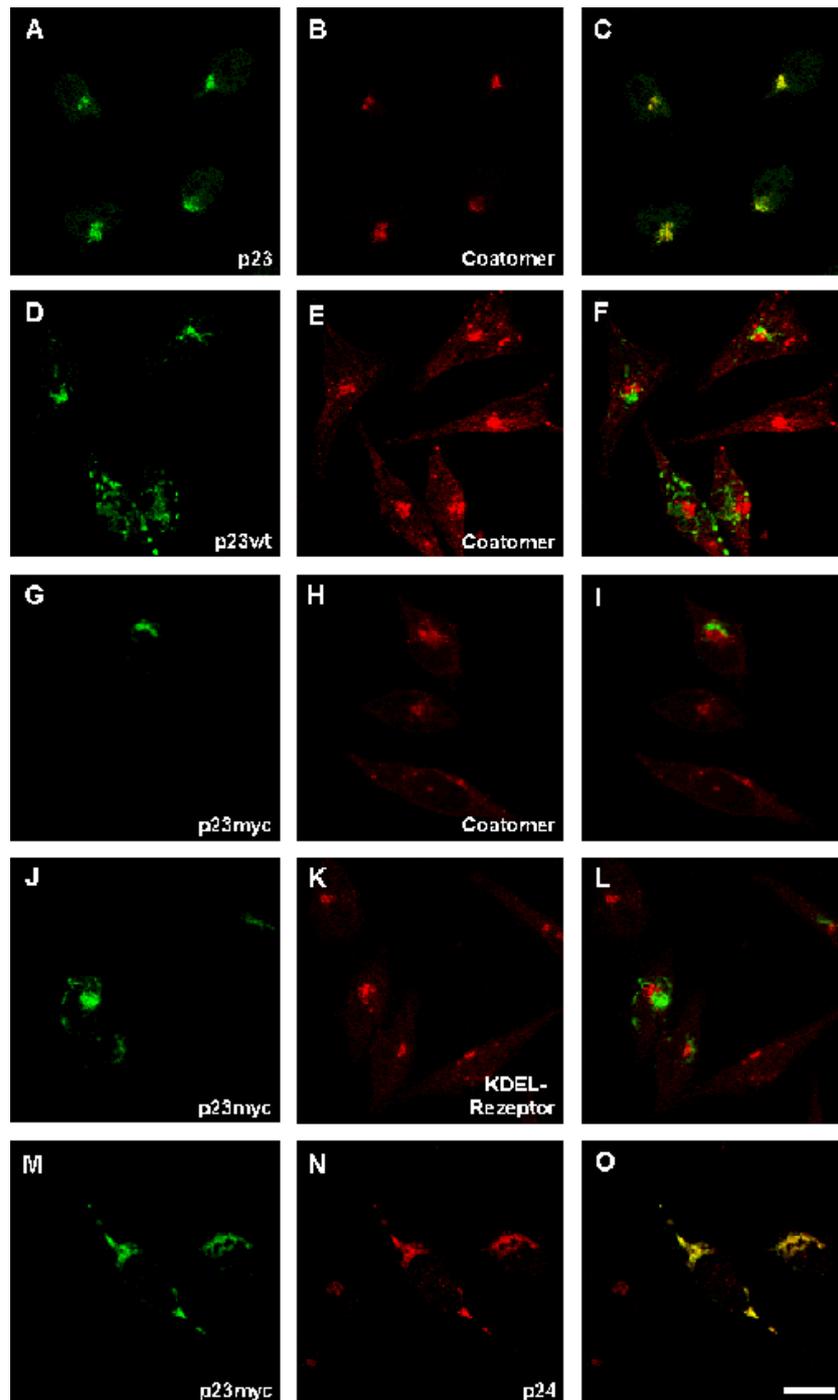


Abb.2: Lokalisation von p23 und p24 in Wildtyp und transient transfizierten HeLa Zellen. Endogenes p23 (A,C) und Coatomer (B,C) kolokalisieren in Wild-Typ HeLa Zellen. Im Gegensatz dazu zeigt die Doppelfärbung von p23 (D,F und G,I) und Coatomer (E,F und H,I) in HeLa Zellen, welche ein p23wt Konstrukt (D-F) oder ein p23myc Konstrukt (G-I) exprimieren, verschiedene Lokalisationen für diese Proteine. Darüber hinaus kolokalisiert transient exprimiertes p23myc Konstrukt (J,L) nicht mit KDEL-Rezeptor (K,L). Jedoch findet man endogenes p24 (N,O) in Strukturen, die durch die Überexpression von p23 induziert wurden und positiv für p23myc sind (M,O). Endogenes p23 und exprimiertes p23wt Konstrukt wurden mittels polyklonalen Kaninchen Antikörpern, die gegen die zytoplasmatische Domäne von p23 gerichtet sind, sichtbar gemacht (#1402). Das p23myc Konstrukt wurde durch monoklonale Anti-Myc Antikörper angefärbt. Endogenes p24 wurde mittels polyklonalen Kaninchen Antikörpern, welche gegen die zytoplasmatische Domäne von p24 gerichtet sind, sichtbar gemacht („Elfriede“). Die rechten Bilder zeigen jeweils die Überlagerungen der Bilder der beiden Kanäle. Maßstab, 10 μ m.

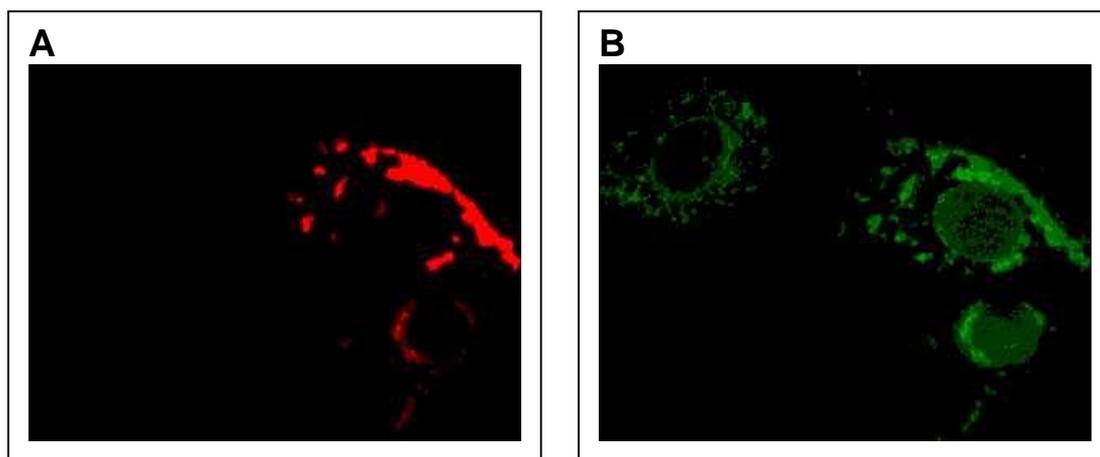


Abb.3: Nach Überexpression lokalisiert p23myc in Membranen des ER. Vero Zellen wurden mit p23wt DNA mikroinjiziert und nach 6h fixiert und entwickelt. (A) Lokalisation von p23wt mit monoklonalen Antikörpern gegen das Myc-Epitop. (B) Lokalisation von Calretikulin mittels polyklonalen Kaninchen Antikörpern (PA3-900).

Vergleichbare Resultate konnten auch für die Lokalisation von endogenem p25 nach Überexpression von p23wt erhalten werden (eigene Daten, hier nicht gezeigt). Daraus folgt, daß die *in vivo* Lokalisationen von einigen p24 Mitgliedern, wenn nicht von allen, auch im normalen zellulären Kontext abhängig von ihren wechselseitigen Interaktionen sind.

3.1.2. Lokalisationsstudien mit p23 Chimären

Die Funktion von p24 Proteinen innerhalb des Sekretionsweges ist noch immer umstritten. Ein Schlüssel zum Verständnis könnte ihre Interaktion mit Coatomer sein. *In vitro* Studien belegen die Bindung von Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen einiger Familienmitglieder, die ihrerseits den klassischen Retrieval-Signalen des Typs KKXX und KKKXX strukturverwandte Signale tragen [Dominguez, 1998; Fiedler, 1996; Sohn, 1996]. Darüber hinaus findet man p24 Proteine in Präparationen von COPI und COPII Vesikeln angereichert [Schimmöller, 1995; Belden und Barlowe, 1996; Sohn, 1996], weshalb p24 Mitglieder auch als strukturelle Komponenten der COPI / COPII Vesikelhüllen gehandelt werden [Sohn, 1996]. So könnten sie die Bindungsstellen für die Rekrutierung der Hüllkomponenten aus dem Zytosol schaffen und damit die Entstehung von COP Vesikeln ermöglichen. Tatsächlich konnte *in vitro* eine Abhängigkeit der Coatomerbindung an Liposomen und anschließender COPI Vesikelbildung vom Vorhandensein der zytoplasmatischen Domäne von p23 festgestellt werden [Bremser, 1999]. Zusätzliche Daten von Nickel und Mitarbeitern weisen darauf hin, daß der C-Terminus von p23 ein funktionelles

Retrieval-Signal enthält, da er, auf ein Plasmamembran Markerprotein übertragen, diesem ER Lokalisation verleiht [Nickel, 1997].

Lokalisationsstudien mit p23 Chimären sollten Aufschluß über die Anteile der beiden anderen Domänen zur *in vivo* Lokalisation und Interaktion mit anderen p24 Mitgliedern geben.

3.1.2.1. p24 Proteine interagieren über ihre luminalen Domänen miteinander

Informationen zum Anteil der luminalen und Transmembrandomäne von p23 auf die zelluläre Lokalisation sowie auf die Komplexbildung von p24 Proteinen sollte ein p23 Konstrukt erbringen, dem die zytoplasmatische Domäne fehlt. Zur leichteren Detektion wurde der zytoplasmatische Schwanz von p23 gegen ein c-myc-Epitop ausgetauscht (p23tail*), welches zudem eine ähnliche Größe besitzt wie die ausgetauschte Domäne. Ein weiteres Konstrukt setzt sich aus der luminalen Domäne von CD8 zusammen, welche an die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne von p23 fusioniert wurde (CD8-p23). Dieses Konstrukt wurde von Walter Nickel bereitgestellt und war von ihm bereits publiziert [Nickel, 1997]. Außerdem wurden die beiden schon beschriebenen Wildtyp Konstrukte von p23, p23wt und p23myc, in die Analyse einbezogen.

Bei transienter Expression von p23tail* in HeLa Zellen lokalisiert das Konstrukt in Strukturen, die denen ähneln, welche durch die Expression von p23wt induziert wurden (Abb.4A). Sie markieren zudem positiv für das ER Protein Calreticulin (eigenen Daten, hier nicht gezeigt) sowie für andere, endogene p24 Proteine (Abb. 4B). Das CD8-p23 Konstrukt lokalisiert im ER, induziert jedoch weder morphologische Veränderungen dieser Organelle, noch bewirkt es die Mislokalisierung anderer, endogener p24 Proteine (Abb.5).

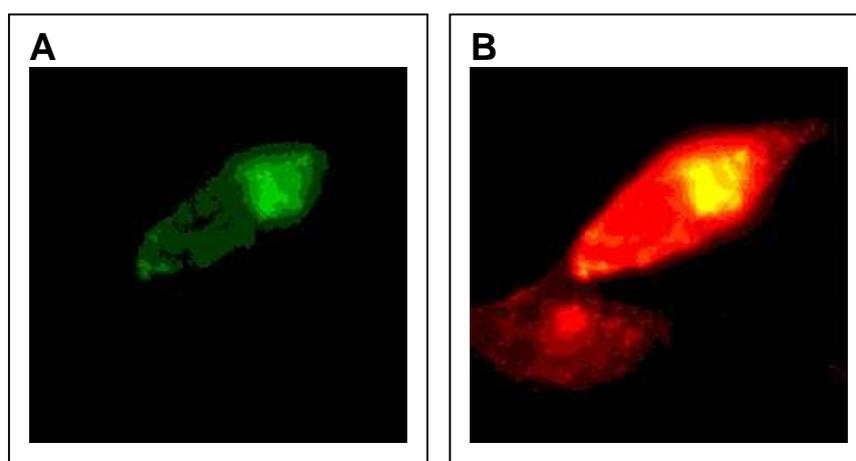


Abb.4: Nach Überexpression von p23tail* lokalisiert das Konstrukt in Strukturen, die denen ähneln, die nach Expression von p23myc erzeugt wurden (A) und induziert gleichfalls eine Umverteilung von endogenem p24 in diese Strukturen (B). HeLa Zellen wurden mittels CaPO_4 transfiziert und nach 12h fixiert. Doppelfärbungen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen das Myc-Epitop (A) und affinitäts-gereinigten, polyklonalen Kaninchen-antikörpern gegen p24 (Elfriede) (B) durchgeführt.

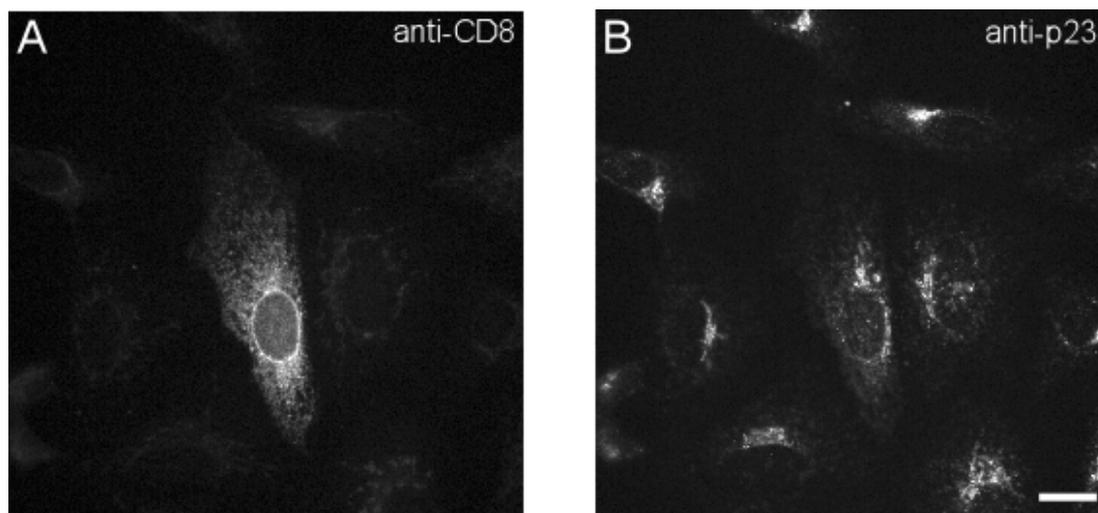


Abb.5: Die Expression des CD8-p23 Konstruktes induziert weder morphologische Veränderungen von ER-Membranen, noch eine Umverteilung von endogenen p24 Mitgliedern. Vero Zellen wurden mit cDNAs mikroinjiziert, welche für CD8-p23 kodieren und nach 6h fixiert und mittels monoklonalen Antikörpern gegen CD8 (Okt8) (A) und affinitätsgereinigten Antikörpern gegen die zytoplasmatische Domäne von p23 (1402) (B) immungefärbt. Maßstab, 10µm.

Da ein p23 Konstrukt mit mutierter zytoplasmatischer Domäne in der Lage ist, endogene p24 Mitglieder umzuverteilen, müssen p24 Proteine entweder über ihre luminalen Anteile, oder ihre Transmembrandomänen, oder über beide, miteinander interagieren. Weil jedoch Transmembran- und zytoplasmatische Domäne von p23 fusioniert an ein CD8 Markerprotein keine Umverteilung von endogenen p24 Mitgliedern bewirken, müssen p24 Proteine über ihre luminalen Domänen miteinander interagieren. Abbildung 6 faßt die Ergebnisse zusammen.

Für p23 und p24 ergaben Strukturvorhersagen für einen Bereich der luminalen Domäne, direkt vor der Transmembrandomäne eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung sogenannte „coiled coil“ Strukturen [Sohn 1996; Stamnes, 1995], welche oft als Interaktionsdomänen zu anderen Proteinen fungieren [Lupas,1996; Lupas, 1991]. Aus diesem Grund ist eine Interaktion zwischen p24 Proteinen über „coiled coil“ Strukturen innerhalb ihrer luminalen Domänen sehr wahrscheinlich.

N-Term.	TM	C-Term.	Lokalisation	Umverteilung von endogenem p24
p23wt				
p23	cc	p23 LRRFFKAKKLIE	ER-Cluster	+
TAG p23	p23	p23	ER-Cluster	+
p23tail*				
p23	p23	c-myc	ER-Cluster	+
CD8-p23				
CD8	p23	p23	ER	-

Abb.6: Zusammenfassung der Lokalisationsstudien mit p23 Chimären.

3.2. Die Expression einer dominant negativen p23-Mutante in HeLa Zellen

Sowohl transiente als auch die stabile Expression der p23tail* Mutante wurden in HeLa Zellen analysiert. Da diesem Konstrukt die zytoplasmatische Domäne von p23 fehlt und deshalb seine Interaktion mit Coatmer unterbunden ist, würde man eine dominant negative p23 Mutante erwarten. Damit sich mögliche toxische Effekte der Mutante während der Selektion stabiler Zelllinien nicht auswirken können, wurde das Konstrukt unter der Kontrolle eines induzierbaren Expressionssystems gestellt. Die Zugabe von Tetrazyklin inhibiert in diesem System die Initiation der Transkription vom Tet-abhängigen CMV-Promotor während der Selektionsphase (Tet-off System) [Gossen und Bujard,1992].

3.2.1. Die Expression einer dominant negativen p23-Mutante ist toxisch

Die p23tail* Mutante konnte transient in HeLa Zellen und Vero Zellen exprimiert werden und lokalisierte, wie bereits beschrieben, in sackartigen Membranen, die dem ER entstammen. Zur weiteren Charakterisierung der Mutante sollten Zelllinien hergestellt werden, welche p23tail*

stabil exprimieren. Dazu wurden pBIV Plasmide, welche für das Konstrukt kodieren mittels CaPO_4 -Präzipitation in HeLa eingebracht und stabile Zelllinien im Tet-off System, in Anwesenheit von Tetrazyklin im Zellmedium, selektioniert. Obwohl die Selektion von drei verschiedenen Konstrukte (CD8p23, p23wt, p23myc) im selben System bereits nach wenigen getesteten Klonen erfolgreich verlief, konnte unter 150 getesteten Klonen keiner isoliert werden, der p23tail* stabil exprimiert.

Die Ursache für das Scheitern der Selektion von p23tail* stabil exprimierenden Zelllinien, könnten toxische Effekte des Konstrukts auf die Zellen während der Selektionsphase sein. Jedoch fiel unsere Wahl bei der Suche nach einem geeigneten Expressionssystem auf das Tet System, da dieses nach Angaben der Hersteller gerade für die Expression toxischer Proteine optimiert wurde. Darüber hinaus legten Analysen dar, daß im abgeschalteten Zustand des Tetrazyklin abhängigen CMV-Promotors keine detektierbare Mengen eines Markerproteins nachgewiesen werden konnten [Gossen und Bujard, 1992]. Trotzdem ist es möglich, daß selbst geringe Mengen von p23tail*, welche unter dem Detektionslimit liegen könnten, ausreichend sind, um während der dreiwöchigen Selektionsphase eine toxische Wirkung zu entfalten. Aus diesem Grund wurden stabile Zellen erneut selektioniert, diesmal jedoch ohne Tetrazyklinzugabe während der Selektionsphase, so daß p23tail* vom CMV Promotor aus transkribiert werden konnte. Eine Quantifizierung der Zellzahl, die im Verlauf der Selektion stabiler Zelllinien p23tail* herstellen, zeigt Abbildung 7.

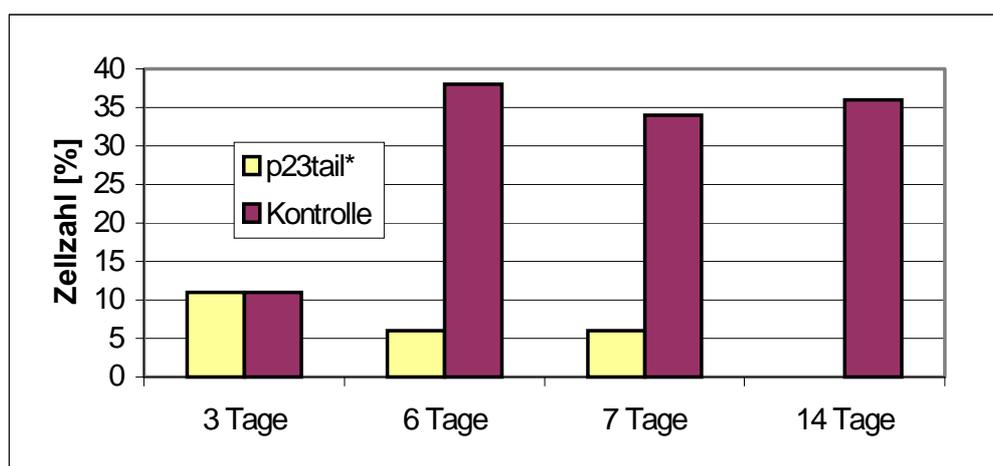


Abb.7: Toxizität einer dominant negativen p23 Mutante (p23tail*). HeLa Zellen wurden mittels CaPO_4 transfiziert und die Anzahl der Zellen, die im Verlauf der Selektion stabiler Zelllinien p23tail* exprimieren, wurde zu den angegebenen Zeitpunkten quantifiziert und mit einer Kontrolltransfektion verglichen. Für jeden Zeitpunkt wurden mindestens 100 Zellen ausgewertet.

Drei Tage nach Transfektion mit p23tail* exprimieren etwa gleich viele Zellen das Konstrukt, wie nach Transfektion mit CD8p23, welches eine ähnliche Größe besitzt. Jedoch schon nach 6 Tagen Selektion veränderte sich dieses Verhältnis dramatisch. Während die Zahl der Zellen, die p23tail* exprimieren auf 6% sinkt, steigt der Anteil der Zellen, welche das selektionierte Protein der Kontrolltransfektion herstellen, auf 38% an. Zwei Wochen nach Transfektion, zu einem Zeitpunkt also, wo Zellklone als Millimeter große Kolonien sichtbar sind und vereinzelt werden können, sind keine Zellen mehr detektierbar, welche für p23tail* positiv markieren. Die plausibelste Erklärung für das Scheitern der Selektion stabiler Zelllinien im Falle der p23 dominant negativen Mutante ist deshalb, daß trotz Tetrazyklinzugabe während der Selektionsphase, eine basale Aktivität des Promotors vorhanden sein muß. Diese basale Aktivität ist ausreichend, um genug p23tail* zu erzeugen, um zum Absterben der betroffenen Zellen zu führen. Für eine vitale Funktion von p23 sprechen auch aktuelle Daten von A. Denzel, welche offen legen, daß der Knockout des Gens in Maus letal ist [Denzel, 2000].

3.3. Einfluß der p24 Mitglieder auf den intrazellulären Protein Transport

Zahlreiche Experimente sprechen für eine Beteiligung von p24 Proteinen im Transport von Cargo Proteinen, jedoch divergieren die Ergebnisse zwischen Hefe und Säugerzellen. So ist der Verlust von nur einem Mitglied in Säugerzellen letal [Denzel, 2000]. Demgegenüber besitzen Nullmutanten in Hefe, denen alle acht p24 Mitglieder fehlen, im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Wachstumsrate. Sie weisen ähnlich moderate Transportdefekte einiger sekretorischer Proteine auf, wie der Knockout eines einzelnen p24 Proteins [Springer, 2000].

Hinweise für eine Beteiligung der p24 Familie im vesikulären Transport in Säugerzellen geben Transportversuche mit Markerproteinen wie dem G-Protein des *vesikular stomatitis virus* (VSV-G Protein). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze mit einer Temperatur-sensitiven Mutante des VSV-G Proteins verfolgt. Zum einen wurden die Auswirkungen der Expression verschiedener p24 Konstrukte auf den Transport von VSV G-Protein untersucht. Ein anderer Ansatz bestand darin, spezifische Antikörper beziehungsweise ihre Fab-Fragmente, welche gegen die zytoplasmatischen Domänen von p24 Mitgliedern gerichtet sind, zu injizieren, während das Markerprotein zur Zelloberfläche transportiert wird.

3.3.1. Die Expression von p24 Konstrukten hemmt den anterograden Transport von VSV-G Protein zur Zelloberfläche

Die Temperatur-sensitive Mutante des VSV Glykoprotein G (tsO45-G) akkumuliert bei 39,5°C fehlgefaltet im ER. Faltung und Export aus dem ER werden erst ermöglicht, nachdem die Temperatur auf 31°C gesenkt wird [Bergmann, 1981].

Plasmide, welche für das jeweilige p24 Konstrukt kodieren, wurden mittels Mikroinjektion in Vero Zellen eingebracht. Nach 6 Stunden exprimierten die Zellen immunochemisch detektierbare Mengen der rekombinanten Proteine und wurden mit Virus infiziert. G-Protein wurde für 3h bei 39°C synthetisiert und im ER akkumuliert. Dann wurde dem Zellmedium Cycloheximid zugefügt, um jede weitere Proteinsynthese zu verhindern und die Temperatur auf 31°C gesenkt, damit der Transport des G-Proteins zur Plasmamembran fortgesetzt werden konnte.

Quantitative Analysen ergaben, daß in Zellen, welche p23tail* exprimieren, der Anteil von tsO45-G, welcher die Plasmamembran erreicht, im Vergleich zu nichtinjizierten Zellen oder zu Zellen, welche ein Kontrollkonstrukt herstellen (ARF oder CD8p23), auf ~20% reduziert ist (Abb.8).

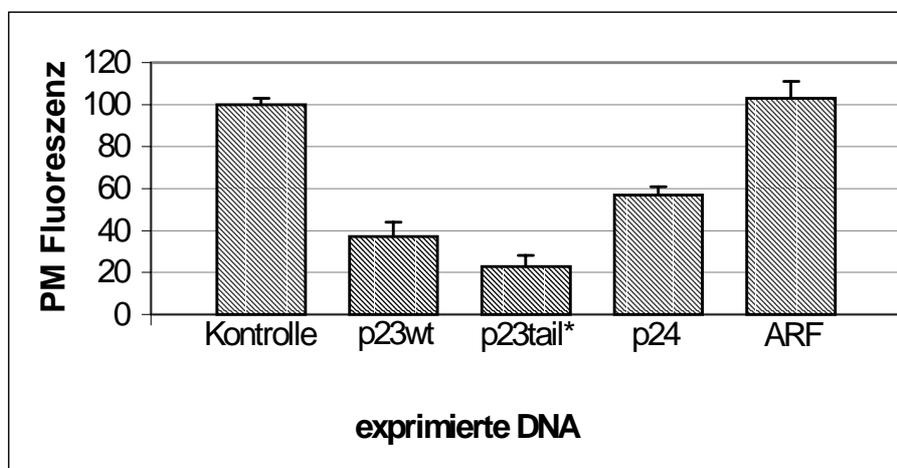


Abb.8: Die Expression von p24 Konstrukten in Vero Zellen hemmt den anterograden Transport von VSV-G zur Zelloberfläche. Vero Zellen wurde mit Plasmiden, welche für die jeweiligen p24 Konstrukte kodieren, mikroinjiziert. Sechs Stunden nach der Injektion wurden die Zellen mit VSV tsO45 infiziert und das tsO45G bei 39,5°C für 3 Stunden synthetisiert und im ER akkumuliert. Danach wurde Cycloheximid dem Medium zugesetzt und die Temperatur auf 31°C abgesenkt. Nach einer weiteren Stunde wurden die Zellen fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern entwickelt. Die Oberflächen (VSV-G) Fluoreszenz der injizierten Zellen wurde quantifiziert und jeder Wert normiert mit der Oberflächenfärbung von nichtinjizierter Zellen (Kontrolle). Als Kontrollkonstrukt wurde ein Plasmid, welches für ARF kodiert injiziert.

Der größere Prozentsatz von ts045-G konnte in diesen Zellen jedoch nicht auf der Oberfläche detektiert werden, sondern akkumuliert in internen Membranen (Abb.9).

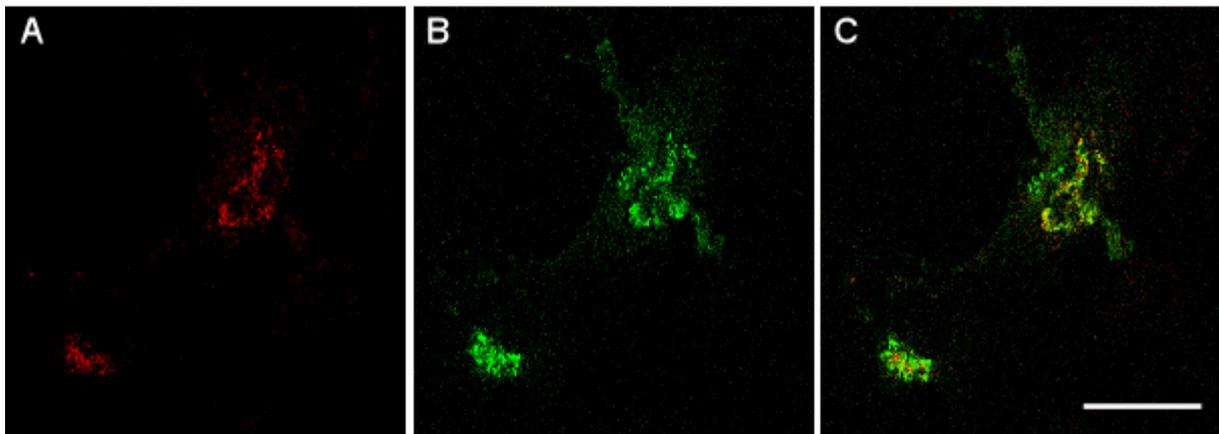


Abb.9: Mikroinjektion von p23tail* DNA hemmt den Transport von tsO45-G zur Zelloberfläche; tsO45G akkumuliert in internen Membranen. Vero Zellen wurden mit Plasmiden, welche für p23tail* kodieren mikroinjiziert. Sechs Stunden nach der Injektion wurden die Zellen mit VSV tsO45 infiziert und das tsO45G bei 39,5°C für 3 Stunden im ER akkumuliert. Danach wurde Cycloheximid dem Medium zugesetzt und die Temperatur auf 31°C abgesenkt. Nach einer weiteren Stunde wurden die Zellen fixiert, mit Triton permeabilisiert und mit Antikörpern gegen VSV-G (P5D4) (B) und p23tail* (1402) (A) entwickelt. Die konfokalen Signale beider Kanäle wurden auf eine ähnliche Intensität gebracht und die erhaltenen Bilder überlagert (C). p23tail* lokalisiert in internen, kernnahen Membranen (A). Intrazelluläres tsO45-G kolokalisiert teilweise mit p23tail*(B). Der größte Teil befindet sich aber in Strukturen, welche nicht für p23tail* markieren. Das rechte Bild zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle (C). Maßstab, 10µm.

Eine Hemmung des Transportes von tsO45-G zur Plasmamembran konnte jedoch auch bei der Expression der Wildtyp Konstrukte von p23 (~60% Hemmung) und p24 (~ 40 % Hemmung) festgestellt werden, nicht aber nach Mikroinjektion von Kontrollkonstrukten. Darüber hinaus führt die Expression von p23wt, p24wt oder p23tail* zu temporären Veränderungen im Endomembransystem, da in mikroinjizierten Zellen (Abb. 10A) die Signale für Coatomer oder Manosidase I fragmentiert erscheinen (Abb. 10B) und nicht wie in Wildtyp Zellen als kompakte Struktur nahe dem Zellkern (Abb.10B).

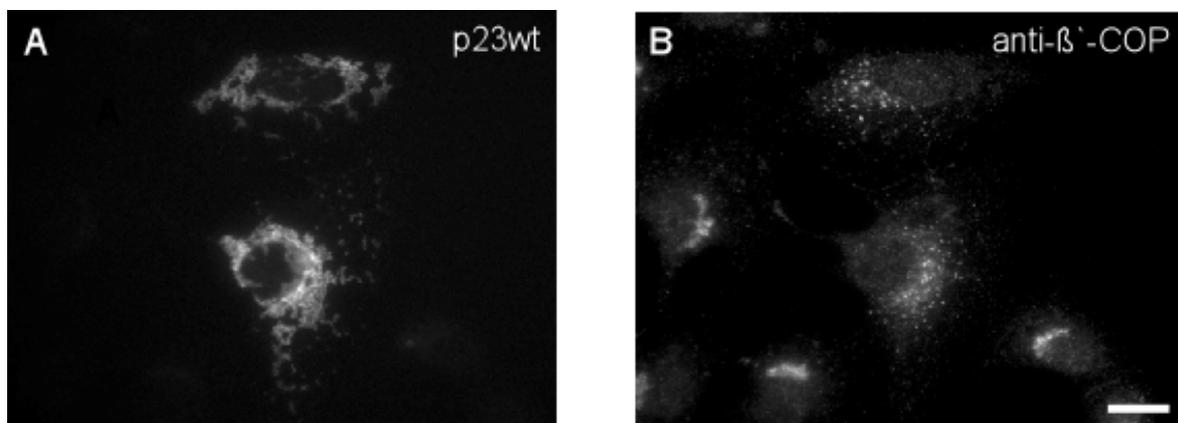


Abb.10: In Zellen, welche p23wt exprimieren (A), erscheint das COPI Signal (B) fragmentiert. Vero Zellen wurden mit p23wt DNA mikroinjiziert, nach sechs Stunden fixiert und mit Antikörpern gegen p23 (1402) und Coatomer (CM1A10) gefärbt. Maßstab, 10µm.

3.3.2. Die Injektion von Antikörpern, welche gegen die zytoplasmatischen Domänen von p23 und p25 gerichtet sind, hemmen den Transport von VSV-G zur Zelloberfläche

Vorangegangene Studien demonstrieren, daß die Mikroinjektion von spezifischen Antikörpern ein wirksames Mittel für die funktionelle *in vivo* Analyse eines Proteins sein kann: Mikroinjizierte Antikörper, welche gegen den zytoplasmatischen Schwanz von VSV-G [Kreis, 1986] oder gegen β -COP [Pepperkok, 1993] gerichtet sind, hemmen den Transport von VSV-G zur Zelloberfläche.

Es stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit beobachteten Transporthemmungen und Membranveränderungen indirekte Effekte sind, hervorgerufen zum Beispiel durch einen Überlastung des ERs, oder ob sie auf eine spezifischen Funktion der p24 Proteine im Transport von Membranproteinen zurückzuführen sind. Deshalb wurden Antikörper, welche gegen zytoplasmatische Peptide von p24 Proteinen gerichtet sind, im VSV-G Transportversuch eingesetzt (Abb. 11).

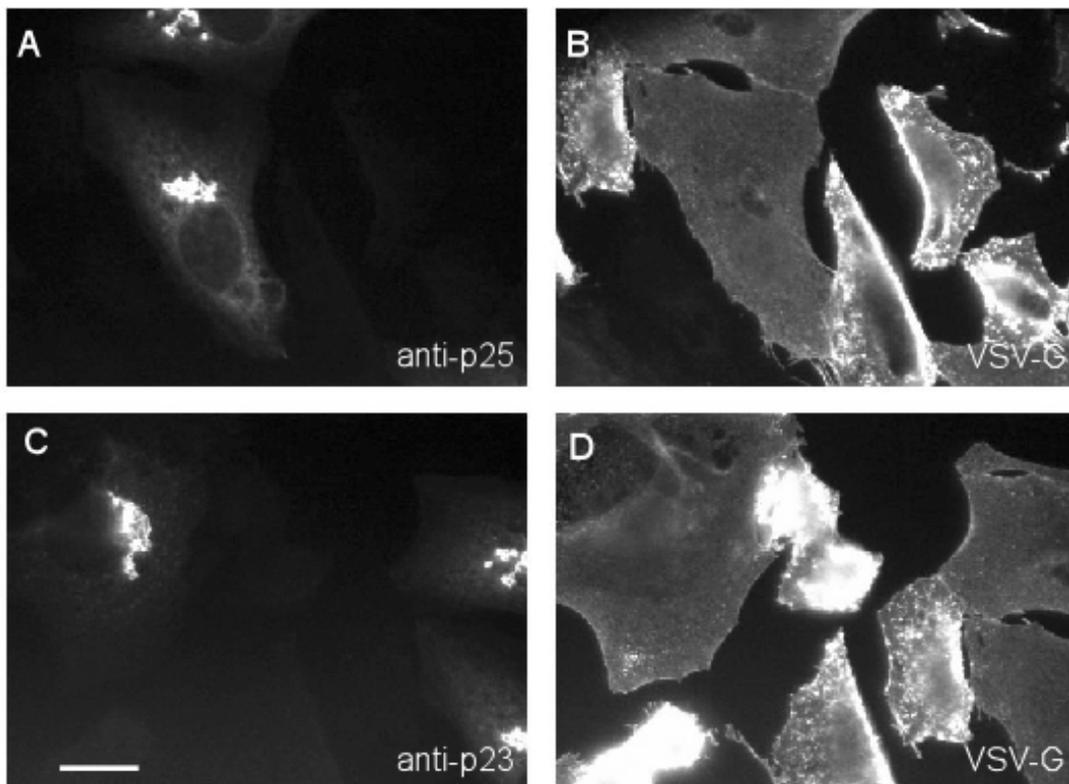


Abb.11: Mikroinjizierte Antikörper gegen den C-Terminus von p23 und p25 binden spezifisch ihre zellulären Antigene und inhibieren den Transport von VSV-G. Vero Zellen wurden mit VSV tsO45 infiziert und das tsO45G bei 39,5°C für 2,5 Stunden synthetisiert und im ER akkumuliert. Antikörper wurden bei 39,5°C mikroinjiziert, Cycloheximid dem Medium zugefügt und die Temperatur auf 31°C reduziert. Nach einer weiteren Stunde wurden die Zellen fixiert und immungefärbt. Mikroinjizierte Antikörper gegen p25 (A) oder p23 (C) binden spezifisch ihre zellulären Epitope. In injizierten Zellen ist gegenüber nichtinjizierten Zellen (B und D) das Oberflächen Signal reduziert. Maßstab, 10µm.

Dazu wurde wieder tsO45-G im ER bei 39°C akkumuliert, die Zellen mit den jeweiligen affinitätsgereinigten Antikörpern bei 39°C injiziert, dem Medium Cycloheximid zugesetzt und anschließend die Temperatur auf 31°C reduziert. Immunfärbungen zeigen eine spezifische Bindung der Antikörper an Golgi Membranen. In den Zellen, denen anti-p23 oder anti-p25 Antikörper injiziert wurden (Abb. 11A,C), ist der Anteil von tsO45-G, welcher die Zellmembran erreichte, gegenüber nichtinjizierten Zellen (Abb. 11B,D) deutlich reduziert.

Die Quantifizierung des tsO45-G Oberflächensignals von injizierten Zellen im Vergleich zu nichtinjizierten Zellen ergab eine Hemmung des VSV-G Transportes nach Injektion von anti-p25 Antikörpern um 45, beziehungsweise 21% nach Injektion von anti-p23 Antikörpern, jedoch keine Hemmung nach Injektion von unspezifischen Kontroll-IgGs (Abb.12). Die Mikroinjektion von Antikörpern, welche gegen p24, p26 und p27 gerichtet waren, blieb ohne Effekt.

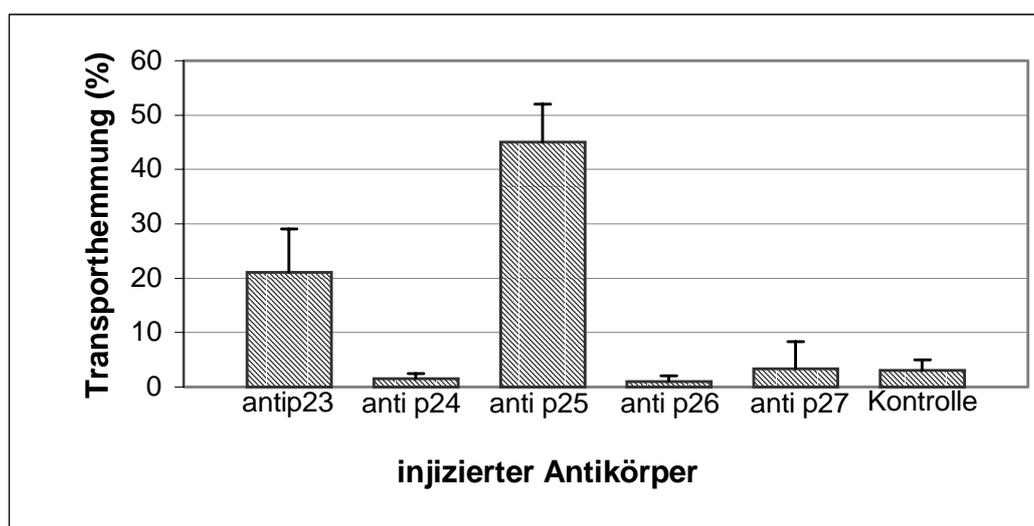


Abb.12: Mikroinjizierte Antikörper gegen den C-Terminus von p23 und p25 inhibieren den Transport von VSV-G zur Plasmamembran in Vero Zellen. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter Abbildung 11 beschrieben. Die VSV-G Oberflächenfluoreszenz injizierter Zellen wurde quantifiziert und zu der nichtinjizierter Zellen ins Verhältnis gesetzt. Während die Injektion von unspezifischen IgGs zu keiner Hemmung im VSV-G Transport führt (Kontrolle), hemmen affinitätsgereinigte anti-p23 und anti-p25 Antikörper. Antikörper gegen p24, p26 oder p27 bewirken keine Transporthemmung.

Grund hierfür könnten unterschiedliche Qualitäten der Antikörperlösungen sein, aber auch Unterschiede in der Anzahl ihrer spezifischen Antigene. Damit eine Transporthemmung durch die Injektion von Antikörpern bewirkt werden kann, müssen diese im Überschuß in den Zellen vorliegen. In Titrationsreihen wurde deshalb überprüft, in welcher Konzentration die Bindung des jeweiligen Antikörper an sein zelluläres Antigen gesättigt ist. Dazu wurden Vero Zellen mit PFA fixiert und mit verschiedenen Verdünnungen des betreffenden Antiköpers

immungefärbt. Alle p24-Antikörper färben den Golgi spezifisch an, der in Vero Zellen in der Immunfluoreszenz als kompakte, signalstarke Struktur leicht detektierbar ist. Deswegen wurde die Stärke der Golgi Signale als Maßstab für die gewonnene Signalintensität bei einer gegebenen Antikörperverdünnung quantifiziert. Abbildung 13 zeigt die erhaltenen Graphen.

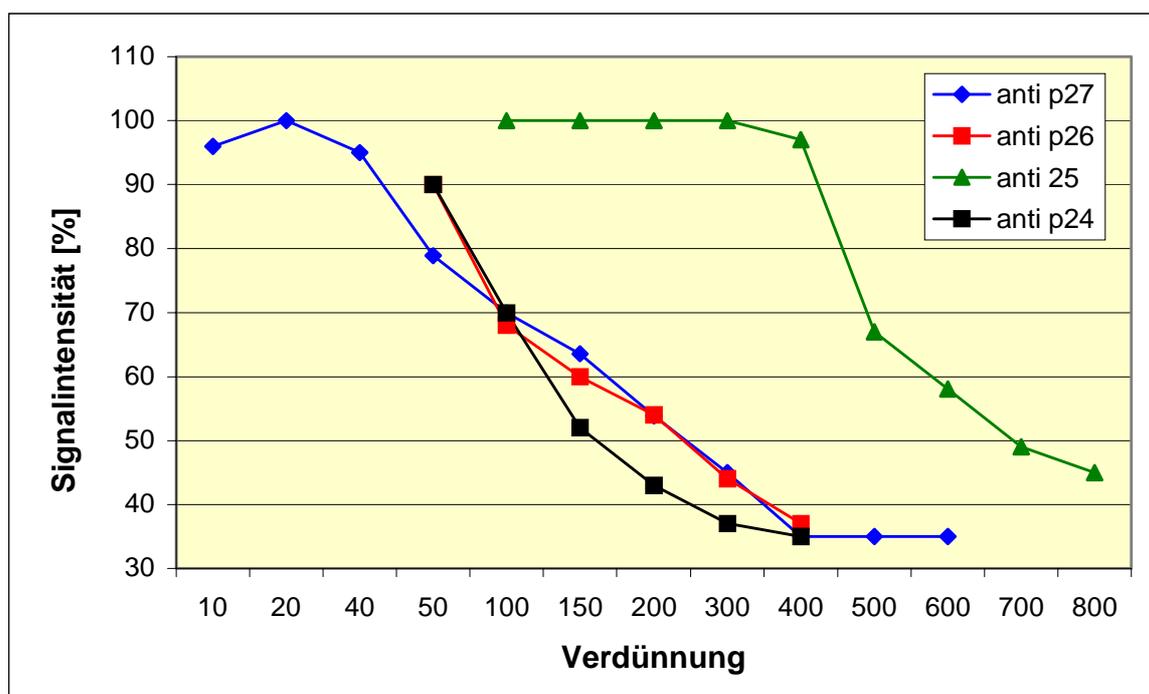


Abb.13: Abhängigkeit der Signalintensitäten der verwendeten Antikörper von ihren Konzentrationen in der Immunfärbung. Vero Zellen wurden mit PFA fixiert und mit verschiedenen Verdünnungen des angegebenen, affinitätsgereinigten Antikörpers immungefärbt. Die Intensität der Golgi Signale wurde quantifiziert und zu der eingesetzten Verdünnung ins Verhältnis gesetzt. Für jeden Datenwert wurden mindestens 100 Signale gemittelt. Die Bindung der anti-p25 Antikörper ist bis zu einer 400-fachen Verdünnung gesättigt. Die Bindung von anti-p27 Antikörpern jedoch nur etwa bis zu einer 40-fachen Verdünnung. Anti-p24 und anti-p26 Antikörper zeigen keine Sättigung ihrer Bindung; ihr Höchstwert wurden deshalb willkürlich auf 90% gesetzt. Mit anti-p23 Antikörpern wurde keine solche Titrationsreihe vermessen, da diese in sehr hohen Konzentrationen in der Immunfluoreszenz eingesetzt werden müssen (1:20) und daher keine Sättigung der Antikörperbindung zu erwarten ist.

P25 Immunfluoreszenzsignale zeigen keinen Verlust ihrer Intensität bis zu einer 400-fachen Verdünnung der Antikörperlösung. Im Gegensatz dazu ist die Bindung der verwendeten anti-p27 Antikörper nur bis zu einer Verdünnung von 1:40 gesättigt. Diejenigen Antikörper, welche gegen die zytoplasmatischen Domänen von p24 oder p26 gerichtet sind, zeigen keine Sättigung ihrer Bindung.

Eine mögliche Ursache für den Umstand, daß die Injektion von Antikörpern gegen p24, p26 und p27 keinen Effekt auf den Transport von VSV-G hat, könnten daher zu geringe Mengen an injizierten Antikörpern sein. Eine weitere Konzentrierung der affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper war jedoch nicht möglich, da sie oberhalb der eingesetzten Konzentrationen Aggregate bildeten und ihre Spezifität einbüßten. Anti-p27 Antikörper zeigen zwar eine Sättigung bis zu einer 40-fachen Verdünnung in fixierten Zellen, innerhalb von lebenden Zellen könnten jedoch ganz andere Bedingungen herrschen. So könnte die Zugänglichkeit des Antigens verändert sein. Zusätzlich werden Lösungen durch die Mikroinjektion in Zellen um etwa den Faktor zehn verdünnt und Immunglobuline in lebenden Zellen relativ schnell durch zelluläre Proteinasen abgebaut. Schon eine Stunde nach Injektion kommt es zu einem deutlichen Signalverlust der Immunfluoreszenzsignale (ohne Abbildung).

Die hemmende Wirkung der anti-p23 und anti-p25 Antikörper auf den VSV-G Transport könnte jedoch auch lediglich auf einer unspezifischen Quervernetzung beruhen, verursacht durch die bivalente Bindungseigenschaft von IgGs. Diese Möglichkeit läßt sich mit Fab-Fragmenten, welche nur eine Valenz besitzen, überprüfen. Hemmen Fab-Fragmente der verwendeten Antikörper, so ist dies ein starker Hinweis für eine Beteiligung von p24 Proteinen im Transport.

3.3.3. Fab-Fragmente, welche gegen die C-Termini von p23, p24, p25, p26 und p27 gerichtet sind, hemmen den Transport von VSV-G zur Zelloberfläche

Die Mikroinjektion von Fab-Fragmenten bietet gegenüber der Verwendung der gesamten IgG Moleküle neben dem Spezifitätskriterium noch weitere Vorteile. Zum einen lassen sie sich höher konzentrieren als affinitätsgereinigte polyklonale Kaninchen IgGs, welche oberhalb einer Konzentration von 2mg/ml dazu tendieren, Aggregate zu bilden. Darüber hinaus sind aufgrund der geringeren Größe von Fab-Fragmenten ihre Antigene in lebenden Zellen unter Umständen für sie leichter zugänglich.

Fab-Fragmente wurden deshalb durch Papain Verdau aus den jeweiligen anti-p24 Antikörpern erzeugt. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen ihre spezifische Bindung an ihre zellulären Antigene (exemplarisch dafür: Abb.14 A,C,E).

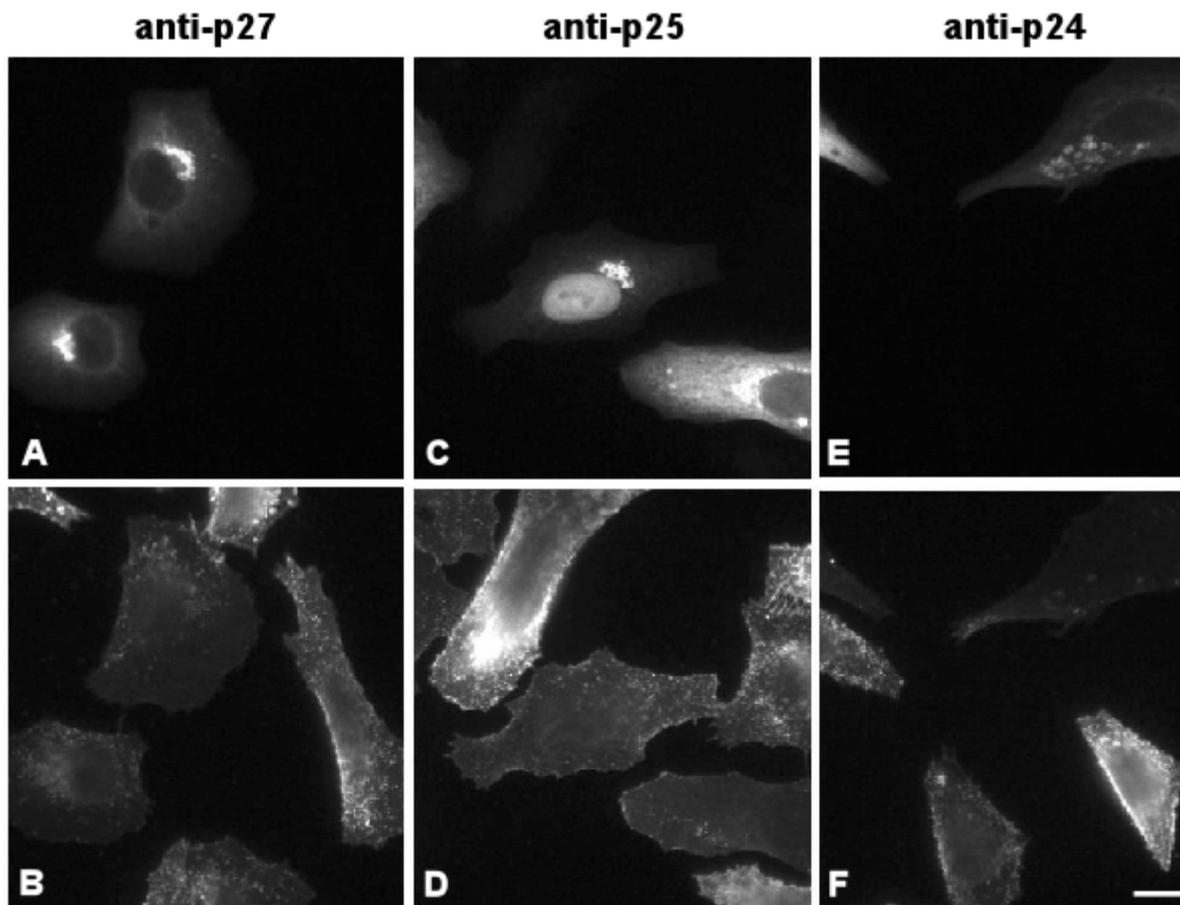


Abb.14: Mikroinjizierte Fab-Fragmente, welche gegen die zytoplasmatischen Domänen von p23, p24, p25, p26 und p27 gerichtet sind, binden spezifisch ihre Antigene in vivo und hemmen den Transport von VSVG zur Zelloberfläche. Die Versuchsdurchführung war wie unter Abb.11 beschrieben. Alle verwendeten Fab-Fragmente binden spezifisch ihr zelluläres Antigen. Fab-Fragmente, gegen die zytoplasmatischen Anteile von p27 (A), p25 (B) und p24 (C) sind hier beispielhaft aufgeführt. In injizierten Zellen ist das VSV-G Oberflächensignal reduziert (B, D und F). Maßstab, 10 μ m.

Wurden sie im VSV-G Versuch eingesetzt, war der Anteil von tsO45-G, welcher die Zellmembran erreichte, in mikroinjizierten Zellen gegenüber nichtinjizierten Zellen deutlich reduziert (Abb. 14 B,D,F). Die Quantifizierung der tsO45-G Oberflächensignale bestätigte, daß Fab-Fragmente aller verwendeten Antikörper gegen p24 Mitglieder, im Gegensatz zu Kontroll-Antikörpern, den VSV-G Transport zur Zelloberfläche signifikant hemmen (Abb.15).

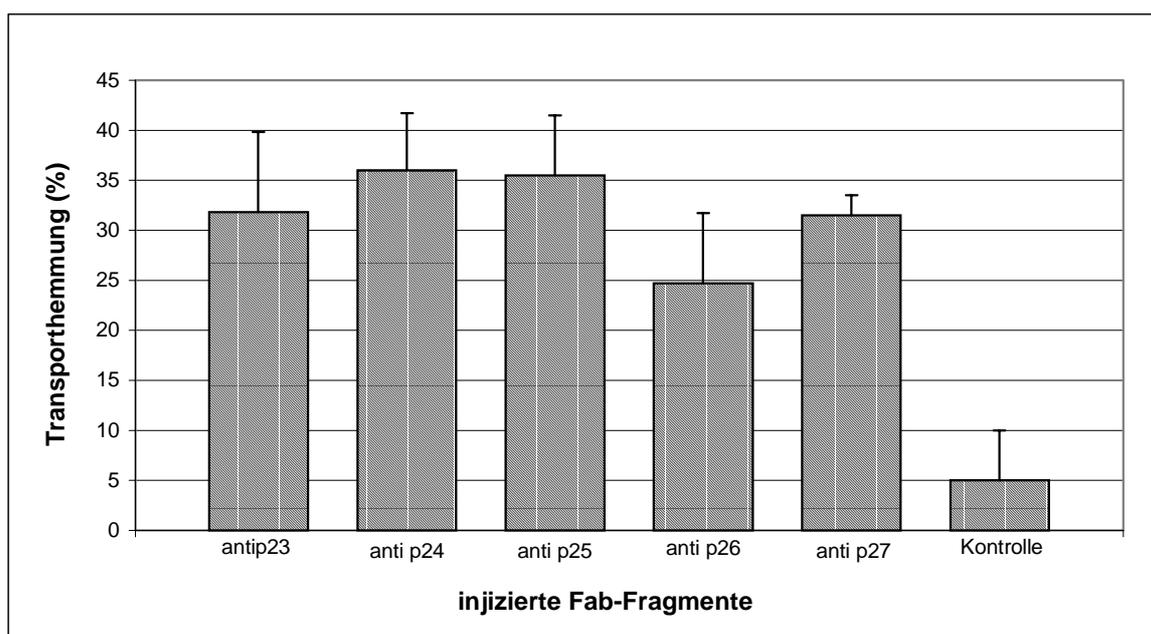


Abb.15: Mikroinjizierte Fab-Fragmente, welche gegen die zytoplasmatischen Domänen von p23, p24, p25, p26 und p27 gerichtet sind, hemmen den Transport von VSV-G zur Zelloberfläche. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter Abbildung 11 beschrieben. Die Quantifizierung der Oberflächensignale injizierter Zellen im Vergleich zu nicht injizierten Zellen ergab eine Hemmung des VSV-G Transportes bei allen verwendeten Fab-Fragmenten um etwa 30%. Unspezifische IgGs führten zu keiner Hemmung des VSV-G Transportes.

Der Umstand, daß der Transport des G-Proteins zur Plasmamembran nicht vollkommen gehemmt wurde, sondern nur um etwa 30% reduziert wurde, ist sicherlich auch auf methodische Grenzen zurückzuführen. Fab-Fragmente werden nach der Mikroinjektion von den Zellen rasch abgebaut. Ihr Abbau vollzieht sich schneller, als dies bei Antikörpern, die noch ihren Fc-Region besitzen, der Fall ist und manifestiert sich in einem Intensitätsverlust der Fluoreszenzsignale schon 45min nach ihrer Mikroinjektion (eigene Daten, ohne Abbildung). Deshalb ist ein Aktivitätsverlust der Fab-Fragmente schon vor Versuchsende zu erwarten.

Andererseits ist es wahrscheinlich, daß zumindest einige p24 Mitglieder nicht direkt am Transport von VSV-G beteiligt sind, sondern daß die beobachteten Effekte vielmehr Auswirkungen einer Störung des Membrangleichgewichts sind, verursacht durch die Hemmung anderer Transportwege. Diese Theorie wird auch durch die Beobachtung untermauert, daß es während des Transportes vom ER zum Golgi zu einer Segregation innerhalb der VTCs (*vesicular tubular clusters*) in VSV-G -haltige und COPI / p23-haltige Domänen kommt [Shima 1999, Martinez-Menarguez 1999]. Dies spricht gegen eine direkte Beteiligung von p23 im anterograden und für seine Funktion im retrograden vesikulären Transport. Eine Hemmung des einen Transportweges muß aber zwangsläufig zu einer

Beeinträchtigung des gegengerichteten Transportes führen. So inhibieren anti-p23 Antikörper als auch ihre Fab-Fragmente den retrograde Transport von Cholera-Toxin [Majouli 98].

Meine Ergebnisse bestätigen eine mindestens mittelbare Rolle von p23 im Transport von VSV-G und weisen darüber hinaus auf eine wichtige Funktion der anderen p24 Mitglieder im intrazellulären Transport hin.

3.4. Hemmt man den Export aus dem ER, werden p24 Proteine in zwei verschiedenen Kinetiken vom Golgi zum ER umverteilt

Arbeiten aus unseren und anderen Arbeitsgruppen demonstrieren, daß p24 Proteine innerhalb der Organellen des frühen Sekretionsweges zyklisieren [Nickel, 1997; Gommel, 1999; Füllekrug, 1999] und miteinander heterooligomere Komplexe bilden [Gommel, 1999; Dominguez, 1998; Belden und Barlowe, 1996; Marzioch 1999]. Mutationsanalysen enthüllten unterschiedliche Lokalisationsmotive in den zytoplasmatischen Domänen von p24 Proteinen. Überträgt man den C-terminalen Schwanz von p23 auf ein normalerweise in der Plasmamembran lokalisiertes Markerprotein, so verleiht er diesem ER Lokalisation [Nickel, 1997]. Wird jedoch der C-Terminus des gleichen Proteins gegen den von p24 ausgetauscht, wird das Konstrukt zur Plasmamembran transportiert [Fiedler, 1997]. Da p23 und p25 diejenigen p24 Mitglieder sind, welche KKXX ähnliche Retrieval Signale enthalten, ist es naheliegend, daß auch die zytoplasmatische Domäne von p25 ER Lokalisationssignale trägt. Dies wurde durch in vivo Mutationsstudien verifiziert [Dominguez, 1998].

Ausgehend von diesen Befunden sind zwei Szenarien denkbar: Entweder existieren verschiedene p24-Protein-Komplexe, mit unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen der einzelnen p24 Mitglieder. Alternativ könnte die Funktion des gleichen p24-Protein-Komplexes modifiziert werden, indem seine Komponenten unterschiedliche Aktivierungszustände annehmen.

Zahlreiche Versuche, die Komposition von p24 Proteinen innerhalb von Golgi Membranen mit der von COP Vesikeln zu vergleichen, ergaben jedoch bisher keine Unterschiede. Vielmehr lokalisierten mindestens vier verschiedene p24 Mitglieder zusammen in Membranen von Golgi Präparationen oder Vesikeln [Dominguez, 1998; Marzioch 1999, Gommel und Verkade, unveröffentlichte Ergebnisse].

In einem alternativen Ansatz verfolgten wir deshalb den retrograden Transport von p24 Proteinen vom Golgi zum ER. Dies wurde erreicht, indem eine dominant negative Mutante von Sar1p (H79G), einer Komponente der COPII Vesikelhülle, in Vero Zellen mikroinjiziert wurde. Die Injektion dieser Mutante hemmt dominant den COPII abhängigen Transport aus dem ER, da Sar1p^{H79G} nicht mehr in der Lage ist, GTP zu hydrolysieren [Barlowe, 1994; Kuge, 1994; Aridor, 1995; Rowe und Balch, 1995]. Nach Mikroinjektion der Sar1p Mutante werden deshalb Proteine, welche zwischen ER und Golgi zyklisieren wie ERGIC-p53, innerhalb kürzester Zeit ins ER umverteilt [Shima, 1998]. Um zu testen, ob p24 Proteine nach Hemmung des ER Exports in unterschiedlichen Zeitverläufen ins ER zurücktransportiert werden, wurden Plasmide, welche für Sar1p^{H79G} codieren, in Vero Zellen mikroinjiziert, die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert und mit anti-p24 Antikörpern immungefärbt.

Überraschend für uns vollzog sich die Umverteilung von verschiedenen p24 Proteinen in zwei klar voneinander getrennten Gruppen. Abbildung 16 A zeigt exemplarisch Zellen, die nach unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und mit Antikörpern gegen p23 oder p27 entwickelt wurden. p23 und p25 wurden dabei schneller ins ER verfrachtet als p27, p26 oder p24. Die graphische Auswertung ergab zwei durch eine halbe Stunde Zeitdifferenz voneinander getrennte Graphen für die beiden Subpopulationen der p24 Mitglieder (Abb.16 B). Eine Subpopulation besteht aus p23 und p25, welche in einer ERGIC-p53 ähnlichen Kinetik im ER erscheinen (Abb.17), wohingegen die andere Population p24, p26 und p27 einschließt, welche erst später im ER ankommen.

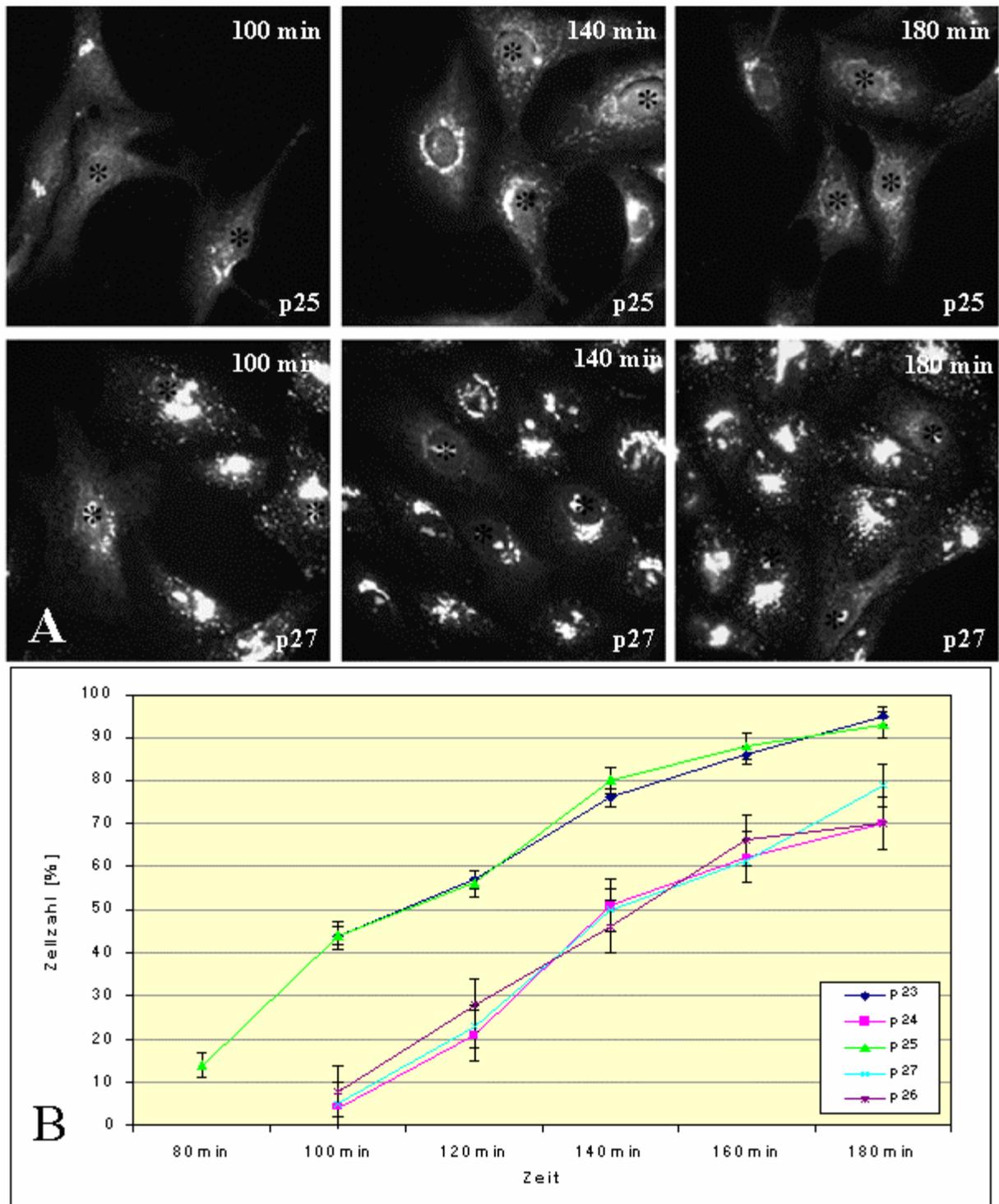


Abb.16: Hemmt man den Export aus dem ER, werden p24 Proteine in zwei verschiedenen Kinetiken vom Golgi zum ER umverteilt. Vero Zellen wurden mit der DNA einer dominant negativen Sar1 Mutante (Sar1m) mikroiinjiziert (Stern), welche den COPII vermittelten anterograden Transport aus dem ER hemmt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und mit Antikörpern gegen p24 Proteine immungefärbt. Die Sar1m induzierte Umverteilung der p24 Mitglieder vollzieht sich in zwei getrennten Gruppen. Dabei verschwindet das Golgi Signal von p23 oder p25 schneller als von allen anderen p24 Mitgliedern und an seiner Stelle erscheint ein schmaler Saum um den Zellkern, typisch für eine ER Signal. Abbildung 16A zeigt exemplarisch einige Zeitpunkte für zwei p24 Mitglieder. (B): Der Anteil der Zellen, welcher das Golgi Signal für das angegebene p24 Mitglied verloren hat wurde für jeden Zeitpunkt bestimmt. Für jeden Datenpunkt wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet. Jeder Graph wurde zweimal reproduziert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte der Standardabweichungen.

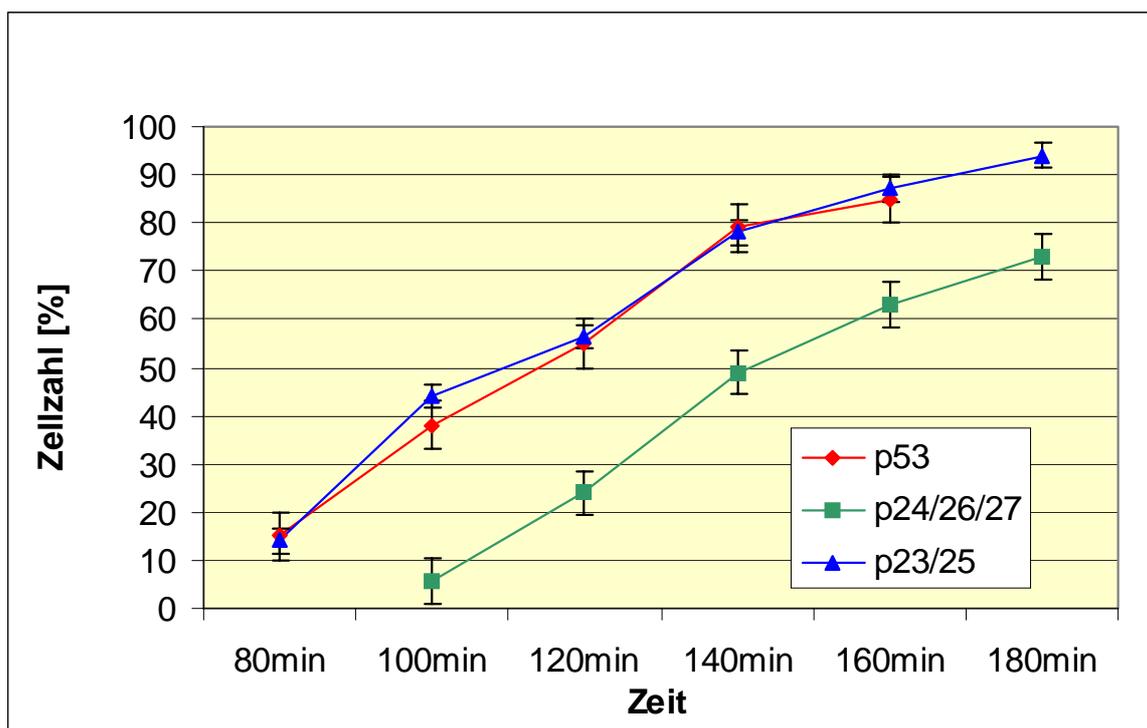


Abb.17: Hemmt man den ER-Export durch Mikroinjektion einer dominant negativen Sar1 Mutante, so werden p25 und p23 in einer ERGIC-p53 ähnlichen Kinetik ins ER umverteilt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie bei Abbildung 16 beschrieben, mit der Ausnahme, daß mit Antikörpern gegen ERGIC-p53 entwickelt wurde. Die Graphen von p24, p26 und p27 wurden gemittelt und zu einer Kurve zusammengefaßt. Ebenso wurde mit den Graphen für p25 und p23 verfahren. Die Fehlerbalken entsprechen den mittleren Standardabweichungen.

Diese Ergebnisse lassen sich nicht einfach durch die unterschiedlichen Lokalisationen der einzelnen p24 Proteine innerhalb des Golgis erklären, da nach Brefeldin A Behandlung p23, 25, 26 und 27 in Strukturen mit KDEL-Rezeptor und ERGIC-p53 kolokalisieren, p24 jedoch zusammen mit Golgi Markern umverteilt wird [Emery, 2000]. Auch unterschiedliche Proteinmengen der p24 Proteine innerhalb des Golgis erklären den beobachteten Effekt nicht, da p23 vorwiegend im cis Golgi lokalisiert [Rojo,1997; Springer, 2000; Sohn, 1996], p25 im ER [Dominguez, 1998; Lavoie, 1999; Wada, 1991], p26 und p27 im cis-medialen Golgi [Emery, 2000; Füllekrug, 1999], wohingegen der Großteil von p24 eher zum medialen-trans Golgi hin orientiert sein sollte [Emery, 2000].

Die plausibelste Erklärung ist daher, daß sich p23 zusammen mit p25 teilweise auf anderen Transportruten bewegt als p24, p26 und p27, und daß es innerhalb des frühen Sekretionsweges zu einer Trennung der p24 Mitglieder kommt. Für diese These spricht auch die sich mit p53 deckenden Kinetik von p23 und p25. Aktuelle Daten von Klumperman deuteten auf die Existenz eines direkten Transportweges vom Intermediären Kompartiment zum ER hin, welcher von ERGIC p53 genutzt wird [Klumperman, 1998]. Meine Daten legen

nahe, daß auch p23 und p25 auf diesem Weg ins ER gelangen könnten und weisen deshalb erstmalig auf eine funktionelle Auftrennung von p24 Proteinen in vivo hin.

4. Diskussion

4.1. Lokalisation und Komplexbildung von p24 Proteinen im frühen Sekretionsweg

Die vorliegende Studie leistet einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Funktion von p24 Proteinen in Säugerzellen. Die erarbeiteten Daten demonstrieren, daß bei Überexpression eines p24 Proteins dieses, zusammen mit endogenen p24 Mitgliedern, in ER-Membranen mißlokalisiert. Da p24 Proteine heterooligomere Komplexe miteinander bilden [Belden und Barlowe, 1996; Dominguez, 1998; Gommel, 1999; Marzioch, 1999] und innerhalb des frühen Sekretionsweges zyklisieren [diese Studie, veröffentlicht in Gommel, 1999; Nickel, 1997; Emery, 2000; Füllekrug, 1999], ist die beobachtete Umverteilung sehr wahrscheinlich Folge einer *in vivo* Interaktion zwischen endogenen p24 Mitgliedern und dem exprimierten Konstrukt. Diese Interaktion findet über die luminalen Domänen der p24 Proteine statt, wahrscheinlich in einem Bereich nahe der Transmembrandomäne, für den Strukturvorhersagen die Ausbildung von *coiled coils* annehmen. Aktuelle Mutationsstudien mit p24 Konstrukten, denen diese *coiled coil*-Motive deletiert wurden, legen ebenfalls eine *in vivo* Interaktion der p24 Proteine über diesen Abschnitt der luminalen Domäne nahe [Emery, 2000].

Die Reduzierung des Expressionsniveaus von p23wt durch steigende Tetrazyklinzugabe im Tet-off Expressionssystem verbesserte nicht dessen Mißlokalisation (eigene Daten, hier nicht gezeigt). Dies läßt vermuten, daß ein festes Mengenverhältnis zwischen den p24 Proteinen essentiell für deren dynamische Positionierung innerhalb der Zelle ist. Für diese Interpretation sprechen auch Ergebnisse aus anderen Arbeitsgruppen: Bei Expression eines einzelnen p24 Proteins mißlokalisiert dieses in ER-Membranen. Koexprimiert man jedoch mehrere Mitglieder, so lokalisiert zumindest ein Prozentsatz der exprimierten Proteine korrekt [Dominguez, 1998; Füllekrug, 1999; Emery, 2000]. Zudem ermittelten Studien in Hefe und Säugerzellen, daß *in vivo* die Proteinmengen einzelne p24 Mitgliedern voneinander abhängig reguliert werden [Belden und Barlow, 1996; Marzioch, 1999; Denzel, 2000].

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie und den zitierten Arbeiten kristallisiert sich daher als eine generelle Tendenz heraus, daß ein Balance von selektiven Interaktionen zwischen p24 Proteinen notwendig ist, um sie in einem dynamischen Gleichgewicht in den Organellen des frühen Sekretionsweges zu positionieren.

4.2. Hefe versus Zellkultur

Der Knockout von allen acht p24 Mitgliedern in Hefe ist vital. Die achtfache Mutante besitzt im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Wachstumsrate und weist ähnlich moderate Transportdefekte einiger sekretorischer Proteine auf, wie der Knockout eines einzelnen p24 Proteins [Springer, 2000]. Scheinbar in Widerspruch zu den Befunden in Hefe steht die Beobachtung, daß eine dominante Mutation von p23 in Säugerzellen toxisch wirkt und der Knockout von p23 in Maus [Denzel, 2000] letal ist. Man sollte sich jedoch vergegenwärtigen, daß Hefe ein wesentlich einfacheres Endomembransystem besitzt und sich Störungen desselben deshalb nicht gleich drastisch auswirken müssen. In Hefe könnten darüber hinaus alternative Transportwege bestehen, die es diesem Organismus ermöglichen, flexibler auf Störungen zu reagieren.

In diesem Zusammenhang sind vielleicht die sogenannte BST-Mutanten zu setzen. BST steht dabei für *bypass of sec thirteen*, wobei Sec13 eine Untereinheit der COPII Proteinhülle darstellt [Pryer, 1993; Salama, 1993]. Schaltet man in Hefezellen Sec13 aus, so ist dies letal [Pryer, 1993]. Mutiert man aber zusätzlich BST-Gene, so können Sec13-Mutanten wieder überleben. Bei BST2 handelt es sich dabei um das Hefehomolog zu p24, Emp24 [Elrod-Erickson und Kaiser; 1996] und BST3 entspricht Erv25p, dem Hefehomolog zu p23 [C. Barlowe, persönliche Mitteilung]. Die Letalität des temperatursensitiven Defektes von Sec13 wird gleichfalls durch Mutationen des Gens für Erp1, einem p25 Ortholog in Hefe, unterdrückt, nicht jedoch nach Ausschalten eines der verbleibenden 5 weiteren p24 Mitglieder in Hefe, erp2 bis erp6 [Marzioch, 1999].

Ähnliche Effekte werden auch in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* für Doppelmutationen der Homologen von p24 oder p23, Sel-9 und F47G9.1, mit Sec13 beobachtet [Wen, 1999]. Verlust oder Mutation von Sel-9 oder F47G9.1 reprimieren die Mutation in den Genen *lin12* und *glp-1*, Homologe der *Drosophila notch* Zelloberflächen-Rezeptorgene. Im Falle von GLP-1 liegt die Ursache darin, daß durch Mutation von p24 Proteinen ein Block aufgehoben wird, welcher mutiertes Protein im ER zurückhält.

Die Befunde mit Doppelmutanten von Sec13 und p24 Proteinen werden häufig dahingehend ausgelegt, daß p24 Proteine negative Regulatoren der Vesikel Bildung und / oder der Frachtsortierung darstellen, indem sie zum Beispiel den Eintritt von Proteinen in die Knospungsbereiche von Vesikel kontrollieren. [eine Übersicht gibt Kaiser, 2000].

Die beschriebenen Defekte könnten aber ebenso einfach mit einem Ungleichgewicht im Endomembransystems erklärt werden: Bei einer Hemmung des anterograden Transportes durch eine Mutation von Sec13 und funktionierendem retrograden Transport, käme es zwangsläufig zu einer Verschiebung des Membrangleichgewichtes. Zum Beispiel würden Membranproteine, die eine spezifische Fusion der Transportvesikel vermitteln (SNARES)

sowie bestimmte Membranlipide in ihrer Lokalisation verändert werden. Wenn jetzt einige p24 Proteine überwiegend in einen retrograden Transportweg involviert sind, würde der Doppelknockout von Sec13 und einem p24 Mitglied wieder eine Balance herstellen. Mit der gleichen Argumentation könnte man den Verlust der Letalität bei Mutation von *glp-1* beziehungsweise *lin12* in *C. elegans* durch den gleichzeitigen Knockout eines p24 Gens erklären. Nicht oder mangelhaft funktionierende Recycling Wege würden dazu führen, mutiertes GLP-1 oder LIN12 an der Plasmamembran zu lokalisieren, wo diese einen Teil ihrer normalen, zellulären Funktion erfüllen könnten, was der Zelle ein Überleben ermöglichen würde. Diese Argumentationslinie geht ebenfalls konform mit dem Befund, daß der Knockout einzelner oder mehrerer p24 Proteine in Hefe eine vermehrte Sekretion ER retenierter Proteine bewirkt [Elrod-Erickson und Kaiser, 1996].

Vergleicht man die aufgeführten Arbeiten, so wird deutlich, daß Ergebnisse, welche mit einfachen Organismen wie Hefe gewonnen werden, nicht immer auf das Säugersystem übertragen werden können. Obwohl Hefezellen den achtfachen Knockout aller p24 Proteine überleben, ist der Verlust von p23 in Maus letal und die Expression einer dominant negativen p23 Mutante (*p23tail**) in HeLa Zellen toxisch. Deshalb müssen zwischen Hefe und Säugierzelle, in Bezug auf ihre p24 Proteine, grundlegende Unterschiede auf der Ebene der einzelnen Zelle bestehen.

Dabei ließe sich die Toxizität des *p23tail** Konstruktes in Säugierzellen hinreichend durch ein p23-abhängigen retrograden Transport erklären. Ein solcher Recyclingweg könnte durch die Expression des *p23tail** Konstruktes nachhaltig gestört werden. Denkbar ist darüber hinaus, daß Recyclingmechanismen im Laufe der Evolution essentiell geworden sind, was die Verschiedenheit von Hefe und Säugierzelle bezüglich der p24 Familie erklären würde.

4.3. Einfluß der p24 Mitglieder auf den intrazellulären Transport

Die in dieser Arbeit beschriebenen Transporthemmung von VSV-G durch die Expression eines *p23tail** Konstruktes ist nicht alleine durch eine Überlastung des ERs zu erklären, da die Expression von ARF sowie eines Transmembranprotein vergleichbarer Größe (CD8-p23) im gleichen Expressionssystem zu keiner vergleichbaren Hemmung führte. Interessant ist, daß schon die Überexpression der Wildtyp Konstrukte *p23wt* und *p24wt* eine signifikante Transporthemmung verursacht. Der Umstand, daß bei diesem Vorgang endogene p24 Mitglieder ins ER umverteilt werden, könnte dabei in einem unmittelbaren Zusammenhang stehen. Für eine Funktion von p24 Mitglieder bei der Bildung von Vesikeln sprechen *in vivo* und *in vitro* Daten: In einer Doppelmutante, welche eine Deletion bezüglich *Emp24* und eine konditionelle Mutation in *Sec18* (NSF-Homolog in Hefe) besitzt, akkumulieren deutlich

weniger Vesikel, als in einer Sec18-Einfachmutanten [Stamnes, 1995]. Des Weiteren bindet ein Peptid, welches der zytoplasmatischen Domäne von p23 entspricht, spezifisch COPI und induziert *in vitro* die Bildung von COPI Vesikel [Bremser, 1999].

Fördern auch andere p24 Mitglieder die Vesikelbildung, so muß die Mißlokalisierung von mehreren p24 Mitgliedern eine Transporthemmung bewirken.

Ein zweiter Ansatz zur Untersuchung des Einflusses der p24 Mitglieder auf den Transport von Transmembranproteinen bestand in der Mikroinjektion von Antikörpern.

Antikörper, welche gegen die zytoplasmatischen Domänen von p24 Proteinen gerichtet sind, beziehungsweise ihre Fab-Fragmente, hemmen spezifisch den Transport von VSV-G zur Zelloberfläche. Dabei wurde eine Hemmung des Transportes bei allen verwendeten Fab-Fragmenten festgestellt, während nur bei anti-p23 und bei anti-p25 Antikörpern eine reproduzierbare Transporthemmung beobachtet werden konnte. Der Gehalt an „aktiven Antikörpern“ in den verwendeten Lösungen korrelierte dabei mit den beobachteten Transporthemmungen. Diejenigen anti-p24 Antikörper, welche keinen Effekt auf den Transport von VSV-G hatten, zeigten auch keine Sättigung ihrer Signale in Titrationsreihen. Deshalb ist anzunehmen, daß alle p24 Proteine im vorwärtsgerichteten Transport von VSV-G eine Rolle spielen. Ob diese Funktion eine unmittelbare oder mittelbare ist, kann durch einen solcherart gestalteten Transportversuch nicht endgültig entschieden werden, da die Hemmung der einen Transportrichtung den entgegengerichteten Transport unweigerlich beeinträchtigen muß, zum Beispiel durch eine Verknappung bestimmter Membranlipide oder auch von Komponenten, die für Vesikelbildung und Fusion notwendig sind.

Ein Möglichkeit, p24 Proteinen *in vivo* zu verfolgen und damit die Frage zu klären, ob sich verschiedene p24 Mitglieder/ Komplexe unterschiedlichen Transportwegen zuordnen lassen, besteht darin, Chimären zwischen p24 Mitgliedern und fluoreszierenden Molekülen herzustellen. Der Versuch einer direkten Fluoreszenz-Markierung von p24 Konstrukten schlug jedoch fehl, da offensichtlich die Funktionalität der Konstrukte beeinträchtigt wurde [Blum, 1999]. Zwar waren GFP-markierte p23 und p24 Konstrukte in der Lage, das ER zu verlassen. In mehreren, unabhängigen Arbeiten wurde aber beschrieben, daß nach Expression von nur einem p24 Protein in Säugerzellen dieses, vermutlich durch seine Wechselwirkung mit endogenen Mitgliedern, im ER zurückgehalten wurde [Gommel, 1999; Füllekrug, 1999; Dominguez, 1998]. Diese Diskrepanz ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die von Blum verwendeten N-terminal markierten p24 Konstrukte nicht mehr in der Lage sind, miteinander Komplexe zu bilden.

Blums Daten demonstrieren, daß eine direkte, N-terminale Markierung von p24 Konstrukten problematisch ist. Der relativ kurze C-Terminus dieser Proteine enthält Motive, deren Positionierung wahrscheinlich essentiell ist für die Interaktion mit Coatomer [Sohn, 1996], und kann daher ebenfalls nicht markiert werden.

Deshalb wählten wir einen alternativen Ansatz, um die Dynamik von p24 Proteinen *in vivo* zu verfolgen: Mikroinjektion einer dominant negative Sar1 Mutante (H79G) hemmte dabei den COPII abhängigen Export aus dem ER, so daß der Rücktransport verschiedener p24 Proteine vom Golgi / IC ins ER verfolgt werden konnte. Dabei erschienen p23 und p25 Signale wesentlich früher im ER als diejenigen von p24, p26 und p27. Die graphische Auswertung ergab, daß p23/p25 und p24/p26/p27 zwei Subpopulationen von p24 Proteinen bilden, welche durch eine Zeitdifferenz von 30 min. voneinander getrennt ins ER umverteilt werden. Dabei decken sich die Kurven, welche man für den Rücktransport für p23 oder p25 erhält, mit der von p53. Die klare Auftrennung in zwei unterschiedliche Zeitverläufe läßt sich nicht allein durch unterschiedliche subzellulären Lokalisationen der p24 Mitglieder erklären. Obwohl p24 bis hinein in den trans Golgi lokalisiert [Emery, 2000], wird es mit der selben Kinetik ins ER umverteilt wie p26 und p27, die bevorzugt im cis-medialem Golgi lokalisieren [Emery, 2000; Füllekrug, 1999].

Eine mögliche Interpretation der Daten ist daher, daß ein Großteil des im frühen Sekretionsweg vorhandenen p23 und p25, verglichen mit p24, p26 und p27, auf unterschiedlichen Transportwegen zyklisiert. Diese Interpretation ließe sich überprüfen, indem man den durchgeführten Versuch mit einen 15°C-Temperaturblock kombiniert. Auf diese Weise erhielten alle p24 Proteine bei Versuchsbeginn die gleiche Lokalisation. Nach Mikroinjektion von Sar1pH79G Protein und Temperaturerhöhung auf 37°C, wäre dann zu überprüfen, ob p24 Proteine auf unterschiedlichen Transportwegen das ER erreichen und in welchem zeitlichen Verlauf sich diese Umverteilung vollzieht.

Denkbar wäre, daß p23 und p25 direkt vom IC ins ER umverteilt werden, wohingegen der Hauptteil der anderen p24 Mitglieder über den Golgi ins ER zyklisiert. Die Existenz eines direkten Weges vom IC ins ER wird durch aktuelle Ergebnisse von Judith Klumperman nahegelegt [Klumperman, 1998]: Nach Akkumulation von ERGIC-p53 und neusynthetisiertem Albumin im IC durch einen 15°C Block beobachtete Klumperman beim Wiederaufwärmen der Zellen, daß sich die Signale für p53 von den Albumin-Signalen separierten. Ein Großteil des im IC angestauten p53 wurde dabei, unter Umgehung des Golgi-Apparates, retrograd ins ER transportiert. Da p23 und p25 mit einer Kinetik retrograd ins ER transportiert werden, welche sich mit der von p53 deckt, ist anzunehmen, daß p23 und p25, vielleicht als Komplex, den gleichen Transportweg nutzen wie p53.

In Übereinstimmung mit den beschriebenen Ergebnissen stehen ebenfalls Daten von Joachim Füllekrug, der unterschiedlich komplexe Glykosylierungen an p25 und p27 in HeLa Zellen beschreibt, welche auf verschiedene Lokalisation und auf unterschiedliche Transportwege dieser beiden p24 Proteine hinweisen [Füllekrug, 1999].

Bewegen sich Subpopulationen von p24 Proteinen auf teilweise getrennten Transportwegen, so müßten sie sich in verschiedenen Organellen des Sekretionsweges zu unterschiedlichen Komplexen formieren. Nicole Jenne aus meiner Arbeitsgruppe untersucht deshalb mittels

Immunpräzipitation und Gelfiltration subzelluläre Fraktionen (ER-, IC- und Golgi-angereicherte Fraktion) bezüglich ihrer p24 Komposition. Bei der Aufklärung der mechanistischen Grundlage, die für das Lösen von bestimmten p24 Komplexen und die daraus resultierende Bildung von neuen Komplexen verantwortlich ist, könnte ARF eine zentrale Stellung einnehmen. Ein mögliches Modell zur COPI Vesikelbildung soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

4.4. Molekulare Mechanismen der COPI-Vesikelbildung

Die Entdeckung der p24 Familie ermöglicht es uns, ein präziseres Bild der molekularen Interaktionen zu zeichnen, die zur Entstehung eines Vesikels beitragen:

ARF1 und Coatomer sind beide lösliche Bestandteile des Zellplasmas. Da ARF1 auch an Membranen des TGN bindet, wo es die Bindung von AP1-Adaptorkomplexen reguliert [Stamnes und Rothman, 1993; Traub, 1993], muß die Spezifität der Anlagerung der COPI Hülle an die Golgimembran durch zusätzliche Faktoren erreicht werden. Die Familie der p24 Proteine könnte diese Funktion erfüllen, indem sie in der Lipidschicht ein Proteingerüst schafft, an welchem sich die Hülle stabil und spezifisch anlagern kann.

Daten aus unserem Labor unterstützen eine solche bivalente Interaktion von Coatomer mit der Membran, nämlich über seine β - und γ -Untereinheit mit ARF1 [Zhao, 1997; Zhao, 1999] und über seine γ -Untereinheit mit den p24 Proteinen [Harter, 1998]. Constanze Reinhard aus meiner Arbeitsgruppe fand heraus, daß bereits geringe Konzentrationen von kovalent verbrückten, dimeren Peptiden, die den zytoplasmatischen Domänen von p23, beziehungsweise p24 entsprechen, ausreichen, um Coatomer quantitativ zu präzipitieren [Reinhard, 1999 und Reinhard, unveröffentlichte Ergebnisse]. Außerdem beobachtete sie eine Konformationsänderung von Coatomer, induziert durch dessen Bindung an die p23 oder p24 Peptide. Coatomer und p24 Proteine stehen dabei in einem Verhältnis von 1 : 4 [Sohn, 1996; Reinhard, 1999]. Vorläufige Daten von Daniel Gommel aus meiner Arbeitsgruppe sprechen zudem für eine Interaktion zwischen ARF1 in seiner GDP-Form und p24 Proteinen.

Zusammengenommen leitet sich für die Bildung von COPI Vesikeln folgendes Arbeitsmodell ab (Abb. 18):

Die erste transiente Interaktion von ARF1 mit der Golgimembran findet in seiner GDP-Form statt und erfolgt über seine Bindung an die zytoplasmatischen Domänen von p24 Proteinkomplexen. Durch die Interaktion mit ARF1 formieren sich veränderte, bindungskompetente Komplexe von p24 Proteinen, welche in der Lage sind, mit Coatomer zu interagieren. Die Bindung von Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen der p24

Mitglieder induziert eine Konformationsänderung von Coatomer, die in einem kooperativen Effekt die Rekrutierung weiterer Coatomer Komplexe aus dem Zytosol erleichtert. Die nun anschließende Aggregation von vielen Coatomer-Molekülen könnte die treibende Kraft sein, welche die flache Membran zu einer Vesikelknospe formt. Die Energie, welche für die Umordnung der p24 Proteinkomplexe erforderlich ist, wird wahrscheinlich durch die Hydrolyse des an ARF gebundenen GTP bereitgestellt. Wahrscheinlich sind in vivo zur Formierung bindungskompetenter p24 Komplexe und zur Sortierung von Frachtproteinen mehrere Hydrolysezyklen notwendig [Nickel und Malsam, 1998; Pepperkok, 2000]. Die Transportroute, die ein neuentstandenes Vesikel einschlägt, könnte durch das stöchiometrische Verhältnis der p24 Protein determiniert werden. Komplexe zwischen p25 und p23 zyklisieren dabei in sehr frühen Bereichen des Sekretionsweges, zwischen ER und dem cis Golgi, wohingegen Komplexe anderer p24 Familienmitglieder auf späteren Transportwegen agieren.

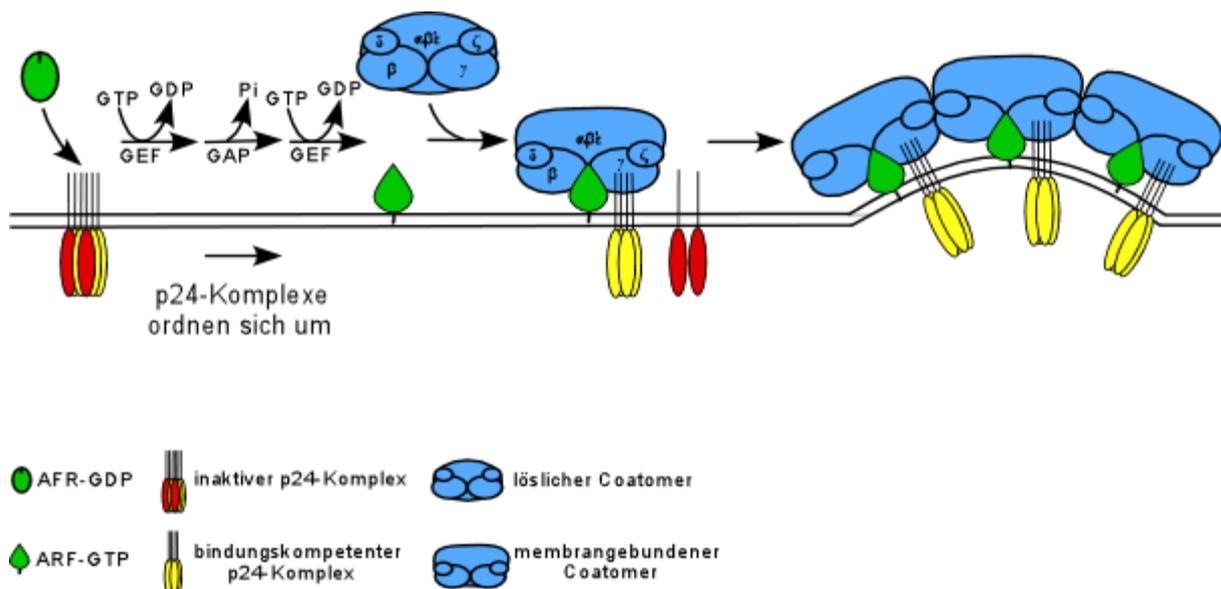


Abb. 18: Modell zur Bildung von COPI Vesikeln. ARF1 ist im Vesikel in seiner GTP-Form an der Membran verankert. Die erste, transiente Interaktion von ARF mit der Golgimembran findet aber in seiner GDP-Form statt und erfolgt über seine Bindung an die zytoplasmatischen Domänen von p24 Proteinkomplexen. Durch diese Interaktion wird die Formierung von bindungskompetenten p24 Komplexen induziert, welche in der Lage sind, mit Coatomer zu interagieren. Die Bindung von Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen der p24 Komplexe bewirkt eine Konformationsänderung von Coatomer, welche in einem kooperativen Effekt die Bindung weiterer Coatomer Moleküle erleichtert. Die Aggregation von Coatomer ist die treibende Kraft, welche die vorher flache Membran zu einer Vesikelknospe formt. Die Energie, die für die Bildung bindungskompetenter p24 Komplexe und zur Sortierung von Fracht erforderlich ist, wird wahrscheinlich durch die Hydrolyse des an ARF gebundenen GTP bereitgestellt. Wahrscheinlich sind dazu in vivo mehrere Hydrolysezyklen notwendig.

5. Material und Methoden

Bei allen nicht aufgeführten Methoden und Lösungen wurde gemäß Sambrook verfahren [Sambrook, 1989].

5.1. Material

5.1.1. Antikörper

Sekundärantikörper:

Anti-Kaninchen-IgG-(H+L) AK FITC-gekoppelt: Affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG, gekoppelt an Fluoreszein-isothiozyanatisomer I (Jackson Immuno Research Laboratories über Dianova, Hamburg)

Anti-Maus-IgG-(H+L)-AK TRITC-gekoppelt: Affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG, gekoppelt an Tetramethylrhodaminisozyanat (Jackson Immuno Research Laboratories über Dianova, Hamburg)

Alexa 546 Ziege anti-Kaninchen-IgG-(H+L) AK: Affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG, konjugiert mit einem Fluorophor, das maximal bei λ 546 absorbiert und wesentlich stabiler und lichtintensiver als TRITC ist (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

Alexa 488 Ziege anti-Maus-IgG-(H+L) AK: Affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Maus IgGs, konjugiert mit einem Fluorophor, das maximal bei λ 488 absorbiert und wesentlich stabiler und lichtintensiver als FITC ist (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

Primärantikörper:

Anti-Calreticulin: AK, PA3-900: Polyklonaler anti-Calreticulin Antikörper aus Kaninchen, produziert gegen rekombinantes, humanes Calreticulin (ABR, Inc über Dianova, Hamburg)

Anti-KDEL Rezeptor AK: Polyklonaler Antikörper gegen Säuger KDEL-Rezeptor aus Kaninchen [Griffith et al, 1994] von H. D. Söling (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Anti-ERCIC-53 AK G1/63: Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen p53 gerichtet [Schweizer et al, 1988], von H.P. Hauri (Biocenter, Basel) zur Verfügung gestellt.

Anti-β`COP AK, CM1A10: Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen nativen Coatomer gerichtet [Orci er al 1993], von Jim Rothman (Sloan Kettering Institute, New York) zur Verfügung gestellt.

Anti-myc AK, 9E10: Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen das c-myc Epitop [Evan et al, 1985].

Anti-VSV-G AK, P5D4: Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen ein zytoplasmatisches Epitop von VSV-G [Kreis, 1986], von Rainer Pepperkok zur Verfügung gestellt.

Anti-VSV-G AK, VG: Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen ein exoplasmatisches Epitop von VSV-G [Pepperkok et al, 1993], von Rainer Pepperkok zur Verfügung gestellt.

Anti-p23, p24, p25, p27 AKs : Antikörper gegen p23, p24, p25 und p27 wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden gewonnen, welche den zytoplasmatischen Domänen dieser Proteine analog waren, von Kai Sohn und Daniel Gommel (BZH, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Anti-p26 AK: Antikörper gegen p26 wurde durch Immunisierung von Meerschweinchen mit Peptiden, welche der zytoplasmatischen Domäne dieses Proteins analog waren, von Kai Sohn und Daniel Gommel (BZH, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

5.1.2. Chemikalien

H₂O: Das verwendete Wasser in allen Pufferlösungen war zweifach destilliert.

Zellkulturreagenzien: Hygromyzin B¹², Cycloheximid⁴, G418¹², Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)¹⁴, CO₃-unabhängiges MEM¹³, fötales Kälberserum (FCS)¹⁵, Penicillin/Streptomycin¹⁴, Trypsin¹⁴, L-Glutamin¹⁴

Oligonukleotide: über NAPS, Göttingen

Sonstige Chemikalien: Ampicillin¹⁶, Ribonuclease³, Cystein⁹, Papain⁹, Aceton¹ Ethanol¹, Isopropanol², Methanol¹; Phenol¹⁰, Adenosintriphosphat⁴ (ATP)⁴, Amidoschwarz³,

Ammoniumperoxidsulfat (APS)⁸, Restriktionsendonukleasen¹⁸, Bromphenolblau³, Rinderserumalbumin¹⁰, Paraformaldehyd⁵, Dithiothreitol (DTT)¹³, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)⁵, Glycerin¹⁰, Harnstoff¹⁰, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)¹⁰, Kaliumchlorid¹, Kaliumdihydrogenphosphat⁸, Kaliumhydroxid⁶, β -Mercaptoethanol¹¹, N,N'-Methylenbisacrylamid¹⁰, Natriumcarbonat⁶, Natriumdodecylsulfat (SDS)⁵, Natriumhydrogencarbonat⁶, Salzsäure², Silbernitrat¹⁰, N,N,N'-Tetramethylethylendiamin³, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan¹⁰, Triton X-100⁵, Trifluoressigsäure⁷, Fluoromount G¹⁷

Firmen: 1 zentrale Chemikalienausgabe, Theoretikum Heidelberg; 2: Merk Darmstadt; 3: Serva, Heidelberg; 4: Sigma, Deisenhofen; 5: Boeringer, Mannheim; 6: Riedel de-Haen, Seelze; 7: Fluka, Neu Ulm; 8: Ferak, Berlin; 9 Pierce, Rockford, IL; 10: Roth, Karlsruhe; 11: BioRad, München; 12 Calbiochem Novabiochem, San Diego, CA, USA; 13: GIBCO BRL; 14: Biochrom KG; 15: PAA, Linz, Österreich; 16: Gerbu, Gaiberg; 17: Southern Biotechnology Associates Inc, Birmingham, UK; 18: NEB (New England Biolabs)

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. PCR

(polymerase chain reaktion) [Saiki et al, 1988]

Jeder PCR-Ansatz enthielt in 100 μ l Volumen:

- 10 ng *template* DNA
- je 25 pmol sense-, antisense-Primer
- je 25 μ M dNTP im dNTP-Mix
- 10 mM Tris/HCl pH 8,3
- 50 mM KCl
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,01 % Gelatine
- 2,5 U Taq-Polymerase

Die Durchführung der Reaktionen erfolgte in einem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) gemäß dem Temperaturprofil:

Start:	5 min	95°C	Denaturierung
	2 min	75°C	Zugabe der Polymerase
Amplifikation (35 Zyklen)	45 s	94°C	Denaturierung
	1 min	55-80°C	<i>Annealing</i> *
	2 min	72°C	Elongation
Vervollständigung	2 min	72°C	Elongation

* Die *Annealing* Temperatur wurde abhängig vom Primerpaar ausgewählt.

5.2.2. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels einer präparativen Elektrophorese in Agarosegelen der Größe nach getrennt. Das betreffende Fragment wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte mit Hilfe des *Genclean-III-Kits* (Dianova) und wurde gemäß den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

5.2.3. Verwendete Bakterien und deren Kultivierung

TG2: subE; Δ (lac-proAB); hsd Δ 5; Δ (srl-recA)306::TN10(tet^r)
 F'[traD36; proAB⁺; lac^q lacZ Δ M15]
 [Gibson, 1984; Westphal und de Kok 1988]

Die Kultivierung erfolgte entweder unter ständigem Schütteln in LB-Flüssigmedium oder auf agarhaltigen Medienplatten im Brutschrank, bei 37°C.

LB-Medium: 1% NaCl
 1% Bacto-Trypton
 0,5% Hefe-Extrakt

Das Medium wurde autoklaviert.

Agar-Platten: Dem LB-Medium wurde vor dem Autoklavieren noch 1,6% Bacto-Agar zugefügt.

Zur Selektion von Bakterien, die ein Plasmid mit einem Ampicillin-Resistenzgen besitzen, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum (von Firma Gerbu, Gaiberg) in einer Konzentration von 50µg/ml zugesetzt.

Dauerkultur:

0,85 ml Übernachtskultur wurden steril mit 0,15 ml Glycerin versetzt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.2.4. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

A. nach Hanahan [Hanahan, 1983]

2ml einer Übernachtskultur wurden 1:100 in 200ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,4 bei 37°C kultiviert. Danach wurde das Bakterienwachstum durch 30-minütiges Inkubieren auf Eis abgestoppt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Die Zellen wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 500 g pelletiert. Das Sediment wurde vorsichtig in 60 ml sterilem TFBI-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 500 g für fünf Minuten, wurde das Bakterienpellet in 4 ml sterilem TFBII-Puffer aufgenommen und nach 15-minütiger Inkubation auf Eis zu je 100 µl aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu 12 Monate gelagert.

TFBI-Puffer:

30 mM	KOAc
50 mM	MnCl ₂ * 4 H ₂ O
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂

TFBII-Puffer

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15 %	Glycerin

15 % Glycerin

mit HAc auf pH 5,8 einstellen

mit NaOH auf pH 6,8 einstellen

B. nach Cohen [Cohen et al, 1972]

1 ml einer Übernachtskultur wurden 1:50 mit LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,4 kultiviert. Die Zellen wurden 5 min auf Eis inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Zellen erfolgte bei 4°C. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 500 g wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 16 ml 0,5 M $CaCl_2$ möglichst luftblasenfrei resuspendiert. Nach 30- bis 60-minütiger Inkubation bei 4°C wurde erneut zentifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml eiskaltem 0,5 M $CaCl_2$ aufgenommen. Die so erhaltenen kompetenten Bakterien wurden bei 4°C maximal einen Tag gelagert.

5.2.5. Transformation von Bakterien

[Hanahan, 1983]

50 µl der kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 10 bis 25 ng Plasmid DNA zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen für 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und wiederum für zwei Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Bakterien eine Stunde lang bei 37°C kultiviert, verschiedene Aliquote auf Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.6. Plasmid-Minipräparation

[Westphal et al, 1988]

3ml Übernachtskultur wurden zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C, 12000 g, 5 min) und zum erhaltenen Pellet wurden 100 µl Glukose-Puffer zugefügt. Nach fünfminütiger

Inkubation bei Raumtemperatur, wurden 200 µl Lysepuffer hinzugefügt und nochmals für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation des Lysats erfolgte durch Zugabe von 3 ml Hochsalzpuffer. Bei der anschließenden fünfminütigen Inkubation auf Eis präzipitieren hochmolekulare RNA und Protein-SDS-Komplexe. Nach Zentrifugation (12000 g, 10 min.) wird der Überstand Phenol-Chloroform extrahiert. Es folgt eine Ethanol-fällung durch Zugabe des zweifachen Volumens an 100%-igem eiskaltem Ethanol und fünfminütiger Inkubation auf Eis. Die Plasmid-DNA wird durch Zentrifugation pelletiert (12000 g, 10 min), das Pellet mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte RNase-Verdau (10 µg/µl Enzymkonzentration, 20 min) und gegebenenfalls PEG-Fällung.

Glukose-Puffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10 mM EDTA
 50 mM Glukose

Lysepuffer: 1% SDS in 0,2 N NaOH

Hochsalzpuffer: 3 M Kaliumacetat
 2 M Essigsäure

TE-Puffer: 10 mM Tris HCL (pH 8); 1mM EDTA

5.2.7. Plasmid-Maxipräparation

Alle DNA Plasmid Präparationen, welche für die Mikroinjektion in Vero Zellen bestimmt waren, wurden aus Gründen der Zeitersparnis und der gleichbleibend guten Qualität mit dem entsprechenden Quiagen Kit hergestellt. Ansonsten erfolgte die Präparation von Plasmid DNA im großen Maßstab wie im Folgenden beschrieben:

70 ml Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (12000 u.p.m., 10 min., 4°C, Beckmann J-21C, Rotor JA20), das Pellet in 4 ml Glukose-Puffer suspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 8 ml alkalischer SDS-Lösung und fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen lysiert. Gleichzeitig denaturiert die chromosomale DNA, wohingegen Plasmid DNA löslich bleibt. Das Lysat wurde mit 6 ml Hochsalzpuffer neutralisiert. Bei der anschließenden fünfminütigen Inkubation auf Eis präzipitieren Protein-SDS-Komplexe. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben, 12000 g, 10

min., 4°C) wurde der Überstand Phenol-Chloroform extrahiert. Die Plasmid DNA wurde anschließend durch Zugabe von zwei Volumen 100%-igem, eiskaltem Ethanol bei 4°C präzipitiert und mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer aufgenommen, einem RNase-Verdau unterzogen und gegebenenfalls PEG gefällt.

5.2.8. PEG-Fällung von DNA

Der DNA-Lösung wurde 1/2 Volumen PEG (20% PEG-6000; 2,5M NaCl) zugesetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die DNA wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 g pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE oder H₂O (bidest.) aufgenommen.

5.2.9. Konzentrationsbestimmung einer DNA Lösung

Die Konzentration einer DNA Lösung wurde photometrisch über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Spektrometer (UltrospecIII, Pharmacia LKB) in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA, beziehungsweise einer Konzentration von 37 µg/ml bei einzelsträngiger DNA.

5.2.10. Ligation von DNA Fragmenten

Um ein DNA Fragment in einen Vektor zu ligieren, wurden diese in verschiedenen Mengenverhältnissen zueinander eingesetzt. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten 2-Fragment-Ligationen wurden molare Verhältnisse von 1:1 oder 1:3 (linearisierter Vektor zu Insert) verwendet. Die Inkubation mit T4-Ligase (Boeringer Mannheim) erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers, über Nacht bei 16°C.

5.2.11. Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele wurden mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 2% hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und dient der späteren Visualisierung der DNA unter UV-Licht. Die Proben wurden mit 1/10 10-fach Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (120 Volt) in TAE-Puffer.

(50x) TAE: 242 g Tris
 57,1 ml Eisessig
 100 ml EDTA; 0,5 M; pH 8

 ad 1 l mit bidest. H₂O

(10x) Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau
 0,25 % Xylen Cyanol
 50 % Glycin

5.2.12. DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung erfolgte im ersten Abschnitt der Doktorarbeit mit dem "fmol-SequencingTM-Kit" (Promega) nach Vorschrift des Herstellers, basierend auf der Strangabbruchsynthese von Sanger [Sanger et al, 1977]. Später wurde es aus Gründen der Zeitersparnis üblich, die DNA zu einem Sequenzierservice zu schicken (Firma Toplab, Martinsried).

DNA Sequenzierung mit dem „fmol Sequencing

Zur Trennung der DNA-Fragmente wurden 60 cm lange, 6%-ige Polyacrylamid-Harnstoff-Gele hergestellt (*Sequagel complete und Sequagel XR ultra pure*; Fertiglösungen von Biozym Diagnostik). Als Sequenzierungsprimer dienten die Universalprimer SP6 und T7 (Pharmacia).

5.2.13. Restriktionsanalyse von Plasmid DNA

Zu Klonierungszwecken und für die Charakterisierung zirkulärer Plasmid DNA wurde diese durch Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Restriktionsanalysen wurden nach den Vorschriften des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt.

5.2.14. Klonierung verschiedener cDNAs

p23wt in pBIV: Die cDNA von p23 eines *full length* Klonen (*Accession*-Nummer: X98303) einer Kaninchen Leber cDNA Bibliothek (λ gt10; Clontech, Palo Alto, CA, USA) wurde mittels PCR vervielfältigt und in den eukaryontischen Expressionsvektor pBIV über eine HindIII und EcoRV Schnittstelle inseriert.

p23wt in pcDNA.3+: Das p23wt cDNA wurde über die Schnittstellen BamHI und EcoRV in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA.3+ eingefügt.

p23myc in pBIV: Die cDNA, welche für das myc-Epitop kodiert (EQKLISEEDL) wurde zwischen Signal Sequenz und N-Terminus des reifen p23 Proteins (Ile³²) mittels PCR basiertem Splicing [Horton, 1989] eingefügt.

p23myc in pcDNA.3+: Die cDNA des fertigen p23myc Konstruktes wurde nach der PCR (*splicing by overlapping extensions*) in den Sequenzierungsvektor pGEM-T über die aus der PCR stammenden Poly A *sites* eingeführt. Aus diesem Vektor wurde die cDNA dann über die Restriktionsstellen BamHI und Eco RI in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA.3+ eingeführt.

p23tail* in pBIV: Das myc Epitop am C-Terminus wurde mittels PCR an die p23wt DNA angehängt, wobei einer der Primer das gesamte myc Epitop kodierte. Die cDNA des p23tail* Konstrukts wurde dann wieder zuerst in den Sequenziervektor pGEM-T kloniert und von dort über NotI und Sall in pBIV eingefügt.

p23tail* in pcDNA.3-: Die Umklonierung von p23tail* aus dem Vektor pBIV in den Vektor pcDNA.3- erfolgte über die Schnittstellen NotI und EcoRV.

CD8-p23 in pBIV: Das CD8-p23 Konstrukt wurde mir von Walter Nickel zur Verfügung gestellt und ist veröffentlicht [Nickel, 1997]. In den pBIV Expressionsvektor wurde es über die Restriktion mit BamHI, anschließenden Klenow-Ansatz und eine zweite Restriktion mit HindIII kloniert (HindIII-blunt-Klonierung). Der pBIV Vektor wurde mit EcoRV (*blunt cutter*) und HindIII geschnitten.

CD8-p23 in pcDNA.3+: Die CD8-p23 cDNA wurde aus dem pcDNA.3 Vektor in den neueren pcDNA.3+ Vektor, welche eine erweiterte *Multiple Cloning Site* enthält, über die Restriktion mit HindIII und BamHI umklontiert.

5.3. Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

5.3.1. Zelllinien

Vero Zellen

Bei den verwendeten Vero Zellen handelt es sich um Nieren Zellen aus Affe der Linie ATCC CCL81 (*African Green mokey*). Alle Mikroinjektionsversuche sowie alle Untersuchungen bei denen mit VSV infiziert wurde, wurden mit Vero Zellen durchgeführt.

HeLa HtTA

HtTA ist eine stabile Transfektionszelllinie von HeLa Zellen (Epithelzellen aus einem Zervix-Karzinom), welche das tetrazyklinsensitives Transaktivatorprotein exprimieren. Sie tragen eine G 418 Resistenz. [Gossen und Buyard, 1992] und wurden von der Arbeitsgruppe Bujard freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie fand bei allen Versuchen mit dem induzierbaren Expressionssystem(Tet-off System) ihre Anwendung.

X1/5

X1/5 ist eine stabile Transfektionslinie von HtTA, welche über das Tet System regulierbar Luziferase exprimiert. X1/5 ist G418 und Hygromyzin resistent. X1/5 ist eine Kontrollzelllinie für das Tet System und wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Bujard zur Verfügung gestellt.

P23wt_{st}, p23myc_{st}, CD8p23_{st}

P23wt_{st}, p23myc_{st}, CD8p23_{st} sind stabile HeLa HtTA Zelllinien, welche in dieser Arbeit hergestellt wurden. Dabei wurden die entsprechenden Konstrukte in den Tet-off Plasmid pBIV kloniert und damit HtTA Zellen zusammen mit einem Selektionsplasmid (pX343; trägt Hygromyzin Resistenz) kotransfiziert.

5.3.2. Kultivieren von Zellen

Alle Zellen wurden, falls nicht anders vermerkt, in *Dulbecco Modified Eagles Medium* (DMEM) unter Zusatz von 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 10^3 U/ml und 1mg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellkulturen wurden in einem Inkubationsschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Sollten stabile Zelllinien selektioniert werden, wurde dem Medium Hygromyzin (von Calbiochem-Novabiochem) zugesetzt. Die G 418 Resistenz wurde sporadisch getestet, immer aber bei Verwendung frisch aufgetauter Hela HfTA Zellen. Trotzdem die verwendeten Zellen keine verminderte Wachstumsrate nach längerer Kultivierungsdauer zeigten, wurden alle drei bis vier Monate ein frisches Zellaliquot aufgetaut und die Kultur ersetzt. Bei Inkubation von Zellen bei 31°C oder 39,5° wurde das Zellkulturmedium gegen CO₃-unabhängigem Medium (GIBCO BRL) ausgetauscht, dem FCS und Glutamin in den Standardkonzentrationen zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte dann entweder im Wasserbad oder im Falle der Mikroinjektion, in einer beheizbaren Kammer.

5.3.3 Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zellen in einem Gemisch aus Medium, 10% FCS und 10% DMSO in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Aus 10 Kulturschalen (94mm Durchmesser) von 50% konfluenten, adherenten Zellen, wurden 5x 2ml Einfrieraliquots hergestellt. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, durch Auf- und Abziehen in einer 10ml Pipette vereinzelt, in 50ml Falcon Röhrchen vereinigt und nach Abzentrifugieren bei 200g und 4°C mit den entsprechenden Mengen Medium, DMSO und FCS versetzt. Die Einfrieraliquots wurden zunächst ein bis zwei Stunden bei 4°C inkubiert, bevor sie mindestens für 24 h bei -80°C schonend (in einer Styroporbox) heruntergekühlt wurden, um dann letztendlich in flüssigen Stickstoff dauergelagert zu werden.

5.3.4 Auftauen von Zellen

Beim Auftauen wurden die Zellen so kurz wie nur möglich mit dem toxischen Einfriermedium in Kontakt belassen. Die Kryoröhrchen, welche die eingefrorenen Zellen

enthielten wurden dazu im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellen sofort in ein vorbereitetes, mit Zellkulturmedium gefülltes Falcon Röhrchen, überführt. Nach Abzentrifugieren des Mediums bei 200 g und 4°C für 5 min wurden die Zellen in frischem Medium auf Zellkulturschalen ausgesät.

5.3.5. Transfektion mittels CaPO₄ Präzipitation

Die Transfektion von HeLa Zellen wurde leicht modifiziert nach der CaPO₄ Methode gemäß Graham [Graham und van der Eb, 1973] durchgeführt. Die beschriebenen Mengen reichen für eine 94mm Kulturschale 40-50% konfluenter Zellen aus. Wurden kleinere Kulturschalen verwendet, wurden die Mengen entsprechend angepaßt.

Eine halbe Stunde vor Beginn der Transfektion wird das Medium erneuert. Zur Herstellung von DNA/CaCl₂-Lösung wurden 2,5M CaCl₂-Lösung auf 37°C vorgewärmt und 25µl davon mit 10-20µg DNA und H₂O auf ein Gesamtvolumen von 250µl gebracht. Bei Kotransfektion eines Selektionsplasmids für die Selektion stabiler Zelllinien, wurde das Plasmid ohne Selektionsmarker im 20fachen Überschuß zum Selektionsplasmid eingesetzt. Die so erhaltene Lösung wurde vermischt und 10min bei 37°C inkubiert. Zu 250µl von ebenfalls auf 37°C vorgewärmten 2x HBS wurde nun 10µl-weise die DNA/CaCl₂-Lösung zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das gebildete DNA Präzipitat (500µl) auf die Zellen gegeben und die Kultur über Nacht 12-18h in den Inkubator gestellt. Am nächsten Morgen wurde das Medium erneuert und der Zustand der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Bei transienter Transfektion wurden die Zellen falls nicht anders vermerkt, 24-48h nach der Transfektion fixiert.

5.3.6. Selektion stabiler Transfektanden

Für die Selektion stabiler Transfektanden wurde HeLa Zellen schon während der Transfektion in Tetrazyklin-haltigen Medium kultiviert. 24-36h nach der Transfektion wurde dann das Selektionsagens (Hygromycin, 300µg/ml) zugesetzt. Während der Dauer der Selektion wurden alle 2-3 Tage das Selektionsmedium gewechselt und frisches Tetrazyklin zugesetzt. Dabei wurde peinlich genau darauf geachtet, daß zu jedem Zeitpunkt der Selektionsphase Tetrazyklin(1µg/ml) in ausreichenden Mengen vorhanden war. Nach 10 Tagen Selektion

waren gewöhnlich schon erste resistente Zellklone als kleine Kolonien mit dem bloßen Auge zu erkennen. Nach ungefähr drei Wochen, wenn der Durchmesser der Kolonien größer als 2mm war, wurden diese in 24well-Platten überführt und sobald wie möglich analysiert. Die Analyse erfolgte immunochemisch mit spezifischen Antikörpern, nachdem Tetrazyklin aus dem Medium entfernt wurden, um die Expression des jeweiligen Konstrukts vom Tet-abhängigen Promotor aus zu induzieren. Positive Transfektanden wurden frühzeitig zur dauerhaften Aufbewahrung eingefroren.

5.3.7. Immunfluoreszenzanalyse

Zellen wurden in Kulturschalen, welche mit Deckgläschen versehen worden waren in der benötigten Verdünnung ausgesät. Die Fixierung der Zellen erfolgte entweder mit 3,5%-iger Paraformaldehydlösung (w/v), Methanol oder *Bouins` Reagenz*. Nach PFA- oder Bouins`-Fixierung wurden die Zellen in 50mM NH₄CL-PBS für 10 min inkubiert (um überschüssige, freie Gruppen abzureagieren). Anschließend wurde für 5 min mit Triton-X-100 (0,1% in PBS) permeabilisiert. Bei einer Fixierung mit Methanol (4min, -20°C) war keine Triton- oder NH₄Cl-Behandlung erforderlich. Nach jedem dieser Schritte folgte zweimaliges Waschen mit PBS. Blockiert wurde mit BSA (1% w/v) für mindestens 10 min. Anschließend wurden die Zellen mit Primär- und Sekundärantikörpern in geeigneten Verdünnungen für mindestens 20 min. behandelt, zwischen den Inkubationen wurde mehrmals mit PBS gewaschen und mit BSA blockiert. Alle Lösungen wurden in PBS angesetzt und alle Inkubationen außer der Methanolfixierung, erfolgten bei Raumtemperatur. Nach erneuten Waschschritten wurden die Deckgläschen vorsichtig auf einem Objektträger in Fluoromount-G (Biozol) eingebettet und einen Tag später mit Nagellack versiegelt.

Bouins' Reagenz: 7,5ml Picrinsäure
 2,5ml Formaldehyd (37-40%-ig)
 0,5ml Eisessig

5.3.8. Mikroinjektion

Die Methode der Mikroinjektion wurde von Rainer Pepperkok (EMBL, Heidelberg, Deutschland) gelernt. Alle Experimente, die diese Methode beinhalten wurden am EMBL Heidelberg, an einem Computer automatisierten Mikroinjektionssystem (AIS von Zeiss) durchgeführt. Alle Injektionen wurden in 3 cm Petrischalen durchgeführt, welche 3ml CO₂ unabhängiges Medium (GIBCO BRL) enthielten und dem 10% FCS und Glutamat zugesetzt war. Injektionen bei 39, 5°C wurden in einer Temperatur kontrollierten, beheizten Kammer durchgeführt.

5.3.9. Bildgewinnung und Signalquantifizierung

Bilder von immungefärbten Zellen wurden an einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiovert TV 135) aufgenommen, welches mit einer gekühlten, langsam scannenden CCD Kamera (Photometrics CH250, 1317 x 1035 Pixel, Tucson, AZ, USA) ausgestattet war und von einem Power Macintosh 8100/100 kontrolliert wurde. Zur Bildgewinnung wurde die Software Openlab (Improvision, Coventry, UK) benutzt und lediglich zur Anordnung der Bilder das Programm Adobe Photoshop. Keine Veränderungen der Bildinformation wurde nach der Bildgewinnung durchgeführt. Wurden Bilder zur späteren Quantifizierung aufgenommen, wurde darauf geachtet, daß das stärkste Signal jedes Bildes gerade nicht gesättigt war.

Zur Signalquantifizierung wurde das Software Paket IP Lab Spektrum Version 3.0 (Signal Analytics Corp., Vienna, VA, USA) genutzt.

Für die Quantifizierung des VSV-G Oberflächensignals wurde für jede analysierte Zelle ein Quadrat mit 200 x 200 Pixel zufällig ausgewählt, was äquivalent zu 15 – 30 % der gesamten, aufgenommenen Zellfläche war. Für alle Experimente einer Reihe wurden alle Parameter des Mikroskops, der Kamera sowie der Software gleich ausgewählt. Als Hintergrund Fluoreszenz wurde ein gleich großes Gebiet auf dem selben Deckgläschen quantifiziert, welches ohne Zellen war und vom Signal abgezogen.

Zur Quantifizierung der Antikörper Titationsreihen (Abb.13) wurden zu jeder untersuchten Verdünnung zwei Aufnahmen des selben Bildausschnitts aufgenommen. Dabei zeigte die erste Aufnahme (z. B. im roten Kanal) den Golgi Apparat der Zellen, welcher durch den monoklonalen Mausantikörper CM1A10 markiert war. Von diesem Bild wurde mittels IP Lab eine Maske erstellt und über die zweite Aufnahme des Zellausschnitts (dann z. B. im grünen Kanal) überlagert, welche eine Antikörperverdünnung darstellte. Die sich überschneidenden Bereiche wurden dann quantifiziert. Durch diese Routine war es möglich, für einen Einzelwert pro Versuch über 100 Zellen auszuwerten.

5.3.10. VSV- Assay

Dieser Versuchsansatz deckt sich in wesentlichen Teilen mit dem von Reiner Pepperkok beschriebenen [Pepperkok, 1993, Cell], mußte jedoch, da Parametern wie Titer der Viruslösung verschieden waren, erneut optimiert werden. Vero Zellen (*African green monkey* Nieren Zellen, ATCC CCL81) wurden einen Tag vor Versuchsbeginn auf Deckgläschen ausgesät, so daß ihre Konfluenz am nächsten Tag 70 bis 80% war. Die Infektion mit dem VSV Stamm tsO45 (Indischer Serotyp) erfolgte zuerst in PBS für 30min bei RT (Anheftung des Virus) und anschließend für 30 min bei 37°C (Virus wird aufgenommen) in einer feuchten Kammer. Die Zellen wurden in CO₃-unabhängiges MEM Medium (GIBCO BRL) transferiert, dem 10% FCS und 2mM Glutamin zugesetzt waren und für 2,5 Stunden bei 39,5°C im Wasserbad inkubiert. Sobald die Temperatur auf 31°C gesenkt wurde, wurde dem Medium Cycloheximid (100µg/ml) zugegeben. Eine Stunde später wurden die Zellen mit 3,5 %-igem PFA fixiert. Wurden während des Assays Antikörper mikroinjiziert, so geschah dies bei nichtpermissiver Temperatur in einer beheizten Apparatur. Zur Kontrolle des 39,5°C Temperaturblocks wurde bei jedem Versuch Kontrollzellen während der gesamten Versuchsdauer auf 39°C gehalten (für 3,5h) und ihre Oberflächenfärbung überprüft. Zur Entwicklung wurden die Zellen mit 3,5%igem PFA fixiert, mit 1%-igem BSA / PBS blockiert und mit einem monoklonalen Maus Antikörper der gegen ein exoplasmatisches Epitop des G-Proteins gerichtet ist (VG), inkubiert. Danach folgte eine Inkubation mit einem entsprechenden Sekundärantikörper (anti Maus IgG Alexa 488) und erneute kurze Fixierung mit PFA, 3,5% für 5 min. Mikroinjizierte Antikörper oder Fab-Fragmente wurden detektiert, indem die Zellen im Anschluß mit 0,1%-igem Triton / PBS für fünf Minuten permeabilisiert wurden und mit Sekundärantikörpern (z.B. anti Kaninchen IgG Alexa 546) behandelt wurden. Alle Antikörperinkubationen erfolgten mindestens für 20 Minuten und waren in PBS / 1% BSA.

5.3.11. Konfokale Mikroskopie

Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Matthew Hannah (Abteilung für Neurobiologie, Universität Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Bilder wurden mit einem Leica TCS^{4D} Laser Scanning Konfokalem Mikroskop erhalten, welches mit einem 63 x 1,4 NA, planaren Apo Objektiv (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg) ausgestattet war. Die Bilder wurden elektronisch vergrößert, um eine kleine Gruppe von Zellen auswählen zu können. Jedes Bild war ein optischen Schnitt, welcher der Mitte

zwischen Zelloberfläche und Boden des Objektträgers entsprach. Für jedes Bildpaar (z.B. roter Kanal versus grüner Kanal einer Überlagerung) wurden außer der Laserintensität, die selben Parameter ausgewählt (z.B. Zoom, Spannung, Offset...). Die Laserintensität wurde dann so ausgewählt, daß das hellste Signal des Bild gerade noch nicht gesättigt war.

5.4. Biochemische Methoden

5.4.1. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurde mit dem Proteinnachweistest nach Bradford der Firma Bio-Rad bestimmt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die unbekannte Proteinkonzentration wurde bei einer OD_{595nm} anhand einer Standardkurve ermittelt.

5.4.2. Affinitätsreinigung von Antikörpern

Absorptionsmittel wie Sepharose machen es möglich, die Interaktion zwischen einem Antikörper und seinem Antigen dafür auszunutzen, spezifische, aktive Antikörper oder Antigene in großen Mengen aus verdünnten Lösungen zu reinigen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörperseren und zum Teil die daraus affinitätsgereinigten Antikörper, welche gegen verschiedene p24 Proteine sind, wurden von Kai Sohn und Daniel Gommel aus meiner Arbeitsgruppe mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der andere Teil der Affinitätsreinigungen wurde weitgehend nach dem von Kai Sohn verwendeten Protokoll, hergestellt. Die Antikörper wurden erzeugt, indem Kaninchen (bezw. bei anti-p26 AKs Meerschweinchen), mit Peptiden immunisiert wurden, die den zytoplasmatischen Domänen der verschiedenen p24 Mitglieder analog waren. Damit man die Peptide an Thiopropylsepharose 6B über Disulfidbrückenbindungen koppeln konnte, wurden diesen bei der Synthese N-terminal ein Cysteinrest angehängt.

A. Kopplung von Peptiden an Thiopropylsepharose

Die gewünschte Menge an Gelmaterial, hier: 250mg, wurde zuerst in 50ml Kopplungspuffer 15 min bei Raumtemperatur gequollen. 250 mg trockenes Gel ergibt dabei 1ml gequollenes Gelmaterial. Das Gel wurde danach bei 2000 g für 5 min. zentrifugiert und mit 50ml Kopplungspuffer zweimal gewaschen. 5mg des Peptids wurden dann in 500µl Kopplungspuffer gelöst. Bei schlecht löslichen Peptiden (p23-Peptid: 2233) geschah dies, unter Zusatz von Harnstoff, in einer Endkonzentration von bis zu 4M. Anschließend wurden gelöstes Peptid und Gelmaterial in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vereinigt und über Nacht auf einem Rotiertisch bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand bei 12.000 u/min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) für 5 min vom Gel getrennt und zur Bestimmung der Kopplungseffizienz eingefroren. Noch verbliebene, freie Cysteingruppen der Thioprophylsepharose wurden unter Zusatz von 200 µl β-Mercaptoethanol in 10ml Blockierungspuffer für 10 min bei Raumtemperatur reduziert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit 10ml Blockierungspuffer (5 min, 2000g, RT) und drei Waschschrte mit jeweils 10ml Kopplungspuffer.

Kopplungspuffer:

100 mM Tris-HCl, pH 7,5

500 mM NaCl

1 mM EDTA, pH 7,5

Blockierungspuffer:

100 mM NaAcetat, pH 4,5

500 mM NaCl

Die Aufbewahrung der Säule erfolgt als 30%-ige PBS-Suspension mit Zusatz von 0,02% NaN₃.

B. Aufreinigung von Antikörpern

15 bis 20ml des jeweiligen Antikörperserums wurden bei 2000 g abzentrifugiert und der Überstand mit den an Thioprophylsepharose gekoppelten Peptiden in einem Falcon Röhrchen vereinigt und auf einen Rotiertisch über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei dieser Inkubation sollten so wenig wie möglich Blasen entstehen (denaturierte Proteine), es wurde daher darauf geachtet, daß die Falcon Röhrchen fast voll waren; gegebenenfalls wurde mit PBS aufgefüllt. Am nächsten Morgen wurden das Säulenmaterial durch fünfminütige Zentrifugation bei 2000 g vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde eingefroren, da er in der Regel noch Antikörper enthält. Das Säulenmaterial wurde in eine Säule überführt und solange mit PBS gewaschen, bis die OD des Durchflusses ~ 0 erreicht hatte und das Eluat klar war. Die gebundenen Antikörper wurden danach mit 100mM Glycin-HCl, pH 2,8 in 500µl Aliquots

eluiert. Dabei wurde soviel einer 1 M Tris-HCl Lösung mit einem pH von 8,8 in Eppendorf Gefäße vorgelegt, daß durch Zugabe von 500 µl der Glycin Lösung (100mM, pH 2,8) der pH neutralisiert wurde. Damit die Antikörper bei der Elution möglichst kurz in einem sauren Milieu inkubiert wurden, wurden die Eluate mit dem vorgelegten Tris-HCl Puffer sofort vermischt. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden gegen PBS dialysiert und zur dauerhaften Aufbewahrung bei 4°C mit 0,02% NaN₃ versetzt. Die Konzentration der Antikörperlösungen wurde photometrisch über ihre OD bei 280nm bestimmt. (OD₂₈₀ = 1 entspricht ~ 0,88mg/ml). Wurden die affinitätsgereinigten Antikörper in der Mikroinjektion eingesetzt, wurde das NaN₃ über Zentrifugen Filtereinheiten (Ultrafree, Millipore) kurz vor Versuchsbeginn, entfernt.

5.4.3. Die Erzeugung von Fab-Fragmenten aus IgG-Molekülen

Fab-Fragmente können durch den Verdau von Antikörpern durch immobilisiertes Papain (von der Firma Pierce) gewonnen werden [Coulter, 1983]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Protokoll des Herstellers, welches für den Verdau von IgGs aus Maus optimiert wurde, für Kaninchen IgGs optimiert.

Vorversuche ergaben einen vollständigen Verdau der Kaninchen IgGs ab einem Mengenverhältnis Papain : IgG von 1 : 30 und einer Inkubationsdauer von 14h bei 37°C. Deshalb wurde im Hauptansatz diese Parameter übernommen. Zur Aktivierung des Papains wurden zuerst 0,5ml der Papainsuspension mit 4ml frisch angesetzten Verdaupuffer versetzt, gemischt und in der Tischzentrifuge bei 12000 g kurz abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Jeweils 200 bis 400 µg affinitätsgereinigte Antikörper in PBS oder Dialysepuffer wurden nun mit 7 – 14 µg Papain versetzt, der Ansatz mit Verdaupuffer auf 400µl aufgefüllt und bei 37°C, auf einem Schüttler, über Nacht, 14 h inkubiert. Am nächsten Morgen wurden durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5min, 12000 g) die Überstände vom Papain getrennt. Fab-Fragmente wurden von unverdauten IgGs beziehungsweise den Fc Teilen mittels Protein A Sepharose (Protein A Sepharose CL-4B von Pharmacia Biotech) getrennt. Dazu wurde die Protein A Sepharose mit dem 10-fachen Volumen von 100mM Tris Puffer, pH8 dreimal gewaschen und der pH der Antikörper durch Zugabe von 1/10 Volumen 1M Tris pH 8 Lösung äquilibriert. Protein A Sepharose hat eine Bindungskapazität für Kaninchen IgGs zwischen 10 bis 20 mg Antikörper pro ml Gel. Um Protein A im Überschuß anzubieten wurden deshalb pro Ansatz (~ 300µg AK) 100µg Protein A Sepharose zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C, über Nacht auf dem „Über-Kopf-Schüttler“. Die Fab-Fragmente wurden durch Zentrifugation von Protein A getrennt. Der Papain Verdau der IgGs wurden durch SDS PAGE und anschließender Silberfärbung nach

Standardprotokollen überprüft. Fab-Fragmente wurden schnellstmöglich nach ihrer Generierung im Versuch eingesetzt.

6. Literatur

- Aridor, M., Bannykh, S.I., Rowe, T. and Balch, W.E. (1995) Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol*, **131**, 875-93.
- Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C. and Balch, W.E. (1998) Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol*, **141**, 61-70.
- Balch, W.E., Dunphy, W.G., Braell, W.A. and Rothman, J.E. (1984) Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N- acetylglucosamine. *Cell*, **39**, 405-16.
- Balch, W.E., McCaffery, J.M., Plutner, H. and Farquhar, M.G. (1994) Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell*, **76**, 841-52.
- Bannykh, S.I. and Balch, W.E. (1997) Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *J Cell Biol*, **138**, 1-4.
- Barlowe, C. (1995) COPII: a membrane coat that forms endoplasmic reticulum-derived vesicles. *FEBS Lett*, **369**, 93-6.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R. (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, **77**, 895-907.
- Barlowe, C. and Schekman, R. (1993) SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature*, **365**, 347-9.
- Belden, W.J. and Barlowe, C. (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.
- Bergmann, J.E., Tokuyasu, K.T. and Singer, S.J. (1981) Passage of an integral membrane protein, the vesicular stomatitis virus glycoprotein, through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 1746-50.
- Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, **67**, 835-51.

- Blum, R., Feick, P., Puype, M., Vandekerckhove, J., Klengel, R., Nastainczyk, W. and Schulz, I. (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., Pfeiffer, F., Feick, P., Nastainczyk, W., Kohler, B., Schafer, K.H. and Schulz, I. (1999) Intracellular localization and in vivo trafficking of p24A and p23. *J Cell Sci*, **112**, 537-48.
- Bremser, M., Nickel, W., Schweikert, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Hughes, C.A., Sollner, T.H., Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1999) Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell*, **96**, 495-506.
- Chardin, P. and McCormick, F. (1999) Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell*, **97**, 153-5.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C.L. and Chabre, M. (1996) A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, **384**, 481-4.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-4.
- Cosson, P., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R. and Letourneur, F. (1996) Delta- and zeta-COP, two coatamer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *Embo J*, **15**, 1792-8.
- Cosson, P. and Letourneur, F. (1994) Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, **263**, 1629-31.
- Coulter, A. and Harris, R. (1983) Simplified preparation of rabbit Fab fragments. *J Immunol Methods*, **59**, 199-203.
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M. and Cassel, D. (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science*, **270**, 1999-2002.
- Dascher, C. and Balch, W.E. (1994) Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, **269**, 1437-48.
- d'Enfert, C., Wuestehube, L.J., Lila, T. and Schekman, R. (1991) Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER. *J Cell Biol*, **114**, 663-70.

- Denzel, A., Otto, F., Girod, A., Pepperkok, R., Watson, R., Rosewell, I., Bergeron, J.J., Solari, R.C. and Owen, M.J. (2000) The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Curr Biol*, **10**, 55-8.
- Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.P., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J. and Nilsson, T. (1998) gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J Cell Biol*, **140**, 751-65.
- Donaldson, J.G., Cassel, D., Kahn, R.A. and Klausner, R.D. (1992) ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6408-12.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B. and Schekman, R. (1994) Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J Biol Chem*, **269**, 24486-95.
- Elrod Erickson, M.J. and Kaiser, C.A. (1996) Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol Biol Cell*, **7**, 1043-58.
- Emery, G., Rojo, M. and Gruenberg, J. (2000) Coupled transport of p24 family members. *J Cell Sci*, **113**, 2507-16.
- Fiedler, K. and Rothman, J.E. (1997) Sorting determinants in the transmembrane domain of p24 proteins. *J Biol Chem*, **272**, 24739-42.
- Fiedler, K., Veit, M., Starnes, M.A. and Rothman, J.E. (1996) Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science*, **273**, 1396-9.
- Fullekrug, J., Suganuma, T., Tang, B.L., Hong, W., Storrie, B. and Nilsson, T. (1999) Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members. *Mol Biol Cell*, **10**, 1939-55.
- Gayle, M.A., Slack, J.L., Bonnert, T.P., Renshaw, B.R., Sonoda, G., Taguchi, T., Testa, J.R., Dower, S.K. and Sims, J.E. (1996) Cloning of a putative ligand for the T1/ST2 receptor. *J Biol Chem*, **271**, 5784-9.
- Glickman, J.N., Conibear, E. and Pearse, B.M. (1989) Specificity of binding of clathrin adaptors to signals on the mannose-6- phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Embo J*, **8**, 1041-7.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-51.

- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse-Locker, J., Nilsson, T., Goud, B., Soling, H.D., Tang, B.L., Wong, S.H. and Hong, W. (1994) Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J Cell Biol*, **127**, 1557-74.
- Griffiths, G., Pfeiffer, S., Simons, K. and Matlin, K. (1985) Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. *J Cell Biol*, **101**, 949-64.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Harter, C. and Wieland, F.T. (1998) A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11649-54.
- Helms, J.B., Palmer, D.J. and Rothman, J.E. (1993) Two distinct populations of ARF bound to Golgi membranes. *J Cell Biol*, **121**, 751-60.
- Helms, J.B. and Rothman, J.E. (1992) Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*, **360**, 352-4.
- Hicke, L. and Schekman, R. (1989) Yeast Sec23p acts in the cytoplasm to promote protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in vivo and in vitro. *Embo J*, **8**, 1677-84.
- Hicke, L., Yoshihisa, T. and Schekman, R. (1992) Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **3**, 667-76.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-8.
- Hsu, V.W., Yuan, L.C., Nuchtern, J.G., Lippincott-Schwartz, J., Hammerling, G.J. and Klausner, R.D. (1991) A recycling pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus for retention of unassembled MHC class I molecules. *Nature*, **352**, 441-4.
- Huttner, W.B. and Tooze, S.A. (1989) Biosynthetic protein transport in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol*, **1**, 648-54.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. and Peterson, P.A. (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **121**, 317-33.
- Kahn, R.A. and Gilman, A.G. (1986) The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem*, **261**, 7906-11.

- Kaiser, C. (2000) Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3783-5.
- Klumperman, J., Schweizer, A., Clausen, H., Tang, B.L., Hong, W., Oorschot, V. and Hauri, H.P. (1998) The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci*, **111**, 3411-25.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, **54**, 631-64.
- Kreis, T.E. (1986) Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *Embo J*, **5**, 931-41.
- Kreis, T.E. and Lodish, H.F. (1986) Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. *Cell*, **46**, 929-37.
- Krijnse-Locker, J., Ericsson, M., Rottier, P.J. and Griffiths, G. (1994) Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J Cell Biol*, **124**, 55-70.
- Kuge, O., Dascher, C., Orci, L., Rowe, T., Amherdt, M., Plutner, H., Ravazzola, M., Tanigawa, G., Rothman, J.E. and Balch, W.E. (1994) Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *J Cell Biol*, **125**, 51-65.
- Lavoie, C., Paiement, J., Dominguez, M., Roy, L., Dahan, S., Gushue, J.N. and Bergeron, J.J. (1999) Roles for alpha(2)p24 and COPI in endoplasmic reticulum cargo exit site formation. *J Cell Biol*, **146**, 285-99.
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H. and Cosson, P. (1994) Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, **79**, 1199-207.
- Lupas, A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, **21**, 375-82.
- Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162-4.
- Majoul, I., Sohn, K., Wieland, F.T., Pepperkok, R., Pizza, M., Hillemann, J. and Soling, H.D. (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.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J.C. and Rothman, J.E. (1989) Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*, **58**, 329-36.

- Martinez Menarguez, J.A., Geuze, H.J., Slot, J.W. and Klumperman, J. (1999) Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell*, **98**, 81-90.
- Marzioch, M., Henthorn, D.C., Herrmann, J.M., Wilson, R., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., Solari, R.C. and Rowley, A. (1999) Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol Biol Cell*, **10**, 1923-38.
- Mellman, I. and Simons, K. (1992) The Golgi complex: in vitro veritas? *Cell*, **68**, 829-40.
- Morinaga, N., Tsai, S.C., Moss, J. and Vaughan, M. (1996) Isolation of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP ribosylation factor (ARF) 1 and ARF3 that contains a Sec7-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12856-60.
- Nakano, A., Brada, D. and Schekman, R. (1988) A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol*, **107**, 851-63.
- Nakano, A. and Muramatsu, M. (1989) A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*, **109**, 2677-91.
- Nickel, W., Malsam, J., Gorgas, K., Ravazzola, M., Jenne, N., Helms, J.B. and Wieland, F.T. (1998) Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J Cell Sci*, **111**, 3081-90.
- Nickel, W., Sohn, K., Bunning, C. and Wieland, F.T. (1997) p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11393-8.
- Nilsson, T., Jackson, M. and Peterson, P.A. (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **58**, 707-18.
- Orci, L., Glick, B.S. and Rothman, J.E. (1986) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell*, **46**, 171-84.
- Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T. and Rothman, J.E. (1989) Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack. *Cell*, **56**, 357-68.
- Orci, L., Palmer, D.J., Amherdt, M. and Rothman, J.E. (1993) Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature*, **364**, 732-4.

- Orci, L., Palmer, D.J., Ravazzola, M., Perrelet, A., Amherdt, M. and Rothman, J.E. (1993) Budding from Golgi membranes requires the coatamer complex of non-clathrin coat proteins. *Nature*, **362**, 648-52.
- Orci, L., Stannes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell*, **90**, 335-49.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-58.
- Palmer, D.J., Helms, J.B., Beckers, C.J., Orci, L. and Rothman, J.E. (1993) Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem*, **268**, 12083-9.
- Pearse, B.M. (1988) Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. *Embo J*, **7**, 3331-6.
- Pelham, H.R. (1989) Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 1-23.
- Pepperkok, R., Lowe, M., Burke, B. and Kreis, T.E. (1998) Three distinct steps in transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein from the ER to the cell surface in vivo with differential sensitivities to GTP gamma S. *J Cell Sci*, **111**, 1877-88.
- Pepperkok, R., Scheel, J., Horstmann, H., Hauri, H.P., Griffiths, G. and Kreis, T.E. (1993) Beta-COP is essential for biosynthetic membrane transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in vivo. *Cell*, **74**, 71-82.
- Pepperkok, R., Whitney, J.A., Gomez, M. and Kreis, T.E. (2000) COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J Cell Sci*, **113**, 135-44.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. and Jackson, C.L. (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell*, **3**, 275-85.
- Pryer, N.K., Salama, N.R., Schekman, R. and Kaiser, C.A. (1993) Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. *J Cell Biol*, **120**, 865-75.
- Reinhard, C., Harter, C., Bremser, M., Brugger, B., Sohn, K., Helms, J.B. and Wieland, F. (1999) Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1224-8.
- Robinson, M.S. (1994) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 538-44.

- Robinson, M.S. (1997) Coats and vesicle budding. *Trends In Cell Biology*, **Mar**, **7**, 99-102.
- Rojo, M., Pepperkok, R., Emery, G., Kellner, R., Stang, E., Parton, R.G. and Gruenberg, J. (1997) Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport. *J Cell Biol*, **139**, 1119-35.
- Rothman, J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, **372**, 55-63.
- Rowe, T., Aridor, M., McCaffery, J.M., Plutner, H., Nuoffer, C. and Balch, W.E. (1996) COPII vesicles derived from mammalian endoplasmic reticulum microsomes recruit COPI. *J Cell Biol*, **135**, 895-911.
- Rowe, T. and Balch, W.E. (1995) Expression and purification of mammalian Sar1. *Methods Enzymol*, **257**, 49-53.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Salama, N.R., Yeung, T. and Schekman, R.W. (1993) The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *Embo J*, **12**, 4073-82.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Saraste, J. and Svensson, K. (1991) Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J Cell Sci*, **100**, 415-30.
- Scales, S.J., Pepperkok, R. and Kreis, T.E. (1997) Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell*, **90**, 1137-48.
- Schimmoller, F., Singer Kruger, B., Schroder, S., Kruger, U., Barlowe, C. and Riezman, H. (1995) The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J*, **14**, 1329-39.
- Schweizer, A., Fransen, J.A., Bachi, T., Ginsel, L. and Hauri, H.P. (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.
- Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K.J., Cole, N., Moreira, J.E., Terasaki, M., Siggia, E. and Lippincott-Schwartz, J. (1997) Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol*, **139**, 1137-55.

- Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1991) A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature*, **349**, 215-20.
- Shima, D.T., Cabrera-Poch, N., Pepperkok, R. and Warren, G. (1998) An ordered inheritance strategy for the Golgi apparatus: visualization of mitotic disassembly reveals a role for the mitotic spindle. *J Cell Biol*, **141**, 955-66.
- Shima, D.T., Scales, S.J., Kreis, T.E. and Pepperkok, R. (1999) Segregation of COPI-rich and anterograde-cargo-rich domains in endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport complexes. *Curr Biol*, **9**, 821-4.
- Sitia, R. and Meldolesi, J. (1992) Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol Biol Cell*, **3**, 1067-72.
- Sohn, K., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Bremser, M., Lottspeich, F., Fiedler, K., Helms, J.B. and Wieland, F.T. (1996) A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol*, **135**, 1239-48.
- Sorkin, A. and Carpenter, G. (1993) Interaction of activated EGF receptors with coated pit adaptins. *Science*, **261**, 612-5.
- Springer, S., Chen, E., Duden, R., Marzioch, M., Rowley, A., Hamamoto, S., Merchant, S. and Schekman, R. (2000) The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae* [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4034-9.
- Stamnes, M.A., Craighead, M.W., Hoe, M.H., Lampen, N., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J.E. (1995) An integral membrane component of coatomer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Nov 7;92(23):10816]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8011-5.
- Stamnes, M.A. and Rothman, J.E. (1993) The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*, **73**, 999-1005.
- Strous, G.J. and Lodish, H.F. (1980) Intracellular transport of secretory and membrane proteins in hepatoma cells infected by vesicular stomatitis virus. *Cell*, **22**, 709-17.
- Traub, L.M., Ostrom, J.A. and Kornfeld, S. (1993) Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J Cell Biol*, **123**, 561-73.

- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, J.J.d., Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (1991) SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, **266**, 19599-610.
- Wandinger-Ness, A., Bennett, M.K., Antony, C. and Simons, K. (1990) Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J Cell Biol*, **111**, 987-1000.
- Waters, M.G., Serafini, T. and Rothman, J.E. (1991) 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, **349**, 248-51.
- Wen, C. and Greenwald, I. (1999) p24 proteins and quality control of LIN-12 and GLP-1 trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, **145**, 1165-75.
- Westphal, A.H. and de Kok, A. (1988) Lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. Molecular cloning, organization and sequence analysis of the gene. *Eur J Biochem*, **172**, 299-305.
- Whiteheart, S.W., Rossnagel, K., Buhrow, S.A., Brunner, M., Jaenicke, R. and Rothman, J.E. (1994) N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J Cell Biol*, **126**, 945-54.
- Yokota, S. and Fahimi, H.D. (1981) Immunocytochemical localization of albumin in the secretory apparatus of rat liver parenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 4970-4.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C. and Schekman, R. (1993) Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*, **259**, 1466-8.
- Zhao, L., Helms, J.B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J. and Wieland, F.T. (1997) Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4418-23.
- Zhao, L., Helms, J.B., Brunner, J. and Wieland, F.T. (1999) GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatamer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem*, **274**, 14198-203.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ARF	<i>ADP-ribosylation factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BFA	Brefeldin A
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BST	<i>bypass of sec thirteen</i>
COP	<i>Coat Protein</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi-intermediate compartment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanin nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Golgi	Golgi Apparat
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IC	<i>intermediate compartment</i>
IgG	Immunglobulin G
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
M6P	Manose 6 Phosphat
NRK	<i>normal rat kidney</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide sensitive fusion protein</i>
PEG	Polyethylenglykol
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SNARE	<i>soluble NSF-attachment protein receptor</i>

Tet	Tetrazyklin
TGN	Trans Golgi Netzwerk
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
VTC	<i>vesicular tubular clusters</i>
wt	Wildtyp