

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker Jörg Moelleken
aus Dinslaken

Tag der mündlichen Prüfung:

Funktionelle Charakterisierung und ultrastrukturelle Lokalisierung der Isotypen des Hüllprotein-Komplexes Coatomer

Gutachter: Prof. Dr. Felix T. Wieland
Prof. Dr. Walter Nickel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung/Abstract.....	1
1. Zusammenfassung.....	1
2. Abstract	3
I. Einleitung	5
1. Die eukaryontische Zelle und ihre Kompartimentierung	5
2. Der sekretorische Weg	5
2.1 ER Import und Qualitätskontrolle	6
2.2 Transport vom ER über das ERGIC zum Golgi: COPII-Vesikel	7
2.3 Der Intra-Golgi-Transport und das Protein Rückführungssystem: COPI-Vesikel.....	8
2.4 Transport vom Golgi zu den finalen Zielorten: Sekretorische Granulen und Clathrin-Vesikel.....	11
2.4.1 Sekretorische Granulen.....	11
2.4.2 Clathrin-umhüllte Vesikel.....	12
3. Komponenten von COPI-Vesikeln und Vergleich mit COPII- und Clathrin-Vesikeln.....	13
3.1 Coatomer-Biogenese und -Architektur: Spezifität der Frachtaufnahme?	13
3.2 SNAREs und <i>tethering</i> Proteine: Spezifität der Frachtübergabe und Fusion mit der Zielmembran	17
3.3 ArfGAPs: Beteiligung bei der Frachtaufnahme.....	18
3.4 Vergleich von COPI- mit COPII- und Clathrin-umhüllten Vesikeln.....	19
4. Zielsetzung der Doktorarbeit.....	22
II. Ergebnisse	24
1. Gewinnung von Antikörpern gegen $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP.....	24
1.1 Eignung der Antikörper für die Western Blot-Analyse	26
1.2 Charakterisierung der Antikörper durch Immunpräzipitation.....	29
1.3 Eignung der Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	30
2. Identifizierung von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP-Interaktionspartnern	37
2.1 Nachweis und Quantifizierung des $\gamma 2/\zeta 2$ -Coatomer Isotyps.....	37
2.2 Interaktionen mit der $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP <i>appendage</i> Domäne	45
2.3 Aufnahme der γ - <i>appendage</i> Interaktionspartner in COPI-Vesikel	50
3. Nachweis und ultrastrukturelle Lokalisierung von isotypischen $\gamma 1\zeta 2$ - und $\gamma 2\zeta 1$ -COPI Vesikeln	51
3.1 Hinweis auf homogen isotypisch umhüllte COPI-Vesikeln	51
3.2 Ultrastrukturelle Lokalisierung von $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP	55
4. Generierung von monoklonalen, Epitop-markierten $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP exprimierenden Zelllinien	58
4.1 Klonierung des Basisplasmids pRevTRE2-IRES (pRTi)	59
4.2 Einführung von Oberflächenmarkern: CD4 und CD8	59
4.3 Einführung der Epitop-markierten γ -COP-Gene: HA- $\gamma 1$ und Myc- $\gamma 2$	59
4.4 Vereinzelung der polyklonalen Zelllinien	63
4.4.1 FACS-basierte Vereinzelung HA- $\gamma 1$ bzw. HA- $\gamma 1$ /Myc- $\gamma 2$ transduzierter Zellen	63
4.4.2 Immunfluoreszenz-basierte Vereinzelung HA- $\gamma 1$ bzw. Myc- $\gamma 2$ transduzierter Zellen	65
4.5 Analyse verschiedener Expressionsbedingungen	65
4.6 Funktionelle Integration von exogenem HA- $\gamma 1$ -COP bzw. Myc- $\gamma 2$ -COP in endogenen Coatomer..	71
5. RNAi-basierte Herunterregulation von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP.....	77
5.1 Überprüfung der $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP cDNA-Sequenzen der 3T3 Zellen	77
5.2 RNAi-Screen	77
III. Diskussion.....	79
1. Interaktionspartner der <i>appendage</i> Domänen von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP	79
1.1 Zfp289 bzw. ArfGAP1-3	79
1.2 Annexin A11	83
1.3 Rab1b und ALG-2	85
2. Nachweis isotypischer $\gamma 1\zeta 2$ - und $\gamma 2\zeta 1$ -COPI-Vesikel.....	85
2.1 Analyse der cytosolischen γ/ζ -COP Interaktionen	85
2.2 Differentielle Verteilung von $\gamma 1\zeta 2$ - und $\gamma 2\zeta 1$ -COPI Vesikeln im Golgi-Apparat	87
2.3 Differentielle Frachtaufnahme in $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COPI Vesikel.....	91
3. Etablierung eines <i>knock-down</i> Systems für $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP	92

4. Ein Modell zur Funktion von γ 1- und γ 2-COP bei der COPI-Vesikelbiogenese.....	92
IV. Material.....	95
1. Chemikalien.....	95
2. Antikörper.....	95
2.1 Primärantikörper.....	95
2.2 Sekundärantikörper.....	97
3. Enzyme.....	97
4. Plasmide.....	98
5. Oligonukleotide.....	98
5.1 PCR-Primer.....	98
5.2 Hybridisierungs-Oligonukleotide.....	100
5.3 Sequenzier-Primer.....	101
6. Zelllinien.....	101
7. Protein-Molekulargewichtstandards und DNA-Größenstandards.....	102
8. Antibiotika.....	102
9. Geräte.....	103
V. Methoden.....	104
1. Molekularbiologische Methoden.....	104
1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	104
1.2 Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA.....	104
1.3 Natrium-Acetat-Präzipitation.....	104
1.4 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	104
1.5 mRNA Isolierung.....	105
1.6 Reverse Transkription zur Herstellung von doppelsträngiger cDNA.....	106
1.7 Polymerase-Kettenreaktion basierte Methoden.....	106
1.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	106
1.7.2 PCR-basiertes Spleißen (Megaprimer PCR).....	107
1.7.3 Positions-spezifische Mutagenese.....	108
1.8 DNA-Ligation.....	109
1.9 Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	110
1.10 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> und PCR-Aufreinigung.....	110
1.11 DNA-Sequenzierung.....	111
1.12 Hybridisierung einzelsträngiger DNA.....	111
1.13 Klonierung der GST-TEV- γ 1- und - γ 2- <i>appendage</i> Expressionsplasmide.....	111
2. Biochemische Methoden.....	112
2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	112
2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung.....	112
2.2.1 Standard-Coomassie Färbung.....	113
2.2.2 Färbung mit kolloidalem Coomassie für die MALDI-Analyse.....	113
2.3 Western-Blot (WB).....	114
2.4 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford.....	115
2.5 Gewinnung von Cytosol.....	115
2.5.1 Cytosol-Gewinnung aus adhären wachsenden Zellen.....	115
2.5.2 Gewinnung von Cytosol aus Rattenleber.....	116
2.6 Spezifische und unspezifische Proteinaufkonzentrierung.....	116
2.6.1 TCA-Präzipitation.....	116
2.6.2 Immunpräzipitation (IP).....	117
2.6.3 Immunisolierung von COPI-Vesikeln.....	117
2.6.4 GST- γ 1- und γ 2- <i>app pull-downs</i>	118
2.6.5 His ₆ -mAnnexin A11 und His ₆ -mZfp289 <i>pull-downs</i>	118
2.7 Isolierung von Golgi aus Rattenleber.....	119
2.8 Herstellung von COPI-Vesikeln.....	120
2.9 Antikörper-kompatible SDS-Denaturierung von Proteinen.....	121
2.10 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen.....	121
2.10.1 Aufreinigung der GST- γ 1- und γ 2- <i>appendage</i> Fusionsproteine.....	121
2.10.2 Native Aufreinigung von His ₆ -mAnnexin A11.....	122
2.10.3 Denaturierende Aufreinigung von His ₆ -mZfp289.....	122
2.11 Gelfiltrationschromatographie von Cytosol.....	123
2.12 Antikörper-Aufreinigungen.....	123
2.12.1 Affinitätsaufreinigung der ζ 2-Antikörper.....	123
2.12.2 Negative Affinitätsaufreinigung der γ 1- und γ 2-Antikörper.....	124

2.12.3 Gewinnung von Antikörpern aus Hybridom-Überstand	125
3. Zellbiologische Methoden	125
3.1 Allgemeine Puffer und Lösungen	125
3.2 Transformation von DNA durch Calcium-Phosphat-Präzipitation	125
3.3 Transformation von DNA durch Effectene™	126
3.4 Retrovirale Transduktion	126
3.5 Immunfluoreszenz (IF)	127
3.6 Elektronenmikroskopie (EM)	128
3.7 Analytische und präparative FACS-Färbung	128
VI. Anhang	130
1. Übersicht der vorgenommenen Modifikationen von γ 1- und γ 2-COP	130
2. Vergleich von ArfGAPs hinsichtlich der Krümmungs-sensitiven Domäne	135
VII. Literaturverzeichnis	137
VIII. Danksagung	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der sekretorische Weg.....	6
Abbildung 2: Mechanismus der COPI-Vesikel Biogenese.	10
Abbildung 3: Coatomer-Biogenese und -Architektur.	15
Abbildung 4: GST-Affinitätsaufreinigung der GST- $\gamma 1$ -app und GST- $\gamma 2$ -app Fusionsproteine.....	24
Abbildung 5: Gelfiltration der GST- $\gamma 1$ -app und GST- $\gamma 2$ -app Fusionsproteine.	25
Abbildung 6: Vergleich der gegen GST- $\gamma 1$ -app und gegen GST- $\gamma 2$ -app gerichteten Antiseren als Primärantikörper bei der Western Blot-Analyse.....	27
Abbildung 7: Spezifität der gegen GST- $\gamma 1$ -app und gegen GST- $\gamma 2$ -app gerichteten Antiseren als Primärantikörper bei der Western Blot-Analyse von Cytosol.	28
Abbildung 8: Vergleich der α GST- $\gamma 1$ -app und α GST- $\gamma 2$ -app Seren als immunpräzipitierendes Agenz.	29
Abbildung 9: Eignung der Antikörper für die Immunfluoreszenz.	35
Abbildung 10: Verifizierung der Spezifität der gegen $\gamma 1$ -COP, $\gamma 2$ -COP und $\zeta 2$ -COP gerichteten Antiseren durch Ko-Inkubation mit den Antigenen.	36
Abbildung 11: Analyse aller Coatomer-Untereinheiten in gegen β' -, β -, $\gamma 1$ - bzw. $\gamma 2$ -COP gerichteten IPs im Vergleich zur IP mit CM1.	38
Abbildung 12: Gelchromatographische Auftrennung von 3T3 Cytosol.....	39
Abbildung 13: $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP läßt sich durch Coatomer spezifische IPs nicht vollständig depletieren.	40
Abbildung 14: Eine Antikörper- <i>appendage</i> Domänen Interaktion führt nicht zur Dissoziation des $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COPI-Subkomplexes.....	41
Abbildung 15: Überprüfung der $\gamma 2/\zeta 2$ -Interaktion durch eine $\zeta 2$ -COP-spezifische IP.	42
Abbildung 16: Quantifizierung der vier Coatomer-Isotypen aus 3T3 Cytosol.	44
Abbildung 17: <i>Pull-downs</i> mit den $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ - <i>appendage</i> Domänen.....	45
Abbildung 18: Differentielle Bindung der γ -COP <i>appendage</i> Interaktionspartner.....	47
Abbildung 19: <i>Pull-downs</i> mit je 100 μ g His ₆ -mAnnexinA11 und His ₆ -mZfp289 aus Rattenlebercytosol.	48
Abbildung 20: Subzelluläre Ko-Lokalisierung von Annexin A11 im Vergleich zu $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP in NRK Zellen.....	50
Abbildung 21: Aufnahme von Annexin A11 und ArfGAP1-3 in COPI-Vesikel.....	50
Abbildung 22: $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP spezifische Immunisolierung von COPI-Vesikeln.	51
Abbildung 23: Quantifizierung der Signalverhältnisse von $\gamma 1/\gamma 2$ - und $\zeta 1/\zeta 2$ -COP in IPs von COPI-Vesikeln mit Antikörpern gegen $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP.	54
Abbildung 24: Ultrastrukturelle Lokalisierung von $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP.	56
Abbildung 25: Quantifizierung der ultrastrukturelle Lokalisierung von $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP.	57
Abbildung 26: Plasmid-Karten der retroviral transduzierbaren Plasmide pRTi 18 und pRTi 24.....	62
Abbildung 27: Verlauf der FACS-basierten Klonierung.....	64
Abbildung 28: IF-Analyse der finalen monoklonalen Zelllinien unter verschiedenen Expressionsbedingungen.	67
Abbildung 29: Bestimmung des Expressionsgrades und des in Coatomer eingebauten Anteils von HA- $\gamma 1$ bzw. Myc- $\gamma 2$ -COP unter verschiedenen Bedingungen.....	68
Abbildung 30: Die Induktion der exogenen Isoformen führt zu der Herunterregulation der endogenen Proteine.	70
Abbildung 31: Bestätigung der Herunterregulation der endogenen γ -COP Isoformen durch Analyse des Gesamtprotein-Hintergrunds.	70
Abbildung 32: Integration der exogenen Proteine in endogenem Coatomer I.	72
Abbildung 33: Integration der exogenen Proteine in endogenem Coatomer II.....	73
Abbildung 34: Ko-Lokalisierung von HA- $\gamma 1$ (A) bzw. Myc- $\gamma 2$ (B) mit β' -COP.	74
Abbildung 35: Funktionelle Analyse von HA- $\gamma 1$ und Myc- $\gamma 2$ -COP.....	76
Abbildung 36: Analyse der Präsenz von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP in Gegenwart unterschiedlicher RNAi-Konstrukte.	78
Abbildung 37: Übersicht der Coatomer/ArfGAP-Interaktionen.	82
Abbildung 38: Schematische Darstellung der reziproken $\gamma 1\zeta 2$ - und $\gamma 2\zeta 1$ -COPI-Vesikel Gradienten über den Golgi-Apparat unter Einbeziehung der Coatomer-Isotyp Stöchiometrien.....	91
Abbildung 39: Modell zur Funktion von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP bei der COPI-Vesikelbiogenese.....	94
Abbildung 40: Prinzip der Megaprimer-PCR.	107
Abbildung 41: Schema der Negativ Affinitätsaufreinigung.....	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Coatomer-Untereinheiten	14
Tabelle 2: Vergleich von COPI- mit COPII- und Clathrin-umhüllten Vesikeln	20
Tabelle 3: Übersicht der Antisera hinsichtlich der Eignung für die Western Blot-Analyse (WB) sowohl von Cytosolen und CM1-IPs, bei der Immunpräzipitation (IP) und für die Immunfluoreszenz (IF)	37
Tabelle 4: Bestimmung der Stöchiometrie der vier Coatomer-Isotypen aus 3T3 Cytosol	44
Tabelle 5: Identifizierte Peptide von Zfp289 und Annexin A11 der γ 1- und γ 2- <i>appendage</i> Domänen- <i>pull-downs</i> aus Rattenlebercytosol	46
Tabelle 6: Unterschiede der gewonnenen hy 1- und hy 2-COP cDNA-Sequenzen zur Literatur	60
Tabelle 7: Unterschiedliche Epitop-Markierung von hy 1- und hy 2-COP	60
Tabelle 8: In hy 1- und hy 2-COP eingeführte, stille Mutationen	61
Tabelle 9: Analyse des Induktionsverhaltens und des in Coatomer-eingebauten Anteils der exogenen γ -COP Isoformen	69
Tabelle 10: Validierung der Coatomer-Stöchiometrie	87
Tabelle 11: Stöchiometrien von γ 1-, γ 2-, ζ 1- und ζ 2-COP in Coatomer, COPI-Vesikeln und γ 1- und γ 2-COPI Isolaten	88
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Primärantikörper. NT = N-Terminus, CT = C-Terminus	95
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper	97
Tabelle 14: Übersicht der eingesetzten Plasmide	98
Tabelle 15: Übersicht der bei der Polymerase Kettenreaktion eingesetzten Oligonukleotide	98
Tabelle 16: Übersicht der zur Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotide	100
Tabelle 17: In folgender Tabelle sind alle Nicht-Standard- Sequenzierprimer aufgeführt	101
Tabelle 18: Verwendete Zelllinien	101
Tabelle 19: Protein-Molekulargewichtsstandards	102
Tabelle 20: DNA-Größenstandards	102
Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Antibiotika	102
Tabelle 22: Ansatz zur reversen Transkription doppelsträngiger cDNA	106
Tabelle 23: Standard-Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion	106
Tabelle 24: Temperaturprogramm der Polymerase-Kettenreaktion	107
Tabelle 25: Bei der Megaprimer-PCR eingesetzte Oligonukleotide	108
Tabelle 26: Ansatz der Positions-spezifischen Mutagenese	108
Tabelle 27: Temperaturprogramm der Positions-spezifischen Mutagenese	108
Tabelle 28: Ligationsansatz von DNA-Fragmenten in das pCR-Blunt™-Plasmid	109
Tabelle 29: Ligationsansatz des TaKaRa™-Kits	109
Tabelle 30: Ansatz zur Hybridisierung von Oligonukleotiden	111
Tabelle 31: Bei der PCR verwendete Oligonukleotide zur Generierung der GST- my 1- und my 2-app-Expressionsplasmide	111
Tabelle 32: Übersicht der verwendeten Polyacrylamid-Gele	113
Tabelle 33: 8 ml Ansatz zur Generierung von COPI-Vesikeln	120
Tabelle 34: Ansatz der Calcium-Phosphat-Präzipitation	126

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
Arl	<i>Arf-related protein</i>
bp	Basenpaar
BMW	<i>broad molecular weight</i> (Proteinmarker)
BSA	bovines Serumalbumin
b ζ 2	ζ 2-COP, bovin
CCV	<i>Clathrin coated vesicle</i>
CDB	Zell-Dissoziationspuffer
CMV	Cytomegalovirus
COP	<i>coat protein</i>
CS	Kälberserum
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DOC	Desoxycholol
Dox	Doxicyclin
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-intermediäres Kompartiment
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GalT	Galactosyltransferase
GAP	GTP-Hydrolyse aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanosinnukleotid-Austauschfaktor
GGA	<i>Golgi-associated, γ-ear containing, Arf1-binding</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-3-O-(thio)-triphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
h γ 1	γ 1-COP, human
h γ 2	γ 2-COP, human
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunoglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

IRES	<i>internal ribosomal entry side</i>
KDELr	KDEL Rezeptor
LB Medium	Luria Bertani Medium
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
LSB	Laemmli Proben Puffer
ManI, ManII	Mannosidase I, Mannosidase II
MBS	<i>modified bovine serum</i>
MCAT	<i>murine cationic aminoacid transporter</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle
m γ 1	γ 1-COP, Maus
m γ 2	γ 2-COP, Maus
m ζ 1	ζ 1-COP, Maus
m ζ 2	ζ 2-COP, Maus
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MW	Molekulargewicht
NAGT	N-Acetylglucosaminyltransferase I
NP-40	Nonidet-P40
NTP	Nukleotid-Triphosphat
OD	optische Dichte
PA	Pikrinsäure
PAF	Paraformaldehyd
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGS	Protein G-Sepharose
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂	Inositol-1,4,5-trisphosphat
pRTi	pRevTRE2-IRES
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
rtTA	reverser Tetracyclin-abhängiger Transaktivator
RLC	Rattenlebercytosol
RLG	Rattenleber-Golgi
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur [°C]
Tet	Tetracyclin
Tfr	Transferrin Rezeptor
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TRE	<i>Tetracycline-responsible element</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether)

U	<i>unit</i> (Enzymaktivität) Endonucleasen [μg verdaute DNA/h bei empfohlener T] Polymerasen [Einbau von 10 nmol dNTP/30 min bei 70°C] Ligasen [50% Ligation von <i>Hind</i> III-Fragmenten]
UTR	untranslatierter DNA Bereich, der die kodierende Sequenz umgibt
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewicht/Volumenverhältnis [100 g/ml]
w/w	Gewichtsverhältnis
WB	Western Blot
x g	Erdbeschleunigung

Einbuchstabencode der Aminosäuren

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

Einbuchstabencode der Nukleinsäuren

A	Adenosin	G	Guanosin
C	Cytosin	T	Thymidin

Zusammenfassung/Abstract

1. Zusammenfassung

Ausgangspunkt der Doktorarbeit war die funktionelle Charakterisierung von γ 1- und γ 2-COP im sekretorischen Weg. Dazu wurden Unterschiede von γ 1- und γ 2-COP hinsichtlich verschiedener Interaktionspartner und ihrer Lokalisierung entdeckt.

Es wurden Bindungsstudien mit den γ 1- und γ 2-COP *appendage* Domänen durchgeführt. *Appendage* Domänen wurden erstmalig bei den α/β -Adaptinen, Bestandteile der Clathrin-Adaptorkomplexe (APs), identifiziert. Neben Aminosäuresequenz-Vergleichen zwischen AP-Komplexen und dem $\beta/\gamma/\delta/\zeta$ -COPI Subkomplex (Schledzewski et al. 1999), der unter nicht physiologischen Salz-Bedingungen vom $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COPI Subkomplex dissoziiert werden kann, legte die Strukturaufklärung der γ 1-COP *appendage* Domäne (Hoffman et al. 2003; Watson et al. 2004) eine Analogie zwischen COPI- und Clathrin-vermitteltem Transport nahe. Während eine Vielzahl von *appendage*-Bindern im Clathrin-System beschrieben sind (Praefcke et al. 2004), waren im COPI-System ausschließlich ArfGAP2 und ArfGAP3 als γ 1-COP-Binder bekannt (Watson et al. 2004). In dieser Arbeit konnten ArfGAP1, ArfGAP3 und Annexin A11 als präferentielle γ 2-COP- und Zfp289 als γ 1-COP- Bindepartner identifiziert werden. Zfp289 ist als Protein mit Arf1-GAP Aktivität beschrieben worden (Singh et al. 2001) und ist möglicherweise identisch mit ArfGAP2. Während eine Beteiligung der kleinen GTPase Arf1 und deren ArfGAPs an der COPI-Biogenese unstrittig ist (Palmer et al. 1993), ist der Einfluß von Annexin A11 gegenwärtig unverstanden. Eine Beteiligung von Ca^{2+} sowohl bei dem COPI-vermittelten Transport (Chen et al. 2002) als auch an der Rekrutierung von Annexin A11 an Membranen (Lecona et al. 2003) legt dieser Interaktion zumindest eine funktionelle Relevanz nahe.

Weiter konnten γ 1 ζ 2- und γ 2 ζ 1-COP enthaltende COPI-Vesikel immunisoliert werden. Unterstützt wird die Präsenz von diesen distinkten Vesikeln durch eine Analyse der ultrastrukturellen Lokalisierung von γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP: Während γ 1- und ζ 2-COP präferentiell im *cis*-Golgi lokalisierten, wies γ 2-COP eine *trans*-Golgi Lokalisation auf. Dies legt eine Funktion von γ 1 ζ 2-Coatomer im *cis*- und von γ 2 ζ 1-Coatomer im *trans*-Golgi Bereich nahe. Wie auch im Clathrin-System wird daher beim COPI-vermittelten Transport Heterogenität durch Variation der Hüllproteine erlangt. Ferner könnten die den AP

Komplexen entsprechenden Komponenten von Coatomer, γ 1- und γ 2- bzw. ζ 1- und ζ 2-COP, eine Direktionalität des Transports determinieren.

Letztlich konnten zwei Zelllinien etabliert werden, die einen induzierbaren, individuellen γ 1- oder γ 2-COP *knock-down* erlaubten. Der *knock-down* der einzelnen γ -COP Isoformen konnte, wie auch ein RNAi-basierter *knock-down* beider Isoformen gleichzeitig, nur transient erreicht werden. Dies unterstützt eine essentielle und unterschiedliche Beteiligung von γ 1- und γ 2-COP am sekretorischen Weg.

2. Abstract

The present work aimed at the functional characterisation of γ 1- and γ 2-COP within the secretory pathway. To this end, differences of γ 1- and γ 2-COP with respect to protein interactions and their localisation were investigated.

First, binding studies with γ 1- and γ 2-COP appendage domains were performed. Originally, appendage domains were identified in α/β -adaptins, components of the clathrin adaptor complexes (APs). An analogy between COPI- and clathrin-mediated transport is shown by aminoacid sequence comparison between clathrin's AP complexes and the $\beta/\gamma/\delta/\zeta$ -COPI subcomplex (Schledzewski et al. 1999), which can be dissociated under non-physiological salt conditions from the $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COPI subcomplex. Additionally, the γ 1-COP appendage domain structure showed a striking similarity to α -adaptin (Hoffman et al. 2003; Watson et al. 2004). A variety of proteins binding to appendage domains of the clathrin system is known (Praefcke et al. 2004). In contrast, only ArfGAP2 and ArfGAP3 are known to bind to γ 1-COP in the COPI system (Watson et al. 2004). In this thesis, ArfGAP1, ArfGAP3 and annexin A11 are identified as preferential γ 2-COP binding partners, and Zfp289 of γ 1-COP. Zfp289 was described as an Arf1-GAP (Singh et al. 2001) and likely represents ArfGAP2. While a participation of the small GTPase Arf1 and its ArfGAPs in COPI-biogenesis is established (Palmer et al. 1993), a contribution of annexin A11 in vesicle formation is not understood. A role played by Ca^{2+} in COPI-mediated transport (Chen et al. 2002) and in recruitment of annexin A11 to membranes (Lecona et al. 2003) could functionally link annexin to COPI transport.

Second, γ 1 ζ 2- und γ 2 ζ 1-COP containing COPI vesicles could be immunisolated. This finding is supported by the determination of the ultrastructural localisation of γ 1-, γ 2- and ζ 2-COP within the Golgi apparatus: γ 1- and ζ 2-COP are predominantly found in the *cis*- and γ 2-COP in the *trans*-Golgi. This implies a function of γ 1 ζ 2 coatomer in the *cis*- and of γ 2 ζ 1 coatomer in the *trans*-Golgi region. With respect to individual clathrin transport proteins, it's tempting to compare the major coatomer isoforms with the various adapter proteins in the clathrin system, known to serve specific transport steps. Comparable to the clathrin system, heterogeneity of vesicles in the COPI system is achieved by variation of the coat proteins. Additionally, the AP complex resembling components of coatomer, γ 1-, γ 2-, ζ 1- and ζ 2-COP, could determine a directionality of transport.

Third, two cell lines were established that allow an individual knock-down of either γ -COP isoform. In addition, a simultaneous RNAi-based knock-down of both isoforms was performed. The knock-down of the individual γ -COP isoforms, as the simultaneous knock-down of both isoforms, could be achieved transiently only. This points to an essential and differential role of both γ -COP isoforms within the secretory pathway.

I. Einleitung

1. Die eukaryontische Zelle und ihre Kompartimentierung

Eukaryontische Zellen werden nach außen durch die Plasmamembran abgegrenzt. Diese erlaubt die Aufrechterhaltung einer komplexen internen Struktur, die neben dem Cytoplasma durch das Vorhandensein von Organellen gekennzeichnet ist. Die Membran-umhüllten Organellen der eukaryontischen Zelle dienen der Erhöhung des Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses der Zelle und stellen vom Cytoplasma unterscheidbare Orte dar, die separate Reaktionen wie Glykosylierung, proteolytische Prozessierung und Abbau ermöglichen. Die Identität und damit das Reaktionsmilieu einer Organelle wird durch die Protein- und Lipid-Zusammensetzung bestimmt. Um die Membran-Identität und -Funktion aufrecht zu erhalten, müssen Transmembranproteine, deren möglicherweise gebundene Fracht und Lipide zwischen den Organellen und der Plasmamembran transportiert werden. Dieser Transport wird größtenteils durch sphärische Vesikel mit einem Durchmesser von 60-100 nm vermittelt. Zwischen Organellen kann eine direkte homo- und heterotypische Fusion auftreten (Endosomen, Lysosomen, mitotische Golgi-Fragmente). Auch hier sind, um die Identität der Organellen zu erhalten, vesikuläre Transportprozesse notwendig, die das Material der ursprünglichen Organelle von der Hybrid-Organelle entfernen.

2. Der sekretorische Weg

Die Existenz eines intrazellulären Transports von neu synthetisierten Proteinen wurde 1964 erstmalig durch Autoradiographie in exokrinen pankreatischen Zellen gezeigt (Caro und Palade 1964). An diesem vektoriellen Transport ist neben dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Golgi-Apparat beteiligt (Jamieson und Palade 1966). Proteine, die entlang des sekretorischen Weges transportiert werden, sind Membranproteine, sezernierte und lysosomale/vakuoläre Proteine. Sekretorische Proteine unterscheiden sich von cytoplasmatischen Proteinen durch das Vorhandensein von Signalsequenzen (Signal-Hypothese), also Aminosäureketten mit bestimmten chemischen Eigenschaften (Blobel und Dobberstein 1975a; Blobel und Dobberstein 1975b). Entlang des sekretorischen Weges erfolgen Protein-spezifische Modifikationen wie N-Glykosylierung (Kornfeld und Kornfeld 1985), Disulfid-Brückenbildung (Freedman et al. 1989), Prolin-Hydroxylierung, O-Glykosylierung (Tooze et al. 1988), die Anheftung von GPI-Ankern (Caras und Weddell 1989) und Tyrosin-Sulfatierung. Hinsichtlich der beteiligten Maschinerie kann der Materialtransport durch den sekretorischen Weg in mindestens vier unterscheidbare Schritte unterteilt werden (**Abbildung 1** und folgende Abschnitte):

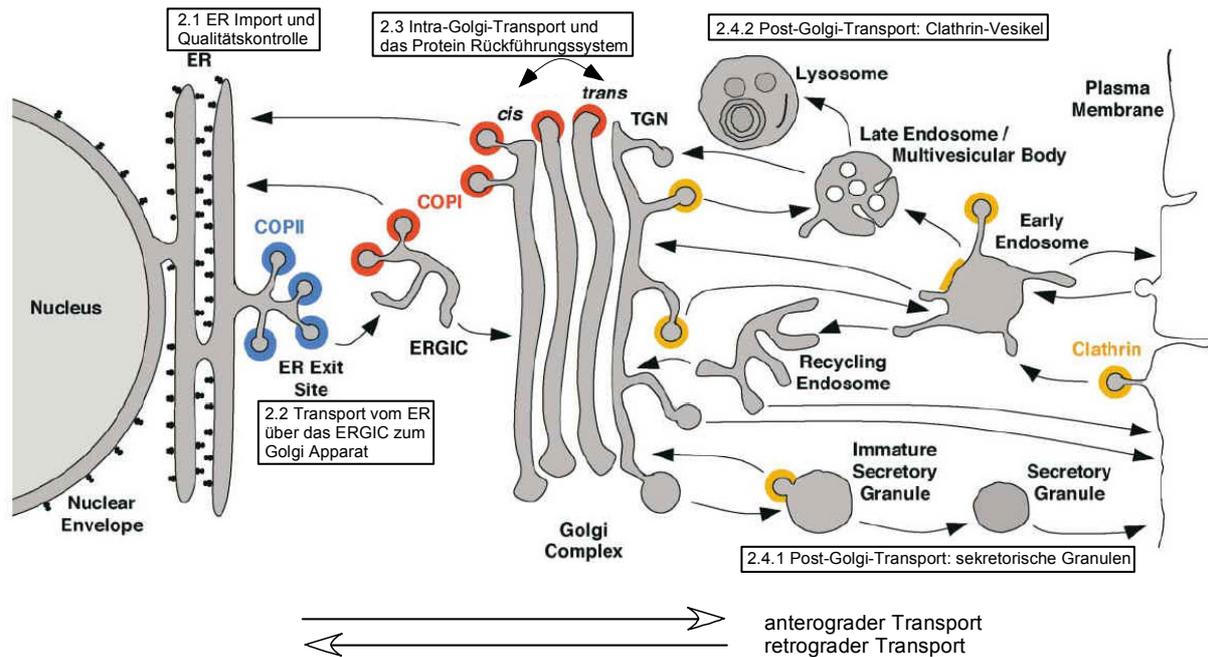


Abbildung 1: Der sekretorische Weg. Neben dem sekretorischen Weg sind der lysosomale und der endocytotische Weg dargestellt. Der sekretorische Weg beginnt mit der Synthese und dem Transport von Proteinen in das ER. Von dort erfolgt der weitere zur Plasmamembran gerichtete (anterograde) Transport durch COPII-Vesikel (blau) über das ERGIC zum Golgi-Apparat. Sowohl der intra-Golgi Transport als auch der zurück zum ER gerichtete (retrograde) Transport wird durch COPI-Vesikel vermittelt (rot). Der Golgi-Export der Proteine sowie die lysosomalen und endocytotischen Wege vermitteln Clathrin-Vesikel (orange). Die in folgenden Abschnitten diskutierten Transportschritte sind angegeben. Modifiziert nach: (Bonifacino und Glick 2004).

2.1 ER Import und Qualitätskontrolle

Der Startpunkt des sekretorischen Weges ist das ER (**Abbildung 1**). Sobald eine Signalsequenz einer naszierenden Polypeptidkette aus dem Ribosom, der für die Proteinbiosynthese erforderlichen Maschinerie, präsentiert wird, führt dies zu einem Arrest der weiteren Polypeptid-Elongation (Walter und Blobel 1981b; Walter und Blobel 1981a; Walter et al. 1981) und der Assoziation dieses Komplexes mit der ER-Membran (Blobel und Potter 1967b; Blobel und Potter 1967a). An der Erkennung der Signalsequenz ist das SRP (*signal recognition particle*) beteiligt, das wiederum an den ER-ständigen SRP Rezeptor (SR) bindet (Walter und Blobel 1980; Gilmore et al. 1982; Ganoth et al. 1988). Die Insertion von Membranproteinen in bzw. die Passage von sezernierten bzw. lysosomalen Proteinen durch die ER-Membran erfolgt durch das ER Translokon, einem aus den Proteinen Sec61 $\alpha/\beta/\gamma$ bestehenden trimere Proteinkomplex (Deshaies und Schekman 1989; Deshaies et al. 1991). Zur Vermeidung der Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen im ER existieren zwei voneinander abhängige, ER-assoziierte Systeme (Friedlander et al. 2000; Travers et al. 2000):

UPR (*unfolded protein response*) und ERAD (*ER-associated degradation*). Werden fehlgefaltete Proteine, freie Thiolgruppen oder unvollständige N-Glykosylierungen identifiziert, wird durch diese nicht nur die Expression von Chaperonen (Faltungshelfern), sondern auch von an der Proteolyse beteiligten Proteinen hochreguliert. Dabei kommt es zur Re-Translokation der Proteine ins Cytosol (Plemper et al. 1999), die mit einer Polyubiquitinierung (Hershko et al. 1979) sowie der Proteasom-abhängigen Proteolyse einhergeht (Haass und Kloetzel 1989).

2.2 Transport vom ER über das ERGIC zum Golgi: COPII-Vesikel

Wenn sekretorische Proteine die ER Qualitätskontrolle passiert haben, also korrekt gefaltet sind, können sie in COPII-Vesikel aufgenommen werden (COP von *coat protein*) (Barlowe et al. 1994) (siehe **Abbildung 1**). Sowohl COPII-, COPI- als auch Clathrin-Vesikel (CCV) weisen einen ähnlichen modularen Aufbau hinsichtlich der Proteinhülle auf (siehe Abschnitt 3.4 Vergleich von COPI- mit COPII- und Clathrin-umhüllten Vesikeln): kleine GTPasen mit beteiligten Nukleotid-Austausch (GEFs) und -Hydrolyse-katalysierenden (GAPs) Proteinen, einen Adaptor- und einen Hüll-Komplex. Die GTPasen besitzen eine N-terminale Domäne, die sicherstellt, daß die GTP beladene Form Membran verankert ist, während die GDP-Form cytosolisch lokalisiert ist. COPII-Vesikel verwenden die kleine GTPase Sar1 (Nakano und Muramatsu 1989), die nach GDP-GTP Austausch durch das Transmembranprotein Sec12 (GEF) mittels einer amphipathischen N-terminalen Helix in der Membran verankert wird. Dadurch wird sequentiell erst der heterodimere Sec23/Sec24 Adaptor-Komplex und dann der heterotetramere Sec13/Sec31 Hüllkomplex rekrutiert (Matsuoka et al. 1998). Als Sar1-GAP fungiert Sec23, wobei diese Aktivität durch den Sec13/31-Komplex noch verstärkt wird (Antonny et al. 2001). Die GTP-Hydrolyse bewirkt die Dissoziation der Proteinhülle von dem Vesikel.

Die bisher charakterisierten ER Export Signale enthalten entweder cytosolisch exponierte di-acidische (DxE), di-hydrophobe oder di-aromatische Motive (Barlowe 2003), die über Sec24 gebunden werden, allerdings an verschiedenen Bindestellen innerhalb des Proteins (Miller et al. 2003; Mossessova et al. 2003). Es ist sinnvoll, zwischen löslicher Fracht bzw. GPI-verankerter Fracht und transmembraner Fracht zu unterscheiden: Transmembrane Fracht weist cytosolisch exponierte Domänen auf, die über Rezeptoren wie Sec24 direkt gebunden werden können, für lösliche/GPI-verankerte Fracht ist dies *per se* nicht der Fall. Hier sind zwei Modelle denkbar: Das *bulk-flow*- und das Rezeptor-vermittelte Modell. Das *bulk-flow*-Modell postuliert, daß für einen effizienten ER-Golgi-Transport von löslicher Fracht keine weiteren spezifischen Signale notwendig sind. Proteine, die eine permanente Lokalisierung

entlang des ER-Golgi-Wegs haben, müssen bestimmte Rückhalte-Signale aufweisen (Wieland et al. 1987; Karrenbauer et al. 1990). Für diese Rückführung sind dann COPI-Vesikel verantwortlich (siehe folgender Abschnitt). Dies wurde nicht nur durch Bestimmung der Sekretionsrate von glykosylierten Acyltripeptiden gezeigt (Wieland et al. 1987), sondern auch durch die Analyse von Amylase und Chymotrypsinogen durch quantitative Elektronenmikroskopie (Martinez-Menarguez et al. 1999). Das Rezeptor-vermittelte Modell hingegen postuliert transmembrane Rezeptoren für die lösliche Fracht. Hier könnte eine Interaktion mit den COPII-Proteinen durch cytosolische Domänen dieser Rezeptoren erfolgen. Durch Deletion des Hefe-Membranproteins Erv29 konnte eine reduzierte Aufnahme des löslichen Pheromons α -Faktor in COPII-Vesikel gezeigt werden (Malkus et al. 2002), jedoch steht der Beweis einer direkten Interaktion von Rezeptor und löslicher Fracht noch aus.

Der weitere Transport zum Golgi-Apparat involviert das ERGIC (ER-Golgi *intermediate compartment*), ein Kompartiment, das durch die Gegenwart des Lectins ERGIC-53 definiert ist (Hauri et al. 2000). Gegenwärtig ist nicht klar, ob das ERGIC *de novo* durch homotypische Fusion von COPII-Vesikeln gebildet wird oder ob es sich um ein bereits bestehendes Kompartiment handelt, das COPII-Vesikel durch heterotypische Fusion aufnimmt (Bannykh und Balch 1998). Das ERGIC kann sowohl mit COPII- als auch COPI-Komponenten markiert werden, daher stellt es vermutlich eine Schnittstelle zwischen beiden Transportwegen dar (Scales et al. 1997). Zwischen dem ER und Golgi Apparat zyklisierende Membranproteine werden in COPI-positiven Strukturen des ERGIC konzentriert, während sekretorische Proteinfracht hauptsächlich in dessen COPI-negativen Strukturen gefunden wird. Daher wird angenommen, daß das ERGIC eine erste Instanz zur Trennung von anterograder und retrograder Fracht darstellt (Martinez-Menarguez et al. 1999). Unterstützt wird diese Hypothese durch *in vivo*-Studien, in denen ein dissoziativer Prozess zwischen dem ER-ERGIC zyklisierenden ERGIC-53 und anterograder Fracht beobachtet wurde (Ben-Tekaya et al. 2005). Der anterograde Transport vom ERGIC zum *cis*-Golgi Apparat erfolgt COPI-unabhängig, da vom ERGIC ausgehende mit anterograder Fracht markierte Strukturen COPI-negativ (Martinez-Menarguez et al. 1999) und viel größer als der erwartete Durchmesser von COPI-Vesikeln sind (Presley et al. 1997; Scales et al. 1997).

2.3 Der Intra-Golgi-Transport und das Protein Rückführungssystem: COPI-Vesikel

Für die weiteren Transport-Schritte, also den Intra-Golgi-Transport und den Golgi-ER-Rücktransport, sind COPI-Vesikel verantwortlich (Malhotra et al. 1989) (siehe **Abbildung 1**). Der Golgi-Apparat ist in vier bis sechs Cisternen mit unterscheidbaren Protein- und

Lipidzusammensetzungen unterteilt und weist eine funktionelle Orientierung ausgehend von der *cis*-Seite inklusive dem *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN) (Rambourg und Clermont 1990) über mediale Cisternen bis zur *trans*-Seite mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) auf (Griffiths und Simons 1986). Entsprechend der Destillations-Hypothese (Dunphy et al. 1981; Rothman 1981) erreichen sekretorische Proteine die *cis*-Seite und werden durch koordinierte Abschnürung und Fusion mittels COPI-Vesikeln (Rothman 1994; Rothman und Wieland 1996) intercisternal transportiert (Rothman et al. 1984a; Rothman et al. 1984b). Demnach existiert auf jeder Ebene, also jeder Golgi-Cisterne, ein Präferenzmechanismus, der zwischen anterograd (Richtung Plasmamembran) und retrograd gerichteter Fracht (Richtung ER) unterscheidet. Der selektive Golgi Export erfolgt dann im TGN. Somit kommt dem Golgi-Apparat nicht nur eine Transport-, sondern auch eine Selektionsfunktion zu.

COPI-Vesikel enthalten die kleine GTPase Arf1 (Kahn und Gilman 1984), die in der GDP-gebundenen Form an die cytoplasmatische Domäne von p23, einem Mitglied der p24 Proteinfamilie, gebunden werden kann (Stamnes et al. 1995; Sohn et al. 1996; Gommel et al. 2001) (siehe **Abbildung 2 #1**). Nach GEF-vermitteltem GDP-GTP-Austausch dissoziiert Arf1·GTP von p23 und wird mittels eines N-terminalem Myristoyl-Ankers und einer amphipatischen Helix an die Membran gebunden (Serafini et al. 1991a; Franco et al. 1996) (siehe **Abbildung 2 #2**). In Säugern wurden sechs verschiedene p24 Familienmitglieder beschrieben (Emery et al. 2000). Alle weisen den gleichen Aufbau auf: Es handelt sich um Typ I-Transmembranproteine, die ein C-terminales dibasisches und Diphenylalanin-Motiv und eine große luminale Domäne aufweisen. Typisch für p23, p24, p25 und p27 ist die Ausbildung von Heterooligomeren (Dominguez et al. 1998; Fullekrug et al. 1999; Gommel et al. 1999; Marzioch et al. 1999; Jenne et al. 2002). Als GEFs fungiert eine Proteinfamilie, die durch das Vorhandensein der katalytischen Sec7-Domäne charakterisiert ist (Chardin et al. 1996). Die Membran-gebundene Form von Arf1·GTP ist in der Lage, einen löslichen heptameren Komplex, Coatomer, zu rekrutieren (Palmer et al. 1993) (siehe **Abbildung 2 #3**). Coatomer besteht aus den Untereinheiten α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - und ζ -COP, die aber im Gegensatz zu den Sec23/24 und den Sec13/31-Komplexen cytosolisch assoziiert sind und *en bloc* an die Membran binden (Hara-Kuge et al. 1994). Die Interaktion von Coatomer mit Arf1 wird mindestens durch die β - und γ -COP-Untereinheit vermittelt (Zhao et al. 1997; Zhao et al. 1999), während eine Bindung von p24 Proteinen über γ -COP erfolgt (Harter et al. 1996). Erst durch die Interaktion von Coatomer mit Oligomeren der p24 Proteinfamilie wird dessen Konformationsänderung bewirkt, die dann vermutlich die treibende Kraft der

Membranausstülpung ist und in der Ausbildung eines COPI-Vesikels resultiert (Reinhard et al. 1999) (siehe **Abbildung 2 #4**). Die Konformationsänderung und Bindung von Coatomer an p24 Proteine ist von deren multimerem Zustand abhängig, ein Monomer kann beide Effekte nur sehr ineffizient hervorrufen (Reinhard et al. 1999). Möglicherweise wird die Multimerisierung der p24 Proteine durch wiederholte GTPase-Zyklen von Arf1 reguliert.

Die Arf1-GTP-Hydrolyse durch ArfGAPs, die durch das Vorhandensein der katalytischen GAP-Domäne definiert sind, bewirkt die Dissoziation der Proteinhülle (Cukierman et al. 1995; Reinhard et al. 2003). Dabei bewirkt Coatomer eine Steigerung der GAP-Aktivität (Goldberg 1999; Szafer et al. 2001) (siehe **Abbildung 2 #5**). Das dargestellte Modell involviert zwei unterschiedliche ArfGAP-Aktivitäten: Zum einen wird eine Beteiligung an der Multimerisierung der p24 Proteine und der Frachtaufnahme, zum anderen an der Dissoziation der Proteinhülle angenommen.

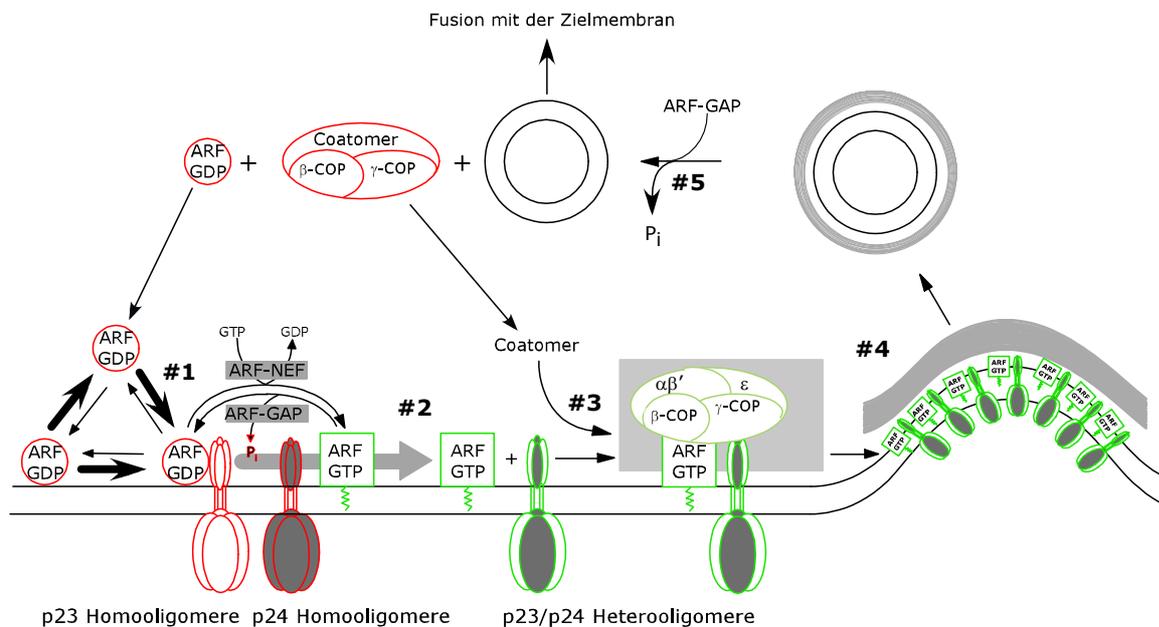


Abbildung 2: Mechanismus der COPI-Vesikel Biogenese. Erläuterungen siehe im obenstehenden Text. Zur Verdeutlichung sind nur die β - und γ -COP-Untereinheiten von Coatomer gezeigt. Die konformative Änderung von Coatomer ist durch grüne und rote Farbe markiert. Modifiziert nach: (Nickel et al. 2002)

Bislang sind vier COPI-Bindemotive bekannt: ein C-terminales KKxx-Motiv (Nilsson et al. 1989) und ein sogenanntes δ L-Motiv Wxx[WYF] (Cosson et al. 1998) für Typ I-Membranproteine, ein N-terminales xxRR-Motiv für Typ II-Membranproteine (Schutze et al. 1994) und ein RxR-Motiv für Typ III-Membranproteine (Zerangue et al. 1999). Anders als im COPII System ist die Motivbindestelle innerhalb von Coatomer nicht eindeutig bestimmt: es gibt Hinweise auf γ -COP (Harter und Wieland 1998; Wu et al. 2000) und auf α - und β' -COP

(Letourneur et al. 1994; Schroder-Kohne et al. 1998; Eugster et al. 2004) als KKxx-Binder. Die Bindung des δ L-Motivs erfolgt über δ -COP (Cosson et al. 1998).

Für luminale, ER-residente Proteine existiert ein COPI-abhängiges Rückführungssystem (*retrieval System*): Vermittelt durch eine C-terminale KDEL-Sequenz (Munro und Pelham 1987; Pelham 1988) erfolgt die Bindung an den transmembranen KDEL Rezeptor (KDELr) (Hardwick et al. 1990; Lewis und Pelham 1990). Der KDELr kann wiederum über ein C-terminales KKxx-Motiv von Coatomer gebunden werden. Der retrograde, COPI-vermittelte Golgi/ER-Transport erfolgt in Säugern vermutlich unter Beteiligung des Actin-Cytoskeletts (Godi et al. 1998; Fucini et al. 2000), während an dem anterograden, COPII-vermittelten ER/Golgi-Transport Mikrotubuli beteiligt sind (Scales et al. 1997).

2.4 Transport vom Golgi zu den finalen Zielorten: Sekretorische Granulen und Clathrin-Vesikel

Vergleichbar mit dem ER Export oder der Rezeptor-vermittelten Endocytose involviert der Golgi Export im TGN eine Sortierung von Fracht, entweder aus dem sekretorischen Weg oder von endocytotischen Transportwegen kommend, in unterschiedliche weitere Richtungen (Gu et al. 2001) (siehe **Abbildung 1**): Lysosomale Hydrolasen, die durch die Anheftung von Mannose-6-phosphat-Gruppen modifiziert werden, binden an Mannose-6-phosphat Rezeptoren und werden zu Endosomen und dann Lysosomen transportiert (Fischer et al. 1980). Monoubiquitinierte Proteine werden ebenfalls in den endocytotischen Transportweg gebracht und gelangen über interne Vesikel der späten Endosomen, auch MVEs (*multivesicular endosomes*) genannt, zu den Lysosomen. Fehlgefaltete oder überschüssige Proteine wandern ebenfalls zu Lysosomen und werden dort abgebaut. Proteine der Plasmamembran oder sezernierte Proteine werden zur Plasmamembran transportiert und exocytiert. Auch die Polarität von epithelialen Zellen, die distinkte apikale und basolaterale Zelloberflächen haben, wird durch TGN Sortierung erreicht. Damit die verschiedenen TGN Proteine korrekt sortiert werden, müssen Vesikel-Hüllproteine die unterschiedlichen Sortierungssignale in der cytoplasmatischen Domäne von Frachtproteinen erkennen und in die korrespondierenden Transport-Vesikel verpacken.

2.4.1 Sekretorische Granulen

Neben dem beschriebenen konstitutiven sekretorischen Weg, an dem ausschließlich Clathrin-umhüllte Vesikel (CCVs) beteiligt sind, zeigen endokrine und neuroendokrine Zellen zusätzlich einen regulierten sekretorischen Weg, in dem Prohormone in sekretorische Granulen verpackt werden, zur Plasmamembran wandern und dort auf einen (externen)

Stimulus hin ihren Inhalt extrazellulär freisetzen (Tooze et al. 2001). Der initiale Schritt der Verpackung von solchen regulierten sekretorischen Proteinen in unreife sekretorische Granulen scheint die Aggregation von deren Proformen zu sein. Bislang wurde keine Beteiligung von Hüllproteinen bei diesem Schritt gezeigt, jedoch sind an der Entfernung von konstitutiven sekretorischen Proteinen aus den unreifen sekretorischen Granulen Clathrin-Vesikel (siehe nächster Abschnitt) beteiligt. Nach homotypischer Fusion der unreifen sekretorischen Granulen und der Prozessierung der Proformen durch Prohormon Konvertasen bilden sich dann reife sekretorische Granulen.

2.4.2 Clathrin-umhüllte Vesikel

Die weiteren Schritte des konstitutiven sekretorischen Weges werden durch Clathrin-umhüllte Vesikel (CCVs) vermittelt. Clathrin wurde erstmalig 1975 beschrieben (Pearse 1975) und weist eine ungewöhnliche molekulare Organisation auf, die Triskelion genannt wird (Kirchhausen 2000): Ausgehend von einem zentralen Punkt zeigen drei schwere Ketten nach außen, an jede schwere Kette ist wiederum eine leichte Kette assoziiert. Dieser Komplex entspricht dem Hüllprotein-Komplex. Durch antiparallele Assoziation der Triskelion-Beine kann ein Clathrin-Netzwerk geschaffen werden, das die zur Vesikel-Abschnürung erforderliche Membran-Kurvatur bewirkt. Weiterhin sind eine Vielzahl von sogenannten Clathrin Adaptorproteinen an der CCV Biogenese beteiligt (Owen et al. 2004). Der Term Clathrin Adaptor beschreibt alle Proteine, die in der Lage sind, das Clathrin-Netzwerk an Proteine oder Lipidkomponenten der darunter liegenden Membranen zu verknüpfen.

Die Clathrin Adaptorproteine können unterteilt werden in solche, die transmembrane Proteinfracht entweder durch cytosolische Domänen in Form von kanonischen Peptidsequenzen oder Monoubiquitinierung erkennen (z.B. AP (*adaptor proteins*) Komplexe, GGAs (*Golgi-associated, γ -ear containing, Arf1-binding*) oder β -Arrestine) oder in Lipid-Binder (AP180/CALM, Amphiphysine und Epsine). Bislang sind vier AP Komplexe in höheren Eukaryonten beschrieben worden (AP1-4), tetramere Heterooligomere bestehend aus zwei großen (β_{1-4} - und entweder γ -, α -, δ -, oder ϵ -Adaptin), einer mittleren (μ_{1-4} -Adaptin) und einer kleinen (σ_{1-4} -Adaptin) Untereinheit (Robinson und Pearse 1986; Ahle et al. 1988; Dell'Angelica et al. 1997; Dell'Angelica et al. 1999). Alle AP Komplexe erkennen Tyrosin-basierte Ypp ϕ -Motive (Collawn et al. 1990) mittels der μ -Adaptine (Ohno et al. 1995), und einige erkennen saure Dileucin-Motive [DE]xxxL[IL] durch β -Adaptine (Rapoport et al. 1998). Die Clathrin Adaptorproteine determinieren den weiteren Transportweg: AP1 und AP4 sind an dem anterograden TGN/Plasmamembran bzw. TGN/Endosomen-Transport beteiligt,

AP2 und die Epsine an dem retrograden Plasmamembran/frühes Endosom Transport. Die großen Untereinheiten aller AP Komplexe sowie die GGAs weisen sogenannte *appendage*-Domänen auf (siehe Abschnitt 3.1 Coatomer-Biogenese und -Architektur: Spezifität der Frachtaufnahme?), die wiederum in der Lage sind, sogenannte akzessorische Proteine zu binden. Interessanterweise fallen unter die Klasse der akzessorischen Proteine einige Clathrin Adaptorproteine wie die Amphiphysine, AP180/CALM und Epsine (Praefcke et al. 2004).

An der Rekrutierung der folgenden Clathrin Adaptoren ist ebenfalls eine kleine GTPase beteiligt: Arf1 bei AP1 (Stamnes und Rothman 1993; Traub et al. 1993), AP3 (Ooi et al. 1998), AP4 (Aguilar et al. 2001) und den GGAs (Dell'Angelica et al. 2000), während AP2 Arf6 involviert (Paleotti et al. 2005). Für die Ablösung der CCVs von der Plasmamembran ist eine weitere GTPase relevant: Dynamin (Wang et al. 1995). Dynamin bildet durch Selbstassemblierung reguläre Spiralen, die durch das Zusammenpressen der Membran am Vesikelhals die Clathrin-umhüllten Vesikel abschnüren könnten. Die Dissoziation der Proteinhülle scheint unabhängig von der Arf-GTP Hydrolysereaktion zu sein. Beschrieben ist die ATP-abhängige Beteiligung des Chaperons Hsp70, das über Auxilin oder Homologe mittels J-Domäne rekrutiert wird (Holstein et al. 1996). Ferner können die AP *appendage* Domänen Synaptojanin1 binden, eine Lipid Phosphatase (Jha et al. 2004). Durch diese Phosphatasereaktion wird die Bindung einiger Clathrin Adaptorkomplexe an die Membran gestört, was vermutlich zur Dissoziation der Komplexe führt.

3. Komponenten von COPI-Vesikeln und Vergleich mit COPII- und Clathrin-Vesikeln

3.1 Coatomer-Biogenese und -Architektur: Spezifität der Frachtaufnahme?

Bezüglich Coatomer können vier verschiedene Betrachtungsebenen definiert werden:

- a) Die Untereinheiten an sich.
- b) Coatomer-Subkomplexe, die z.B. bei der Coatomer-Biogenese auftreten.
- c) Coatomer-Isotypen, definiert durch unterschiedliche γ_1/γ_2 - ζ_1/ζ_2 -COP Interaktionen.
- d) Möglicherweise unterschiedliche COPI-Vesikel-Populationen, definiert durch die ausschließliche oder präferentielle Verwendung der Coatomer-Isotypen.

a) Ursprünglich wurde der Begriff Coatomer 1991 geprägt, als Waters und Kollegen einen tetrameren Komplex, bestehend aus α -, β -, γ - und δ -COP identifizierten (Waters et al. 1991). Dieser Komplex zeigte nicht nur eine cytosolische Lokalisierung, sondern war auch

Bestandteil von nicht-Clathrin-umhüllten Transportvesikeln des Golgi-Apparats (Serafini et al. 1991b). Sukzessive wurden die weiteren Untereinheiten β' -COP (Stenbeck et al. 1993), ε -COP (Hara-Kuge et al. 1994; Duden et al. 1998) und ζ -COP (Kuge et al. 1993) des heterooligomeren Komplexes identifiziert. Als bislang letzte bekannte Untereinheiten wurden γ 2-COP und ζ 2-COP gefunden, während die ursprünglich identifizierten Untereinheiten als γ 1-COP und ζ 1-COP bezeichnet werden (Blagitko et al. 1999; Futatsumori et al. 2000) (siehe **Tabelle 1**). Wie auch die vorher genannten Untereinheiten liegen die γ 1- und γ 2-COP bzw. ζ 1- und ζ 2-COP Untereinheiten jeweils in nur einer Kopie im Coatomer-Komplex vor (Wegmann et al. 2004). Allein ζ 1-COP existiert *in vivo* auch als Monomer (Kuge et al. 1993; Lowe und Kreis 1995). γ 1-COP kann strukturell in zwei Domänen unterteilt werden, einer N-terminalen *trunk*-Domäne und einer C-terminalen *appendage*-Domäne. Die Kristallstruktur der γ 1-*appendage*-Domäne konnte gelöst werden (Hoffman et al. 2003; Watson et al. 2004) und weist Ähnlichkeiten zu den *appendage*-Domänen von β 2- und α -Adaptin auf. Die meisten *appendage*-Domänen weisen eine N-terminale β -*sandwich* und eine C-terminale Plattform Subdomäne auf. Beide Subdomänen definieren mindestens jeweils eine Proteinbindestelle. Die Plattform-Subdomäne von α -Adaptin bindet Dx[FW]-, FxDxF- und FxxFxxL-Motive und die β -*sandwich*-Subdomäne bindet WxxF-Motive (Praefcke et al. 2004). *Appendage*-Domänen können dadurch eine Vielzahl von akzessorischen Proteinen binden (siehe Clathrin-Vesikel), und auch für die γ 1-COP *appendage* Domäne konnte die Bindung von ArfGAP2 und ArfGAP3 an die Plattform-Domäne gezeigt werden (Watson et al. 2004).

Eine Übersicht über die Molekulargewichte und Hefeanaloga der einzelnen Untereinheiten ist in **Tabelle 1** dargestellt:

Tabelle 1: Übersicht der Coatomer-Untereinheiten. In *S. cerevisiae* ist jeweils nur eine Isoform von γ - und ζ -COP bekannt.

human	<i>S. cerevisiae</i>	MW [kDa]
α -COP	Ret1p	140
β -COP	Sec26p	107
β' -COP	Sec27p (Harter et al. 1993)	102
γ 1-COP	Sec21p (Hosobuchi et al. 1992)	97
γ 2-COP		97
δ -COP	Ret2p	57
ε -COP	Sec28p (Duden et al. 1998)	35
ζ 1-COP	Ret3p (Cosson et al. 1996)	20
ζ 2-COP		23,5

b) Durch Analyse der *in vitro* Dissoziation/Assemblierung von Coatomer, durch *yeast-two-hybrid* Studien und durch Ko-Immunpräzipitationen von *in vitro*-Translationsansätzen

konnten drei Coatomer-Subkomplexe und damit direkte Untereinheiten-Interaktionen identifiziert werden: $\alpha/\beta'/\varepsilon$ -COP, γ/ζ -COP und β/δ -COP (Lowe und Kreis 1995; Faulstich et al. 1996; Pavel et al. 1998). ε -COP scheint eine Rolle bei der Stabilisierung von α -COP unter nicht-physiologischen Temperaturen zu spielen (Guo et al. 1996; Duden et al. 1998), während δ -COP möglicherweise als Faltungshelfer bei der Coatomer-Biogenese wirkt (siehe **Abbildung 3**). Interessanterweise wurde bei einer Studie der *in vivo* Assemblierung von Coatomer ein sukzessiver Aufbau, ausgehend von den gleichen Subkomplexen, identifiziert (Lowe und Kreis 1996). Während die Bindung des $\alpha/\beta'/\varepsilon$ -COP Subkomplexes an Membranen nicht Nukleotid-, aber KKxx-abhängig ist (Lowe und Kreis 1995), wurde eine GTP- und Arf1-Abhängigkeit für den β/δ -COP Subkomplex beobachtet (Pavel et al. 1998).

Während bislang die Interaktion des γ/ζ - mit dem β/δ -Subkomplexes nicht gezeigt werden konnte, lieferten *yeast two-hybrid* Studien Hinweise darauf, wie sich der Gesamtkomplex aus den Subkomplexen aufbaut: Der γ/ζ -Teilkomplex kann den $\alpha/\beta'/\varepsilon$ -Komplex mittels zweier γ/β' - und γ/ε -Interaktionen binden. Der β/δ -Subkomplex assoziiert durch zwei β/α und β/β' -Wechselwirkungen (Eugster et al. 2000). Die Coatomer-Biogenese und -Architektur sind in **Abbildung 3** dargestellt:

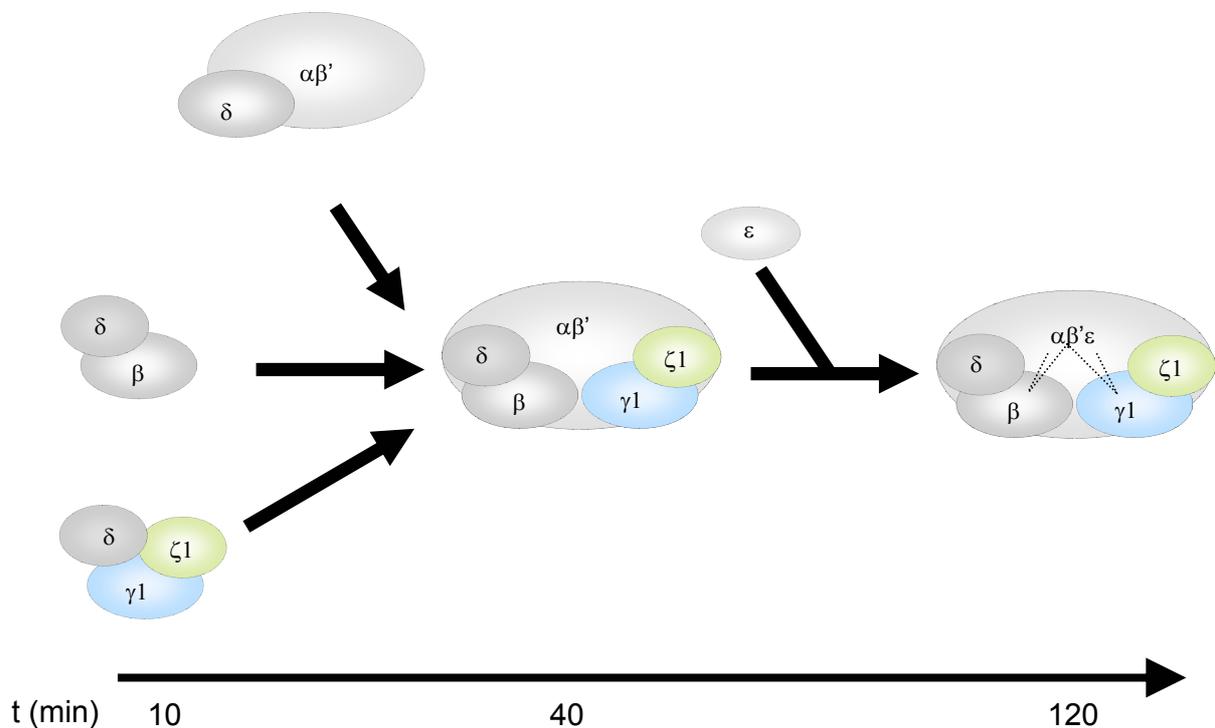


Abbildung 3: Coatomer-Biogenese und -Architektur. Gezeigt ist die schrittweise Assemblierung der α/β' -, β/δ - und γ/ζ -COP Subkomplexe zu Coatomer in Abhängigkeit der Zeit. δ -COP interagiert mit allen Subkomplexen bereits in einem frühen Stadium der Assemblierung. Dies könnte auf eine Rolle als Faltungshelfer bei der Coatomer-Biogenese hinweisen. Die Interaktionen der Subkomplexe sind durch gestrichelte Linien indiziert. Modifiziert nach: (Lowe und Kreis 1996)

c) Wenn COPI-Vesikel unterschiedliche Transportwege (anterograd vs. retrograd, intra-Golgi vs. Golgi/ER) gehen, so sollten sie sich auch in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. In Analogie zu den unterschiedlichen Adaptor-Komplexen des Clathrin-Systems könnte es verschiedene Coatomer-Komplexe geben (siehe auch folgender Abschnitt).

Hinweise auf das Vorhandensein distinkter Coatomer-Populationen ergaben sich durch die substöchiometrische Präsenz von β -COP und die Abwesenheit von γ - und δ -COP von an Endosomen-rekrutiertem Coatomer im Vergleich zu ER/Golgi-rekrutiertem Coatomer (Whitney et al. 1995; Aniento et al. 1996). Da die Analyse auf immunologischer Unterscheidung beruhte, kann dies allerdings auch durch posttranslationale Modifikationen erklärt werden. So konnte gezeigt werden, daß β -COP durch Serin-Phosphorylierung in vier bis fünf und δ -COP in drei Spezies unterteilt werden kann (Sheff et al. 1996). Die Identifizierung von γ 2- und ζ 2-COP (Blagitko et al. 1999; Futatsumori et al. 2000; Hahn et al. 2000; Wegmann et al. 2004) bietet hier eine weitere Diversifikationsebene an. Obwohl durch *yeast two-hybrid* Studien sowohl für γ 1-COP als auch für γ 2-COP eine Interaktion jeweils mit ζ 1- und ζ 2-COP gezeigt wurde (Futatsumori et al. 2000; Takatsu et al. 2001), wurden von vier möglichen γ/ζ -Subkomplexen ausschließlich drei Coatomer-Isotypen nachgewiesen, ein γ 2 ζ 2-Coatomer konnte nicht identifiziert werden (Wegmann et al. 2004).

d) Hinweise auf die Präsenz von mindestens zwei COPI-Vesikelpopulationen wurden durch quantitative Elektronenmikroskopie erbracht: Eine anterograd gerichtete Fracht (Proinsulin) ko-lokalisierte nicht signifikant mit dem KDELr als Hauptkomponente des *retrieval*-Systems, wobei mit beiden Markerproteinen eine Ko-Lokalisierung mit COPI-Komponenten gezeigt wurde (Orci et al. 1997). Später wurde die Präsenz zweier COPI-Vesikelpopulationen durch das Golgi-residente v-SNARE Gos28 erhärtet: Gos28 ko-lokalisierte mit VSV G, einer anterograd gerichteter Fracht und nicht mit dem KDELr. Alle drei Proteine ko-lokaliserten mit Coatomer (Orci et al. 2000). Immunisolierungen von COPI-Vesikel auf Basis zweier verschiedener *tethering* Proteinkomplexe, dem Giantin/p115/GM130/GRASP65- und dem Golgin 84/CASP-Komplex korrelieren die exklusive Gegenwart von p24 Proteinen mit dem ersten und die exklusive Gegenwart von Mannosidase I/II mit dem zweiten Komplex. Der KDELr konnte hingegen in beiden Populationen nachgewiesen werden (Malsam et al. 2005). Zusammenfassend legt dies das Vorhandensein von mindestens drei distinkten COPI-Vesikelpopulationen nahe.

3.2 SNAREs und *tethering* Proteine: Spezifität der Frachtübergabe und Fusion mit der Zielmembran

Während die Hüllprotein-Komplexe vermutlich die Determinanten der spezifischen Frachtaufnahme an der Donormembran darstellen, sind für die spezifische Anheftung von Vesikeln an die Akzeptormembran und die folgende Membranfusion einhergehend mit der Frachtübergabe zwei weitere Proteinklassen beteiligt: *tethering* Proteine und SNAREs (*soluble NSF attachment protein receptors*). Während *tethering* Proteine die Anheftung der Transportvesikel an die Zielmembran initiieren, wird die weitere Spezifität der Anheftung sowie die Membranfusion selbst durch spezifische Paarung von SNARE-Proteinen sichergestellt.

Tethering Proteine werden in zwei Proteinklassen unterteilt: In elongierte *coiled-coil* Proteine (Barr und Short 2003; Short und Barr 2003) und in große Multiprotein-Komplexe (Whyte und Munro 2002). Während erstere ausschließlich in der Golgi- und der Endosomen-Fusion relevant sind, sind die Multiprotein-Komplexe zusätzlich in weitere Transportschritte wie der Exocytose involviert. Zu den elongierten *coiled-coil* Proteinen gehören die Golgi-lokalisierten Golgine wie GM130, Giantin, p115, Golgin 84 und CASP. Giantin und Golgin 84 werden als Transmembranproteine in COPI-Vesikel aufgenommen und vermitteln mittels p115, GM130 und dem peripheren Membranprotein GRASP65 (bei Giantin) bzw. dem Transmembranprotein CASP (bei Golgin 84) die Anheftung der Vesikel an die Golgi-Membran.

Die Spezifität und eigentliche Fusion der Vesikel- mit der Zielmembran wird durch komplementäre SNARE-Paarungen sichergestellt (McNew et al. 2000). SNARE-Proteine weisen das SNARE-Motiv (Sollner et al. 1993b; Weber et al. 1998), das zu einem tetrahelikalen Bündel assemblieren kann. Hier wird eine Helix durch die v-SNAREs und drei Helices durch die t-SNAREs bereitgestellt (Parlati et al. 2000). Während die v-SNAREs in Vesikel aufgenommen werden, sind die t-SNAREs ausschließlich in der Zielmembran lokalisiert. Die Membranfusion erfolgt, wenn die SNARE-Paarung *in trans* erfolgt, also zwischen v-SNARE des Vesikels und t-SNARE der Zielmembran. SNAREs stellen die minimale Fusionsmaschinerie dar (Weber et al. 1998). Nach der Fusion wird das SNARE-Paar zu einem inerten *cis*-Komplex, der ATP-abhängig durch NSF, einer AAA ATPase und SNAP, dem Ko-Chaperon, dissoziiert werden muss, um für weitere Fusionszyklen zur Verfügung zu stehen (Sollner et al. 1993a).

Damit unterschiedliche Frachtmoleküle nicht nur spezifisch aufgenommen, sondern auch spezifisch übergeben werden können, ist eine doppelte selektive Aufnahme der SNAREs und

tethering Proteine in die Vesikel erforderlich: Einmal müssen für die heterotypische Fusion der Vesikel v-SNAREs von t-SNAREs (Antonny 2004) bzw. Vesikel-Golginen von Golgi-Golginen getrennt werden, zum anderen muss die Vesikel-Fracht mit den SNAREs/*tethering* Proteinen korreliert sein. Für diese Funktion sind die Vesikel-Hüllproteine prädisponiert.

3.3 ArfGAPs: Beteiligung bei der Frachtaufnahme

Durch Analyse der Frachtaufnahme in COPI-Vesikel unter GTP- und GTP γ S- (einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analog) Bedingungen konnte gezeigt werden, daß sowohl anterograd als auch retrograd gerichtete, transmembrane Fracht die Arf1-abhängige GTP Hydrolyse zur Aufnahme benötigt (Nickel et al. 1998; Malsam et al. 1999; Pepperkok et al. 2000). Dieser Befund konnte für Golgi-residente Enzyme wie Mannosidase II (ManII), Galactosyl-Transferase (GalT) und N-Acetylglucosaminyltransferase I (NAGT) bestätigt werden, allerdings nicht für den anterograd gerichteten polymorphen Immunglobulin Rezeptor (pIgR) (Lanoix et al. 1999; Lanoix et al. 2001). Die GTP Hydrolyse-Abhängigkeit ist Arf1-abhängig und legt daher eine Rolle von ArfGAPs bei der Frachtaufnahme nahe (Malsam et al. 1999).

Übereinstimmend damit führte eine Interaktion von KDEL-Proteinen mit dem KDELr zu einer erhöhten Rekrutierung von ArfGAP1 an die cytoplasmatische Domäne des KDELr. Dies bewirkte eine vermehrte Aufnahme des KDELr in COPI-Vesikel (Aoe et al. 1998; Aoe et al. 1999; Yang et al. 2002). Weiter konnte am Beispiel der v-SNAREs Bet1p und Sec22p anhand Glo3p, einem von vier in der Hefe bekannten GAPs, eine ArfGAP-vermittelte konformationelle Änderung von Bet1p und Sec22p gezeigt werden (Rein et al. 2002). Erst diese Änderung erlaubte die nachfolgende Bindung von N Δ 17-Arf1 und Coatomer. Auch für p24 Familienmitglieder wurde eine direkte Interaktion mit ArfGAP1 gezeigt. Durch lösliches Peptid, das dem C-terminalen Teil von p24 entsprach, konnte sowohl die ArfGAP1-Aktivität als auch die Aufnahme von ManII und den p24 Proteinen in COPI Vesikel reduziert werden (Lanoix et al. 2001).

Demnach kann ein kinetisch kontrolliertes Fracht-Aufnahmemodell formuliert werden: In Abwesenheit von Golgi-residenten Proteinen wird Membran-gebundenes Arf1·GTP schnell durch ArfGAP in die lösliche Arf1·GDP-Form überführt und es kommt nicht zur Bildung eines COPI-Vesikels. Erst durch die Anwesenheit von cytoplasmatischen Peptidschwänzen der Golgi-residenten Proteine wird ArfGAP inhibiert und Coatomer kann an Arf1 und z.B. p23 binden (Lanoix et al. 2001). Dieses Prinzip koppelt die Bildung der COPI-Vesikel kinetisch an die Aufnahme von transmembraner Fracht (Goldberg 2000). Durch die Verwendung von GTP γ S ließe sich diese Kopplung aufheben.

Allerdings ist die Rolle von ArfGAP1 bei der COPI-Vesikelbiogenese umstritten. Während eine Vielzahl von Befunden zur GAP-Aktivität eine der COPI-Vesikelbildung antagonisierende Wirkung nahelegen (Bigay et al. 2003; Reinhard et al. 2003), konnten sowohl ArfGAP1 sowie Glo3p als notwendige und stöchiometrische Komponente der COPI-Vesikelhülle identifiziert werden (Yang et al. 2002; Lewis et al. 2004; Lee et al. 2005b). Einen Erklärungsansatz für diesen Widerspruch bietet die Fähigkeit mancher Proteine, Membran-Kurvatur zu erkennen. In Amphiphysin konnte als Determinante dafür die sogenannte BAR-Domäne gefunden werden (Peter et al. 2004). Auch bei ArfGAP1 und Gcs1p, dem Hefe-Homolog, konnte eine solche Membran-Sensitivität beobachtet werden. Eine erhöhte Membrankrümmung bewirkte eine Steigerung der ArfGAP1-abhängigen Arf1-GTP-Hydrolyse um zwei Größenordnungen (Bigay et al. 2003; Bigay et al. 2005). Dies legt neben der Fracht-abhängigen eine räumliche GAP-Modulation nahe. So wäre die GAP-Aktivität an einer planaren Membran, entsprechend der Situation bei der Ausbildung eines COPI-Vesikels bei der Frachtaufnahme, am geringsten, während sie an einem COPI-Vesikel mit hoher Membrankrümmung maximal ist und zur Coatomer-Dissoziation führt. Diese räumliche GAP-Modulation könnte die beiden in **Abbildung 2** dargestellten ArfGAP-Aktivitäten begründen: Eine basale ArfGAP-Aktivität ist an der Multimerisierung der p24 Proteine und der Frachtaufnahme beteiligt und eine maximale ArfGAP-Aktivität an der GTP-Hydrolyse-abhängigen Dissoziation der Proteinhülle.

3.4 Vergleich von COPI- mit COPII- und Clathrin-umhüllten Vesikeln

In **Tabelle 2** ist ein Vergleich der drei Hauptklassen von Protein-umhüllten Vesikeln dargestellt (Boehm und Bonifacino 2001; Lee et al. 2004; McMahon und Mills 2004):

Tabelle 2: Vergleich von COPI- mit COPII- und Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs). Erläuterungen siehe untenstehender Text. Bisher nicht zitierte Literatur ist angegeben. GEF = Guanosinnukleotid-Austauschfaktor, GAP = GTP-Hydrolyse aktivierendes Protein.

System/ Komponente	COPI	COPII	Clathrin/CCV
GTPase	Arf1	Sar1	Arf1 (AP1/3/4, GGA1-3) Arf6 (AP2)
GEF	Gbf1 (Niu et al. 2005), Sec7-Domäne enthaltende Proteine	Sec12	Sec7-Domäne enthaltende Proteine
GAP	ArfGAP1, ArfGAP2 und ArfGAP3 (siehe diese Arbeit)	Sec23	ArfGAPs
GAP aktivierende Komponente	Coatomer	Sec13/Sec31	
Hüllprotein-Komplex	$\alpha/\beta^{\prime}/\epsilon$ -COPI- Subkomplex als Clathrin- Analog (Eugster et al. 2000)	Sec13/Sec31	Clathrin
Adaptor-Komplex	$\beta/\gamma/\delta/\zeta$ -COPI- Subkomplex als AP- Analog (Schledzewski et al. 1999)	Sec23/Sec24	AP1-4, β -Arrestine, GGAs
unterschiedliche Hüllproteine	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (siehe diese Arbeit)	Sec24 und Orthologe (Hefe: Sfb2, Sfb3/Lst1, human: hSec24A-D) (Pagano et al. 1999; Peng et al. 2000)	β_{1-4}/μ_{1-4} -Adaptine
Krümmungs-Sensitivität	Arf1·GTP/ArfGAP (Bigay et al. 2003)	Sar1·GTP/Sec23/ Sec24 (Lee et al. 2005a)	Amphiphysin (AP2) (Peter et al. 2004)
Sequenz/Struktur- Homologe	β -COP als β -Adaptin Homolog (Serafini et al. 1991b) δ/ζ -COP zeigen μ/σ -Adaptin Homologie (Cosson et al. 1996) γ/β -COP als α/β -Adaptin Homologe (Eugster et al. 2000; Hoffman et al. 2003; Watson et al. 2004)		

Die Rolle dieser Komponenten bei der Vesikelbildung:

GTPasen

Die GTPasen müssen in der GTP-beladenen Form Membran-assoziiert sein. Nur in der GTP-Form wird eine N-terminale amphipatische Helix (Arf1, Sar1) bzw. zusätzlich ein Myristoyl-Rest (Arf1) exponiert, wodurch eine fehlerbehafteten Aktivierung im Cytosol vermieden wird.

GEFs

Damit die GEF-Reaktion in Membran-Nähe stattfindet, ist der GEF entweder ein Membranprotein (Sec12) oder weist Lipid-bindende Domänen wie die PH-Domäne bei den kleinen Arf-GEFs auf.

GAPs

Die sukzessive Assemblierung der vollständigen Proteinhülle führt zu einer Steigerung der GAP-Aktivität. Die Proteinhülle ist somit zur vollständigen GAP-Aktivität notwendig, damit nicht Hüllprotein-freie GTP-Hydrolyse erfolgt (COPI und COPII). Die Bindung der GAPs im COPI-System erfolgt vermutlich durch die *appendage*-Domänen der α/β -Adaptin-ähnlichen Proteine und wird in dieser Arbeit untersucht.

Adaptor-Komplex

Um eine Vielzahl von Frachtmolekülen (Lipide, Proteine) binden zu können, wird innerhalb einer Vesikelklasse Heterogenität durch die Variation der Adaptor-Komplexe erlangt. Während für COPI-Vesikel die Verwendung von γ 1-, γ 2-, ζ 1- und ζ 2-COP naheliegend ist (Wegmann et al. 2004) und in dieser Arbeit untersucht wird, wird im COPII-System vom differentiellen Einbau der Sec24-Orthologe Gebrauch gemacht (Pagano et al. 1999; Peng et al. 2000). Insbesondere für CCVs sind eine Vielzahl von Clathrin Adaptoren beschrieben und bereits diskutiert worden (Abschnitt 2.4.2 Clathrin-umhüllte Vesikel).

Hüllprotein-Komplex

Im Clathrin- und COPII-System wird die Hülle in zwei Schritten rekrutiert. In einem ersten Schritt wird der Adaptor-Komplex an die Membran gebunden, während eine Polymerisierung durch eine darauf folgende Rekrutierung des Hüllprotein-Komplexes bewirkt wird. Nur im COPI-System ist der Hüllprotein-Komplex stabil mit dem Adaptor-Komplex assoziiert und wird *en bloc* rekrutiert.

Krümmungs-Sensitivität

Bei allen drei beschriebenen Hüllprotein-Systemen entsteht ein sphärisches Vesikel mit konvexer Membranoberfläche aus einer Donormembran mit eher planarer Oberfläche. Um eine solche negative Membrankurvatur zu induzieren bzw. zu erkennen sind drei Mechanismen denkbar (Zimmerberg und McLaughlin 2004): Insertion von hydrophoben Gruppen eines Proteins in die Membran (ArfGAP1; Sar1), Polymerisierung von Hüllproteinen auf der Membran (Hüllprotein-Komplexe) oder elektrostatische Bindung von konkaven Proteinen mit BAR-Domänen ähnlicher Struktur (Amphiphysin). Die Identifizierung und Analyse der Kristallstruktur der BAR-Domäne von Amphiphysin, ein Clathrin Adaptorprotein des AP-2 Komplexes, zeigte eine Sichel-artige Struktur auf (Peter et al. 2004). Die

Strukturaufklärung des Sar1/Sec23/24 Komplexes legte hier eine ähnliche Funktion nahe (Bi et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, daß durch Insertion der amphipatischen Helix von Sar1 an Liposomen eine Deformierung induziert wurde, die der von Amphiphysin ähnlich ist. Diese neuartige Sar1-Aktivität ist bei der COPII-Biogenese notwendig (Lee et al. 2005a). Neben der Induktion von Membran-Kurvatur kommt der differentiellen Bindung von Proteinen an Membranen verschiedener Krümmung vermutlich auch eine räumlich modulatorische Rolle zu, wie dies bereits zuvor für ArfGAP1 diskutiert wurde (Abschnitt 3.3 ArfGAPs: Beteiligung bei der Frachtaufnahme).

4. Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Problemstellung lag in der funktionellen Charakterisierung von γ 1- und γ 2-COP im sekretorischen Weg. Während eine Hüllprotein-determinierte Heterogenität (COPII und Clathrin) und eine damit verbundene differentielle Lokalisierung von Vesikeln im Clathrin-System bekannt waren, wurde dies im COPI-System bislang nicht hinreichend untersucht. Ferner zeigte die Strukturaufklärung der *appendage*-Domäne von γ 1-COP eine signifikante Ähnlichkeit mit den *appendage*-Domänen der α/β -Adaptine (Clathrin-Vesikel). Im Gegensatz zum Clathrin-System, in dem eine Vielzahl von an die *appendage*-Domäne bindenden Proteinen beschrieben ist, waren im COPI-System nur ArfGAP2 und ArfGAP3 als entsprechende γ 1-COP-Bindeproteine bekannt. Daher war es naheliegend, entsprechende Analysen der γ 1- und γ 2- *appendage*-Domäne durchzuführen.

Bereits etablierte Zelllinien mit HA-markiertem γ 1- und γ 2-COP (Futatsumori et al. 2000) restringierten weitergehende zellbiologische und biochemische Versuche:

- a) Der Expressionsgrad der γ -COP Isoformen war nicht regulierbar, was zu einer ineffizienten Inkorporation der exogenen Proteine in endogenen Coatomeer führte.
- b) Beide Zelllinien zeigten eine heterogene Expression in der Immunfluoreszenz und verloren die Fähigkeit der Expression nach wenigen Passagen in Kultur vollständig. Damit waren sie für z.B. elektronenmikroskopische Analysen nicht geeignet.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Wege eingeschlagen:

- a) Die Herstellung von gegen Maus γ 1- und γ 2-COP gerichteten Antikörpern. Für biochemische und zellbiologische Ansätze war es wichtig, daß die Antikörper sowohl natives als auch *in situ*-fixiertes γ 1- und γ 2-COP differenzieren können. Die dazu eingesetzten Antigene in Form von C-terminalen γ -COP *appendage* Domänen sollten ferner *pull-down* Analysen ermöglichen.

b) Die Generierung von monoklonale Zelllinien, die unterschiedlich Epitop-markiertes $\gamma 1$ - bzw. $\gamma 2$ -COP regulierbar exprimieren. Um spätere *loss-of-function*-Studien mittels der RNAi-Technologie, einer Sequenz-spezifischen, auf mRNA-Abbau basierenden Methode, zu ermöglichen, wurden humane exogene Proteine in Verbindung mit einer Maus-Zelllinie verwendet. Bei vergleichbarer Aminosäuresequenz-Identität von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP zwischen Maus und Mensch (97% und 98%) zeigt sich auf DNA-Ebene eine geringere Sequenz-Identität (89% und 91%). Dadurch sollte die Resistenz der exogenen Proteine gegenüber gegen Maus-gerichtete RNAi-Ansätze sichergestellt werden. In einem analogen Ansatz konnte bereits gezeigt werden, daß eine Kombination der RNAi-Technologie mit einer gleichzeitigen Expression von RNAi-insensitiven Proteinen den Einbau in Proteinkomplexen wesentlich verbesserte (Forler et al. 2003). Ferner sollten die eingeführten N-terminalen Epitop-Markierungen (HA und Myc) in Verbindung mit HA- und Myc-spezifischen Antikörpern eine Alternative zu den C-terminalen *appendage*-Domänen spezifischen Antikörpern bereitstellen.

II. Ergebnisse

1. Gewinnung von Antikörpern gegen $\text{my}1$ - und $\text{my}2$ -COP

Es sollten gegen native Proteine gerichtete Antikörper gewonnen werden, die später hauptsächlich in der biochemischen Analyse von Coatomer bzw. COPI-Vesikeln (Immunpräzipitation) und zur Bestimmung der ultrastrukturellen Lokalisierung von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP (Elektronenmikroskopie) eingesetzt werden können. Zur Immunisierung wurden rekombinante GST-Fusionsproteine mit den C-terminalen *appendage*-Domänen von $\text{my}1$ - und $\text{my}2$ -COP aus folgenden Gründen verwendet:

- Die Löslichkeit vergleichbarer Konstrukte von bovinem $\gamma 1$ -COP wurde bereits gezeigt (Hoffman et al. 2003; Watson et al. 2004).
- Der GST-Anteil der Fusionsproteine soll die Immunogenität der hochkonservierten γ -COP Proteine erhöhen.
- Eine Differenzierung von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP soll durch den im Vergleich zur *trunk*-Domäne variablen *appendage*-Bereich erreicht werden.

In **Abbildung 4** ist der Verlauf der GST-Affinitätsaufreinigung beider Antigene dargestellt:

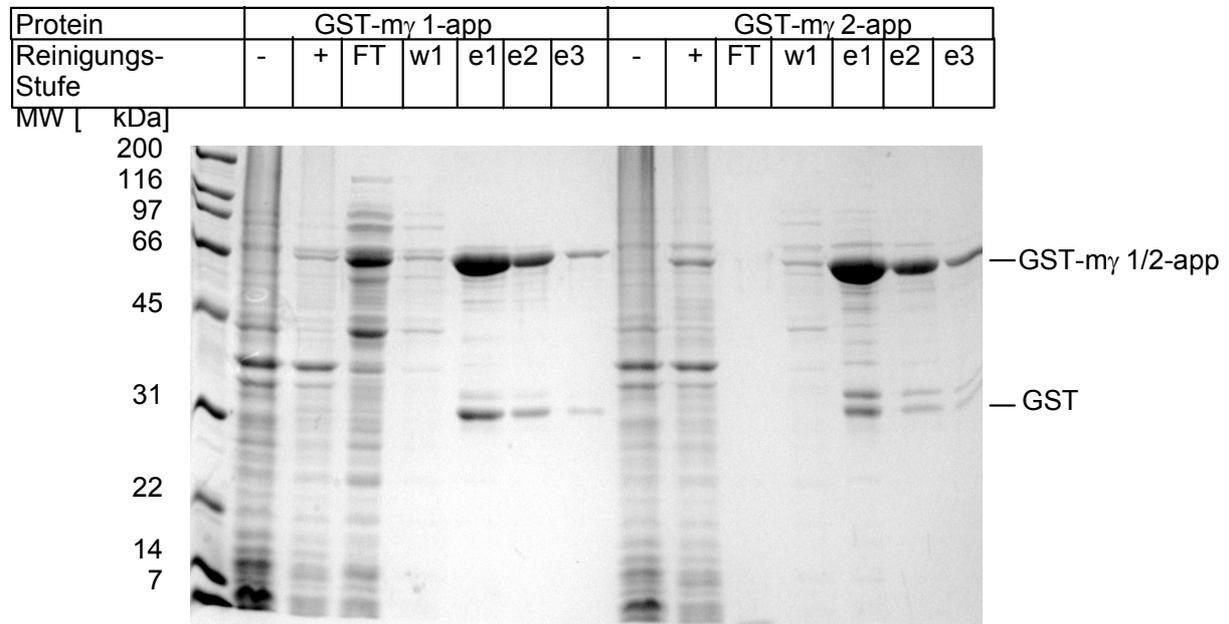
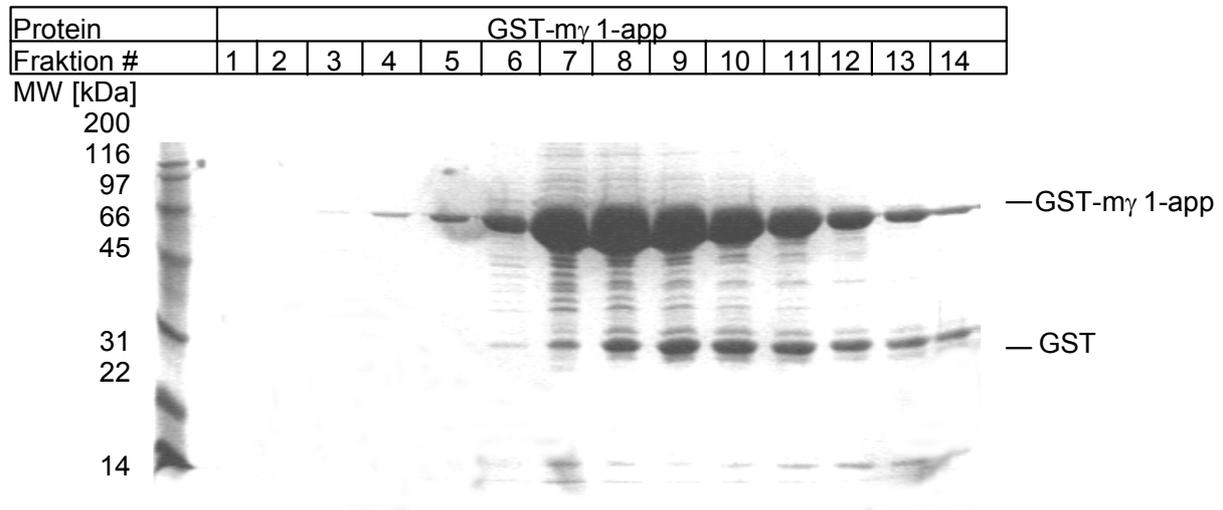


Abbildung 4: GST-Affinitätsaufreinigung der GST- $\text{my}1$ -app und GST- $\text{my}2$ -app Fusionsproteine. Gezeigt ist eine Coomassie-Färbung eines 12% PAA-Gels einer typischen Aufreinigung. Durch – und + wird die IPTG-Induktionskontrolle dargestellt, FT bezeichnet den nicht an die GSH-Sepharose gebundenen Anteil, w1 markiert den ersten Waschschrift und e1-3 bezeichnet die drei Glutathion-Eluate.

Der Protein-Hauptanteil der Glutathion-Eluate wurde bei ca. 65 kDa detektiert und entspricht damit den gewünschten GST- $\text{my}1$ - und $\text{my}2$ -app Fusionsproteinen (**Abbildung 4**). Neben

geringen Verunreinigungen wurde bei 31 kDa eine Proteinbande detektiert, die vermutlich nicht fusionierter GST entsprach, einer bei GST-Affinitätsaufreinigungen oft vorkommenden Kontamination. Zur weiteren Reinigung dieser wurde eine Gelfiltration durchgeführt:

A



B

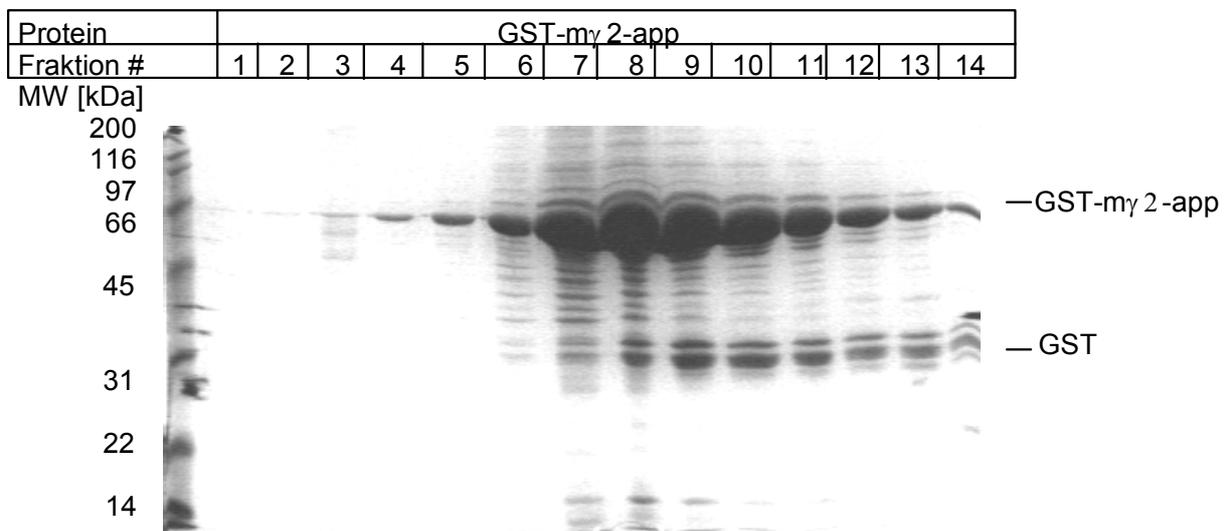


Abbildung 5: Gelfiltration der GST- $\mu\gamma$ 1-app (A) und GST- $\mu\gamma$ 2-app (B) Fusionsproteine. Gezeigt ist eine Coomassie-Färbung eines 12% PAA-Gels. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Bei beiden Aufreinigungen eluierten die vollständigen Fusionsproteine im Bereich der Fraktion #7/8, während der Hauptanteil der GST-Kontamination um Fraktion #10/11 eluierte (**Abbildung 5**). Insgesamt hat sich das Verhältnis des gewünschten Antigens zur GST-Kontamination deutlich erhöht. Die Fraktionen #7/8 (GST- $\mu\gamma$ 1-app) bzw. #8/9 (GST- $\mu\gamma$ 2-app) wurden zur Antikörper-Herstellung durch den Pineda Antikörper-Service, Berlin

herangezogen. Die Ausbeuten pro 6 l Kultur waren 10 mg von GST-my1-app und 5 mg von GST-my2-app.

Da nach dem 150. Tag keine Verbesserung des Antikörper-Titers beobachtet werden konnte, wurden die Tiere nach einem finalen Antigen-Boost ausgeblutet. Im weiteren werden die finalen Antiseren (165. Tag) hinsichtlich ihrer Eignung in verschiedenen Anwendungen getestet. Die Bezeichnungen der erhaltenen Antiseren sind in untenstehender **Tabelle 3** aufgeführt. Wurden vom 165. Tag abweichende Seren analysiert, so ist dies angegeben.

1.1 Eignung der Antikörper für die Western Blot-Analyse

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Antikörper das SDS-denaturierte Antigen im Vergleich zum etablierten γ 1R-Antikörper erkennen. Dazu wurden zwei Ansätze gewählt: Einmal sollte die Antigen-Erkennung im Kontext von cytosolischen Proteinen überprüft werden und einmal in Verbindung mit durch Immunpräzipitation aufgereinigtem Coatomer (CM1-IP). Dazu wurde TCA-präzipitiertes Cytosol durch 6% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Analog wurde mit Eluaten von CM1-IPs verfahren.

A

Behandlung	CM1-IP	TCA-Präzipitat						CM1-IP	TCA-Präzipitat					
Antikörper	γ 1R	r1.1		r1.2		r1.3		γ 1R	g1.1		g1.2		c1	
Tag		165.	1.	165.	1.	165.	1.		165.	1.	165.	1.	165.	1.



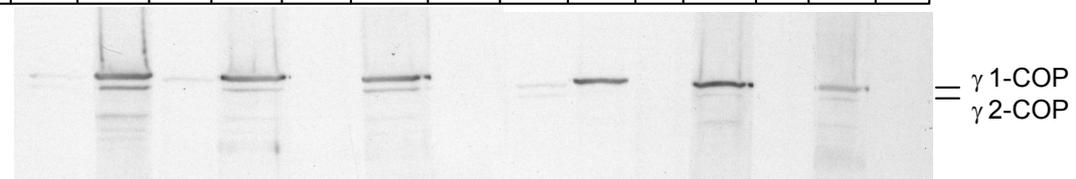
B

Behandlung	CM1-IP	TCA-Präzipitat						CM1-IP	TCA-Präzipitat					
Antikörper	γ 1R	r2.1		r2.2		r2.3		γ 1R	g2.1		g2.2		c2	
Tag		165.	1.	165.	1.	165.	1.		165.	1.	165.	1.	165.	1.



C

Behandlung	CM1-IP													
Antikörper	γ 1R	r1.1		r1.2		r1.3		γ 1R	g1.1		g1.2		c1	
Tag		165.	1.	165.	1.	165.	1.		165.	1.	165.	1.	165.	1.



D

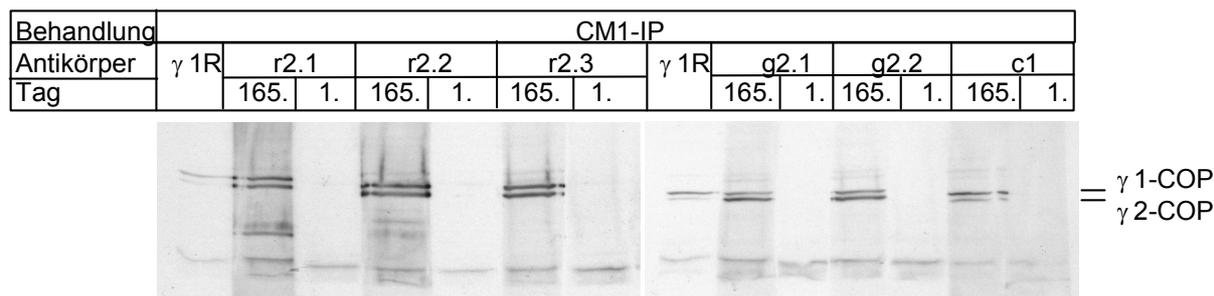
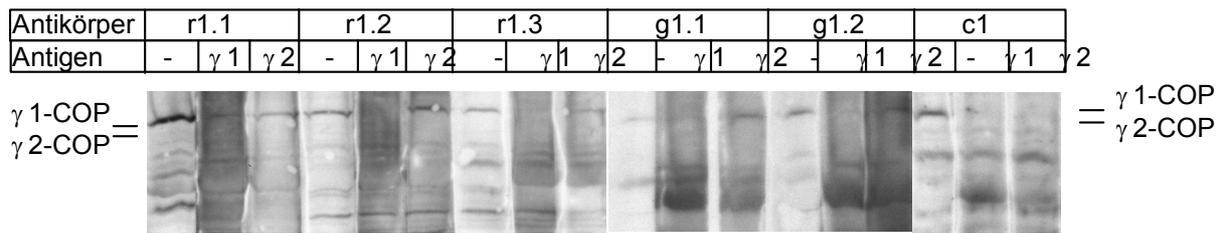


Abbildung 6: Vergleich der gegen GST-my1-app (A + C) und gegen GST-my2-app (B + D) gerichteten Antiseren als Primärantikörper bei der Western Blot-Analyse. Es wurden TCA-Präzipitate von je 50 μ g 3T3-Cytosol (A + B) und CM1-IPs von 300 μ g Cytosol verwendet (C + D). Die Auftrennung der Proteinbanden erfolgte durch ein 6% PAA-Gel. Die Präimmunsere sind als 1. Tag bezeichnet, die finalen Seren als 165. Tag. Alle Seren wurden 1:1000 verdünnt. Die Seren sind folgendermaßen bezeichnet: Der Buchstabe gibt die Spezies an (r = Kaninchen, g = Meerschwein, c = Huhn), die nachfolgende Ziffer das Antigen (1 = γ 1-COP, 2 = γ 2-COP) und die letzte Ziffer das Tier.

Die Betrachtung von TCA-präzipitierten Cytosolen zeigte bei allen gegen GST-my1-app-gerichteten Antiseren eine mit γ 1-COP korrelierende Bande und kein Signal auf der Höhe von γ 2-COP bei variablem Hintergrund (**Abbildung 6 A**). Bei einem Vergleich der γ 1R-abhängigen Signale zwischen CM1-IP und TCA-Präzipitat wurde deutlich, daß zur Detektion von γ 1- und γ 2-COP eine Immunpräzipitation erforderlich ist. Bei den α GST-my2-app Seren wurde mit Ausnahme des c2-Serums bei allen Seren eine Bande auf Höhe von γ 2-COP detektiert, allerdings war eine γ 1-COP korrelierende Bande in geringerer bis vergleichbarer Signalstärke ebenfalls präsent (**Abbildung 6 B**). Mit Ausnahme des c2-Serums zeigten die Präimmunsere nur sehr geringe Signalstärken.

Bei den durch CM1-IP aufgereinigten Cytosolen erkannten alle Seren eine γ 1-COP entsprechenden Bande, während eine γ 2-COP korrelierende Bande entweder gar nicht (siehe g1.1) oder in verschiedenen Verhältnissen erkannt wurde (**Abbildung 6 C + D**). Die Präimmunsere (1. Tag) zeigten keine Signale. Alle Signale der Antiseren waren deutlich stärker als die des γ 1R-Antikörpers, allerdings konnte kein Vergleich der Antikörper-Titer gemacht werden, da der Referenz-Antikörper standardmäßig zehnmal stärker verdünnt wurde als die Antiseren. Zur Validierung der spezifischen γ 1- und γ 2-COP Erkennung aus Cytosolen wurde obiges Experiment wiederholt, wobei nun die Primärantikörper-Inkubation in Gegenwart des SDS-denaturierten Antigens durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 2.9 Antikörper-kompatible SDS-Denaturierung von Proteinen).

A



B

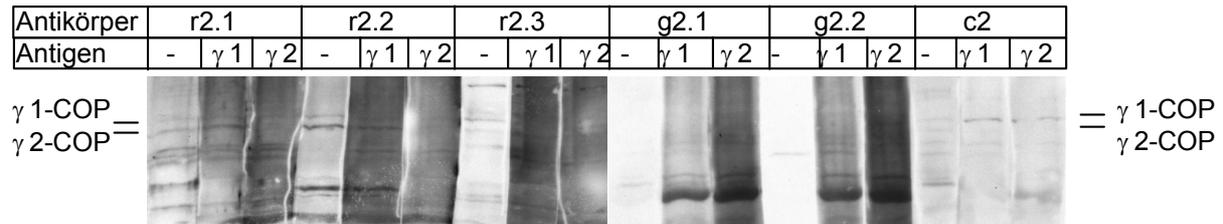


Abbildung 7: Spezifität der gegen GST- $\gamma 1$ -app (A) und gegen GST- $\gamma 2$ -app (B) gerichteten Antiseren als Primärantikörper bei der Western Blot-Analyse von Cytosol. Es wurden je 50 μg TCA-präzipitiertes Cytosol analysiert. Jedes Antiserum wurde in Abwesenheit (-), in Gegenwart von 100 μg SDS-denaturiertem GST- $\gamma 1$ -app ($\gamma 1$) oder GST- $\gamma 2$ -app ($\gamma 2$) inkubiert. Die Auftrennung der Proteinbanden erfolgte durch ein 6% PAA-Gel. Alle Seren wurden 1:1000 verdünnt. Die Bezeichnung der Seren ist in **Tabelle 3** erklärt.

Auffallend war, daß die meisten Antiseren in Gegenwart von SDS-denaturiertem Antigen einen erhöhten Signalhintergrund zeigten (**Abbildung 7**). Dies liegt vermutlich an einer partiellen Denaturierung des Antikörpers. Als Kriterium der $\gamma 1$ -COP Erkennung wurde einmal die Detektion der korrespondierenden Bande in Gegenwart von $\gamma 2$ -COP herangezogen. Ferner sollte die Bande in Anwesenheit von $\gamma 1$ -COP nicht erkannt werden. Das Kriterium der $\gamma 2$ -COP Erkennung war umgekehrt: Erkennung in Gegenwart von $\gamma 1$ -COP und nicht-Erkennung in Gegenwart von $\gamma 2$ -COP. Daher war z.B. das Antiserum r1.2 spezifisch für $\gamma 1$ -COP, nicht aber das c1-Serum. Allerdings ist der Proteinbackground einer CM1-IP wesentlich geringer als der eines cytosolischen TCA-Präzipitates. Somit wurden $\gamma 2$ -COP korrespondierende Banden bei der CM1-IP generell als spezifisch angesehen. Da eine Kreuzreaktivität der $\gamma 1$ -COP erkennenden Antiseren mit dem *appendage*-Domänen enthaltenden β -COP von vergleichbarem Molekulargewicht nicht ausgeschlossen werden konnte, erforderten $\gamma 1$ -COP korrespondierende Banden zusätzlich die genannte Kreuzauslöschung. Eine Übersicht der Antiseren folgt am Ende des Abschnitts.

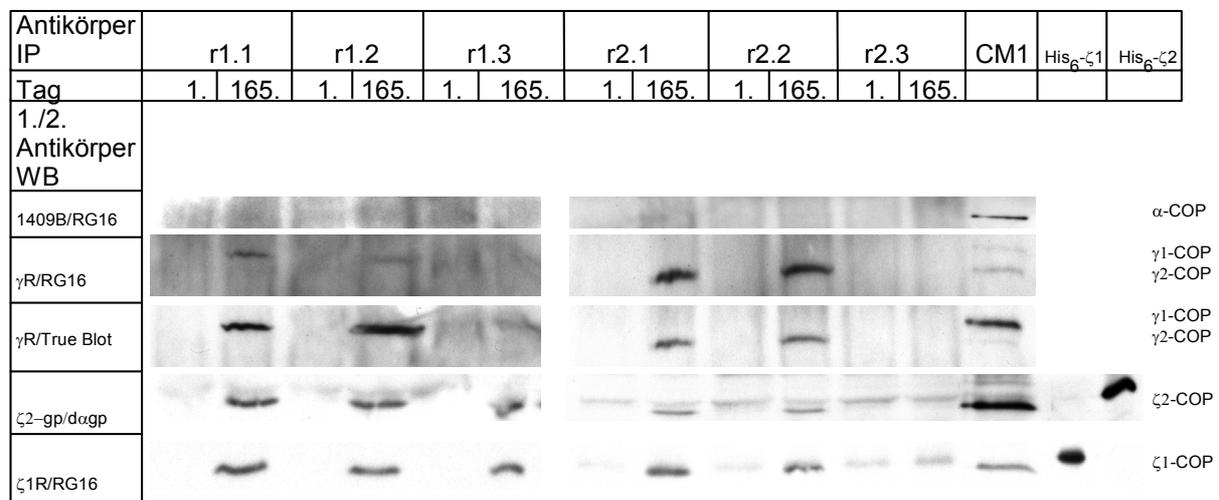
Es kann festgehalten werden, daß das Antigen unter SDS-Bedingungen im Western Blot erkannt wurde, allerdings detektierten die Antiseren bei CM1-aufgereinigtem Cytosol sowohl

γ 1- als auch γ 2-COP. Im Gegensatz zum γ 1R-Antikörper erlaubten aber sechs Seren eine spezifischere und sensitivere Detektion von γ 1- oder γ 2-COP auch aus Cytosol.

1.2 Charakterisierung der Antikörper durch Immunpräzipitation

Es sollte die Erkennung des nativen Antigens analysiert werden. Dazu wurde eine Immunpräzipitation aus Cytosol unter physiologischen Puffer-Bedingungen durchgeführt. Die verschiedenen Antiseren wurden mit dem CM1-Antikörper verglichen. Als Spezifitätskriterium wurde die Präsenz von γ 1- und γ 2-COP untersucht. Zusätzlich wurde die Anwesenheit von α -, ζ 1- und ζ 2-COP analysiert.

A



B

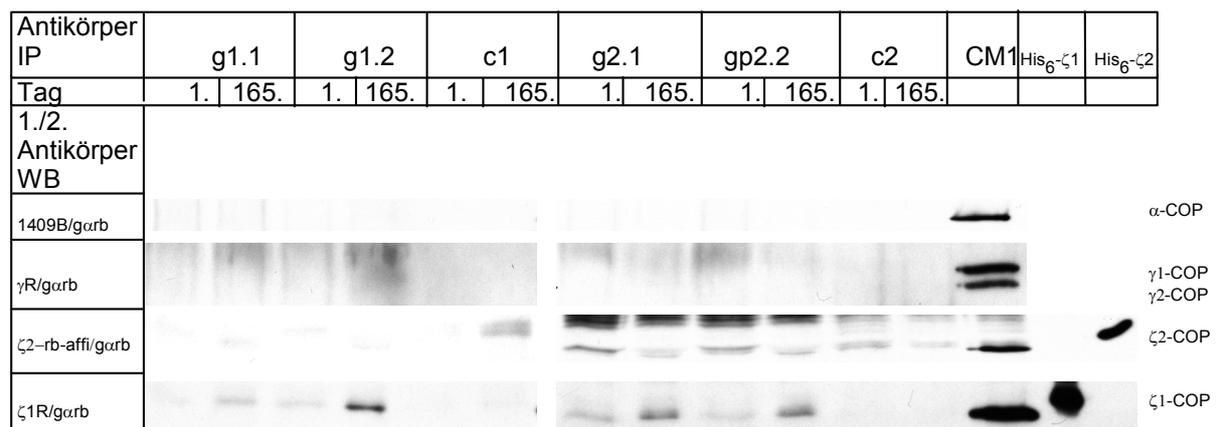


Abbildung 8: Vergleich der α GST- γ 1-app und α GST- γ 2-app Seren als immunpräzipitierendes Agens. In (A) sind aus Kaninchen, in (B) aus den Meerschweinchen und Huhn gewonnenen Seren getestet. Es wurden 200 μ g 3T3 Cytosol pro IP eingesetzt. In (A) wurden die aus Kaninchen stammenden Western Blot Primärantikörper mit den monoklonalen Sekundärantikörpern RG16 und True Blot detektiert. Die Bezeichnung der Seren ist in **Tabelle 3** erklärt.

Alle analysierten Coatomer-Untereinheiten konnten wie erwartet bei der CM1-IP detektiert werden (**Abbildung 8**). Bei den mit Kaninchen-Serum durchgeführten IPs zeigte nur das r2.3 Serum kein Signal für γ 2-COP, während die aus Meerschweinchen und Huhn gewonnenen Seren entweder negativ waren oder nur ein geringes Signal zeigten (g1.2). Da aus Kaninchen stammende Western Blot-Primärantikörper insbesondere bei mit Kaninchenserum durchgeführten IPs einen hohen Signalthintergrund zeigten, wurden monoklonale Sekundärantikörper (RG 16 und True Blot) eingesetzt. Diese erkennen ausschließlich ein natives Epitop der Kaninchenantikörper. Somit wird durch die monoklonalen HRP-Konjugate zwar der Western Blot-Primärantikörper erkannt, nicht aber der bei der IP durch SDS/ β -Mercaptoethanolamin-Elution denaturierte IP-Antikörper.

Es zeigte sich, daß die γ 1-COP erkennende Spezies des γ 1R-Serums immunologisch unterscheidbar von der γ 2-COP erkennenden Spezies war. Während der RG16-Antikörper präferentiell γ 2-COP dekorierte, erkannte der True Blot-Antikörper primär γ 1-COP. Allerdings erlaubte die Kombination beider eine verlässliche Aussage über die γ 1- und γ 2-COP immunpräzipitierende Fähigkeit der Kaninchenserum. Eine Übersicht über die Eignung in der IP ist am Ende dieses Abschnittes zu finden.

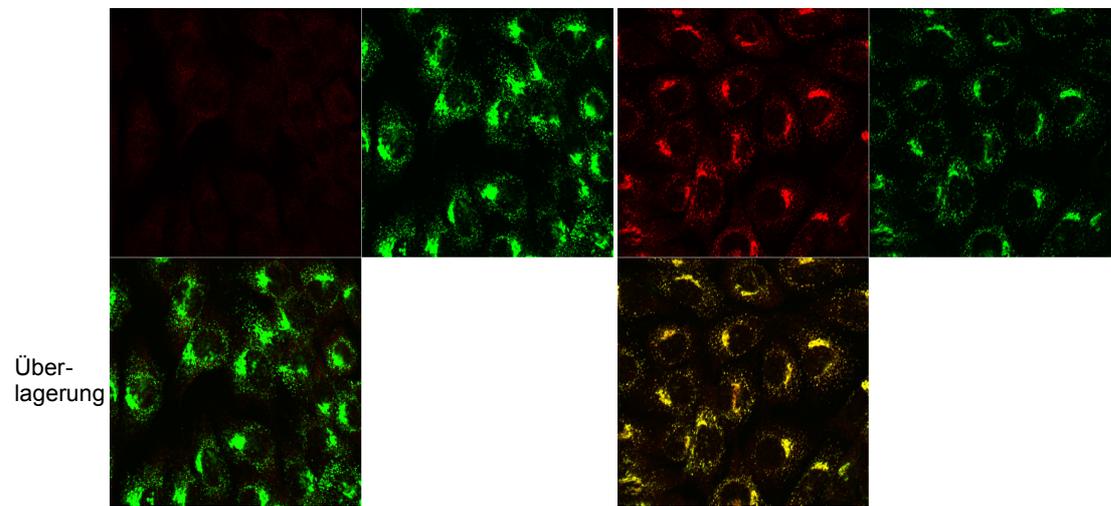
Auffallend ist, daß bei den positiven γ 1- und γ 2-COP IPs sowohl ζ 1- als auch ζ 2-COP koimmunpräzipitiert wird. Es konnte gezeigt werden, daß von den vier möglichen Coatomer-Isotypen der γ 2 ζ 2-Isotyp nicht existent ist (Wegmann et al. 2004). Daher war eine γ 2/ ζ 2-COP Interaktion nicht *per se* zu erwarten. Allerdings könnte das Fehlen der α -COP Banden bei den korrespondierenden Seren auf die Abwesenheit des $\alpha/\beta^{\prime}/\epsilon$ -COPI Subkomplexes hinweisen. Dies wurde im weiteren untersucht (siehe 2.1 Nachweis und Quantifizierung des γ 2/ ζ 2-Coatomer Isotyps).

1.3 Eignung der Antikörper für die Immunfluoreszenz

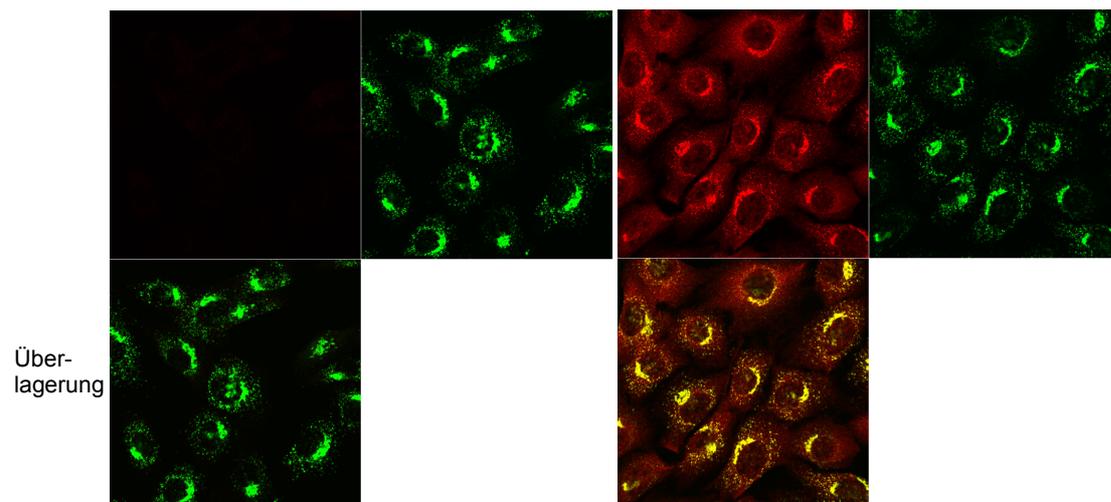
Als wichtigstes Kriterium der Antikörper für die Tauglichkeit in der Elektronenmikroskopie wurde die Immunfluoreszenz herangezogen. Dazu wurde eine Lokalisierung der Antiseren mit dem CM1-Antikörper als Coatomer-Marker verglichen.

A

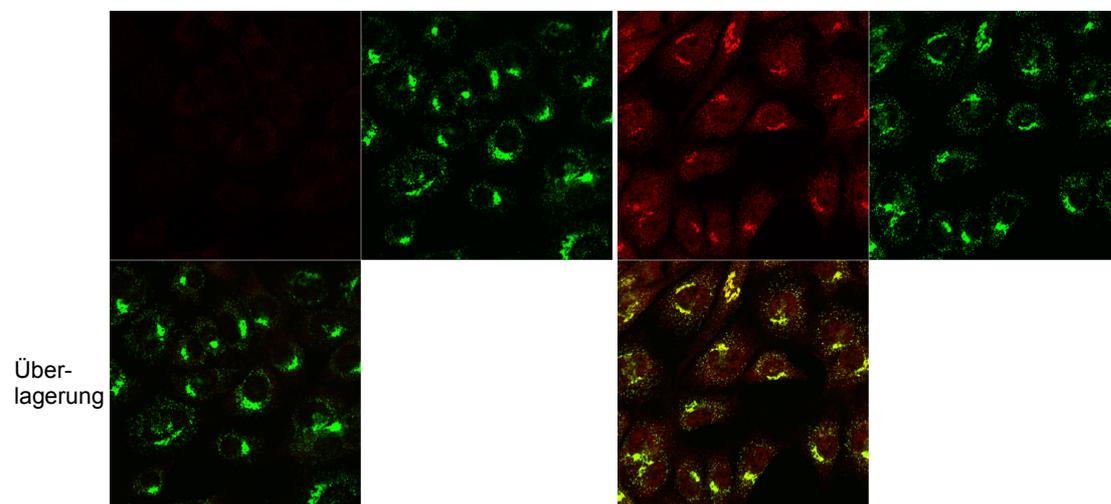
Anti-körper	r1.1	CM1	r1.1	CM1
Tag	1.		165.	



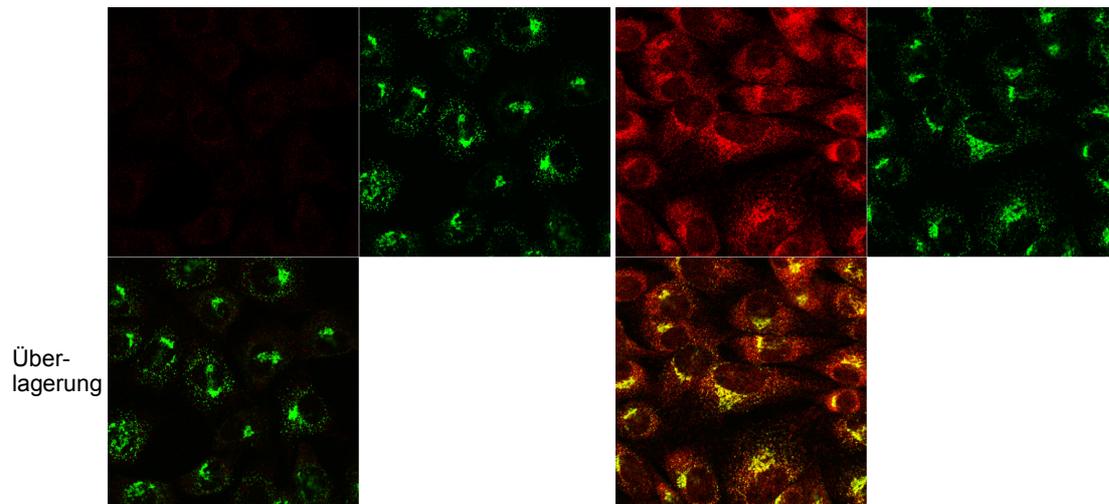
Anti-körper	r1.2	CM1	r1.2	CM1
Tag	1.		165.	



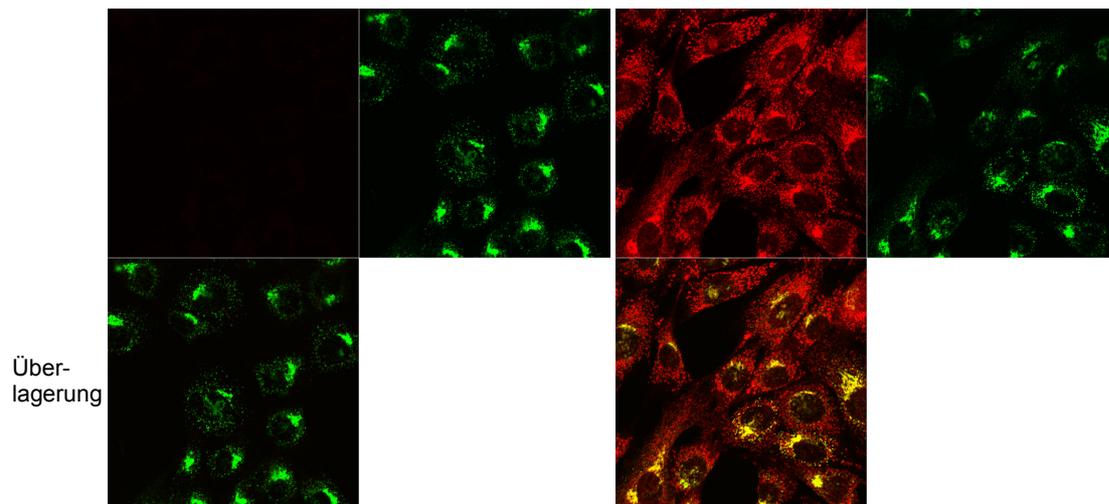
Anti-körper	r1.3	CM1	r1.3	CM1
Tag	1.		165.	



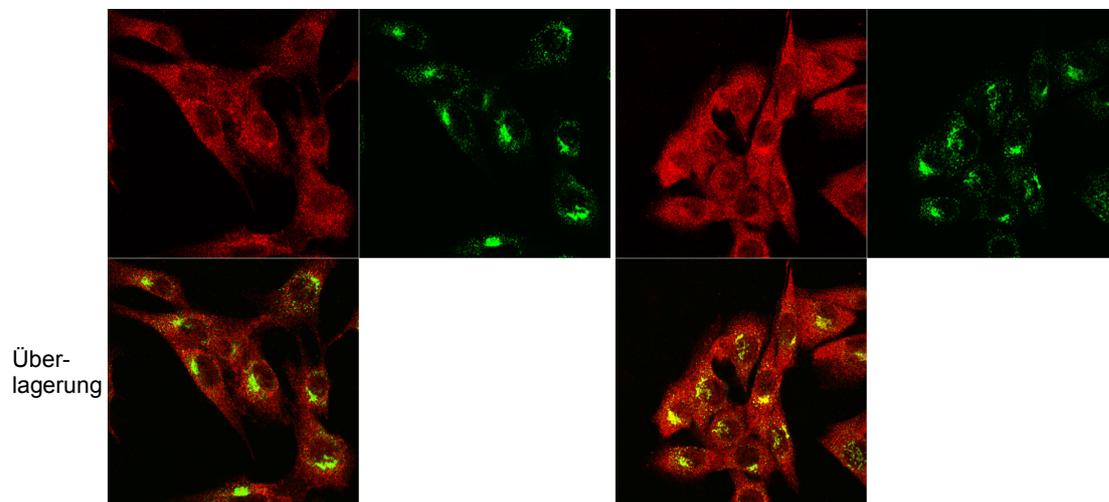
Anti-körper	g1.1	CM1	g1.1	CM1
Tag	1.		165.	



Anti-körper	g1.2	CM1	g1.2	CM1
Tag	1.		165.	

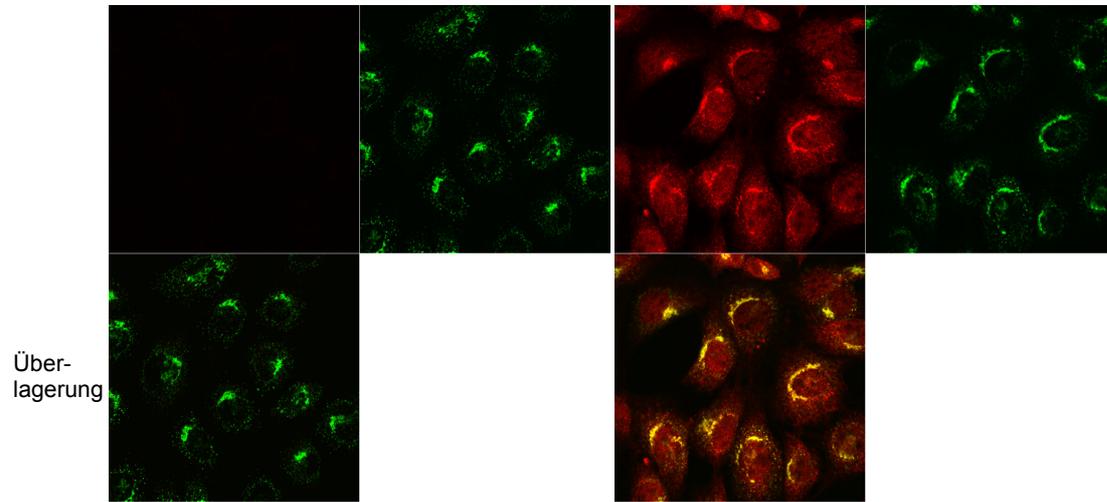


Anti-körper	c1	CM1	c1	CM1
Tag	1.		165.	

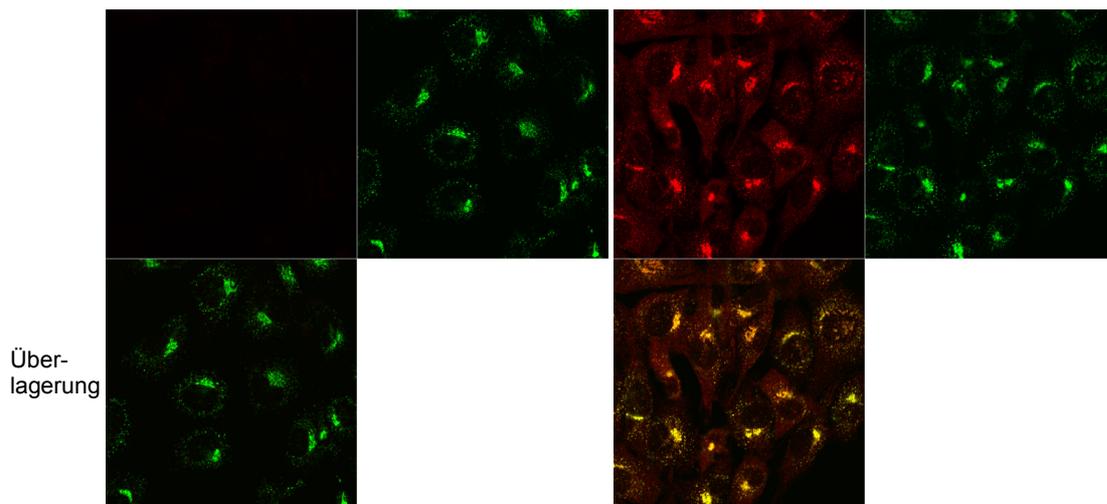


B

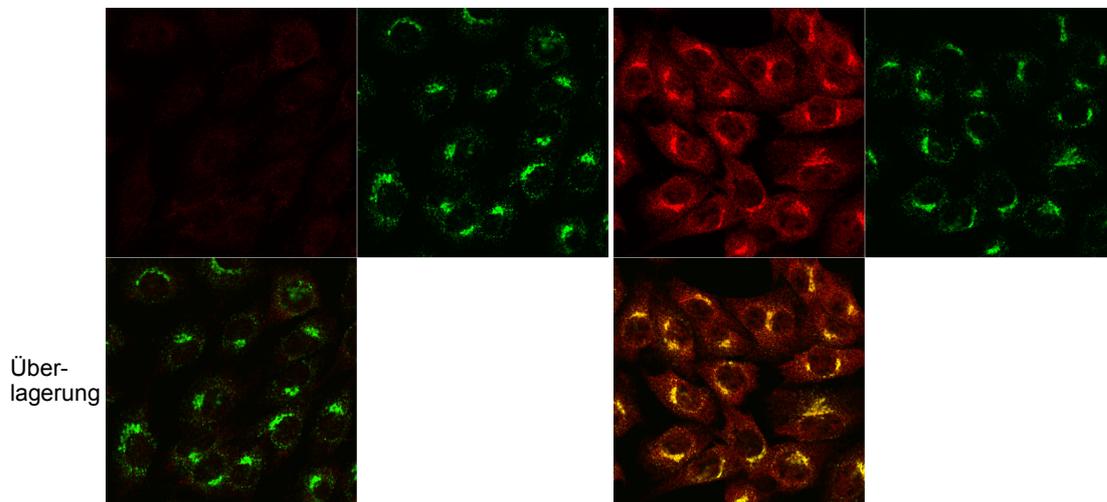
Anti-körper	r2.1	CM1	r2.1	CM1
Tag	1.		165.	



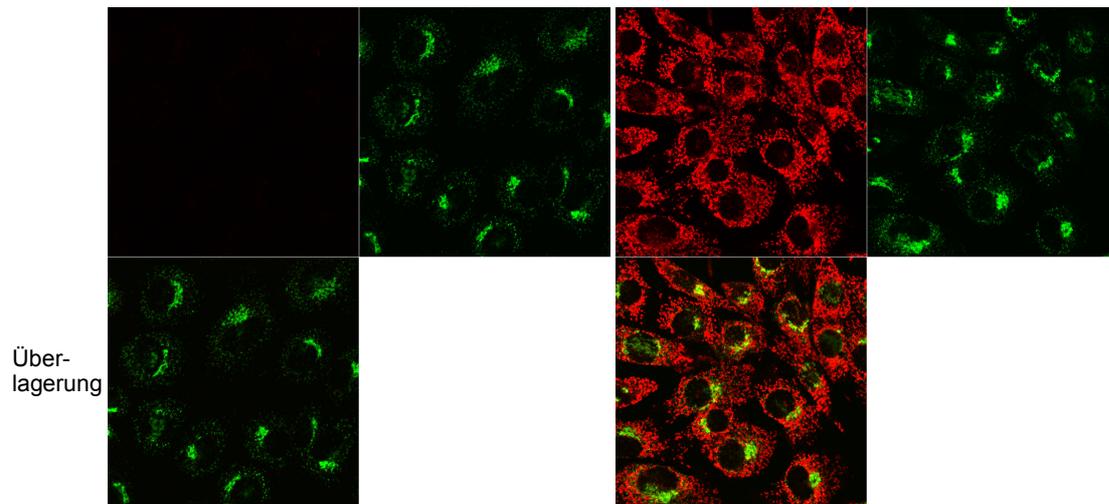
Anti-körper	r2.2	CM1	r2.2	CM1
Tag	1.		165.	



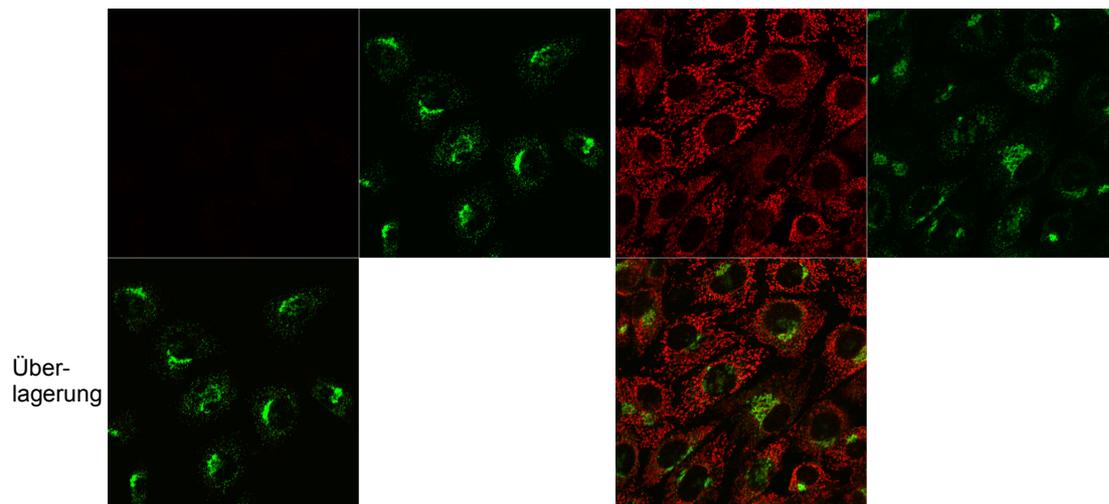
Anti-körper	r2.3	CM1	r2.3	CM1
Tag	1.		165.	



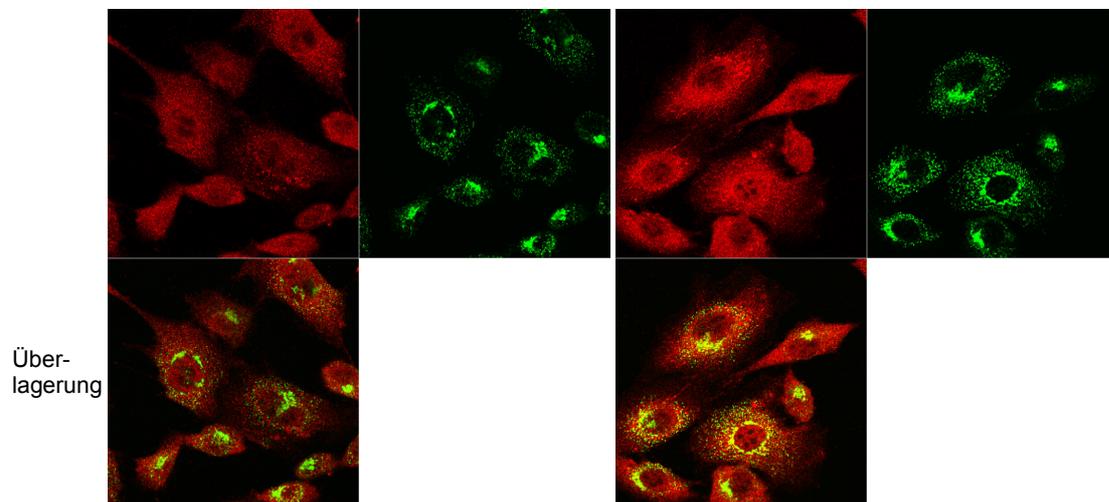
Anti-körper	g2.1	CM1	g2.1	CM1
Tag	1.		165.	



Anti-körper	g2.2	CM1	g2.2	CM1
Tag	1.		165.	



Anti-körper	c2	CM1	c2	CM1
Tag	1.		165.	



C

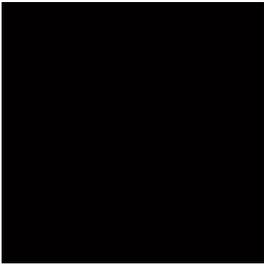
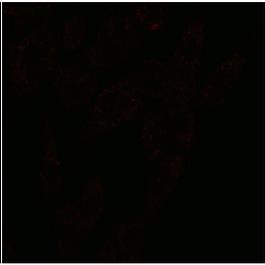
Anti-körper	Ziege- α Meerschwein Alexa 546	Ziege- α Huhn Alexa 546
		

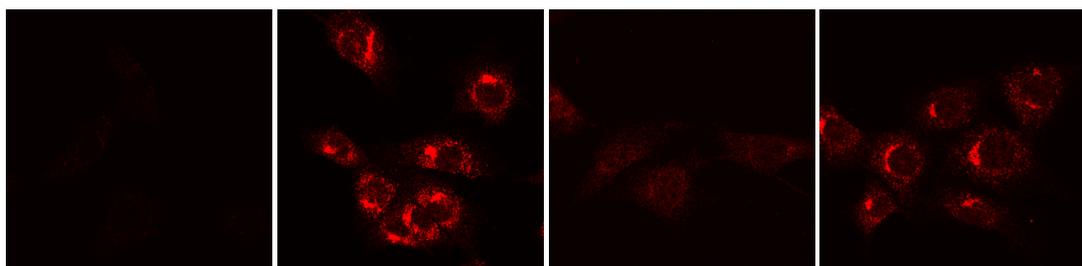
Abbildung 9: Eignung der Antikörper für die Immunfluoreszenz. Die gegen GST- γ 1-app gerichteten Antikörper sind in (A), gegen GST- γ 2-app in (B) und in (C) sind die durch die Sekundärantikörper bedingten Signale gezeigt. Die Antiseren wurden 1:1.000 verdünnt, der CM1-Hybridomüberstand 1:10. Die Bezeichnung der Seren ist in **Tabelle 3** erklärt.

Alle Präimmunsere (1. Tag) zeigten mit Ausnahme der Hühnerseren kein Signal, während die meisten Seren eine perinukleäre Färbung, die mit dem CM1-Signal ko-lokalisierte, aufwies (**Abbildung 9**). Daher war davon auszugehen, daß die in **Tabelle 3** aufgeführten Antiseren γ 1- und γ 2-COP unter IF-Bedingungen erkennen.

Während bei der Western Blot-Analyse eine Erkennung des Antigens unter SDS-denaturierten Bedingungen vorliegt und bei der IP natives Antigen vorhanden ist, befindet sich das Antigen bei der IF bedingt durch die Fixierungsbedingungen in einem PFA-kreuzvernetzten Zustand. Zur Überprüfung der notwendigen Diskriminierung zwischen γ 1- und γ 2-COP wurde daher eine Signalveränderung analysiert, die sich durch Ko-Inkubation der Antikörper mit den entsprechenden Antigenen, die in einem nativen Zustand vorlagen, ergab (**Abbildung 10**). Zuvor wurden die Seren r1.1 90. Tag und r2.2 90. Tag wie im Methodenteil beschrieben durch eine negative Affinitätsaufreinigung aufbereitet.

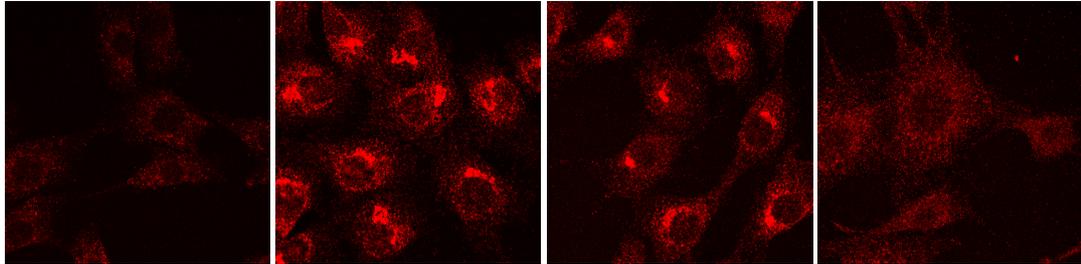
A

1. Antikörper	-	r1.1	r1.1	r1.1
2. Antikörper	+	+	+	+
Antigen	-	-	GST- γ 1-app	GST- γ 2-app



B

1. Antikörper	-	r2.2	r2.2	r2.2
2. Antikörper	+	+	+	+
Antigen	-	-	GST- γ 1-app	GST- γ 2-app



C

1. Antikörper	-	ζ 2-gp	ζ 2-gp
2. Antikörper	+	+	+
Antigen	-	-	ζ 2-NT Peptid

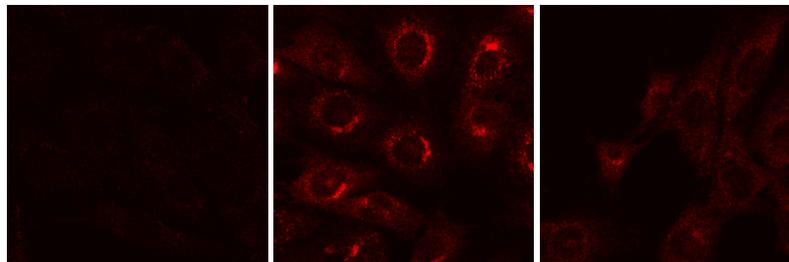


Abbildung 10: Verifizierung der Spezifität der gegen γ 1-COP (A), γ 2-COP (B) und ζ 2-COP (C) gerichteten Antiseren durch Ko-Inkubation mit den Antigenen. Die Antiseren r1.1 (90. Tag) und r2.2 (90. Tag) wurden 1:3.000 und 1:10.000 verdünnt und mit 250 ng GST- γ 1-app oder GST- γ 2-app versetzt. Das ζ 2-COP spezifische Antiserum G442 wurde 1:1000 verdünnt und mit 3,7 μ g des N-terminalen Peptidepitops von ζ 2-COP versetzt. Es wurden 3T3-Zellen verwendet, die 20 min mit 3% (w/v) PFA fixiert wurden. Die Bezeichnung der Seren ist in **Tabelle 3** erklärt.

Bei allen Ansätzen wurde die perinukleäre Färbung durch das korrespondierende Antigen ausgelöscht (**Abbildung 10**). Da eine Kreuzauslöschung durch das jeweils andere Antigen nicht möglich war, legte dies die diskriminierende Fähigkeit der Antiseren unter den verwendeten Fixierungsbedingungen nahe. Somit entsprachen die γ 1- und γ 2-COP Antigene in der PFA-Fixierung der nativen Situation, die auch in der IP vorlag.

In **Tabelle 3** sind die Antiseren hinsichtlich der Eignung in verschiedenen Anwendungen dargestellt:

Tabelle 3: Übersicht der Antiseren hinsichtlich der Eignung für die Western Blot-Analyse (WB) sowohl von Cytosolen und CM1-IPs, bei der Immunpräzipitation (IP) und für die Immunfluoreszenz (IF). Die Verdünnungen sind den jeweiligen Applikationen zu entnehmen. Die Seren sind folgendermaßen bezeichnet: Der Buchstabe gibt die Spezies an (r = Kaninchen, g = Meerschwein, c = Huhn), die nachfolgende Ziffer das Antigen (1 = γ 1-COP, 2 = γ 2-COP) und die letzte Ziffer das Tier. Die Angaben der IP beziehen sich allein auf γ 1- und γ 2-COP bzw. den korrespondierenden $\gamma\zeta$ -Subkomplexen, weitere Erläuterungen siehe im folgenden Abschnitt. Bei den durch * indizierten Angaben handelt es sich um negativ affinitätsaufgereinigte Antiseren des 90. Tages in einer Verdünnung von 1:3.000 (γ 1) und 1:10.000 (γ 2). Die durch () markierten Antiseren eignen sich prinzipiell für die entsprechende Applikation, sind allerdings im Vergleich zu den anderen Seren deutlich schlechter geeignet. Die unterstrichenen Antiseren wurden im weiteren ausschließlich bei den angegebenen Anwendungen verwendet.

Antigen/ Anwendung	GST-my1-app						GST-my2-app					
	r1.1	r1.2	r1.3	g1.1	g1.2	c1	r2.1	r2.2	r2.3	g2.1	g2.2	c2
Antikörper (165. Tag)												
WB 1:1.000 (Cytosol)	-	<u>γ1</u>	γ 1	γ 1	γ 1	-	γ 2	<u>γ2</u>	-	-	-	-
WB 1:1.000 (CM1-IP)	-	<u>γ1>γ2</u>	γ 1> γ 2	γ 1	γ 1> γ 2	-	γ 2	<u>γ2</u>	γ 2	γ 2	γ 2	γ 2
IP (5 μ l/10 μ l PAS)	<u>γ1</u>	γ 1	(γ 1)	-	-	-	γ 2	<u>γ2</u>	-	-	-	-
IF 1:1.000	<u>γ1/γ2</u> <u>*γ1</u>	γ 1/ γ 2	γ 1/ γ 2	(γ 1/ γ 2)	(γ 1/ γ 2)	(γ 1/ γ 2)	γ 1/ γ 2	<u>γ1/γ2</u> <u>*γ2</u>	γ 1/ γ 2	-	-	-

2. Identifizierung von γ 1- und γ 2-COP-Interaktionspartnern

Im weiteren sollte die neue, bislang unerkannte γ 2/ ζ 2-Interaktion untersucht werden. Dazu mußte zunächst untersucht werden, ob der analysierte ko-immunpräzipitierte Komplex mit substöchiometrischer α -COP Präsenz repräsentativ für Coatomer ist.

Ferner wurden *pull-downs* mit den GST-my1- und -my2-app Proteinen durchgeführt, um (differentielle) Interaktionspartner mit den *appendage*-Domänen von γ 1- und γ 2-COP zu identifizieren.

2.1 Nachweis und Quantifizierung des γ 2/ ζ 2-Coatomer Isotyps

Zunächst wurde genauer untersucht, welche Coatomer-Untereinheiten mit den γ 1- bzw. γ 2-COP spezifischen Antikörpern im Vergleich zu Referenz-Antikörpern ko-immunpräzipitierten. Um mögliche bei der IP entstehende Präzipitationseffekte zu erkennen, wurde bei der CM1-IP eine Kontrolle mit CD8 durchgeführt, während bei den IPs von γ 1- und γ 2-COP die Präimmunseren herangezogen wurden.

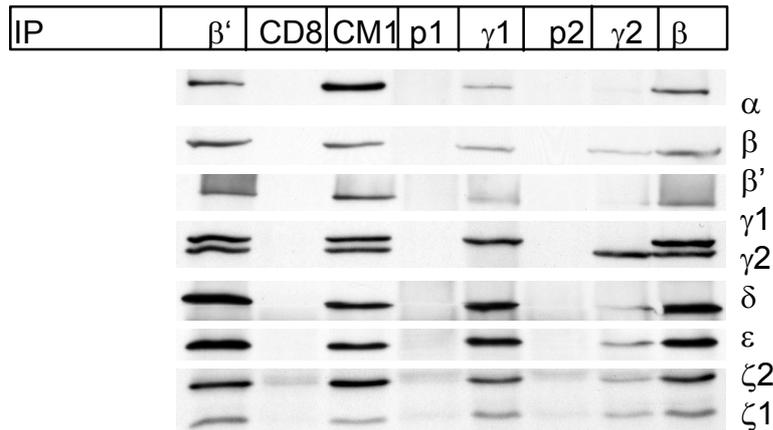


Abbildung 11: Analyse aller Coatomer-Untereinheiten in gegen β' -, β -, $\gamma 1$ - bzw. $\gamma 2$ -COP (r1.2 bzw. r2.2, jeweils negativ affinitätsaufgereinigt) gerichteten IPs im Vergleich zur IP mit CM1. Es wurden jeweils 500 μg 3T3 Cytosol immunpräzipitiert und die ko-immunpräzipitierten Coatomer-Untereinheiten wie angegeben mit Western Blot-Analyse untersucht. p1 und p2 bezeichnet jeweils die korrespondierenden Präimmunsereen. Die β' -COP IP wurde mit dem 891-Antiserum und die β -COP IP mit dem B1.2-Antiserum durchgeführt. Die bei der Western Blot-Analyse eingesetzten Antikörper sind der **Tabelle 12** zu entnehmen.

Bei allen durchgeführten Immunpräzipitationen wurden alle Coatomer-Untereinheiten ko-immunpräzipitiert (**Abbildung 11**). Insbesondere bei der $\gamma 2$ - als auch bei der $\gamma 1$ -COP-spezifischen IP ergaben sich jedoch deutlich substöchiometrische Signale für α - und β' -COP, während nur bei der gegen $\gamma 2$ -COP-gerichteten IP außerdem β -, δ - und ϵ -COP geringere Signale aufwiesen.

Dies konnte zwei Ursachen haben: Entweder handelte es sich um eine während der gegen $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP gerichteten IPs auftretenden Dissoziation der genannten Komponenten, beispielsweise bedingt durch zu stringentes Waschen oder einen Antikörper-induzierten Effekt, oder es existierte ein nicht mit Coatomer assoziierter *pool* von $\gamma 1$ - bzw. $\gamma 2$ -COP.

Um festzustellen, ob es einen Coatomer-freien *pool* von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP gibt, wurde 3T3 Cytosol durch Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt und das Elutionsverhalten aller Coatomer-Komponenten analysiert. Insbesondere die Detektion von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP aus Cytosol war durch den $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP-erkennenden $\gamma 1R$ -Antikörper bislang nicht möglich (siehe z.B. **Abbildung 6**).

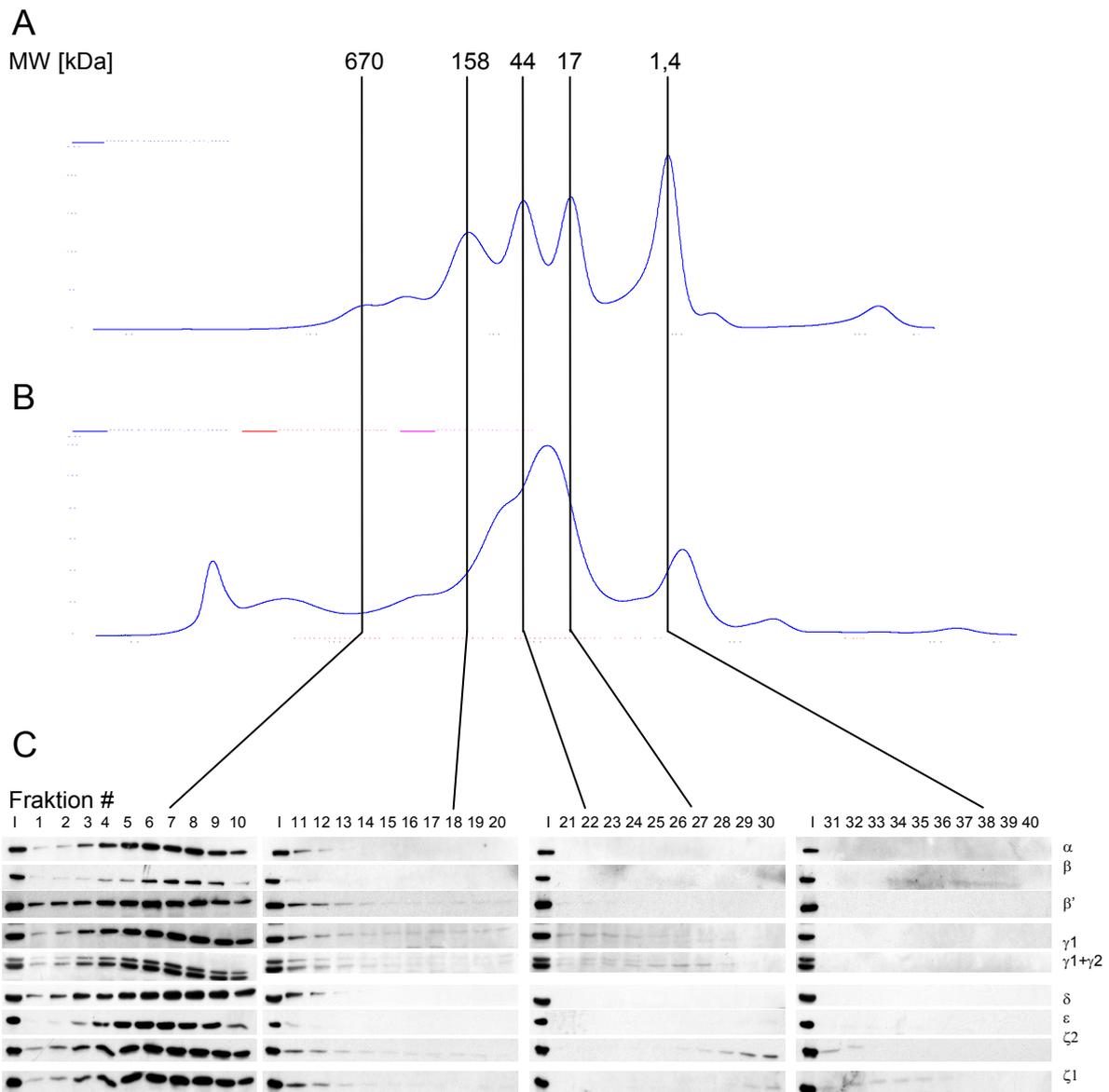


Abbildung 12: Gelchromatographische Auftrennung von 3T3 Cytosol. Es wurden 1,65 mg 3T3 Cytosol mit einer 24 ml Superose 6-Säule größenabhängig aufgetrennt und das Elutionsverhalten aller Coatomer-Komponenten analysiert. In (A) ist eine Kalibrierung der Säule mit Größenstandards gezeigt, in (B) die Auftrennung des Cytosols, wobei die Elution durch UV Absorbtion bei 280 nm aufgezeichnet wurde. In (C) ist das Elutionsverhalten aller Coatomer-Untereinheiten durch Western Blot-Analyse aufgezeigt. Die mit I bezeichneten Proben entsprechen einem 10% Input. Die Dekoration von γ_2 -COP erfolgte nach der von γ_1 -COP, daher sind in der entsprechenden Western Blot-Analyse beide Banden sichtbar.

Alle untersuchten Coatomer-Untereinheiten ko-eluierten wie erwartet im Bereich 700 kDa (**Abbildung 12**). Sowohl ζ_1 - als auch ζ_2 -COP lagen als Monomere von erwarteter molarer Masse von ca. 20 kDa vor. Darüber hinaus konnten nebst γ_1 - auch γ_2 -COP als Coatomerfreier *pool* bei 30 - 100 kDa detektiert werden, wobei γ_2 -COP später eluierte. Die Verschiebung von γ_1 - und auch γ_2 -COP zu größeren Elutionsvolumina war nicht zu erwarten.

Möglicherweise interagierten beide Proteine mit der Gelmatrix der Säule, sodaß neben der Gelfiltration auch zusätzliche chromatographische Effekte relevant waren.

Es konnte bis auf eine geringe Überlappung der γ 1- mit der ζ 2-COP Bande kein Ko-Elutionsverhalten von γ 1- und γ 2- bzw. ζ 1- und γ 2-COP beobachtet werden. Somit lag ein geringer Anteil von γ 1- und auch γ 2-COP im Cytosol in Coatomer ungebundener Form vor. Eine Quantifizierung der Fraktionen # 13 – 28 ergab einen Anteil von jeweils ca. 2% für γ 1- und γ 2-COP.

Anzumerken ist, daß auch β' -COP als Coatomer-freie Fraktion im Bereich von ca. 200 kDa detektierbar war.

Um auszuschließen, daß ein Coatomer-ungebundener Anteil von vergleichbarer molarer Masse existierte, wurde Cytosol durch fünf sequentielle CM1-IPs depletiert und der Überstand durch eine sechste CM1- bzw. γ 1- oder γ 2-COP spezifische IP analysiert.

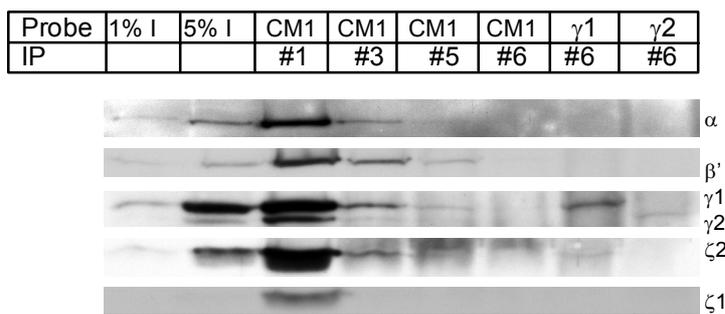


Abbildung 13: γ 1- und γ 2-COP läßt sich durch Coatomer spezifische IPs nicht vollständig depletieren. Es wurden 2 mg 3T3 Cytosol durch fünfmalige sequentielle IP mit dem gegen nativen Coatomer gerichteten Antikörper CM1 depletiert und jeweils 1/3 des finalen Überstands mit CM1, mit gegen γ 1- und γ 2-COP gerichteten Antikörpern behandelt (r1.2 bzw. r2.2, jeweils negativ affinitätsaufgereinigt). Gezeigt sind die auf gleiche Cytosol-Mengen normalisierten Immunpräzipitate. I entspricht Inputs der angegebenen Mengen.

Durch die fünf sequentiellen CM1-IPs konnte Coatomer vollständig depletiert werden, da eine sechste CM1-IP keine Signale der verwendeten Coatomer-Marker lieferte (**Abbildung 13**). Die γ 1- oder γ 2-COP spezifischen IPs der finalen Überstände zeigten, daß ein geringer Anteil von Coatomer ungebundenem γ 1- bzw. γ 2-COP verbleibt. Eine Abschätzung der Signalstärken im Vergleich zu den Inputs ergab einen Anteil von ca. 2% für γ 1- und γ 2-COP. Das Fehlen der ζ 1- bzw. ζ 2-COP Signale bei der γ 2-COP spezifischen IP legte allerdings nahe, daß es sich hierbei um Coatomer-freies, nicht ζ -COP komplexiertes γ 2-COP handelte. Im Gegensatz dazu konnte bei der γ 1-COP IP auch ζ 2-COP detektiert werden. Vermutlich handelte es sich um Coatomer-freie γ 1 ζ 2-Subkomplexe. Dies könnte die im Vergleich zu

Coatomer-freiem γ 2-COP zu kleineren Elutionsvolumina verschobenen Signale der Gelfiltration erklären.

Im weiteren sollte überprüft werden, ob durch die Bindung der Antikörper an die *appendage*-Domänen von γ 1- und γ 2-COP eine Dissoziation des $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP Subkomplexes bewirkt wird. Dazu wurde eine gegen β' -COP gerichtete IP des Überstandes einer γ 1- bzw. γ 2-COP spezifischen IP mit einer direkten β' -COP IP verglichen. Als Indikator des $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP Subkomplexes wurde β' -COP herangezogen, während der $\beta/\gamma/\delta/\zeta$ -COP Subkomplex durch γ 1-, γ 2-, ζ 1- und ζ 2-COP detektiert wurde.

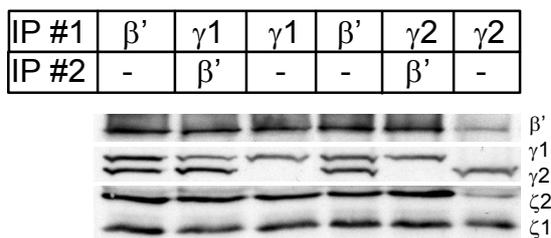


Abbildung 14: Eine Antikörper-*appendage* Domänen Interaktion führt nicht zur Dissoziation des $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COPI-Subkomplexes. Es wurden jeweils 500 μ g 3T3 Cytosol mit den angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert und anschließend durch Western Blot analysiert. #1 entspricht dem Immunpräzipitat einer ersten IP und #2 dem Präzipitat einer nachfolgenden IP.

Erwartungsgemäß wurden durch die γ 1- bzw. γ 2-COP IPs jeweils nur die entsprechenden γ -COP Isoformen präzipitiert (**Abbildung 14**). Eine nachfolgende zweite β' -COP IP zeigte eine quantitative γ 2-Depletion und eine γ 1-COP Reduktion verglichen mit einer einfachen β' -COP IP. Es wurde deutlich, daß bei der einfachen β' -COP IP das Verhältnis der β' -COP Signalstärke zu γ 1/ γ 2- und ζ 1/ ζ 2-COP nicht signifikant kleiner war als bei einer vorgeschalteten γ 1- oder γ 2-COP IP. Würde durch die Bindung der Antikörper an γ -COP eine Dissoziation von $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP bewirkt werden, wären bei einer nachfolgenden β' -COP IP verminderte γ -COP Signale zu erwarten. Dies sprach gegen eine Antikörper-induzierte Dissoziation von β' -COP.

Die γ 2/ ζ 2-Interaktion sollte letztlich durch eine ζ 2-COP-spezifische IP validiert werden.

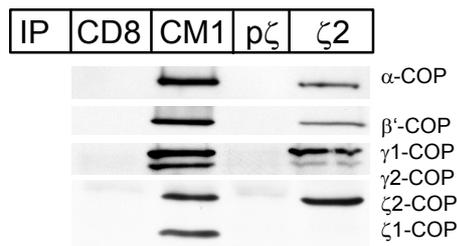


Abbildung 15: Überprüfung der γ 2/ ζ 2-Interaktion durch eine ζ 2-COP-spezifische IP. Es wurden jeweils 500 μ g 3T3 Cytosol mit den angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert und anschließend durch Western Blot analysiert.

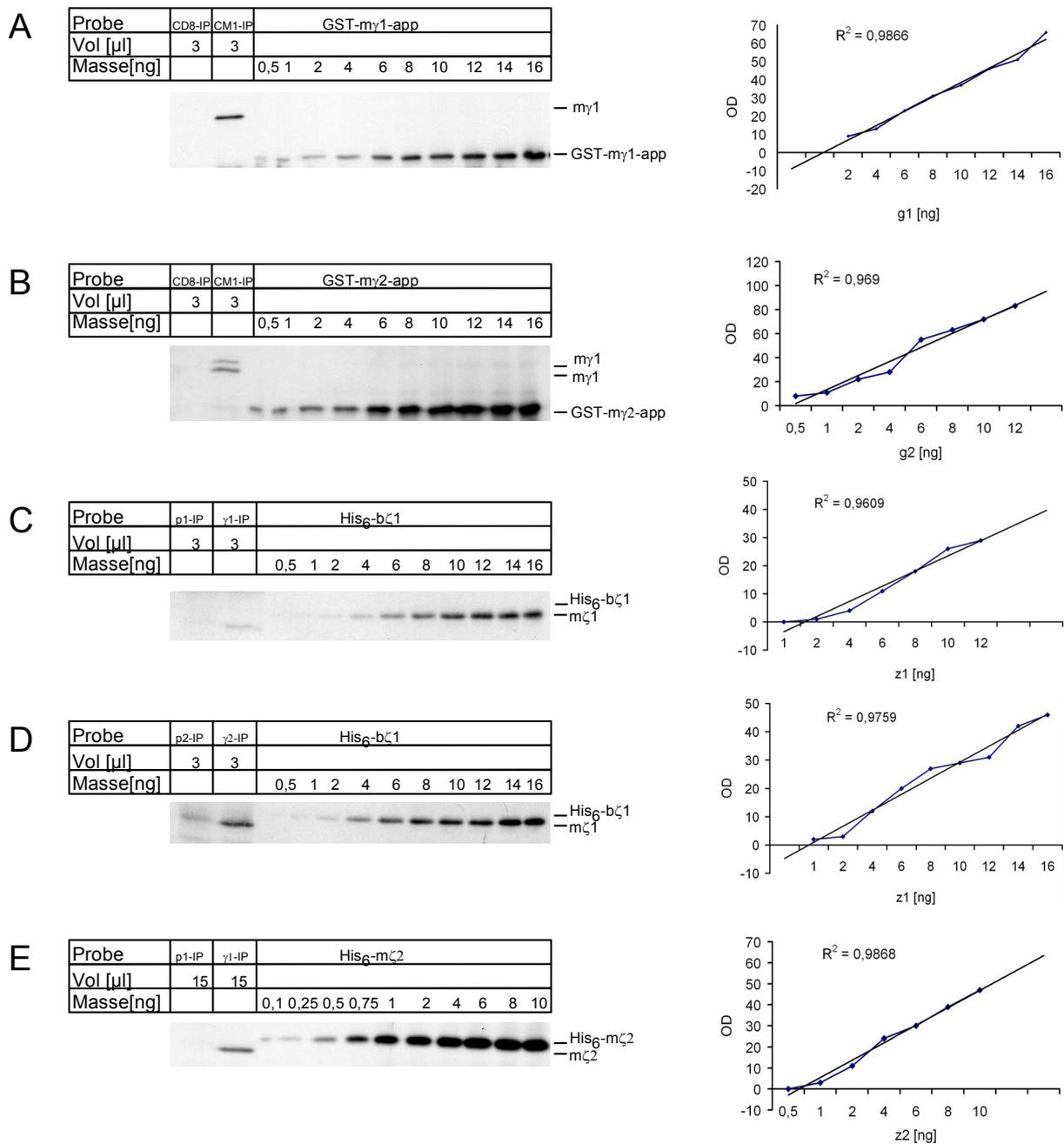
Es wird deutlich, daß mit einer ζ 2-COP spezifischen IP nicht nur γ 1-, sondern auch γ 2-COP ko-immunpräzipitiert wurde (**Abbildung 15**). Diese reziproke ζ 2-COP IP bestätigt den durch die γ 2-COP-IP erhaltenen Befund einer γ 2 ζ 2-Interaktion.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß es Coatomer-freies γ 1- und γ 2-COP gibt, wobei γ 1-COP mit ζ 2-COP komplexiert ist. Es kommt bedingt durch die γ 1- oder γ 2-COP spezifischen IPs zur partiellen Dissoziation von Untereinheiten. Somit können die durch eine IP bestimmten γ/ζ -Interaktionen auch in substöchiometrischer Präsenz von anderen Coatomer-Komponenten unter Berücksichtigung der Coatomer-freien Anteile von γ 1- und γ 2-COP auf Gesamt-Coatomer extrapoliert werden. Demnach definieren die vier γ 1/ γ 2- bzw. ζ 1/ ζ 2-COP Interaktionen ebenfalls vier Coatomer Isoypten.

Es war bekannt, daß die γ 1 ζ 1-, γ 1 ζ 2-, γ 2 ζ 1-Coatomer Isotypen in einer Stöchiometrie von 40%, 20% und 40% vorliegen (Wegmann et al. 2004). Somit war eine erneute Quantifizierung notwendig. Dazu mußte sichergestellt werden, daß der immunpräzipitierende Antikörper keine Präferenz für γ 1- bzw. γ 2-COP enthaltenden Maus-Coatomer aufweist. Dazu wurden die in **Abbildung 11** dargestellten Signale von γ 1- bzw. γ 2-COP der CM1- und β '-COP-IPs quantifiziert. Ein Vergleich zeigte, daß beide Antikörper das gleiche Signalverhältnis von γ 1- zu γ 2-COP liefern (jeweils 1,1). Daher ist davon auszugehen, daß eine CM1-IP keine Präferenz für Coatomer-Isotypen hat.

Im weiteren wurde daher die Signalintensität einer Western Blot-Analyse von γ 1- und γ 2-COP einer CM1-IP aus 3T3 Cytosol mit einer Eichreihe der GST- γ 1-app bzw. GST- γ 2-app Fusionsproteine verglichen. Als Primärantikörper der Western Blot-Analyse wurden die r1.2 und r2.2 Seren herangezogen, da diese ebenfalls gegen die Spezies Maus gerichtet sind. Dies liefert den Anteil von γ 1- und γ 2-COP an Gesamt-Coatomer (**Abbildung 16 A und B**).

Im weiteren wurden die Signalintensitäten von ζ 1- und ζ 2-COP der γ 1- bzw. γ 2-COP-spezifischen IPs mit rekombinanten His₆-b ζ 1 und His₆-m ζ 2 verglichen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Bernd Weigle und Dr. Dominik Wegmann) (**Abbildung 16 C bis F**). Um Epitop-Identität zwischen dem bovinen rekombinanten His₆-b ζ 1- und dem endogenen m ζ 1-COP sicherzustellen, wurde zur Detektion von ζ 1-COP das gegen ein gemeinsames internes Peptid gerichtete Antiserum 468.1 verwendet. Dadurch ergab sich der Anteil von ζ 1- bzw. ζ 2-COP an den γ 1- und γ 2-Coatomer-Subpopulationen.



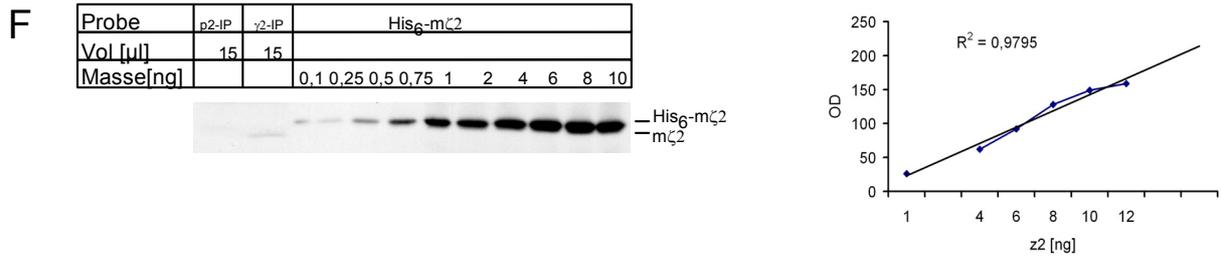


Abbildung 16: Quantifizierung der vier Coatomer-Isotypen aus 3T3 Cytosol. In (A) und (B) werden die Massen von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP in Coatomer, in (C) und (D) von $\zeta 1$ -COP und in (E) und (F) von $\zeta 2$ -COP in den $\gamma 1$ - bzw. $\gamma 2$ -COP enthaltenden Coatomer-Isotypen einer repräsentativen Stichprobe ($n = 6$) bestimmt. Die γ -COP spezifischen Antikörper (r1.2 bzw. r2.2) wurden zuvor negativ affinitätsaufgereinigt. Neben der Western Blot-Analyse ist eine Quantifizierung der korrespondierenden Signale gezeigt. Zur Detektion von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP wurden die Antikörper r1.2 und r2.2 des 165. Tages in einer Verdünnung von 1:10.000 und 1:20.000 verwendet. Die Detektion von $\zeta 1$ -COP wurde durch den True Blot Sekundärintikörper (eBiosciences, San Diego, USA) durchgeführt.

Nach Umrechnung der analysierten Massen in die Stoffmenge (GST-m $\gamma 1$ -app = 63,5 kDa, GST-m $\gamma 2$ -app = 63,4 kDa, His₆-b $\zeta 1$ = 21,1 kDa und His₆-m $\zeta 2$ = 22,9 kDa) ergab sich die folgende Stöchiometrie:

Tabelle 4: Bestimmung der Stöchiometrie der vier Coatomer-Isotypen aus 3T3 Cytosol ($n = 6$). Zunächst wurde der relative Anteil von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP aus einer CM1-IP bestimmt. Dann wurde der relative Anteil von $\zeta 1$ - und $\zeta 2$ -COP aus einer $\gamma 1$ - oder einer $\gamma 2$ -COP spezifischen IP analysiert. Der Anteil der Coatomer-Isotypen ergab sich dann aus dem Produkt der jeweiligen Anteile, z.B. $\gamma 1\zeta 1$ [%] = $\gamma 1$ CM1-IP [%] · $\zeta 1$ $_{\gamma 1$ -IP [%].

γ -COP Isoform	$\gamma 1$		$\gamma 2$	
Anteil [%] aus einer CM1-IP	70 (A) und (B)		30 (A) und (B)	
ζ -COP Isoform	$\zeta 1$	$\zeta 2$	$\zeta 1$	$\zeta 2$
Anteil [%] aus einer $\gamma 1$ - oder $\gamma 2$ -COP IP	78 (C) und (E)	22 (C) und (E)	86 (D) und (F)	14 (D) und (F)
Berücksichtigung von 2% Coatomer- freiem $\gamma 1\zeta 2$ bzw. $\gamma 2$	80	20	-	-
Coatomer-Isotyp	$\gamma 1\zeta 1$	$\gamma 1\zeta 2$	$\gamma 2\zeta 1$	$\gamma 2\zeta 2$
Anteil [%]	56 +/- 15 (= 70% · 80%)	14 +/- 3 (= 70% · 20%)	26 +/- 9 (= 30% · 86%)	5 +/- 4 (= 30% · 14%)

Es wurde deutlich, daß der neu erkannte $\gamma 2\zeta 2$ -Coatomer Isotyp lediglich einen Anteil von 5% am Coatomer-*pool* aufwies, während der Anteil von $\gamma 1\zeta 2$ -Coatomer geringfügig kleiner geworden war (**Tabelle 4**). Ferner ist der Anteil von $\gamma 1\zeta 1$ um ca. 15% höher und der von $\gamma 2\zeta 1$ um ca. 15% geringer als die ursprünglich erhaltenen Werte (Wegmann et al. 2004).

2.2 Interaktionen mit der γ 1- und γ 2-COP *appendage* Domäne

Im Gegensatz zu den *appendage*-Domänen der Adaptine der CCVs sind im COPI-System nahezu keine Bindungspartner bekannt. Daher wurden GST-Fusionsproteine der γ 1- und γ 2-COP *appendage* Domäne an Glutathion-*beads* gebunden, und mit Rattenlebercytosol inkubiert. Nach Waschen der *beads* wurden die *appendage*-Domänen sowie daran assoziierte Proteine durch die TEV-Protease von den GST-Glutathion-*beads* abgespalten. Der Überstand wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt. Einzelne Proteinbanden wurden anschließend durch MALDI-TOF analysiert (FG Dr. Johannes Lechner, BZH). Das Ergebnis ist in **Abbildung 17** dargestellt:

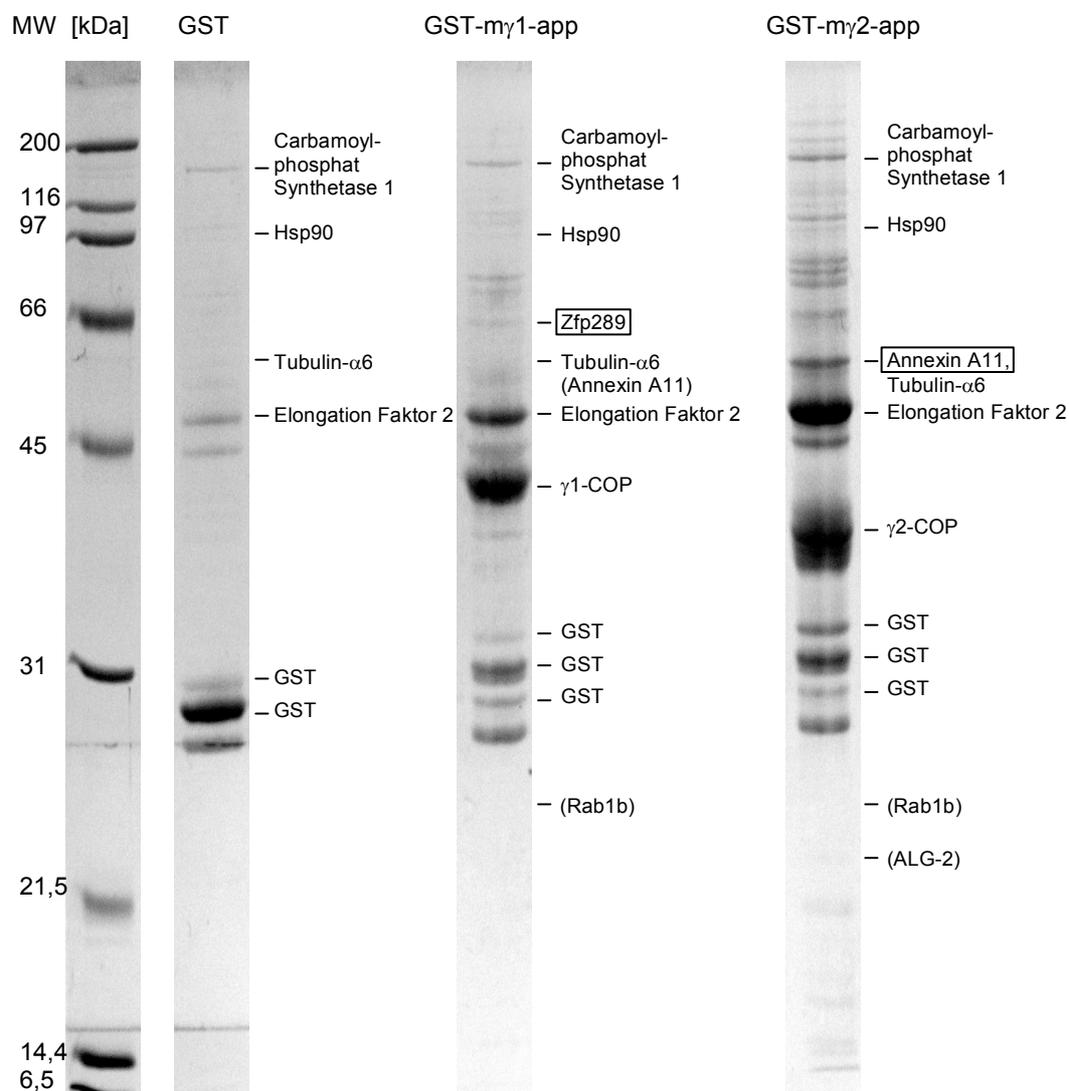


Abbildung 17: Pull-downs mit den γ 1- und γ 2-*appendage* Domänen. Gezeigt ist eine Coomassie-Färbung eines 12% PAA-Gels. Es wurden jeweils 16 mg Rattenlebercytosol mit 20 μ g der genannten GSH-gekoppelten Fusionsproteine versetzt. Angegeben sind die durch MALDI-TOF-Analyse identifizierten Proteine.

Neben Proteinen, die auch in der GST-Kontrolle gefunden wurden (Carbamoylphosphat Synthetase 1, Hsp90 und Tubulin- α 6), interagierte nur Zfp289 exklusiv mit der γ 1-*appendage*-Domäne, während Annexin A11 eine präferentielle Interaktion mit der γ 2-*appendage*-Domäne aufzeigte (**Abbildung 17**). Ferner wurde in einem Experiment Rab1b als Interaktionspartner sowohl für die γ 1- als auch die γ 2-*appendage* Domäne gefunden und ALG-2 (= *apoptosis-linked-gene 2*) als γ 2-*appendage* Bindepartner. Folgende Peptide konnten den beiden neuen Interaktionspartnern zugeordnet werden:

Tabelle 5: Identifizierte Peptide von Zfp289 und Annexin A11 der γ 1- und γ 2-*appendage* Domänen-*pull-downs* aus Rattenlebercytosol. Dargestellt sind nur die Peptide, die ohne fehlerhafte Trypsin-Spaltstelle erhalten wurden. Ox. indiziert das einfach oxidierte Peptid.

Peptid	Position	erhaltende Masse [kDa]	erwartete Masse [kDa]
Zfp289			
SLGVHLSFIR	55 – 64	1128.63	1127.62
STELDSNWSWLQLR	65 – 78	1734.88	1733.87
IRQLGSTALAR	118 – 128	1185.66	1184.65
QLGSTALAR	120 – 128	899.48	898.47
VSNQSFTEIER	235 – 245	1309.63	1308.62
LAYQELQIDR	275 – 284	1248.69	1247.68
LQNLEGG	291 – 297	801.49	800.48
LGMGLVSR	305 – 312	848.46	847.45
SQDLDFDDVGTFFASGPPK	339 – 356	1893.92	1892.91
DNPFSLGETFGSR	359 – 371	1426.72	1425.71
ISGLESSEAR	412 – 421	1048.57	1047.56
AISSDMFFGR	429 – 438	1130.53	1129.52
AISSDMFFGR (Ox.)	429 – 438	1146.51	1145.50
EVDSEYEAR	439 – 447	1097.45	1096.45
Annexin A11			
GTITDASGFDPLR	190 – 202	1349.66	1348.65
DAEVLRL	203 – 208	702.41	701.40
GFGTDEQAIIDCLGSR	213 – 228	1738.82	1737.81
SELSGNFEEK	254 – 262	1010.45	1009.44
TPVLFDVYEIK	270 – 280	1323.70	1322.69
GAGTDEACLIIEILASR	285 – 300	1675.83	1674.83
SNEHIR	301 – 306	755.39	754.38
TLEEAIR	319 – 325	831.45	830.45
SDTSGHFQR	326 – 334	1034.42	1033.42
LLISLSQGNR	335 – 344	1100.61	1099.60
DESTNVDMSLVQR	345 – 357	1493.68	1492.68
DESTNVDMSLVQR (Ox.)	345 – 357	1509.67	1508.66
DVQELYAAGENR	358 – 369	1364.63	1363.63
FNAILCSR	377 – 384	980.46	979.46
AHLVAVFNEYQR	387 – 398	1446.75	1445.74
EMSGDLEQGMLAVVK	411 – 425	1620.83	1619.83
NTPAFFAER	429 – 437	1052.48	1051.47
SELDLLDIR	460 – 468	1073.55	1072.55
SLYHDITGDTSGDYR	478 – 492	1698.76	1698.75

Um eine quantitative Aussage über die differentielle Bindung der beiden Bindungspartner zu machen, wurde ein 2% Anteil der oben gezeigten Proben durch Western Blot analysiert. Zfp289 ist bereits als Arf1-GAP beschrieben worden (Singh et al. 2001). Da es gegenwärtig

keine gegen Zfp289-gerichtete Antikörper gab, wurden statt dessen gegen ArfGAP1, ArfGAP2 und ArfGAP3 gerichtete Antikörper eingesetzt.

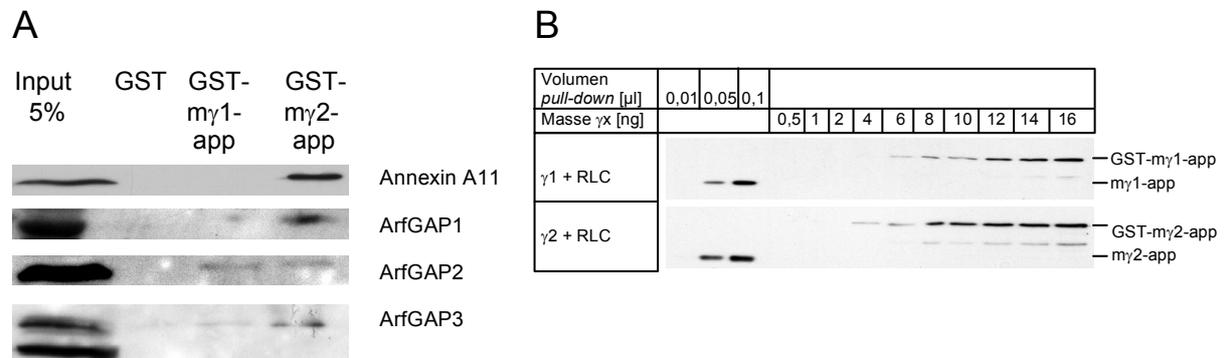


Abbildung 18: Differentielle Bindung der γ -COP appendage Interaktionspartner. In (A) wurde 2% des in **Abbildung 17** dargestellten *pull-downs* durch Western Blot-Analyse untersucht. Die eingesetzten Antikörper der Western Blot-Analyse sind **Tabelle 12** zu entnehmen. In (B) wurde die durch TEV-Protease Spaltung abgespaltene Menge der γ 1- und γ 2-appendage Domänen analysiert.

Es wurde deutlich, daß Annexin A11, ArfGAP1 und ArfGAP3 nahezu exklusive Signale bei dem γ 2-COP *pull-down* zeigten, während ArfGAP2 eine leichte Präferenz zur γ 1-appendage Domäne zeigte (**Abbildung 18 A**). Um sicherzustellen, daß vergleichbare Mengen der nach TEV-Spaltung freigesetzten *appendage*-Domänen vorlagen, wurden diese wie in obigem Abschnitt quantifiziert. Demnach sind die Mengen der freigesetzten Domänen vergleichbar (**Abbildung 18 B**: 0,05 μ l des *pull-downs* = 10 – 12 ng γ 1- oder γ 2-COP *appendage* Domäne).

Zur Verifikation der Interaktion der beiden neuen Bindepartner wurde ein reziproker *pull-down* mit rekombinantem His₆-mAnnexinA11 bzw. His₆-mZfp289 durchgeführt. Der Aufreinigungsvorgang ist im Methodenteil (Abschnitt 2.10 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen) beschrieben.

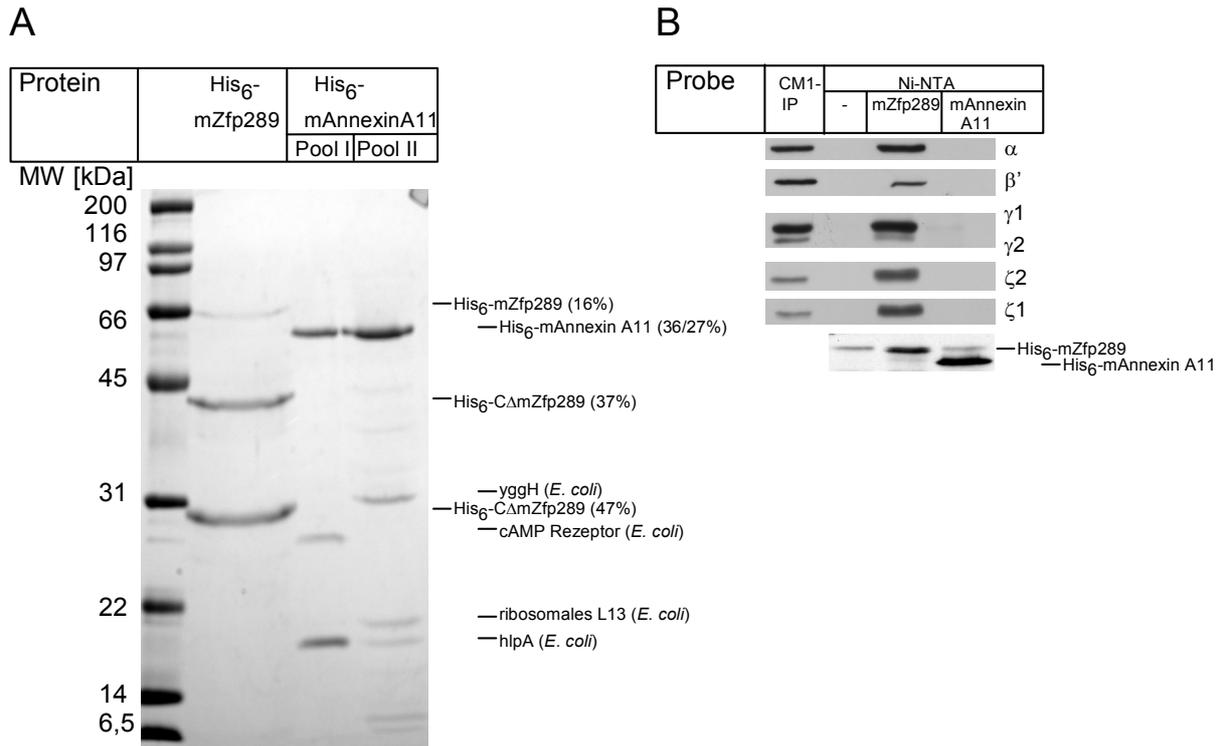


Abbildung 19: *Pull-downs* mit je 100 µg His₆-mAnnexinA11 (*Pool I*) und His₆-mZfp289 aus Rattenlebercytosol. Gezeigt ist eine Coomassie-Färbung der eingesetzten Proteine (A) und eine Western Blot-Analyse der angegebenen Coatomer-Untereinheiten (B). Die in Klammern angegebenen Werte zeigen den relativen Anteil der entsprechenden Proteinbande nach Coomassie-Färbung. Bei der CM1 Kontroll IP wurde 500 µg Rattenlebercytosol eingesetzt, bei den Ni-NTA basierten *pull-downs* jeweils 30 mg.

Die Coomassie-Färbung zeigte den Reinheitsgrad der rekombinanten Proteine. Eine Quantifizierung ergab einen Anteil von 16% für Zfp289 (Volllänge) und 36% für Annexin A11 (**Abbildung 19 A**). Eine MALDI-Analyse der Proteinkontaminationen ergab, daß die beiden Hauptkontaminationen der Zfp289-Aufreinigung C-terminalen Abbau-Produkten entsprachen. Somit handelte es sich bei der kleinsten Proteinbande um verkürztes CΔ183-Zfp289, konsistent mit einer N-terminalen His₆-basierten Aufreinigung. Bei der Annexin A11-Aufreinigung hingegen wurden ausschließlich aus *E. coli* stammende Proteinkontaminationen gefunden.

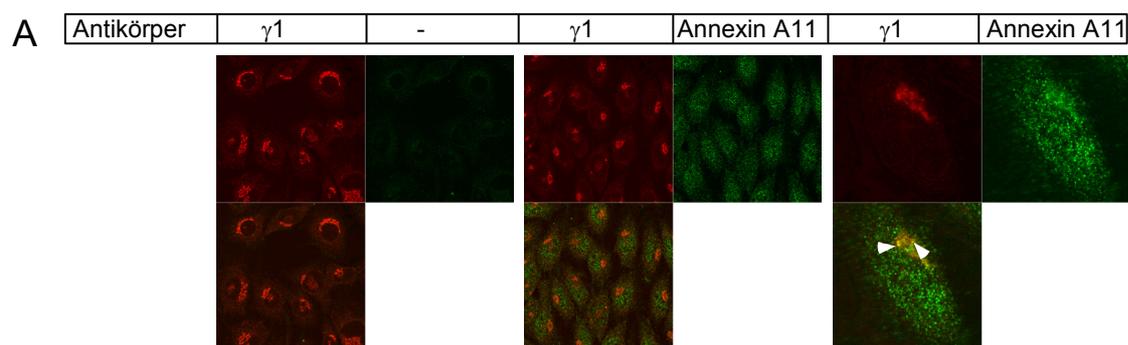
Der auf gleiche Input-Mengen der Volllänge-proteine normalisierte *pull-down* (**Abbildung 19 B**) zeigte, daß Coatomer zwar durch Zfp289 gebunden wurde, nicht aber durch Annexin A11. Durch Dekoration des Blots mit αHis₆-Antikörpern konnte die Anwesenheit der rekombinanten Proteine verifiziert werden. Eine Betrachtung der γ1- und γ2-COP Signale ließ den Schluß zu, daß auch γ2-Coatomer gebunden wurde, allerdings im Vergleich zu einer CM1-IP eine starke Präferenz für γ1-Coatomer besteht. Eine unterschiedliche Beteiligung der

ζ -COP Proteine an der Zfp289-Interaktion ist auszuschließen, da sowohl ζ 1- als auch ζ 2-COP ko-präzipitiert werden.

Zusammenfassend konnte eine neue Interaktion von γ 1-COP mit Zfp289 validiert werden, ein sicherer Nachweis einer γ 2-COP Interaktion mit Annexin A11 steht an dieser Stelle aus.

Voraussetzung einer *in vivo*-Interaktion ist die Ko-Lokalisierung der Bindungspartner. Während Zfp289 als perinukleäres Protein beschrieben ist (Singh et al. 2001), ist die Lokalisierung von Annexin A11 umstritten. Es gibt Hinweise auf eine exklusive Präsenz im Zellkern (Mizutani et al. 1992; Mizutani et al. 1993) als auch auf eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisierung (Tomas et al. 2004).

Daher wurde die subzelluläre Lokalisierung von Annexin A11 in NRK (*normal rat kidney*)-Zellen durch IF-Analyse im Vergleich zu γ 1- und γ 2-COP bestimmt. Die NRK-Zellen sollten eine gute Vergleichbarkeit zu den mit Rattenlebercytosol durchgeführten *pull-down*-Analysen ermöglichen. Da zur Detektion von Annexin A11 ein Ziege- α Annexin A11/Esel- α Ziege-Alexa 488 Antikörper System in Kombination mit einem Kaninchen- α γ -COP/Ziege- α Kaninchen-Alexa 546 Antikörper System verwendet wurde, mußte sichergestellt werden, daß es nicht zu einer Interaktion von Esel- α Ziege-Alexa 488 mit Ziege- α Kaninchen-Alexa 546 kommt. Daher wurden die Sekundärantikörper sequentiell mit zwei 10 minütigen Waschschrinen inkubiert. Um dennoch eine mögliche Interaktion auszuschließen, wurden die Primärantikörper in An- und Abwesenheit des Ziege- α Annexin A11 Antikörpers angefärbt.



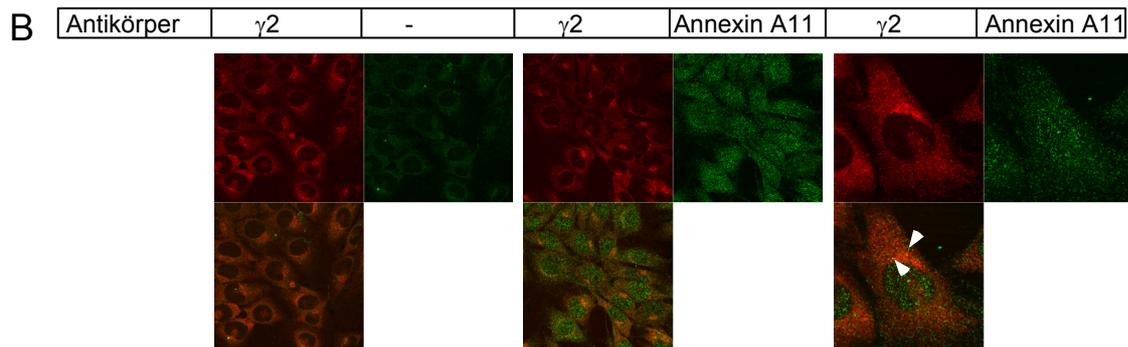


Abbildung 20: Subzelluläre Ko-Lokalisierung von Annexin A11 im Vergleich zu $\gamma 1$ - (A) und $\gamma 2$ -COP (B) in NRK Zellen. Die weißen Pfeilköpfe markieren Orte, an denen Annexin A11 mit $\gamma 1$ - oder $\gamma 2$ -COP interagieren könnte.

Es zeigte sich, daß Annexin A11 sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert ist (**Abbildung 20**). Allerdings häuft sich Annexin A11 präferentiell in bislang nicht identifizierten subzellulären Strukturen an (punktierte Färbung) (Tomas und Moss 2003). Insgesamt war hier sowohl mit $\gamma 1$ - (**Abbildung 20 A**) als auch $\gamma 2$ -COP (**Abbildung 20 B**) nur eine sehr schwache Ko-Lokalisierung in den punktuellen Strukturen zu beobachten (siehe weiße Pfeile). Demnach könnte sowohl $\gamma 1$ - als auch $\gamma 2$ -COP mit Annexin A11 *in vivo* interagieren.

2.3 Aufnahme der γ -appendage Interaktionspartner in COPI-Vesikel

Im weiteren sollte nun untersucht werden, ob die neu identifizierten Interaktionspartner in COPI-Vesikel aufgenommen werden. Dazu wurden Vesikel *in vitro* in Gegenwart von GTP γ S hergestellt und durch Saccharose-Dichtegradienten gereinigt. Die aufgetrennten Fraktionen wurden durch Western Blot auf Präsenz von Annexin A11 und ArfGAP1-3 analysiert.

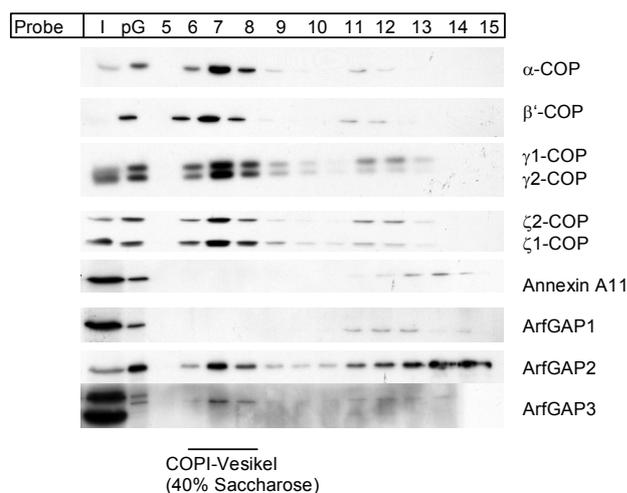


Abbildung 21: Aufnahme von Annexin A11 und ArfGAP1-3 in COPI-Vesikel. Es wurde ein 8 ml Ansatz einer *in vitro* Vesikelbiogenese ausgehend von Rattenlebercytosol und – Golgi durch einen Saccharose-Gradienten aufgetrennt und durch Western Blot auf Präsenz von Coatomer-Komponenten und der angegebenen Interaktionspartner analysiert. I bezeichnet 1% des Gesamtinputs und pG 1% des Inputs von *primed* Golgi-Membranen. Der COPI-Vesikel enthaltende Bereich entspricht den Fraktionen #6-8.

Die angegebenen COP-Marker indizierten die Präsenz sowohl von γ 1- und γ 2- als auch ζ 1- und ζ 2-COP, demnach handelte es sich bei den markierten COPI-Vesikeln um einen vollständigen COPI-Vesikelpool (**Abbildung 21**). Sowohl Annexin A11 und ArfGAP1 wurden zwar im Gesamtinput und auch bei dem *primed Golgi*-Input detektiert, nicht aber in den COPI-Vesikel enthaltenden Fraktionen. Demnach erfolgte eine Rekrutierung beider Proteine an die Golgi-Membran, allerdings machen diese keine stöchiometrische Komponente von COPI-Vesikeln aus. Im Gegensatz dazu zeigten ArfGAP2 und ArfGAP3 ein den COP-Komponenten vergleichbares Signalmuster: Beide Proteine werden in COPI-Vesikel aufgenommen.

3. Nachweis und ultrastrukturelle Lokalisierung von isotypischen γ 1 ζ 2- und γ 2 ζ 1-COPI Vesikeln

3.1 Hinweis auf homogen isotypisch umhüllte COPI-Vesikeln

Es sollte die Frage geklärt werden, ob COPI-Vesikel existieren, die nur mit einer isotypischen Coatomer-Hülle umgeben sind, oder ob die isotypischen Hüllproteine gemischt in Vesikeln vorkommen. Ferner sollte eine mögliche Isoform-spezifische, differentielle Frachtaufnahme untersucht werden. Dazu wurden COPI-Vesikel *in vitro* unter GTP γ S-Bedingungen generiert und durch γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP spezifische Antikörper immunisoliert. Das Ergebnis einer Western Blot-Analyse dieser Isolate ist in **Abbildung 22** dargestellt:

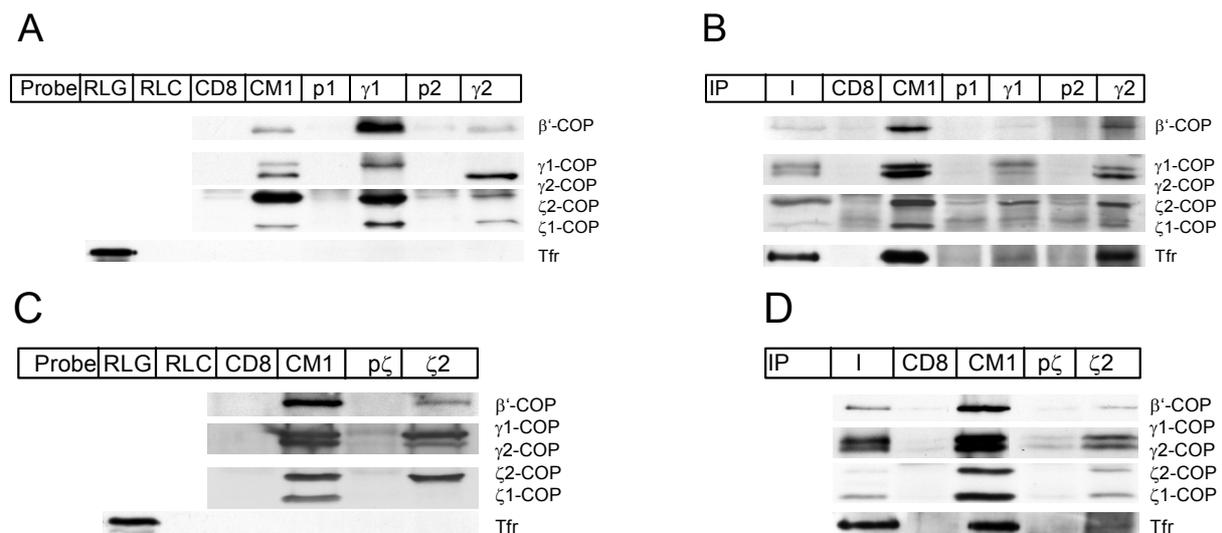


Abbildung 22: γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP spezifische Immunisolierung von COPI-Vesikeln. Ausgehend von jeweils einem 30 ml Ansatz der *in vitro* Vesikelbiogenese von Rattenlebercytosol und Rattenlebergolgi wurde der 40% (w/w) Bereich der Saccharose-Gradienten vereinigt und wie im Methodenteil beschrieben immunisoliert. In (A) und (C) wurde die Spezifität der gegen Maus-Antigene gerichteten Antikörper überprüft, wobei jeweils 500 μ g

Rattenlebercytosol eingesetzt wurde, während in (B) und (D) die Immunisolierungen von COPI-Vesikeln dargestellt sind. I bezeichnet einen 20% Input der COPI-Vesikel, während die mit CD8 und den Präimmunseren (p) durchgeführten IPs als Präzipitationskontrolle dienten (p1 für $\gamma 1$, p2 für $\gamma 2$ und p ζ für $\zeta 2$). Die $\gamma 1$ - bzw. $\gamma 2$ -spezifischen IPs wurden mit negativ affinitätsaufgereinigten Seren des 165. Tags durchgeführt. RLG bezeichnet 5 μ g Rattenlebergolgi, RLC 10 μ g Rattenlebercytosol und Tfr markiert den Transferrin Rezeptor.

Es ließen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Es zeigte sich in (**Abbildung 22 A**) und (**Abbildung 22 C**), daß die verwendeten $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP spezifischen Antikörper bei Antigenen der Ratte die gleiche Spezifität aufweisen wie bei Maus-Antigenen (vgl. **Abbildung 11** und **Abbildung 15**).
2. Der Vergleich mit den korrespondierenden Immunisolierungen von COPI-Vesikeln zeigte eine Ko-Präzipitation von $\gamma 2$ - in einer $\gamma 1$ -COP spezifischen IP und umgekehrt (**Abbildung 22 B**), ferner wurde nun auch $\zeta 1$ -COP mit einer $\zeta 2$ -COP spezifischen IP ko-präzipitiert (**Abbildung 22 D**). Die Signalstärken der Immunisolierungen lagen deutlich über denen der Präzipitationskontrollen. Dies legte nahe, daß polymerer Coatomer als Indikator für COPI Vesikel isoliert wurde (**Abbildung 22 B** und **D**), während die Spezifitätskontrollen in (**Abbildung 22 A**) und (**Abbildung 22 C**) monomeren Coatomer präzipitiert hatten. Ein Vergleich der Signalstärken der Isotyp-spezifischen IPs mit der CM1-IP von cytosolischem (**Abbildung 22 A** und **C**) und COPI-inkorporiertem Coatomer (**Abbildung 22 B** und **D**) zeigte, daß sowohl die C-terminalen *appendage*-Domänen von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP als auch der N-terminale Überhang von $\zeta 2$ -COP in COPI-Vesikeln weniger zugänglich sein muß als im cytosolischen Coatomer.
3. Bei allen drei $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP spezifischen COPI IPs wurde ein gegenüber dem Präzipitationshintergrund erhöhtes Tfr-Signal detektiert (**Abbildung 22 B** und **D**), während eine cytosolische Ko-Präzipitation von Tfr erwartungsgemäß nicht möglich war (**Abbildung 22 A** und **C**). Das Vorhandensein des Membranproteins bestätigte, daß wirklich COPI-Vesikel immunisoliert wurden. Ferner zeigt eine IP mit α - $\gamma 2$ -COP ein erhöhtes Tfr-Signal bei vergleichbaren $\gamma 1/\gamma 2$ -COP Signalen in Relation zu der $\gamma 1$ -COP IP. Möglicherweise kommt es unter GTP γ S-Bedingungen zu einer $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP determinierten Tfr-Aufnahme in COPI-Vesikeln.
4. Die Berücksichtigung des Signalverhältnisses von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP bei den Inputs im Vergleich zu den $\gamma 1$ - oder $\gamma 2$ -COP spezifischen IPs legte nahe, daß es unter GTP γ S-Bedingungen zu einer präferentiellen Polymerisierung von $\gamma 1$ - oder $\gamma 2$ -Coatomer in

COPI-Vesikeln kam (**Abbildung 22 B**). Dies traf ebenfalls auf die ζ 2-COP IP zu, denn auch hier wurde ζ 2-COP relativ zu ζ 1-COP im Vergleich zum Input angereichert (**Abbildung 22 D**). Die verwendete Methode erlaubte aber keine weitere Unterteilung der γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP enthaltenden COPI-Vesikel. Somit sind gemischte COPI-Vesikelpopulationen denkbar, die, wie die vier Coatomer-Isotypen, durch exklusives Auftreten der Isoformen bestimmt sind. Ferner kann es auch Vesikel mit statistischer Isotyp-Inkorporation geben. Allerdings müßten letztere einen geringen Anteil ausmachen.

5. Bei der IP mit α - γ 1-COP konnte kein ζ 1-COP Signal beobachtet werden (**Abbildung 22 B**). Dies ließ vermuten, daß keine oder nur sehr wenig γ 1 ζ 1-Isotyp enthaltende COPI-Vesikel isoliert wurden, es handelte sich also primär um γ 1 ζ 2-COPI Vesikel. Eine IP mit α - γ 2-COP zeigte ein im Vergleich zum Input konstantes ζ 1/ ζ 2-COP Signalverhältnis bei einer relativen Abnahme von γ 1- zu γ 2-COP, was eine Immunisolierung von hauptsächlich γ 2 ζ 1- und γ 2 ζ 2-COPI Vesikeln nahelegte. Allerdings waren die Signalintensitäten von γ 1- und ζ 2-COP bei der γ 1- und der γ 2-COPI IP vergleichbar, während gleichzeitig eine Erhöhung des γ 2- und ζ 1-COP Signals beobachtet werden konnte. Demnach stammte das ζ 2-COP Signal vermutlich aus ko-immunpräzipitiertem γ 1-COP. In diesem Fall sind primär γ 2 ζ 1-COPI Vesikel immunisoliert worden.
6. Bei einer Immunisolierung von ζ 2-COP im Vergleich zum Input wurde ζ 1-COP relativ zu ζ 2-COP abgereichert. Sowohl der Input als auch die IP mit α - ζ 2-COP zeigten ein vergleichbares γ 1/ γ 2-COP Verhältnis (**Abbildung 22 D**). Somit handelte es sich um γ 1 ζ 2/ γ 2 ζ 2-Coatomer enthaltende Vesikel. Die Ko-Präzipitation von ζ 1-COP bei der IP von ζ 2-COP sollte durch Einbau von γ 2 ζ 1-Coatomer in diesen Vesikeln bedingt sein.

Eine Quantifizierung der γ 1/ γ 2- und ζ 1/ ζ 2-COP-Signalverhältnisse von IPs mit γ 1- bzw. γ 2-COP Antikörpern im Vergleich zum Input bestätigten obige Annahmen, wie in **Abbildung 22** gezeigt ist:

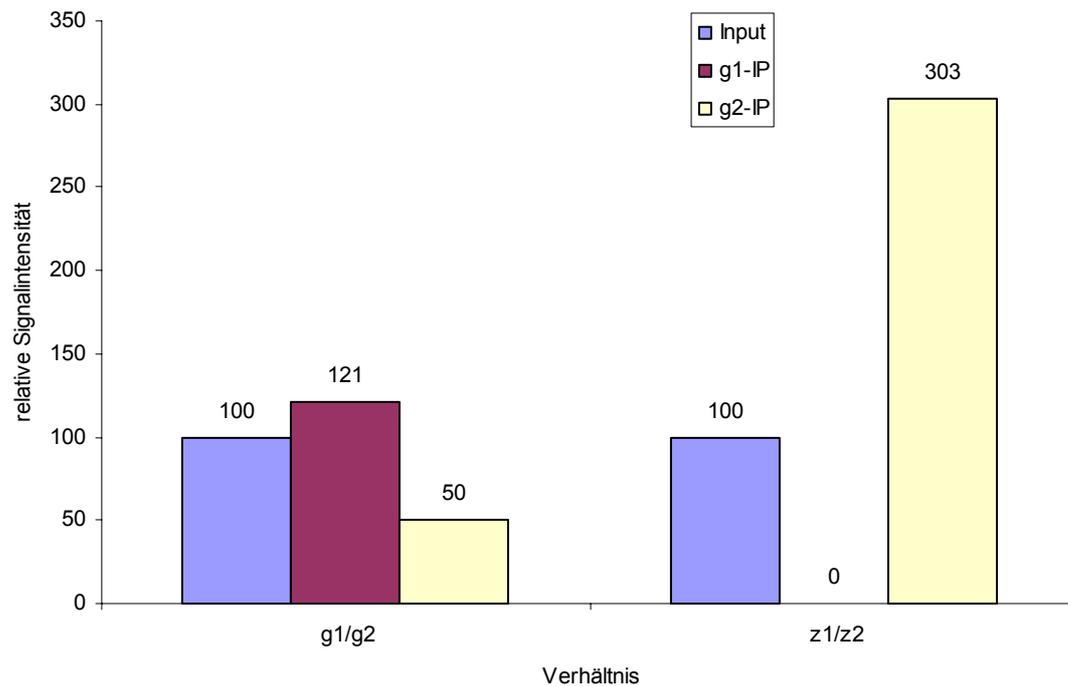
Quantifizierung des $\gamma 1/2$ und $\zeta 1/2$ -Verhältnisses von COPI $\gamma 1/2$ -IP Isolaten

Abbildung 23: Quantifizierung der Signalverhältnisse von $\gamma 1/2$ - und $\zeta 1/2$ -COP in IPs von COPI-Vesikeln mit Antikörpern gegen $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP. Die Signalintensitäten aus **Abbildung 22** wurden durch die Software ImageJ V1.34h (NIH, USA) unter Berücksichtigung des Signalhintergrunds bestimmt. Angegeben sind die relativen Signalverhältnisse im Vergleich zum COPI-Vesikelinput.

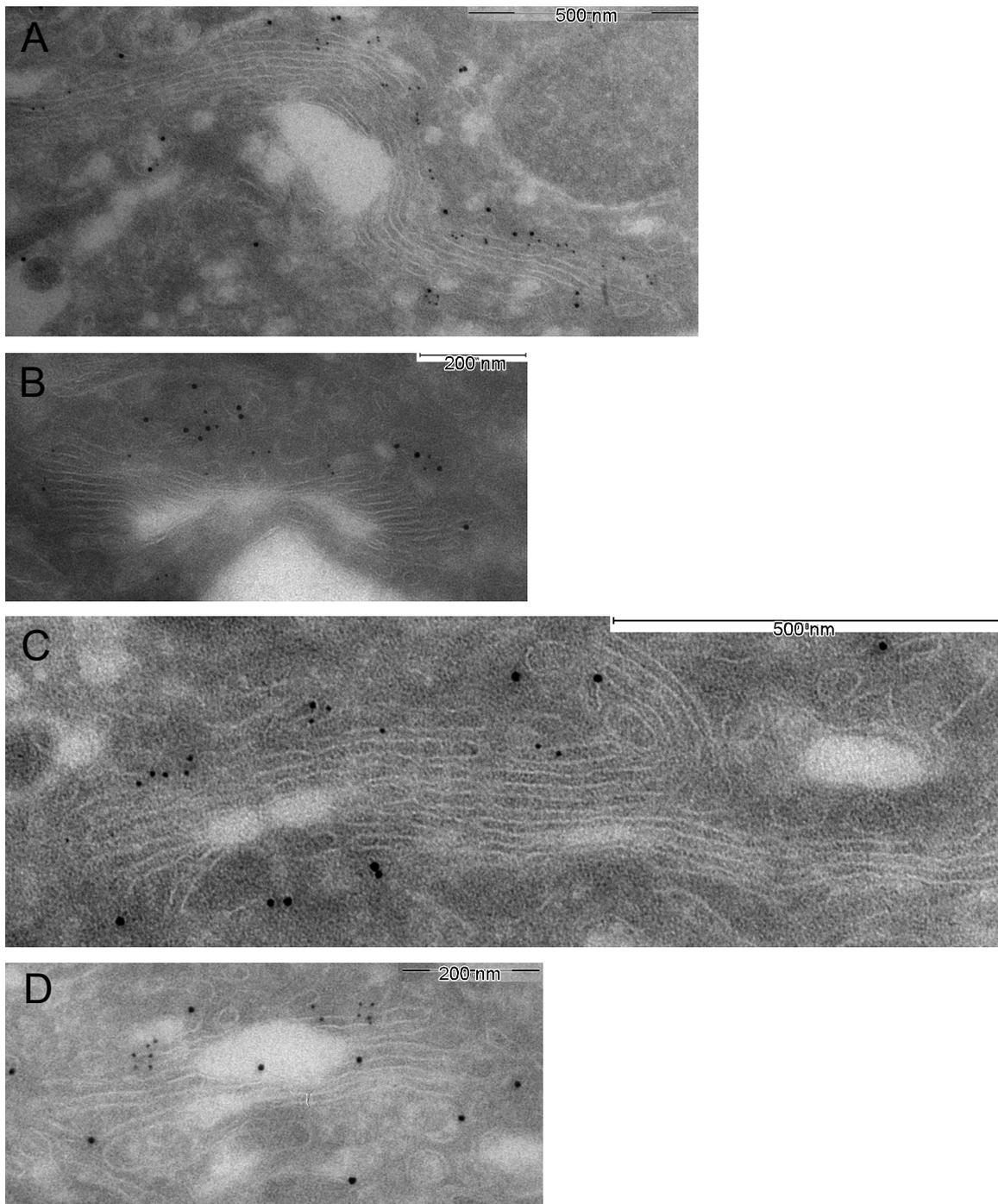
Es läßt sich zusammenfassen, daß bei den $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP spezifischen Immunsolierungen von COPI Vesikeln primär $\gamma 1\zeta 2$ -, $\gamma 2\zeta 1$ - und $\gamma 1\zeta 2/\gamma 2\zeta 2$ COPI-Vesikel immunisoliert wurden (siehe **Abbildung 22** und **Abbildung 23**). Die Isolierung von Vesikeln wurde durch zwei Effekte indiziert: Es kommt zur Ko-Präzipitation der jeweils anderen Isoform, demnach ist polymerer Coatomer isoliert worden. Ferner kann transmembrane Proteinfraucht (Tfr) ko-immunpräzipitiert werden.

Es könnte sich aber auch durch eine IP-bedingte Überrepräsentation der immunpräzipitierten Komponente handeln. Zur weiteren Klärung wurde eine Analyse der ultrastrukturellen Lokalisierung von COPI-Vesikeln durch Elektronenmikroskopie durchgeführt.

Zusammenfassend wurden an dieser Stelle deutliche Hinweise auf mindestens zwei dominanten COPI Vesikelpopulationen mit unterschiedlichen Coatomer-Isotypen und unterschiedlicher Frachtaufnahme erarbeitet, ein zwingender Beweis steht jedoch noch aus.

3.2 Ultrastrukturelle Lokalisierung von γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP

Es sollte die ultrastrukturelle Lokalisierung von γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP bestimmt werden. Dazu wurden NRK-Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP dekoriert. Die Lage dieser Antikörper wurde durch Gold-markiertes Protein A im Elektronenmikroskop analysiert. Zur Unterscheidung der *cis/trans*-Orientierung des Golgi-Apparates wurden GM130 Antikörper verwendet, die den *cis*-Golgi markieren. Entsprechend behandelte, ultradünne Kryoschnitte von NRK Zellen sind in **Abbildung 24** dargestellt:



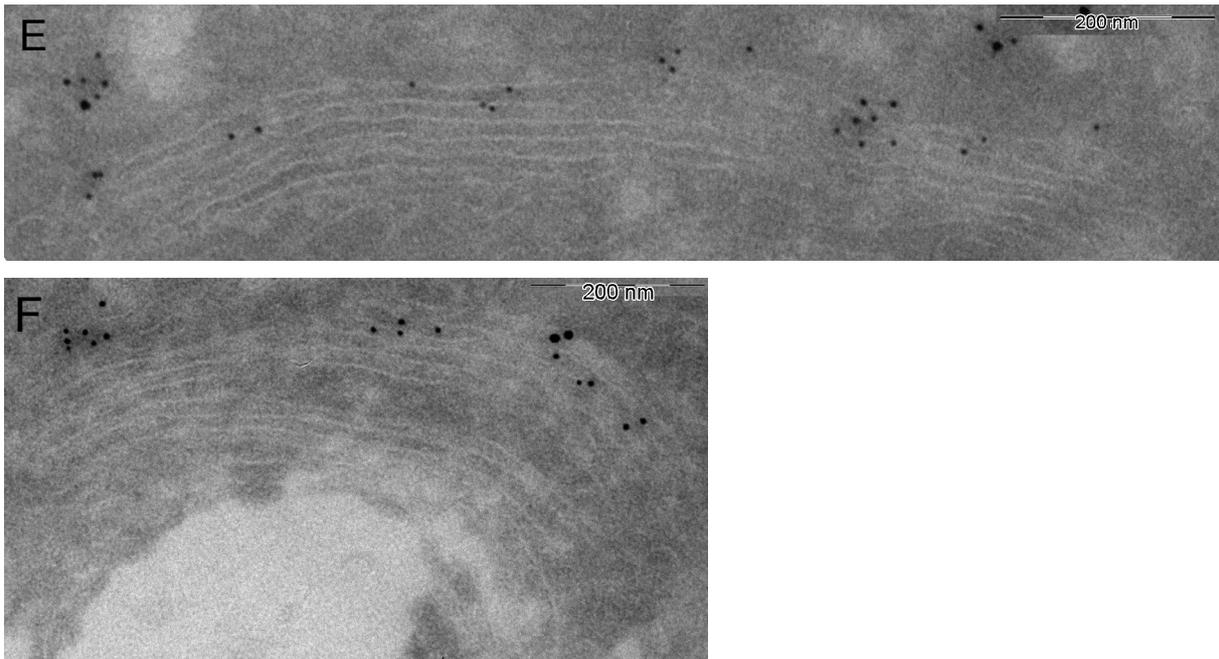
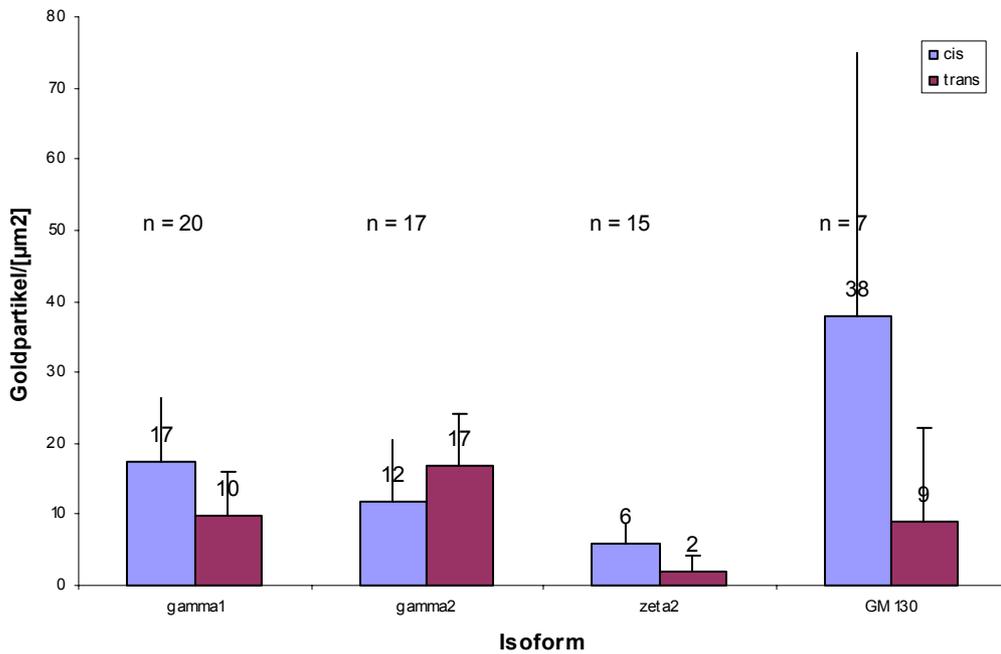


Abbildung 24: Ultrastrukturelle Lokalisierung von γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP (15 nm Goldpartikel). Zur Detektion von γ 1-COP wurde das negativ-affinitätsaufgereinigte r1.1 Serum des 165. Tages verwendet (A + B), γ 2-COP wurde durch ebenso behandeltes r2.2 Serum markiert (C + D) und die Analyse von ζ 2-COP erfolgte durch affinitätsaufgereinigtes ζ 2-gp/G442-Serum (E + F). Gezeigt sind repräsentative Ultradünnschnitte von NRK Zellen. Der *cis*-Golgi wurde durch Antikörper gegen GM130 markiert (10 nm Goldpartikel).

Es wurde deutlich, daß γ 1- (**Abbildung 24 A + B**) und ζ 2-COP (**Abbildung 24 E + F**) präferentiell mit dem *cis*-Golgi-Marker ko-lokalisierten, während γ 2-COP keine Ko-Lokalisierung aufzeigte (**Abbildung 24 C + D**). Im weiteren wurde diese qualitative Aussage durch Auszählen der 15 nm-Goldpartikel quantifiziert. Dazu wurde der Golgi-Apparat in zwei Hälften (*cis* und *trans*) unterteilt, wobei die *cis*-Seite durch GM130 festgelegt wurde. Die ausgezählten Goldpartikel konnten so der *cis*- oder *trans*-Seite zugeordnet werden. In einem weiteren Schritt wurde dann die Fläche des Golgi-Apparates aufgrund der eingeblendeten Skala durch die Software ImageJ V1.34h (NIH, USA) berechnet, so daß eine Normalisierung der Anzahl der Goldpartikel auf eine Fläche von $1 \mu\text{m}^2$ möglich war. Es ergab sich die in **Abbildung 25** dargestellte Verteilung:

A

cis/trans-Verteilung der Coatomer-Isoformen



B

Verteilung der Golgi-Apparate hinsichtlich der Isoform-Markierungsdichten

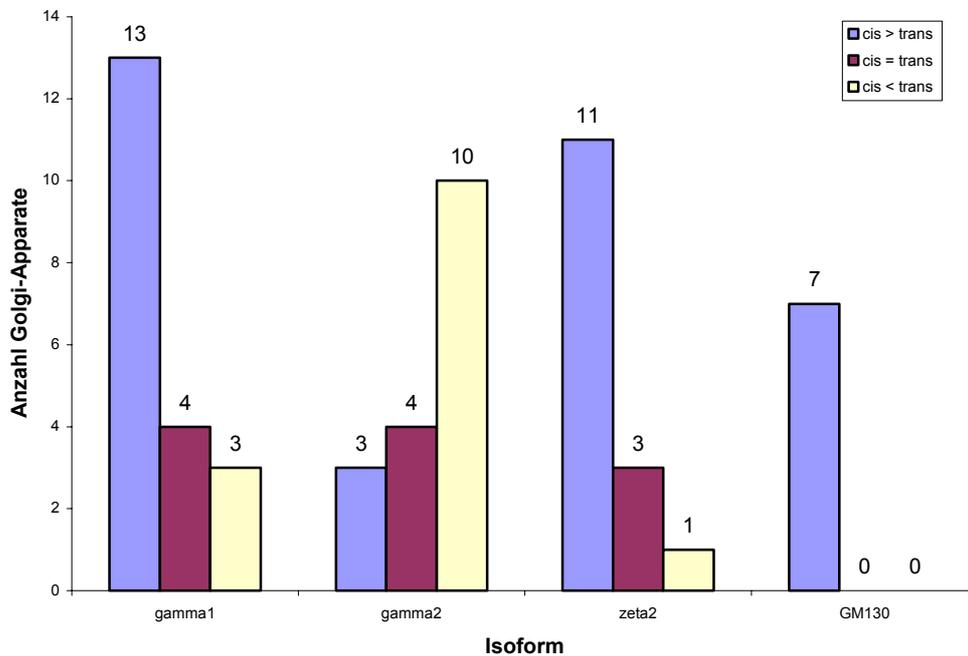


Abbildung 25: Quantifizierung der ultrastrukturelle Lokalisierung von $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP. Der Golgi-Apparat wurde in zwei Hälften unterteilt, wobei die *cis/trans*-Orientierung durch den *cis*-Golgi-Marker GM130 festgelegt wurde. Um eine Vergleichbarkeit einzelner Bilder einer Isoform zu gewährleisten, wurden die ausgezählten Goldpartikel auf eine Fläche von $1 \mu\text{m}^2$ normalisiert. Die Fläche wurde durch die Software ImageJ V1.34h (NIH, USA) aufgrund eingblendeter Skalen errechnet. n gibt die Anzahl ausgezählter Golgi-Apparate an (A). In (B) ist die *cis/trans*-Verteilung der Markierungsdichten in den untersuchten Golgi-Abschnitten wiedergegeben.

Während γ 1- und ζ 2-COP eher der *cis*-Seite zugeordnet werden konnten, fand sich γ 2-COP hauptsächlich auf der *trans*-Seite des Golgi-Apparates (**Abbildung 25** A und B). Da die einzelnen Untereinheiten von Coatomer nur in verschwindend kleinen Mengen vorkommen (siehe **Abbildung 12**), zeigen diese Daten eine hauptsächlich *cis*-Golgi-Lokalisierung von γ 1 ζ 2-Coatomer und eine *trans*-Golgi-Lokalisierung von γ 2-Coatomer. Dieser Befund erhärtete die obige Annahme von Vesikelpopulationen, die bevorzugt mit γ 1 ζ 2- oder mit γ 2 ζ 1-Coatomer umhüllt sind. Aufgrund statistischer Inkorporation von γ 1/ γ 2-COP in COPI-Vesikeln wären nämlich keine Gradienten über den Golgi-Apparat denkbar.

Aufgrund dieser Daten könnten aber im medialen Golgi-Bereich COPI-Vesikel postuliert werden, in denen γ 1- und γ 2-COP ko-lokalisieren. Dies wäre konsistent mit dem Befund, daß γ 1- und γ 2-COP in COPI-Vesikeln ko-immunpräzipitiert werden können.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, daß verschiedene isotypische Coatomer-Spezies ungleich über den Golgi-Apparat verteilt sind. Dies ist ein zusätzlicher starker Hinweis auf unterschiedliche Funktionen isotypischer COPI-Vesikel.

4. Generierung von monoklonalen, Epitop-markierten $h\gamma$ 1- und $h\gamma$ 2-COP exprimierenden Zelllinien

Im weiteren sollten monoklonale Zelllinien generiert werden, die unterschiedlich Epitop-markiertes γ 1- bzw. γ 2-COP regulierbar exprimieren. Damit *loss-of-function*-Studien durch die RNAi-Technologie, einer auf mRNA-Abbau basierende Methode, möglich sind, wurde humanes γ 1- und γ 2-COP in eine 3T3/NIH Mauszelllinie gebracht. Bei vergleichbarer Aminosäuresequenz-Identität von γ 1- und γ 2-COP zwischen Maus und Mensch (97% und 98%) ist die DNA-Sequenz-Identität geringer (89% und 91%). Dies sollte die Resistenz der exogenen, humanen Proteine gegenüber gegen Maus-gerichtete RNAi-Ansätze sicherstellen. Ferner sollten die eingeführten N-terminalen Epitop-Markierungen (HA und Myc) in Verbindung mit HA- und Myc-spezifischen Antikörpern biochemische und zellbiologische Analysen ermöglichen. Dadurch würde eine Alternative zu den bereits etablierten C-terminalen *appendage*-Domänen spezifischen Antikörpern entstehen (siehe Abschnitt 1. Gewinnung von Antikörpern gegen $m\gamma$ 1- und $m\gamma$ 2-COP).

Zunächst sollte ein retroviral transduzierbares Plasmid hergestellt werden, das die regulierbare bicistronische Expression von Epitop-markiertem humanen γ 1- bzw. γ 2-COP (HA- $h\gamma$ 1- und

Myc-hy2-COP) in Verbindung mit einem Zelloberflächen-Marker für vereinfachte präparative FACS-Vereinzelung in Eukaryonten erlaubte. In einem zweiten Schritt wurden dann 3T3/NIH Maus-Fibroblasten damit transduziert. Um eine homogene Expression und den Einbau der exogenen Proteine in endogenen Coatomer zu gewährleisten wurden die Zellen vereinzelt und Expressionsbedingungen etabliert.

4.1 Klonierung des Basisplasmids pRevTRE2-IRES (pRTi)

Als Basis-Plasmid wurde pRevTRE2 verwendet, in das über *Bam*HI/*Cla*I ein IRES-Element, flankiert von zwei multiplen Klonierungsstellen (MCS A und B), eingebracht wurde. Dieses Plasmid wird im weiteren als pRTi bezeichnet. Die Amplifikation des IRES Elements erfolgte durch das Primerpaar MCS A (*Bam*HI, *Mlu*I, *Pac*I)/MCS B (*Fse*I, *Sbf*I, *Cla*I). Als PCR-Templat wurde das Plasmid pIRES (Clontech, Heidelberg) verwendet. Um in beide multiplen Klonierungsstellen eingebrachte Abschnitte sequenzieren zu können, wurden die Oligonukleotide MCS A 5'/3' bzw. MCS B 5'/3' verwendet.

4.2 Einführung von Oberflächenmarkern: CD4 und CD8

Im weiteren wurde die für zwei unterschiedliche Zelloberflächen-Marker (CD4 und CD8) kodierende DNA über die Restriktionsenzyme *Fse*I/*Cla*I in die zweite, dem IRES-Element nachfolgende MCS B inseriert. Bei der PCR wurden die Primerpaare CD4 5' *Fse*I/CD4 3' *Cla*I bzw. CD8 5' *Fse*I/CD8 3' *Cla*I eingesetzt. Dadurch wurden neben den genannten Restriktionsschnittstellen auch eine eukaryontische Ribosomen-Bindestelle (Kozak-Sequenz: GCCGCCACCATGG, wobei ATG das Startcodon darstellt) eingebracht. Als Vorlage wurden die Plasmide pBI-CD4 und pCMUIV-CD8 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Vas Ponnambalam) verwendet. Beide Zelloberflächen-Marker sind humanen Ursprungs und stellen um ihre cytoplasmatische Domäne verkürzte Proteine dar, wobei als CD8 hier und im weiteren lediglich die α -Polypeptid-Kette des heterodimeren CD8 Komplexes bezeichnet wird (CD4: *accession number* M12807; CD8: *accession number* NM_001768). Es resultierten die als pRTi 04 und pRTi 08 benannten Plasmide.

4.3 Einführung der Epitop-markierten γ -COP-Gene: HA-hy1 und Myc-hy2

Im zweiten Schritt sollten die kodierenden Sequenzen von humanem, Epitop-markierten γ 1-COP bzw. γ 2-COP in die erste, dem IRES-Element vorstehende, MCS A eingebracht werden.

a) Gewinnung der kodierenden Sequenzen von $hy1$ - und $hy2$ -COP

Dazu mußte zunächst mRNA aus Hela-Zellen isoliert werden, die dann in einem zweiten Schritt in doppelsträngige cDNA revers transkribiert wurde. Diese cDNA wurde dann als Templat zur Gewinnung der kodierenden Sequenzen von $hy1$ - und $hy2$ -COP eingesetzt. Es wurden die Primerpaare g1 5' UTR/g1 3' UTR bzw. g1 5' UTR/g1 3' UTR verwendet, wobei insbesondere der unterschiedliche untranslatierte Bereich (UTR) zur Primerbindung herangezogen wurde, um die kodierende Sequenz von $hy1$ - und $hy2$ -COP (73% Identität) eindeutig unterscheiden zu können. Die PCR-Amplikons wurden nach *Bam*HI/*Nde*I-Verdau in pET15b eingebracht. Positive Klone wurden mit den Standardprimern T7 Promoter und T7 Terminator ansequenziert. Die vollständige Sequenzierung, die aufgrund der Größe der kodierenden Sequenzen von ca. 2,7 kbp nicht mit den Standardprimern möglich war, erfolgte mit $hy1$ - bzw. $hy2$ -COP spezifische Sequenzierprimer (hinterlegt bei GATC, Konstanz). Im Vergleich zur Literatur (Blagitko et al. 1999; Futatsumori et al. 2000) ergaben sich dabei folgende Unterschiede:

Tabelle 6: Unterschiede der gewonnenen $hy1$ - und $hy2$ -COP cDNA-Sequenzen zur Literatur.

$hy1$ (accession number: AB047846)	$hy2$ (accession number: AF157833)
stille Mutationen: T663C, C1416T	stille Mutationen: G1656A, T1974C
	Insertion: 1971 TTC CAG CTT TTC CAT TTA CTG ACT (DNA)
	F Q L F H L L T (aa)

Die 24 bp Insertion in $hy2$ -COP an Stelle 1971 zeigte keinerlei Sequenzhomologien zu Sequenzen von $\gamma2$ -COP anderer Spezies, daher lag die Schlußfolgerung nahe, daß es sich hierbei, wie auch bei den stillen Mutationen, um Modifikationen handelt, die aus der fortwährenden Passage der Hela Zellen resultieren. Somit wurde die Insertion durch PCR-basiertes Spleißen (Megaprimer PCR, siehe **Abbildung 40**) entfernt. Das Endprodukt der Megaprimer PCR wurde dann in das pCR-Blunt-Plasmid ligiert.

b) Epitop-Markierung und Einführung von stillen Mutationen

Weiterhin sollten beide Isoformen eine individuelle Epitop-Markierung erhalten. Für $hy1$ -COP wurde das HA-Epitop und für $hy2$ -COP das Myc-Epitop gewählt.

Tabelle 7: Unterschiedliche Epitop-Markierung von $hy1$ - und $hy2$ -COP.

	HA	Myc
Aminosäure-Sequenz	YPYDVPDYA	EQKLISEEDL
Klon-Bezeichnung	4C12	9E10

Ferner wurden stille Mutationen eingeführt, um Resistenz gegenüber RNAi-basierten Methoden zu gewährleisten. Die eingeführten Mutationen sind in **Tabelle 8** aufgeführt:

Tabelle 8: In *hy1*- und *hy2*-COP eingeführte, stille Mutationen.

<i>hy1</i> (accession number: AB047846)	<i>hy2</i> (accession number: AF157833)
G24A	G24A, C27T, A1116G, G1122A

Die Mutationen an den Positionen 1116 und 1122 mussten durch eine Positions-spezifische Mutagenese eingeführt werden. Die Stellen 24 und 27 konnten durch eine Standard-PCR mit modifizierten *sense*-Primern mutagenisiert werden.

a) HA-*hy1*-COP

Das HA-Epitop und die G24A-Mutation wurden durch zwei aufeinanderfolgende PCR eingeführt. Ausgehend von pET15b-*hy1* als Vorlage wurde dabei in einer ersten PCR der 5'-Bereich von *hy1*-COP partiell durch den *sense* Primer PreHAg1h 5' in Kombination mit dem *antisense*-Primer HAg1h 3' (*PacI*) verlängert. Nach PCR-Aufreinigung des Amplikons wurde dieses als Vorlage bei einer zweiten PCR eingesetzt, wobei der *antisense*-Primer beibehalten wurde, während als *sense* Primer HAg1h 5' (*BamHI*) verwendet wurde. Das Produkt wurde dann in das Plasmid pCR-Blunt ligiert, wobei positive Klone über einen *BamHI/PacI* Restriktionsverdau identifiziert wurden (pCR-Blunt-HA-*hy1*-BP).

b) Myc-*hy2*-COP

Ausgehend von pCR-Blunt-*hy2* wurden die Positionen 1116 und 1122 von *hy2*-COP durch Positions-spezifische Mutagenese durch das Primerpaar g2h* *sense* L/g2h* *anti sense* L modifiziert. Das so modifizierte *hy2*-COP wurde dann in einer PCR mit dem Primerpaar g2h 5' (*NdeI*)/Mycg2h 3' (*PacI*) mit den genannten Schnittstellen versehen. Ferner wurde das Oligonucleotidpaar Myc For (*BamHI*, *NdeI*)/Myc Rev (*BamHI*, *NdeI*) hybridisiert und in das *BamHI/NdeI*-geschnittene pETDuet-1-Plasmid ligiert. Das resultierende pETDuet-1-Myc-Plasmid wurde dann wie auch *hy2*-COP mit *NdeI/PacI* verdaut. Nach Ligation ergab sich das gewünschte Konstrukt pETDuet-1-Myc-*hy2*-BP.

Letztlich wurden die beiden genannten Konstrukte mit *BamHI/PacI* verdaut und in die Plasmide pRTi 04 und pRTi 08 gebracht, so daß sich die finalen Plasmide pRTi HA-*hy1*-CD8 (pRTi 18) und pRTi Myc-*hy2*-CD4 (pRTi 24) ergaben (**Abbildung 26**):

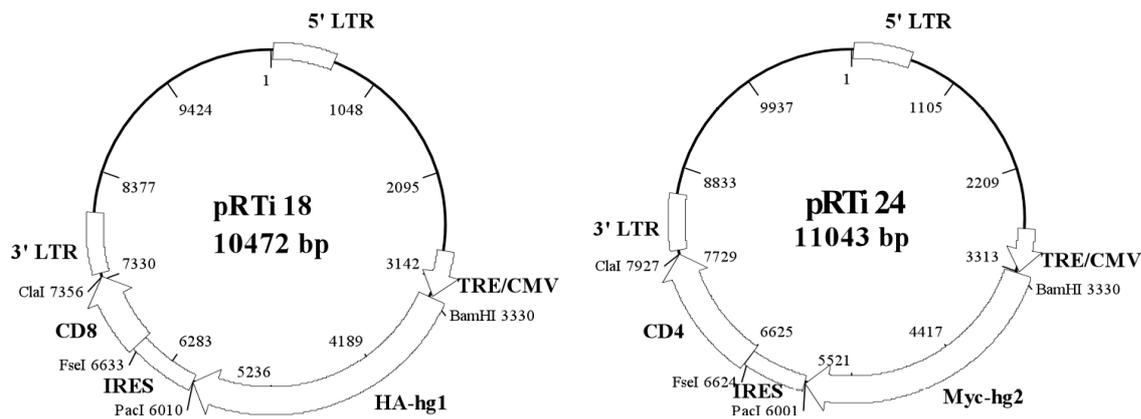


Abbildung 26: Plasmid-Karten der retroviral transduzierbaren Plasmide pRTi 18 und pRTi 24. Neben den relativen Positionen der zu exprimierenden Gene HA-hy1, Myc-hy2, CD4 und CD8 sind funktionelle Elemente wie der Dox-abhängige Promotor (TRE/CMV), das IRES-Element und die beiden zur viralen Replikation notwendigen LTRs eingezeichnet.

Die Plasmide pRTi 18 und pRTi 24 bzw. pRTi 08 und pRTi 04 als Kontrollen wurden durch retrovirale Transduktion in 3T3/NIH-rtTA-M2-CD2 Zellen gebracht (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Dirk Görlich, rtTA-M2 beschrieben in (Urlinger et al. 2000)). Diese Zelllinie wird im weiteren als 3T3 bezeichnet und wurde aus folgenden Gründen verwendet:

- Das Maus-Genom ist vollständig entschlüsselt, somit lagen Sequenzinformationen über die beteiligten Proteine vor, was geplante RNAi-Studien vereinfachen sollte.
- Es handelt sich um Fibroblasten. Aufgrund deren ausgebreiteter Struktur sind diese günstig in IF-Studien.
- Es handelt sich um eine ζ 2-enthaltende Zelllinie.
- Die Herstellung der transgenen rtTA-Zelllinie war nicht mehr notwendig.

Die Analyse der Transduktions-Effizienz erfolgte durch FACS-Analyse unter Verwendung von CD4 und CD8-spezifischen Antikörpern und lag üblicherweise zwischen 5 – 40% bei allen Ansätzen. Die Transduktions-Effizienz der Kontrollansätze mit pRTi 04 und pRTi 08 war meist größer als die der korrespondierenden, zusätzlich γ 1- oder γ 2-COP enthaltenden Plasmide. Dieser Effekt ist vermutlich auf die unterschiedlichen Plasmidgrößen zurückzuführen, da kleinere DNA-Abschnitte besser in die retroviralen Partikel verpackt werden können als große.

4.4 Vereinzelung der polyklonalen Zelllinien

4.4.1 FACS-basierte Vereinzelung HA-hy1 bzw. HA-hy1/Myc-hy2 transduzierter Zellen

Um eine gute Doxycyclin (Dox)-abhängige Schaltbarkeit der HA-hy1- bzw. Myc-hy2-Proteine zu gewährleisten, wurden drei präparative FACS-Schritte durchgeführt. Bei jedem Schritt wurden 50.000 Zellen isoliert. Der erste (*Pool I*) und der dritte Schritt (*Pool III*) diente dem Isolieren von CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen nach 24 h Inkubation in Gegenwart von 1 µg/ml Dox. Durch den ersten Schritt wurden alle positiv transduzierten Zellen isoliert, während durch den dritten Schritt eine wiederholte Anschaltbarkeit gewährleistet wurde. Im zweiten Schritt (*Pool II*) wurden Zellen sortiert, die in Abwesenheit von Dox einen CD4⁻- bzw. CD8⁻-Phänotyp zeigten. Dieser Schritt sollte eine stringente Abhängigkeit der Dox-abhängigen Induktion sicherstellen. Um monoklonale Zellkulturen zu erhalten, wurden parallel zum dritten FACS-Schritt Einzelzellen in 96-Loch-Platten ausgesät und dann einzeln expandiert.

In **Abbildung 27** ist der Verlauf der zunächst mit pRTi 18 und danach mit pRTi 24 transduzierten, FACS-isolierten Zellen dargestellt. Die Immunfluoreszenzen wurden mit rHA- und mMyc-Antikörpern durchgeführt, bei der FACS-Analyse wurden Hybridom-Überstände von Okt4- und Okt8-Zellen verwendet. Nach jeder Transduktion wurden die drei beschriebenen präparativen FACS-Schritte durchgeführt.

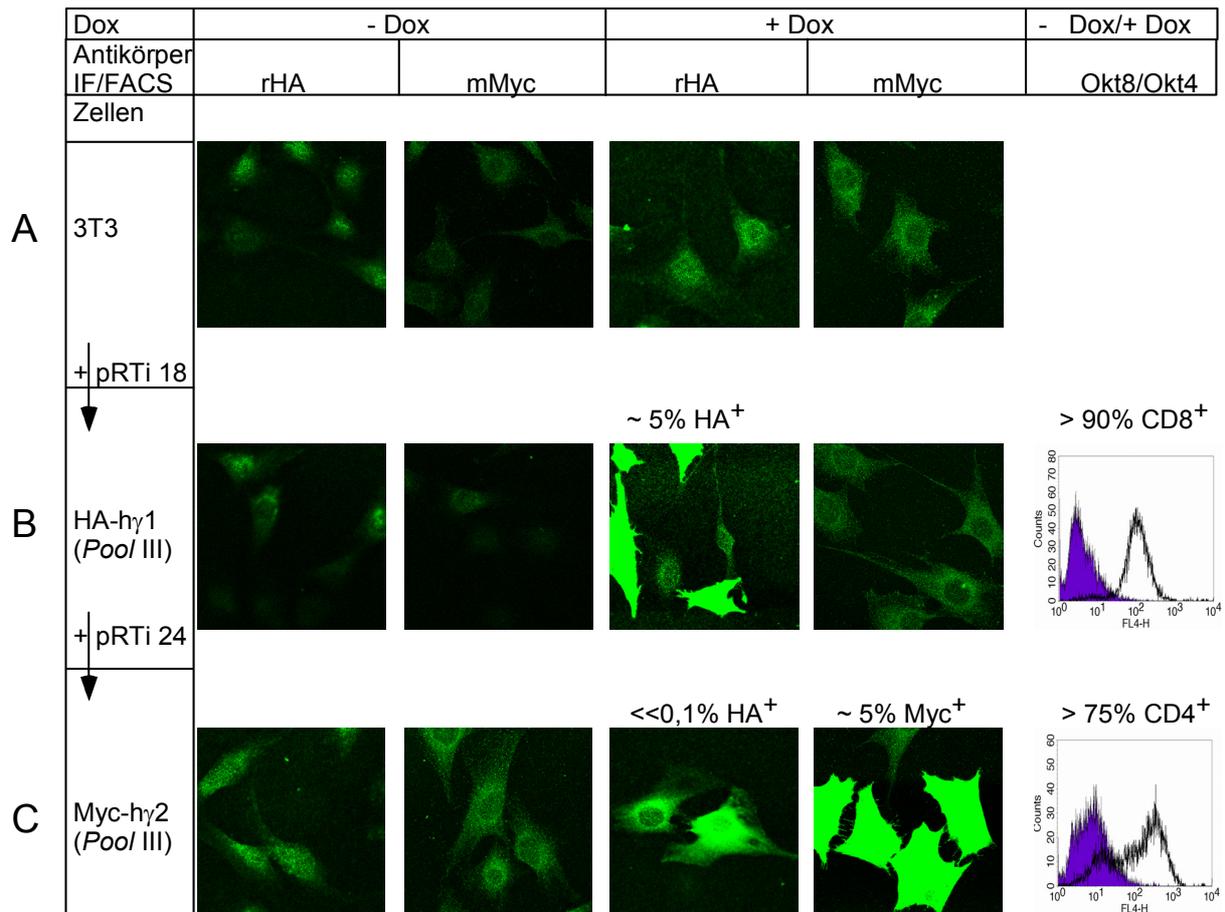


Abbildung 27: Verlauf der FACS-basierten Klonierung. 3T3-Zellen (A) wurden zunächst mit dem Plasmid pRTi18 (B) und dann mit dem Plasmid 24 (C) transduziert. Dargestellt ist die Analyse der *Pool III*-Zellen in An- und Abwesenheit von Dox durch IF-Färbung (HA/Myc) und durch FACS-Histogramme (CD8 und CD4). Die Signale der IF wurden auf den Hintergrund der HA/Myc-Färbung der nicht transduzierten Zellen (3T3) normiert. Die gezeigten Ausschnitte der angeschalteten HA-hy1 bzw. Myc-hy2-Zellen sind nicht repräsentativ bzgl. des Anteils der HA- bzw. Myc-positiven Zellen. Im FACS-Histogramm sind nicht angeschaltete Zellen als blaue und die angeschalteten Zellen als weiße Hüllkurve dargestellt.

Die finalen (*Pool III*) HA-hy1/CD8-Zellen waren $\sim 5\%$ HA⁺ und $> 90\%$ CD8⁺ (**Abbildung 27 B**) und die Myc-hy2/CD4-Zellen waren $\sim 5\%$ Myc⁺ und $> 75\%$ CD4⁺ (**Abbildung 27 C**). Diese Vorgehensweise führte nicht zum gewünschten Ergebnis, da die finalen Zellen zwar eine Schaltbarkeit der Oberflächenmarker CD4 und CD8 aufwiesen, die Korrelation mit der Expression von HA-hy1-COP und Myc-hy2-COP aber verloren gegangen ist. Dieser Befund wurde ebenso reziprok erhalten, also Analyse von CD4/CD8 durch IF und von HA/Myc durch FACS von permeabilisierten Zellen und führte zum gleichen Ergebnis (hier nicht gezeigt). Es lag also hauptsächlich ein HA⁻/CD8⁺- bzw. Myc⁻/CD4⁺-Phänotyp vor. Versuche, aus diesen Zellpools HA/Myc-schaltbare Einzelklone zu isolieren, scheiterten. Diese mangelnde Korrelation ist nicht auf das IRES-Element *per se* zurückzuführen, das die Expression des gewünschten Gens an die des Oberflächenmarkers koppelt, da der Anteil der HA⁺/CD8⁺ bzw.

Myc⁺/CD4⁺-Zellen direkt nach der retroviralen Transduktion etwa gleich war (siehe finale Zelllinien). Daher lag die Vermutung nahe, daß die zweimalige Passage der Zellen in Gegenwart von Dox die Ursache der mangelnden Induktionsfähigkeit von γ 1- und γ 2-COP war. Somit wurde die folgende Strategie gewählt:

4.4.2 Immunfluoreszenz-basierte Vereinzelung HA-h γ 1 bzw. Myc-h γ 2 transduzierter Zellen

Um eine Passage der Zellen in Gegenwart von Dox zu vermeiden, wurden die o.g. Selektionsschritte nicht mehr durch FACS, sondern in der IF ausgewertet.

Nach retroviraler Transduktion wurden die Zellen direkt in 96-Loch-Platten vereinzelt und expandiert. Die drei Selektionsschritte wurden jeweils von Duplikaten der Einzelklone durchgeführt, wobei die Expression von HA-h γ 1-COP bzw. Myc-h γ 2-COP direkt durch HA- bzw. Myc-spezifische IF untersucht wurde. Ausgehend von jeweils 600 Einzelklonen ergaben sich die beiden Zelllinien 3T3/rtTA-HA-h γ 1-CD8 Klon XII und 3T3/rtTA-Myc-h γ 2-CD4 Klon A4, im weiteren als HA-h γ 1 und Myc-h γ 2 bezeichnet. Beide Zelllinien zeichneten sich insbesondere durch die Fähigkeit aus, auch nach mehreren Passagen induzierbar zu bleiben. Dem Vorteil der IF-basierten Vereinzelung, der Vermeidung einer (Über-)Expression des gewünschten Proteins während der Expansionsphase der Zelllinie, stand allerdings der mangelnde Probendurchsatz bei den Selektionsschritten gegenüber. Bei der präparativen FACS-Färbung wurden allein bei dem ersten Schritt 50.000 positiv transduzierte Zellen isoliert.

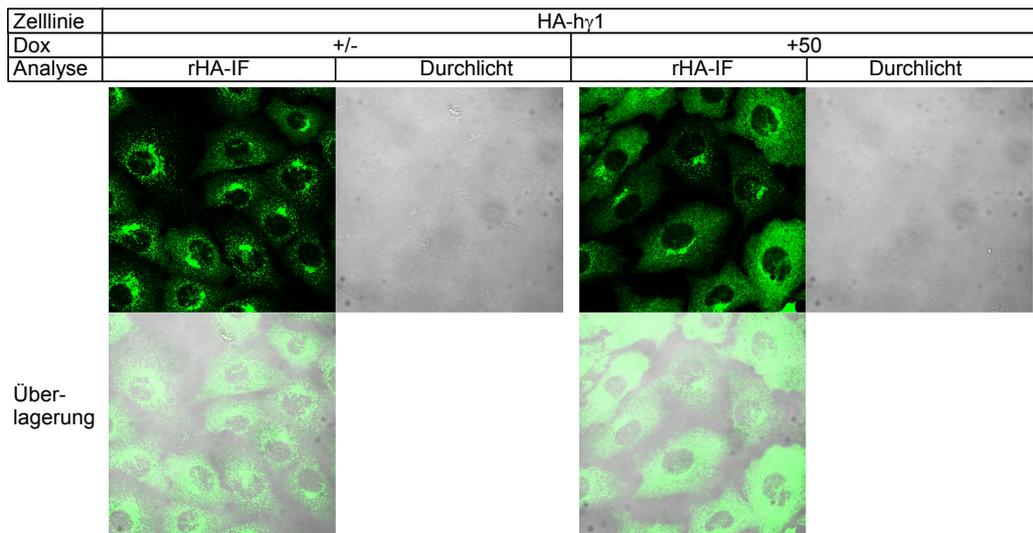
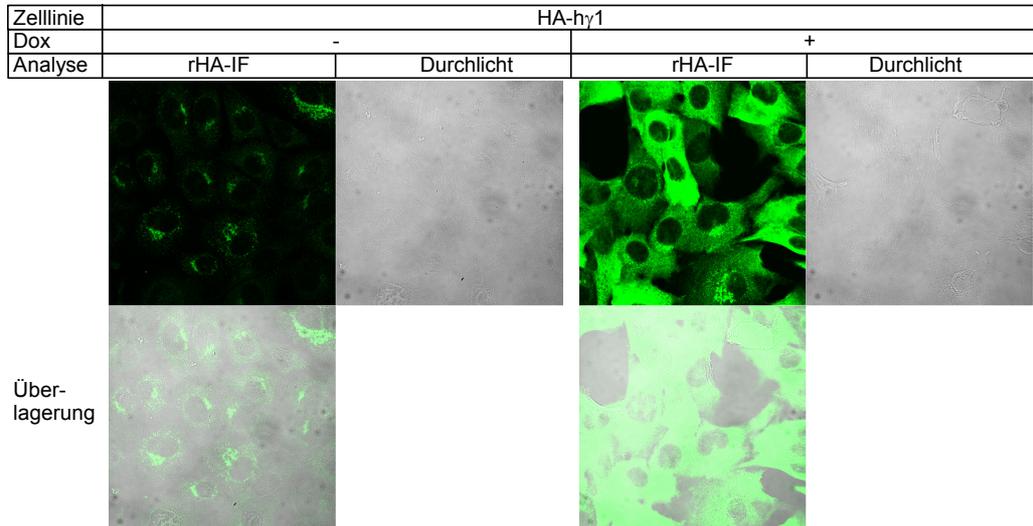
4.5 Analyse verschiedener Expressionsbedingungen

Schon während der Selektion der Einzelklone durch IF-Analyse zeigte sich, daß HA-h γ 1-COP und Myc-h γ 2-COP unter Standard-Induktionsbedingungen von 24 h 1 μ g/ml Dox nicht bei allen Zellen gleichermaßen exprimiert wurden. Ferner war das HA- bzw. Myc-Signal nicht nur perinukleär, sondern auch cytoplasmatisch lokalisiert. Dieser Effekt beruhte vermutlich auf der Überexpression der exogenen Proteine und ist bereits von Futatsumori und Kollegen beschrieben worden (Futatsumori et al. 2000). Insbesondere für elektronenmikroskopische Studien war allerdings eine homogene, spezifische Lokalisierung notwendige Voraussetzung. Der TRE/CMV-Promotor des pRTi erlaubt in Kombination mit dem reversen Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (rtTA-M2) der transgenen 3T3/NIH-Zelllinie eine von der Dox-Konzentration abhängige Expression beider γ -COP Isoformen.

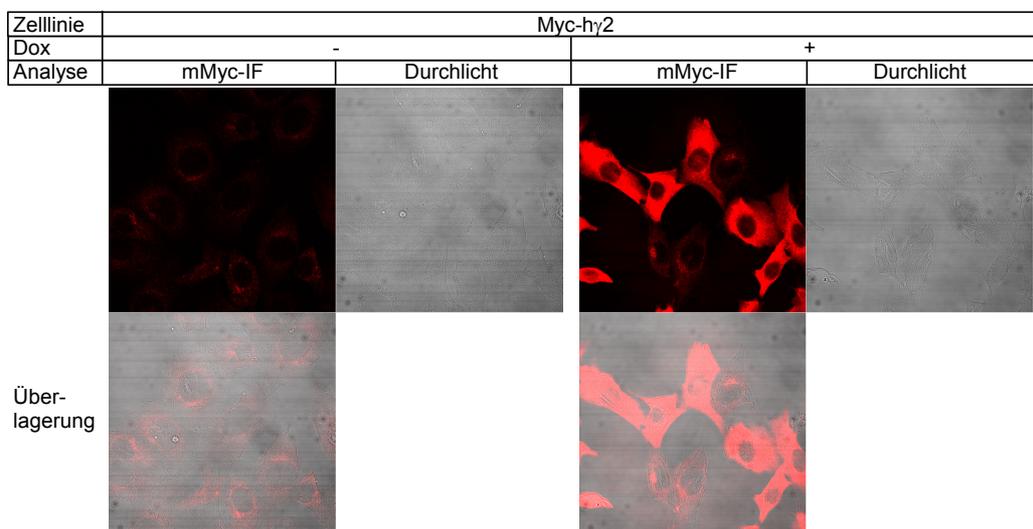
Im folgenden wurde daher einmal 72 h mit 50 ng/ml Dox (geringer erwarteter Expressionsgrad), einmal 24 h mit 1000 ng/ml Dox (Standardbedingung) und einmal 48 h mit

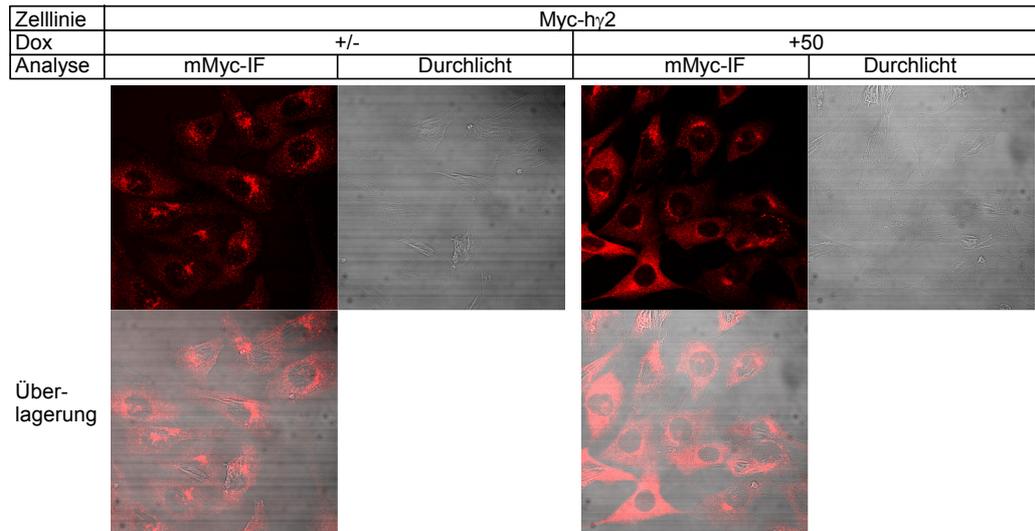
1000 ng/ml Dox und dann 24 h ohne Dox induziert (Vollinduktion, gefolgt von einer Erholungsphase). In **Abbildung 28** ist eine IF-Analyse von HA/Myc-gefärbten Zellen gezeigt:

A



B





C

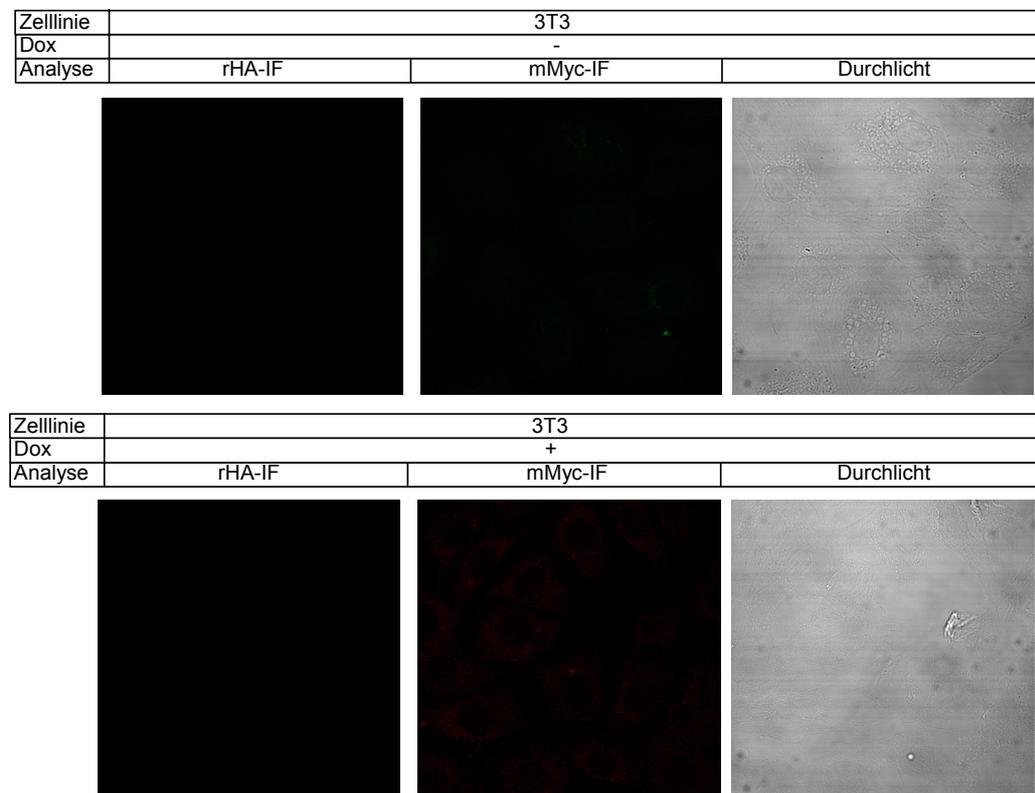


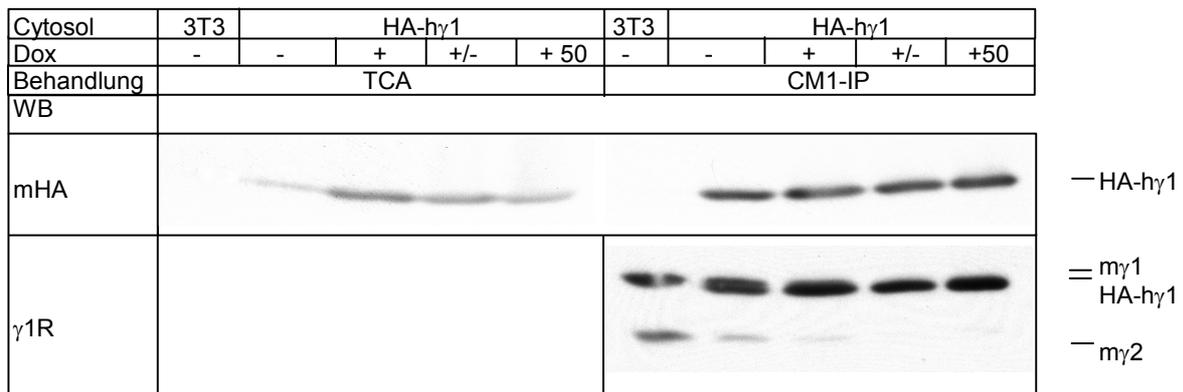
Abbildung 28: IF-Analyse der finalen monoklonalen Zelllinien unter verschiedenen Expressionsbedingungen. Gezeigt ist eine HA-Färbung der HA-hy1- (A) und eine Myc-Färbung der Myc-hy2-Zelllinie (B). In (C) wird die mögliche Kreuzreaktivität der HA/Myc-Antikörpern bei nicht transduzierten 3T3-Zellen überprüft. Das (-) indiziert die Abwesenheit von Dox, (+) entspricht 24 h 1000 ng/ml Dox, (+/-) entspricht 48 h 1000 ng/ml Dox und 24 h Abwesenheit von Dox und (+50) indiziert 72 h 50 ng/ml Dox.

Ein Anschalten der Klone in Gegenwart von 1 $\mu\text{g/ml}$ Dox für 48 h und weiterer Inkubation für 24 h in Abwesenheit von Dox gewährleisteten eine homogene Expression der Epitop-markierten Proteine sowie eine reduzierte cytoplasmatische Färbung im Vergleich zur Standard-Induktion (**Abbildung 28**). Ein vergleichbarer Effekt wurde durch die Zugabe von

50 ng/ml Dox erreicht. Der Vergleich der HA/Myc-Signale mit den nicht transduzierten Ausgangszellen (3T3) zeigte die hohe Spezifität der verwendeten Antikörper, jedoch wird auch deutlich, daß selbst in Abwesenheit von Dox geringe Mengen der Epitop-markierten γ -COP Isoformen exprimiert wurden. Die erhaltenen Zelllinien sind demnach undicht bezüglich der Dox-abhängigen Induktion.

Weiter wurde der Expressionsgrad und der Anteil des in Coatomer eingebauten exogenen γ -COP im Vergleich zum unkomplexierten Protein unter den verschiedenen Expressionsbedingungen bestimmt. Zur Bestimmung des Expressionsgrades wurden die Cytosole durch TCA-Präzipitation aufkonzentriert und die Signalintensitäten durch Western Blot-Analyse mit mHA- und mMyc-Antikörpern verglichen (**Abbildung 29** und **Tabelle 9**). Ein Vergleich dieser Signale mit IPs durch den CM1-Antikörper lieferte dann den in Coatomer eingebauten Anteil der exogenen Proteine. Die Dekoration des Western Blots mit dem γ 1R-Antikörper erlaubte die Betrachtung aller γ -COP Spezies, wie in **Abbildung 29** dargestellt:

A



B

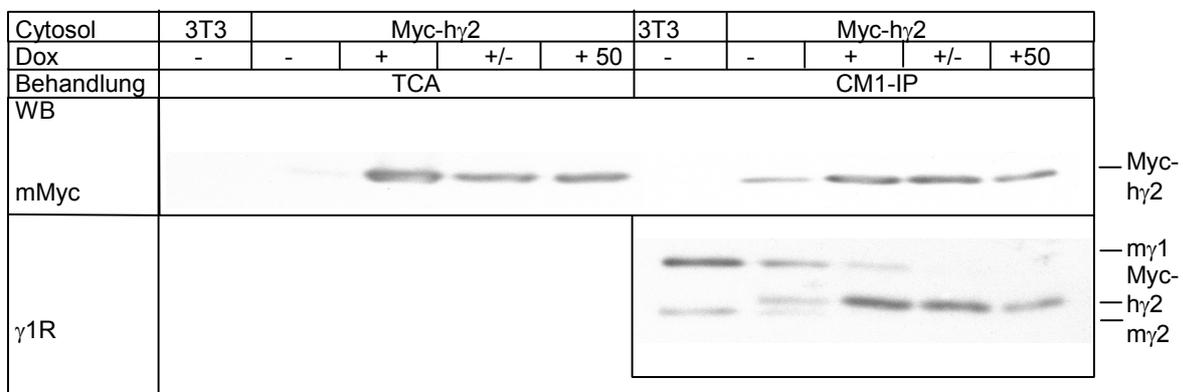


Abbildung 29: Bestimmung des Expressionsgrades und des in Coatomer eingebauten Anteils von HA-h γ 1 (A) bzw. Myc-h γ 2-COP (B) unter verschiedenen Bedingungen (siehe Text). Bei den TCA-präzipitierten Cytosolen wurden 50 μ g Gesamtprotein geladen (10% Input), die CM1-IPs wurden ausgehend von 500 μ g Gesamtprotein durchgeführt. Zur Trennung der exogenen Proteine von den endogenen Pendanten wurde ein 15 cm 6% PAA-Trenngel mit einem Verhältnis von Bisacrylamid/Acrylamid 1:100 verwendet.

Die Quantifizierung der Signalstärken des oben dargestellten Western Blots lieferte in **Tabelle 9** dargestellte Werte:

Tabelle 9: Analyse des Induktionsverhaltens und des in Coatomer-eingebauten Anteils der exogenen γ -COP Isoformen. Die Expressionsgrade sind auf die nicht-induzierten Zellen normiert, während der Anteil der in Coatomer-inkorporierten Proteine als absoluter und als relativer Anteil, also unter der Einbeziehung der CM1-IP-Effizienz, angegeben ist. Die CM1-IP-Effizienz ergibt sich aus der Normierung des höchsten erhaltenen Wertes, also 90%.

Expressions- bedingung	- Dox	+ Dox	+/- Dox	+ 50 Dox
Expressionsgrad HA-h γ 1	1x	7x	2x	4x
Expressionsgrad Myc-h γ 2	1x	39x	10x	14x
(relativer) HA-h γ 1 Anteil in Coatomer	90% (100%)	17% (19%)	40% (44%)	24% (27%)
(relativer) Myc-h γ 2 Anteil in Coatomer	65% (72%)	11% (12%)	37% (41%)	10% (11%)

Die Ergebnisse bestätigten die durch IF erhaltenen Schlußfolgerungen. Auch in Abwesenheit von Dox konnte ein HA- bzw. Myc-Signal erhalten werden. Unter Standard-Bedingungen, also 24 h 1000 ng/ml Dox, ergab sich der höchste Induktionsgrad der Proteine, der relativ in Coatomer eingebaute Anteil war jedoch deutlich geringer als unter +/- Dox Bedingungen (**Tabelle 9**). Die Präsenz der exogenen Proteine in CM1-IPs zeigte bereits an dieser Stelle den Einbau in endogenen Coatomer.

Allerdings wurde ein unerwarteter Effekt bei der Analyse durch den γ 1R-Antikörpers deutlich: Die graduelle Induktion der exogenen γ -COP Isoformen führte zu einer Verringerung sowohl des endogenen Pendants (vgl. 3T3 mit – Dox beider Zelllinien), als auch der jeweils zweiten endogenen Isoform (vgl. – Dox mit + Dox oder +/- Dox). Zwei Erklärungen sind denkbar:

1. Eine isotypische Hochregulation, die die bindende Kapazität der Antikörper übersteigt und so eine artifizielle Herunterregulation aufzeigen würde.
2. Eine Herunterregulation der endogenen Proteine.

Um diese Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden verschiedene Cytosol-Mengen der induzierten Zelllinien im Vergleich zu der nicht transduzierten Zelllinie (3T3) mit konstanten CM1/Protein A-Sepharose Mengen immunpräzipitiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 30** gezeigt.

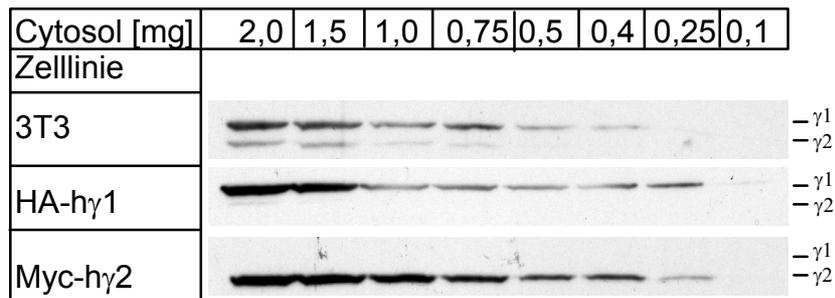


Abbildung 30: Die Induktion der exogenen Isoformen führt zu der Herunterregulation der endogenen Proteine. Gezeigt ist die Western Blot Analyse von CM1-IPs unter variierenden Mengen von Cytosol. Die Blotmembran wurde mit dem γ 1R-Antikörper dekoriert.

Bei allen verwendeten Cytosolen wurden die γ 1- und γ 2-COP Signale ab 1,5 mg Gesamtprotein pro IP sättigend, während diese im Bereich um 0,5 mg im ansteigenden Bereich lagen (**Abbildung 30**). Somit wurde bei weiteren IPs mit dem CM1-Antikörper 0,5 mg oder weniger Gesamtprotein eingesetzt, wenn diese nicht limitierend sein sollten und 1,5 mg oder mehr, wenn andere Faktoren das Ergebnis limitieren sollten (beispielsweise bei einem Vergleich von Antikörper-Titern). Somit zeigten die γ 1- und γ 2-COP-Signale bei 0,5 mg Cytosol, daß *in vivo* eine Herunterregulation der endogenen Proteine vorlag. Um sicherzustellen, daß das stark verminderte Signal der jeweils anderen Isoform nicht durch eine veränderte Antikörper-Antigen-Interaktion des γ 1R-Antikörpers begründet war, wie es z.B. durch stark veränderte, durch die Doxycyclin-Gabe induzierte Protein-Modifikationen auftreten könnte, wurde ein analoger Ansatz der IPs mit Coomassie angefärbt, wie in **Abbildung 31** dargestellt.

Cytosol	3T3	HA-hγ1	Myc-hγ2
Dox	-	+/-	+/-

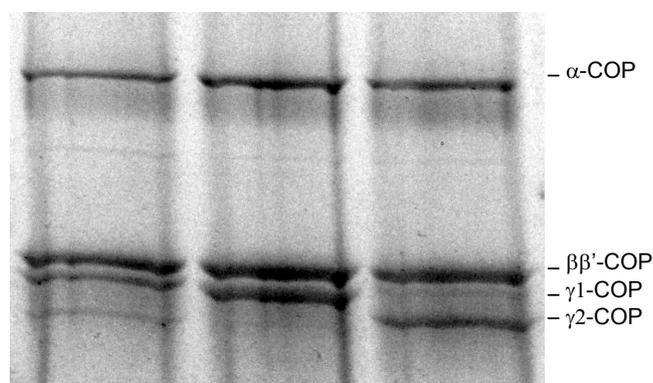


Abbildung 31: Bestätigung der Herunterregulation der endogenen γ -COP Isoformen durch Analyse des Gesamtprotein-Hintergrunds. Dargestellt ist die Coomassie-Färbung einer CM1-IP von 1,5 mg Gesamtprotein der angegebenen Cytosole.

Auch durch Anfärbung mit Coomassie wurde die endogene Herunterregulation indiziert (**Abbildung 31**). Somit war die Abwesenheit der endogenen Proteinbanden nicht auf ein Detektionsproblem des primären Western Blot-Antikörpers zurück zu führen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß beide monoklonalen Zelllinien undicht bzgl. der Dox-Induktion waren. Dies führte bereits in Abwesenheit des Induktors zu einem leicht veränderten Verhältnis von endogenem $\gamma 1/\gamma 2$ -COP. Im Vergleich der verschiedenen Induktionsbedingungen hatte sich die +/- Dox Induktion als günstig herausgestellt: Es wurde eine homogene Expression der exogenen Proteine ermöglicht (siehe **Abbildung 28**), bei der der Anteil an nicht-Coatomer komplexiertem Protein am geringsten war (siehe **Abbildung 29**). Allerdings wurde bei Induktion der exogenen γ -COP Isoformen die Anwesenheit der endogenen γ -COP Proteine im Coatomer stark herabreguliert.

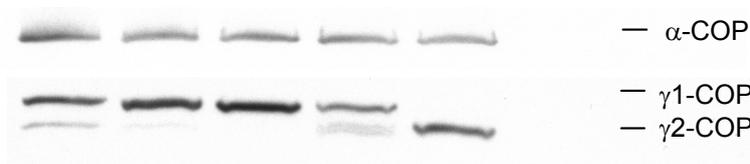
Hinsichtlich von *loss-of-function* Studien unter +/- Dox-Bedingungen, die weitere RNAi-basierte Ansätze überflüssig machen würden, war nun zu prüfen, ob die Epitop-markierten exogenen humanen γ -COPs *in vivo* von den endogenen Maus-Pendants unterscheidbar sind. Dazu wurde der Einbau in endogenen Coatomer genauer untersucht, ferner sollte als erweitertes Funktionalitäts- bzw. Spezifitätskriterium der bei $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP bekannte präferentielle Einbau von $\gamma 2$ - über $\gamma 1$ -COP in COPI-Vesikel analysiert werden.

4.6 Funktionelle Integration von exogenem HA-h $\gamma 1$ -COP bzw. Myc-h $\gamma 2$ -COP in endogenen Coatomer

Im folgenden wurde eine gegen Gesamt-Coatomer gerichtete IP mit dem CM1-Antikörper aus Cytosolen von 3T3-, HA-h $\gamma 1$ - und Myc-h $\gamma 2$ -Zellen durchgeführt und dann durch Western Blot mit mHA- bzw. mMyc- Antikörpern der Einbau der exogenen Isoformen unter – und +/- Dox Bedingungen getestet. Zur Verifizierung der Präsenz von Coatomer wurde die Gegenwart von α -COP als Untereinheit des $\alpha/\beta'/\epsilon$ -Subkomplexes überprüft, ferner sollte das Verhältnis von $\zeta 1$ - zu $\zeta 2$ -COP insbesondere unter +/- Dox Bedingungen getestet werden. Zu diesem Zweck wurde Gesamtcoatomer jeweils mit dem Antikörper CM1 immunpräzipitiert, und diese Proben im Western Blot analysiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 32** gezeigt.

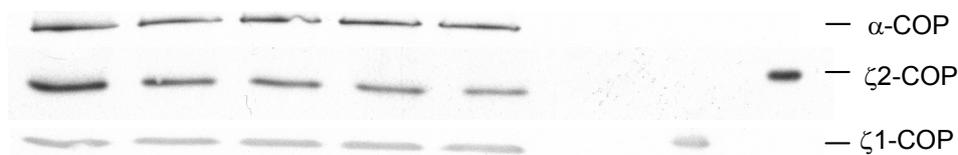
A

Cytosol	3T3	HA-h γ 1		Myc-h γ 2		-
Dox	-	-	+/-	-	+/-	



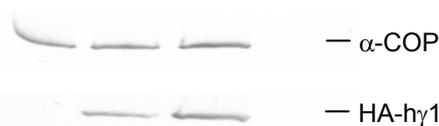
B

Cytosol	3T3	HA-h γ 1		Myc-h γ 2		-	His ₆ - ζ 1	His ₆ - ζ 2
Dox	-	-	+/-	-	+/-			



C

Cytosol	3T3	HA-h γ 1		-
Dox	-	-	+/-	



D

Cytosol	3T3	Myc-h γ 2		-
Dox	-	-	+/-	



Abbildung 32: Integration der exogenen Proteine in endogenem Coatomer. In allen Abbildungen wurden je 500 μ g der verschiedenen Cytosole mit dem CM1-Antikörper immunpräzipitiert und dann unterschiedlich durch Western Blot Analyse untersucht. Zur Standardisierung der aufgetragenen Massen wurden die Blots mit einem gegen α -COP gerichteten Antikörper dekoriert. (A) Zur Trennung der γ -COP Isoformen wurde ein 6% PAA-Gel verwendet. Es wird die γ 1- und γ 2-COP Situation analysiert. (B) Analyse des ζ 1- und ζ 2-COP Verhältnisses durch ein 12% PAA-Gel. Zur Detektionskontrolle wurden je 10 ng von rekombinantem His₆- ζ 1- oder ζ 2-COP verwendet. Durch den His₆-Tag sind die Molekulargewichte um ca. 1 kDa erhöht. (C) und (D) Analyse der Gegenwart von HA-h γ 1 bzw. Myc-h γ 2 durch ein 6% PAA-Gel.

Eine Betrachtung der α -COP Signalstärken bei allen IPs zeigte, daß endogener Coatomer immunpräzipitiert wurde (**Abbildung 32**). Aufgrund der Konstanz der α -COP Signale war davon auszugehen, daß unter den getesteten Bedingungen α -COP nicht von der endogenen Herunterregulation betroffen ist, daher dient das α -COP Signal als interne Massen-Standardisierung, um eine Vergleichbarkeit der Coatomer-Konzentration in verschiedenen Cytosolen zu gewährleisten. Insgesamt wurden 1,5 mg der Cytosole immunpräzipitiert und auf je drei PAA-Gele verteilt. In (**Abbildung 32 A**) werden γ 1- und γ 2-COP analysiert. Die Ergebnisse bestätigten den Befund der endogenen Herunterregulation der endogenen γ -COP Isoformen, allerdings erlaubte das verwendete Gelsystem keine klare Trennung der exogenen Proteine von den endogenen Pendanten. In (**Abbildung 32 B**) wird die Präsenz von ζ 1- und

ζ 2-COP in Gegenwart von unterschiedlichen Stöchiometrien von γ 1- und γ 2-COP enthaltenem Coatomer überprüft. Auffallend war die Konstanz der Signalstärken von ζ 1- und ζ 2-COP bei allen Cytosolen. Auch hier wurde die Gegenwart einer γ 2/ ζ 2-Interaktion bestätigt. Allerdings mußte die Induktion der exogenen Proteine eine Verschiebung der Stöchiometrien der Coatomer-Isotypen bewirken, die aber nicht weiter quantifiziert wurde. Die Analyse mit mHA- bzw. mMyC-Antikörpern in (**Abbildung 32 C**) und (**Abbildung 32 D**) lieferte Dox-abhängige Signalstärken und indizierte die Präsenz der exogenen γ -COP Isoformen bei den entsprechenden Zelllinien. Die Abwesenheit einer HA- bzw. Myc-Bande bei den 3T3-Cytosolen zeigte die Spezifität der verwendeten Antikörper. Bei allen durchgeführten CM1-IPs waren sowohl α -, ζ 1- und ζ 2-COP detektierbar. Dies beweist, daß die exogenen Proteine in endogenem Coatomer eingebaut wurden. Somit waren die exogenen Proteine *in vivo* hinsichtlich der Coatomer-Inkorporation nicht von den endogenen Pendants unterscheidbar. Ferner betraf die endogene Herunterregulation ausschließlich die γ -COP Isoformen, da durch die CM1-IP eine Selektion auf nativen Coatomer erfolgt. Bestätigt wurde dies exemplarisch durch die Präsenz von α -, ζ 1- und ζ 2-COP.

Der Einbau der exogenen Proteine sollte weiter durch eine IP mit α - ζ 2-COP bestätigt werden, wie in **Abbildung 33** gezeigt.

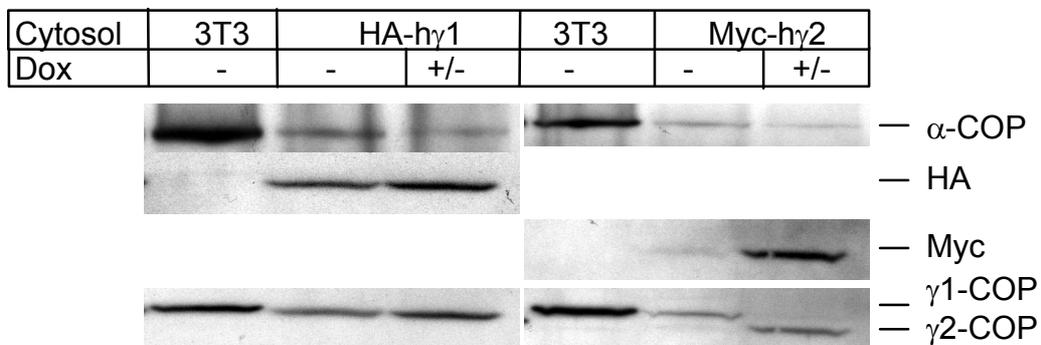


Abbildung 33: Integration der exogenen Proteine in endogenem Coatomer. Es wurden je 1 mg der verschiedenen Cytosole mit dem ζ 2-gp-Antikörper immunpräzipitiert und dann durch Western Blot Analyse untersucht. Die Detektion von γ 1- und γ 2-COP erfolgte durch den γ 1R-Antikörper.

Zunächst wurde der bereits bekannte Befunde bestätigt: Aus 3T3 Cytosol konnte durch eine ζ 2-COP IP eine schwache γ 2-COP Bande ko-immunpräzipitiert werden. Bei den Cytosolen der HA-h γ 1- bzw. Myc-h γ 2-Zellen wurden Dox-abhängige HA- bzw. Myc-Signale sichtbar (**Abbildung 33**). Dies untermauert einmal die Integration der exogenen Proteine in Coatomer, ferner wurde die Interaktion zwischen γ 2- und ζ 2-COP validiert. Eine Verschiebung des

$\gamma 1/\gamma 2$ -COP Gleichgewichts bewirkt bei den Myc-hy2-Zellen also die verstärkte Präsenz des $\gamma 2/\zeta 2$ -Isotyps.

Weiter sollte der Einbau der exogenen γ -COP Proteine durch eine IF-Analyse analysiert werden. Als Coatomer-Marker wurde ein gegen β' -COP gerichteter Antikörper als Bestandteil des $\alpha/\beta'/\epsilon$ -COP Subkomplexes verwendet. Beispiele der erhaltenen IF-Bilder sind in **Abbildung 34** gezeigt.

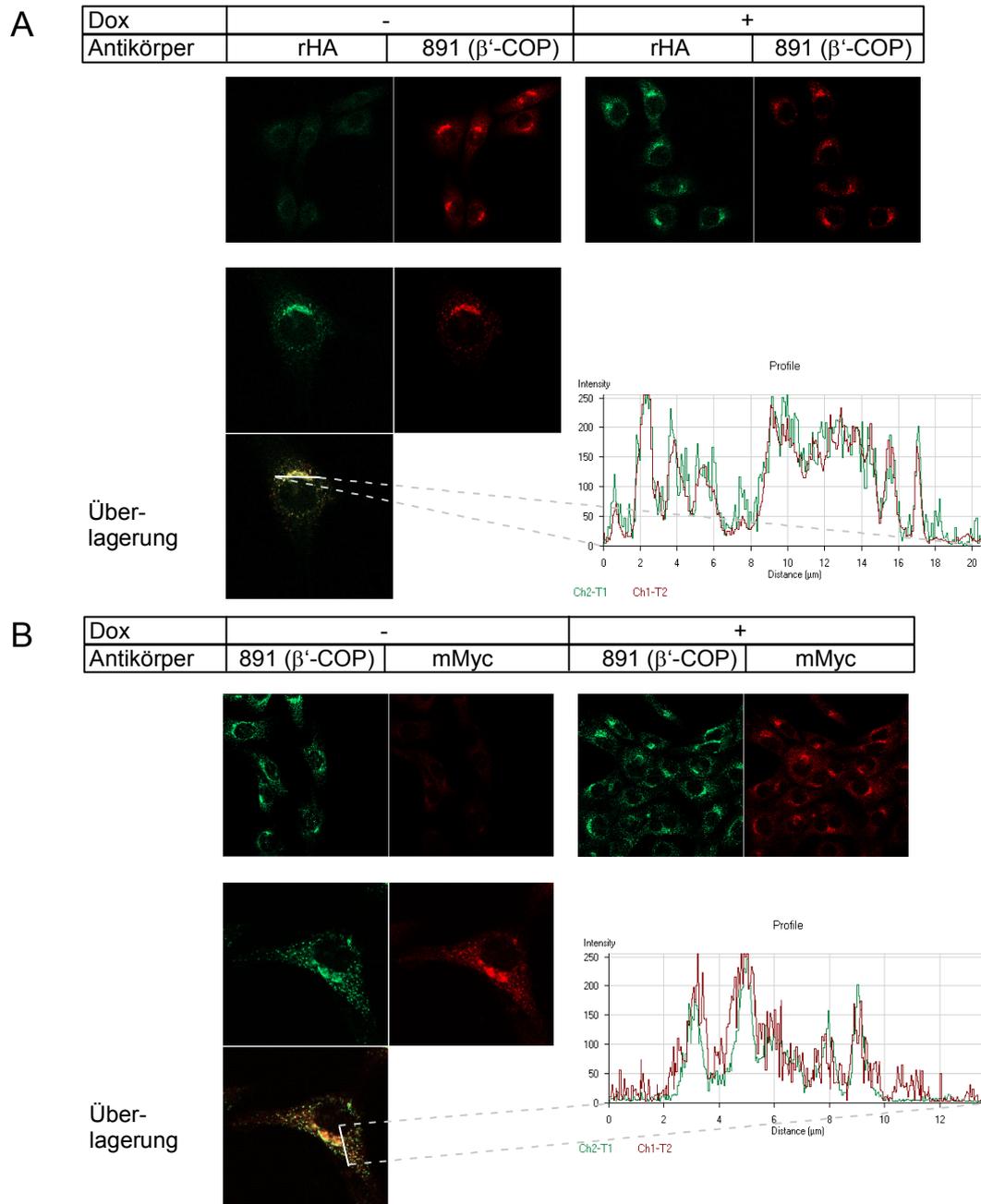
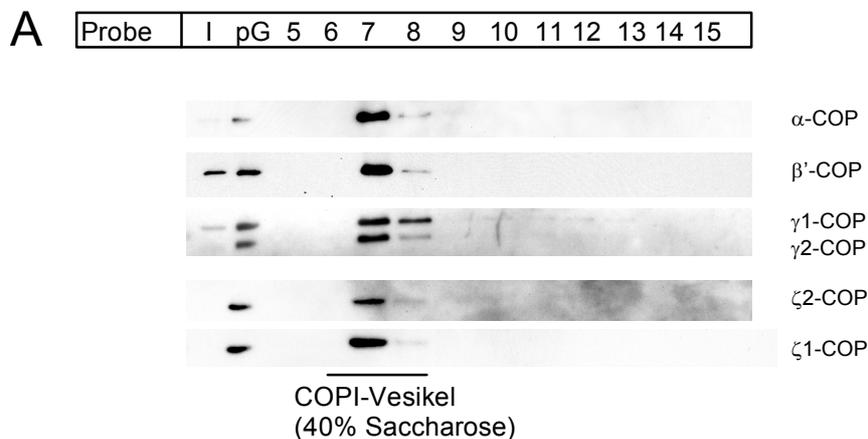


Abbildung 34: Ko-Lokalisierung von HA-hy1 (A) bzw. Myc-hy2 (B) mit β' -COP. Gezeigt ist sowohl die Dox-Abhängigkeit der HA- bzw. Myc-Signale als auch eine Profilanalyse einer Signalüberlagerung (markiert durch den weißen Balken). Zur Detektion des HA-Epitops wurde der rHA-, für das Myc-Epitop der mMHA- und für β' -COP der 891-Antikörper verwendet.

Die dargestellte Überlagerung der HA- bzw. Myc-Signale mit β' -COP zeigte wie die IP die Assemblierung der exogenen Proteine in Coatomer (**Abbildung 34**). Anders als die IP, die ausschließlich cytosolischen Coatomer analysiert, (über)repräsentiert die IF an Golgi-Membranen gebundenen Coatomer, der mit dem cytosolischen Anteil im dynamischen Gleichgewicht steht. Dies legte nahe, daß die HA-h γ 1- (**Abbildung 34 A**) und Myc-h γ 2- (**Abbildung 34 B**) Coatomer Populationen auch funktionell sind. Es war nicht möglich, isolierte β' -COP Signale zu detektieren, wie dies bei der Koexistenz der γ 1- bzw. γ 2-Coatomer-Isotypen zu erwarten gewesen wäre (siehe Profilanalyse der Überlagerung). Der Befund war jedoch übereinstimmend mit den biochemischen Daten aus der IP Analyse.

Als wichtigstes Kriterium der Coatomer-Inkorporation sollte im weiteren überprüft werden, ob die exogenen Proteine funktionell die endogenen Maus-Pendants ersetzen können, d.h. die Bildung von COPI-Vesikeln erlauben. Dazu wurde Cytosol von HA-h γ 1- bzw. Myc-h γ 2-Zellen unter +/- Dox-Bedingungen gewonnen (siehe Abschnitt 2.5.1 Cytosol-Gewinnung aus adhärent wachsenden Zellen), mit Rattenleber Golgi versetzt und eine *in vitro*-COPI-Vesikelbiogenese durchgeführt. Nach Trennung der Vesikel im Saccharose-Gradienten wurden die einzelnen Fraktionen im Western Blot auf die Gegenwart von endogenen und Epitop-markierten COPs analysiert (**Abbildung 35**).



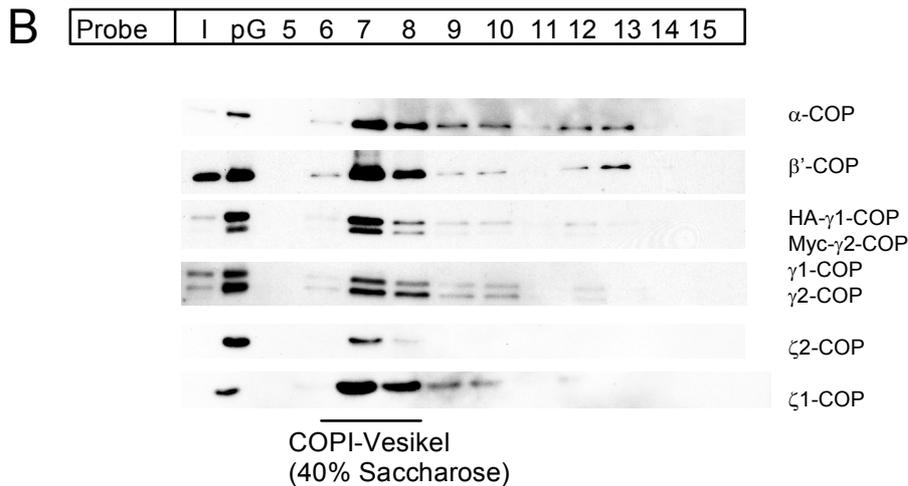


Abbildung 35: Funktionelle Analyse von HA-hy1 und Myc-hy2-COP. Es wurden 2 mg/ml 3T3 Cytosol in einem 1,25 ml-Ansatz mit Rattenlebergolgi versetzt (A). In (B) wurde ein analoger Ansatz vorbereitet, wobei je 1 mg/ml HA-hy1 und Myc-hy2-enthaltendes Cytosol vereinigt wurden. Die entstehenden COPI-Vesikel wurden durch einen Saccharose-Gradienten sedimentiert und durch Western Blot-Analyse identifiziert. Neben den Fraktionen ist ein 0,1% Input (I) sowie ein 1,6% Aliquot des *primed* Golgi (pG) aufgetragen.

In (**Abbildung 35 A**) ist das Ergebnis einer typischen *in vitro*-Vesikelbiogenese gezeigt. Neben dem Coatomer-Marker α -COP fand sich sowohl γ 1- als auch γ 2-COP im Bereich von 40% (w/w) Saccharose (Fraktionen 7-9). Ein Vergleich mit dem Input zeigte einen bereits bekannten Unterschied von γ 1- zu γ 2-COP (Wegmann et al. 2004): γ 2/ ζ 1 wird relativ zu γ 1/ ζ 2-COP in COPI-Vesikel angereichert. In (**Abbildung 35 B**) wurde deutlich, daß im Bereich der COPI-Vesikel sowohl HA- als auch Myc-Signale detektierbar sind. Die Ko-Sedimentation mit anderen Coatomer-Proteinen beweist eine funktionelle Inkorporation der exogenen Proteine in COPI-Vesikel. Darüberhinaus wurde noch ein zweiter Aspekt deutlich: Im Vergleich zum Input zeigte sich eine relative Signalzunahme der Myc-Bande über der HA-Bande, ferner stieg auch das relative ζ 1- zu ζ 2-COP Signalverhältnis an. Dies indizierte, daß Myc-hy2-COP, ähnlich wie endogenes my2-COP, bevorzugt in COPI-Vesikel eingebaut wird.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, daß die beiden exogenen Epitop-markierten Proteine in Coatomer eingebaut und vergleichbar den endogenen Pendanten in COPI-Vesikel aufgenommen wurden. Damit waren die etablierten Zelllinien ein gültiges Werkzeug für weitere *loss-of-function*-Studien und es erübrigten sich RNAi-Screens, die my1- und my2-COP einzeln runterregulieren sollten. Im weiteren konnte aber eine RNAi-Zielsequenz bestimmt werden, die sowohl my1- und auch my2-COP gleichzeitig herabregulierte.

5. RNAi-basierte Herunterregulation von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP

5.1 Überprüfung der $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP cDNA-Sequenzen der 3T3 Zellen

Um eventuelle Zellkultur-bedingte Mutationen der $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP Gene, wie sie beispielsweise bei den $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP Genen aufgetreten waren, oder auch Abweichungen zu den Referenzsequenzen beim Design von RNAi-Zielsequenzen berücksichtigen zu können, sollten die endogenen Gene sequenziert werden.

Es wurde mRNA aus 3T3/rtTA-Zellen isoliert und wie weiter unten beschrieben (Abschnitt 1.6 Reverse Transkription zur Herstellung von doppelsträngiger cDNA) in cDNA umgeschrieben. Um einmal den durch die PCR resultierenden Sequenzinformationsverlust der bindenden Primer möglichst gering zu halten und weiter den Vorteil einer PCR von kleineren Fragmenten zu erlangen, wurden von beiden Genen jeweils zwei überlappende Fragmente (A und B) amplifiziert, wobei insbesondere der UTR-Bereich bei den aussenstehenden Primern berücksichtigt wurde. Für $\gamma 1$ -A wurde das Primerpaar g1m 5' UTR (NdeI)/ g1.1m 3' UTR, für $\gamma 1$ -B g1.1m 5' UTR/ g1m 3' UTR (PacI) V2, für $\gamma 2$ -A g2m 5' UTR (NdeI)/ g2.1m 3' UTR und für $\gamma 2$ -B g2.1m 5' UTR/ g2m 3' UTR (PacI) V2 verwendet. Die Amplikons wurden in das Plasmid pCR-Blunt kloniert und positive Klone sequenziert. Im Vergleich zur Literatur ergaben sich dabei keinerlei Unterschiede ($\gamma 1$ *accession number*: AF187079, $\gamma 2$ *accession number*: AJ251067), daher wurde auf Kontrollsequenzierungen von Klonen aus unabhängigen PCR-Reaktionen verzichtet.

5.2 RNAi-Screen

Das Ziel war, RNAi-Zielsequenzen zu identifizieren, die sowohl die Expression von $\gamma 1$ - als auch $\gamma 2$ -COP herabregulierten. Dazu wurden die im Methodenteil (Abschnitt 5.2 Hybridisierungs-Oligonukleotide) beschriebenen Oligonukleotide hybridisiert und in das *Bgl*II/*Hind*III-verdaute Plasmid pSuperior ligiert. Nach Kontrollsequenzierung wurde aus positiven Klonen DNA isoliert und durch EffecteneTM-Transfektion in 3T3-Zellen gebracht. Bei der hier durchgeführten Methode handelt es sich also um eine Plasmid-basierte *in vivo* Expression von siRNA. Nach Selektion von positiv transfizierten Zellen durch G418 (800 μ g/ml, bestimmt durch *kill curve*-Analyse, hier nicht gezeigt) wurde das Cytosol durch CM1-IP mit anschließendem $\gamma 1$ R-Western Blot analysiert, wie in **Abbildung 36** dargestellt.

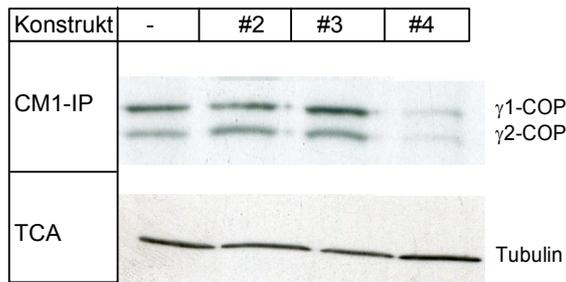


Abbildung 36: Analyse der Präsenz von γ 1- und γ 2-COP in Gegenwart unterschiedlicher RNAi-Konstrukte. Ausgehend von 500 μ g Cytosol wurden CM1-IPs auf ein 6% PAA-Gel geladen und der Western Blot mit dem γ 1R-Antikörper analysiert. Als Kontrolle diente das leere pSuperior-Plasmid. Es wurde eine externe Standardisierung von TCA-Präzipitaten von 100 μ g Cytosol durch den gegen α -Tubulin gerichteten YL1/2-Antikörper durchgeführt.

Es wurde eine RNAi-Zielsequenz bestimmt (Position #1012 bezogen auf die endogene γ 1- und γ 2-COP Sequenz), die gleichzeitig γ 1- und γ 2-COP herunterregulierte (**Abbildung 36**). Die eingesetzten Cytosole stammten von Zellen, die nach 7-14 tägiger G418-Selektion erhalten wurden. Allerdings war es nicht möglich, stabile Zelllinien zu generieren, da die Zellen bei fortwährender Passage entweder vollständig abgestorben sind oder aber die Fähigkeit zur Herunterregulation von γ 1- und γ 2-COP verloren haben.

III. Diskussion

In dieser Arbeit konnten Hinweise auf unterschiedliche Funktionen von γ 1- und γ 2-COP im sekretorischen Weg erbracht werden. Einmal konnte eine differentielle Bindung von Proteinbindedpartnern an die γ 1- und γ 2-COP *appendage* Domänen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1. Interaktionspartner der *appendage* Domänen von γ 1- und γ 2-COP). Zweitens wurde sowohl biochemisch als auch zellbiologisch die Präsenz von dominanten γ 1 ζ 2- und γ 2 ζ 1-COPI-Vesikeln gezeigt (siehe Abschnitt 2. Nachweis isotypischer γ 1 ζ 2- und γ 2 ζ 1-COPI-Vesikel). Drittens legen *knock-down* Experimente der einzelnen γ -COP Isoformen einen dem Coatomer-*knock-down* vergleichbaren letalen Phänotyp nahe (siehe Abschnitt 3. Etablierung eines *knock-down* Systems für γ 1- und γ 2-COP). Letztlich wird unter Berücksichtigung der genannten Ansätze ein Modell der γ -COP determinierten, differentiellen Frachtaufnahme dargestellt (siehe Abschnitt 4. Ein Modell).

1. Interaktionspartner der *appendage* Domänen von γ 1- und γ 2-COP

Es konnte gezeigt werden, daß die folgenden Interaktionspartner präferentiell an die *appendage* Domänen von γ 1- und γ 2-COP binden (siehe **Abbildung 17** und **Abbildung 19**). Während die γ 1-COP *appendage*-Domäne mit Zfp289 interagiert, konnte die γ 2-COP *appendage*-Domäne ArfGAP1, ArfGAP3 und vermutlich auch Annexin A11 binden. Es kann davon ausgegangen werden, daß die verschiedenen Interaktionspartner an unterschiedliche Stellen der γ 2-COP *appendage*-Domäne binden. Bei der *appendage*-Domäne von α -Adaptin konnten mindestens zwei unterschiedliche Proteinbindestellen in der β -*sandwich*- und in der Plattform-Subdomäne identifiziert werden (Praefcke et al. 2004). Aufgrund der Präsenz beider Subdomänen in der γ 1-COP *appendage*-Domäne liegt hier die unterschiedliche Bindung der genannten Interaktionspartner an die beiden Subdomänen nahe.

1.1 Zfp289 bzw. ArfGAP1-3

Zfp289 ist als Arf1-GAP mit cytosolischer und perinukleärer Lokalisierung beschrieben worden und wurde in einem *screen* identifiziert, der Id-1 (*inhibitors of differentiation*) Zielgene identifizieren sollte (Singh et al. 2001). Id-1 ist ein dominant negativer Regulator von bHLH (*basic helix-loop-helix*) Transkriptionsfaktoren und inhibiert nicht nur Differenzierung, sondern induziert auch den G₁-S-Phasenübergang, Proliferation, Migration, Invasion in Brustepithelzellen und z.B. die verstärkte Sezernierung der MT1-MMP/MMP-14 (*matrix metalloprotease*). MMP-14 ist ein Typ I-Transmembranprotein (cytosolischer

Peptidschwanz: RRHGTPKRLLYCQRSLLDKV). Id-1 gehört zur der Klasse V der HLH Transkriptionsfaktoren und existiert nicht in *S. cerevisiae* oder *C. elegans*, ist aber in *D. melanogaster* präsent (Massari und Murre 2000). Allerdings weisen *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *D. melanogaster* nur eine γ -COP Isoform auf. Daher ist eine ko-evolutionäre transkriptionelle Kopplung von Zfp289 und γ 1-COP nicht sehr wahrscheinlich.

In Säugern ist eine Vielzahl von ArfGAPs beschrieben worden (Nie et al. 2003; Randazzo und Hirsch 2004), allerdings sind nur ArfGAP1-3 perinukleär lokalisiert (Nie et al. 2003; Watson et al. 2004). ArfGAP1 wurde erstmalig durch einen Ansatz der reversen Genetik aus Rattenlebercytosol identifiziert und kloniert. Gezeigt werden konnte, daß die Golgi-Rekrutierung von ArfGAP1 durch BFA antagonisiert wird und somit Arf1·GTP-abhängig ist (Cukierman et al. 1995; Makler et al. 1995). Aus gleicher Quelle konnte eine Arf1-GAP Aktivität aufgereinigt werden, wobei nachgewiesen wurde, daß von ArfGAP1 distinkte Polypeptide involviert sind. Dieser Protein-*pool* wurde daher als ArfGAP2 bezeichnet, eine vollständige Analyse einer Proteinsequenz war an dieser Stelle nicht möglich (Randazzo 1997). Zu ArfGAP2 gibt es gegenwärtig keine weiteren Informationen, allerdings wurde von Watson und Kollegen (Watson et al. 2004) ein α ArfGAP2-Antikörper beschrieben, der in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Frigerio et al., Manuskript in Arbeit). ArfGAP2 zeigt eine stärkere Stimulierung der GAP-Aktivität in Gegenwart von PIP₂, hinsichtlich der Substratspezifität konnte aber keine Präferenz gezeigt werden: Beide Isoformen interagieren mit Arf1 und Arf5, nicht aber Arf6 oder Arl2 (*Arf-related protein-2*) (Randazzo 1997). Letztlich wurde ArfGAP3 aus humaner fötaler Leber isoliert. Durch Überexpression von ArfGAP3 wurde die konstitutive Sekretion von sezernierter alkalischer Phosphatase inhibiert, somit ist eine funktionelle Beteiligung am sekretorischen Weg anzunehmen (Liu et al. 2001). In der Hefe gibt es vier Proteine mit ArfGAP-Aktivität: Gcs1p, Glo3p, Age1p und Age2p. Sowohl für Gcs1p/Age2p (Poon et al. 2001) als auch für Gcs1p/Glo3p (Poon et al. 1999) sind durch genetische Analysen überlappende, aber essentielle und unterschiedliche Funktionen beschrieben worden.

Es konnte eine Coatomer-abhängige Steigerung der ArfGAP1-Aktivität sowie eine Interaktion mit Arf1·GTP und Coatomer gezeigt werden (Goldberg 1999; Liu et al. 2005). Auch in der Hefe ist eine direkte Glo3p, nicht aber eine Gcs1p, Interaktion mit β' - und γ -COP beschrieben worden (Eugster et al. 2000; Lewis et al. 2004). Dies legt die Existenz eines trimeren Arf1·GTP/ArfGAP1/Coatomer-Komplexes nahe.

Die beiden bislang beschriebenen Bindepartner der $\gamma 1$ -*appendage* Domäne sind ArfGAP2 und ArfGAP3 (Watson et al. 2004). In dieser Arbeit wurde die bevorzugte Bindung von ArfGAP1 und ArfGAP3 an die *appendage*-Domäne von $\gamma 2$ -COP und die präferentielle Interaktion von Zfp289 an die $\gamma 1$ -COP *appendage*-Domäne identifiziert. Möglicherweise handelt es sich bei Zfp289 um ArfGAP2. Allerdings zeigte ArfGAP2 lediglich eine leichte Präferenz der Bindung an $\gamma 1$ -COP und wurde auch von $\gamma 2$ -COP gebunden, während Zfp289 nach MALDI-Analyse (hier keine Normierung der *appendage* Domänen) und reziprokem *pull-down* eine ausgeprägte Präferenz für $\gamma 1$ -COP zeigte.

Zur weiteren Analyse dieser Interaktionen werden weitere Studien notwendig sein, die eine Bindung der ArfGAP-Isoformen an $\gamma 1$ - bzw. $\gamma 2$ -Coatomer untersuchen. Dies wird insbesondere eine differentielle Bindung der ArfGAP-Isoformen an die *appendage*-Domänen im Kontext des Gesamt-Coatomer Komplexes beleuchten.

Es konnte gezeigt werden, daß unter $GTP\gamma S$ -Bedingungen sowohl ArfGAP2 und ArfGAP3, nicht aber ArfGAP1, in COPI Vesikeln aufgenommen werden. Für ArfGAP1 konnte eine krümmungs-sensitive GTPase Aktivität beobachtet werden (Bigay et al. 2003). Als Determinate der ArfGAP1-Krümmungs-Sensitivität wurde eine zentrale 40 AS große Domäne identifiziert (ALPS Motiv = ArfGAP1 *lipid packing sensor*) (Bigay et al. 2005). Insbesondere konnten Punktmutationen von W211A > F214A \cong L207A eine erhöhte GAP-Aktivität an Liposomen mit kleineren Radii, verursacht durch erhöhte Bindung an die steilere Krümmung, deutlich reduzieren. Dies legt nahe, daß die lose gepackten Lipide in der äußeren Lipidschicht von nahezu fertiggestellten oder bereits abgeknospeten COPI-Vesikeln eine erhöhte Lipid-determinierte ArfGAP1-Rekrutierung bedingen als die an einer planaren Lipidmembran der Fall ist. Eine solche Betrachtung vernachlässigt aber eine Beteiligung von Hüllproteinen. Bei den hier durchgeführten Studien wurde zur Erhaltung der COPI-Hüllproteine $GTP\gamma S$ eingesetzt. Anhand von Studien von COPII-Hüllproteinen mit Liposomen konnte gezeigt werden, daß eine unter nicht hydrolysierbaren GMPPNP-Bedingungen generierte Hülle zwar deutlich dünner war als unter GTP-Bedingungen, allerdings waren solche Liposomen vollständig von den Hüllproteinen umgeben. Im Gegensatz dazu waren unter GTP-Bedingungen nur Teilbereiche der Liposomen Protein-umhüllt (Antonny et al. 2001). Dies legt eine dynamische (De-)Polymerisierung von Coatomer auf der Donormembran nahe. Demnach besteht die Möglichkeit, daß die Abwesenheit von ArfGAP1 bei den COPI-Vesikeln unter $GTP\gamma S$ -Bedingungen hervorgerufen wird durch mangelnde Protein-Lipid-Interaktionsstellen. Einhergehend damit muß angenommen werden, daß eine $\gamma 2$ -

COP/ArfGAP1-Interaktion im COPI-Vesikel entweder nicht ausreichend oder, bedingt durch die konformative Änderung/Polymerisierung von Coatomer, nicht vorhanden ist. Analog wäre eine Beteiligung von Lipiden an der Bindung von ArfGAP2 und ArfGAP3 an COPI-Vesikel vernachlässigbar. Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen (siehe Abschnitt 2. Vergleich von ArfGAPs hinsichtlich der krümmungs-sensitiven Domäne) legt jedenfalls nahe, daß die an der Erkennung von Membran-Krümmung beteiligten Aminosäuren von ArfGAP1/Gcs1p nicht in ArfGAP3 (und Zfp289) konserviert sind (Bigay et al. 2005).

Eine verminderte Aufnahme von ArfGAP1 in COPI-Vesikel unter GTP γ S-, nicht aber unter GTP-Bedingungen, wurde bereits gezeigt (Yang et al. 2002). Die Autoren führten dies auf eine artifiziell durch GTP γ S-hervorgerufene Konformation von Membran-verankertem Arf1 zurück. Demnach wäre eine reduzierte Arf1-GTP/ArfGAP1-Interaktion ursächlich für die Abwesenheit von ArfGAP1 in COPI-Vesikeln.

Es ist anzunehmen, daß die dritte im Coatomer-Komplex vorhandene *appendage*-Domäne von β -COP ebenso individuelle Interaktionspartner aufweist. Aufgrund der Präsenz von β -COP bei allen Coatomer-Isotypen wären die β -COP Bindepertner allerdings nicht an einer γ -COP determinierten differentiellen Funktion beteiligt. Andererseits wären unterschiedliche isotypisch bedingte Funktionen für Zfp289 und ArfGAP1/3 anzunehmen. Da vermutlich nur ArfGAP1, nicht aber Zfp289 und ArfGAP3, ein ALPS-Motiv aufweisen, erscheint es möglich, daß nur die γ 2-Coatomer Dissoziation einer Krümmungs-Sensitivität unterworfen ist. Eine Übersicht der Coatomer/ArfGAP-Interaktionen ist in **Abbildung 37** dargestellt.

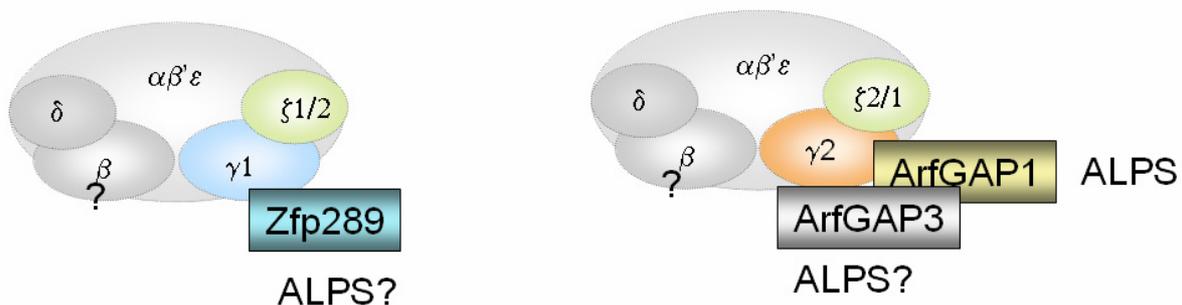


Abbildung 37: Übersicht der Interaktionen von Coatomer- mit ArfGAP-Isoformen. Dargestellt sind die Interaktionen von γ_1 -COP mit Zfp289 und von γ_2 -COP mit ArfGAP1 und ArfGAP3. Aufgrund einer wahrscheinlichen Identität von Zfp289 mit ArfGAP2 ist ArfGAP2 vernachlässigt worden. ALPS = ArfGAP1 lipid packaging sensor (Bigay et al. 2005). Ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen legt nahe, daß ArfGAP3 und Zfp289 nicht krümmungs-sensitiv sind.

1.2 Annexin A11

Annexin A11 gehört zu der Annexin Superfamilie. In Säugern sind 13 Annexine beschrieben worden (A1-A13). Per Definition muß ein Annexin zwei Kriterien erfüllen: Erstens Ca^{2+} -abhängige Bindung an negativ geladene Phospholipide und zweitens die Präsenz eines konservierten strukturellen Elements, des sogenannten Annexin *repeats* (Gerke und Moss 2002). Annexine sind in der Lage, zwei Lipidmembranen zu verbrücken, die genauen Mechanismen dazu sind allerdings nicht vollständig verstanden. Annexine sind an verschiedenen intrazellulären Prozessen beteiligt. Darunter ist auch eine Beteiligung in exo- und endocytotischen Transportwegen beschrieben, z.B. des apikalen Transportwegs von TGN (Annexin A13b), der Ca^{2+} -induzierten Exocytose von sekretorischen Granulen (Annexin A2/S100A10), der Biogenese von späten Endosomen (Annexin A1/2) und speziellen Clathrin-abhängigen Transportwegen (Annexin A6) (Gerke et al. 2005). Annexin A11 kann sowohl PE, PA und PS, nicht aber PC, insbesondere in Gegenwart von Calcium binden. Ferner induziert Annexin A11 in Gegenwart von nicht physiologischen Calcium-Konzentrationen ($> 1 \text{ mM}$) die Aggregation von PS- und PA-Vesikeln (Lecona et al. 2003). In den meisten kultivierten Zelllinien ist Annexin A11 weitgehend nukleär lokalisiert, während eine cytoplasmatische Lokalisierung in primären Hepatocytenkulturen beobachtet wird. Eine typische KernLokalisierungssequenz konnte jedoch nicht identifiziert werden. An der subzellulären Lokalisierung scheinen folgende Parameter beteiligt zu sein:

- Ca^{2+} -Konzentration: Einerseits konnte Annexin A11 aus isolierten 3Y1-Zellkernen in Abwesenheit von Ca^{2+} extrahiert werden, während durch IF-Studien in COS-7 Zellen ein umgekehrtes Verhalten beobachtet wurde (Mizutani et al. 1992; Farnaes und Ditzel 2003)
- Ser/Thr-Phosphorylierung: In v-src-transformierten 3Y1-Zellen wurde eine partielle Ser/Thr-Phosphorylierung von Annexin A11 gezeigt. Nur die phosphorylierte Form konnte in einer cytoplasmatischen Fraktion detektiert werden (Mizutani et al. 1993)
- Alternatives Spleißen: Innerhalb der N-terminalen Domäne (197 AS) konnte eine alternative Speißstelle von 37 und 39 AS an Position 20 identifiziert werden, daher gibt es zwei alternative Annexin A11-Isoformen: Annexin A11-A und -B. Nur Annexin A11-B ist in Sf9-Zellen cytoplasmatisch, insbesondere an ER und Plasmamembranen, lokalisiert. Allerdings war die Membran-Assoziation von Annexin A11-B Ca^{2+} -unabhängig (Sudo und Hidaka 1998).

Bislang sind vier Interaktionspartner von Annexin A11 bekannt: ALG-2 (*apoptosis-linked gen-2*) und S100A6/Calcyclin, beides Ca^{2+} -bindende Proteine der Penta EF-Handfamilie (Tokumitsu et al. 1993; Satoh et al. 2002) sowie β -Tubulin und CHO1 (Tomas et al. 2004). Während die Interaktionen mit den Penta EF-Handproteinen bislang keinerlei funktionelle Hinweise erbrachte, zeigte die Interaktion mit Tubulin und insbesondere mit CHO1 eine Beteiligung von Annexin A11 an der Ausbildung der Zentralspindel und des *midbodies* bei der letzten Phase der Cytokinese.

Zusammenfassend konnte die Bindung von Annexin A11 an die *appendage* Domäne von γ 2-COP gezeigt werden. Die MALDI-Analyse erlaubte allerdings keine Diskriminierung zwischen mAnnexin A11-A und -B, da das der alternativen Spleißstelle am nächsten liegende Peptid erst an Position 203 identifiziert wurde. Eine reziproke Bindung von γ 2-COP an rekombinantes Maus Annexin A11-A war allerdings nicht möglich. Für bovines Annexin A11 konnte gezeigt werden, daß lediglich eine durch alternatives Spleißen entstandene Isoform, Annexin A11-B, cytoplasmatisch bzw. (ER)-Membran assoziiert war, während Annexin A11-A hauptsächlich im Zellkern lokalisiert war (Sudo und Hidaka 1998). Somit wäre nur Annexin A11-B in der Lage, cytoplasmatischen Coatomer zu binden. Ferner war nur Annexin A11-A in der Lage, einen bekannten Annexin A11-Liganden (S100A6) zu binden, daher ist eine Bindung von S100A6 im alternativen Spleißbereich anzunehmen. Möglicherweise befindet sich die Bindestelle von γ 2-COP ebenso dort. Demnach kann vermutet werden, daß Annexin A11-B der relevante γ 2-COP Bindepertner ist.

Eine funktionelle Relevanz dieser Interaktion steht allerdings noch aus, da Annexin A11 weder in COPI-Vesikel aufgenommen (**Abbildung 21**) wird noch eine deutliche Ko-Lokalisierung gezeigt werden konnte (**Abbildung 20**). Hier ist anzumerken, daß der in beiden genannten Experimenten verwendete Antikörper das Annexin A11 bei der *pull-down*-Analyse erkannt hat (**Abbildung 17**) und somit zum Nachweis geeignet war.

Annexin A11 ist nicht in der Hefe, in *D. melonogaster* oder *C. elegans* vorhanden (Tomas et al. 2004). Ebenso weisen diese Organismen nur eine γ -COP Isoform auf. Dies könnte auf eine ko-evolutionär bedingte, funktionelle Kopplung beider Proteine hinweisen.

Weiterhin ist bekannt, daß die Ca^{2+} -Konzentration einen Einfluß auf den COPI-vermittelten Transport hat (Ivessa et al. 1995; Porat und Elazar 2000; Ahluwalia et al. 2001; Chen et al. 2002). Da bislang keine COPI-Komponente bekannt ist, die Ca^{2+} bindet, könnte hier Annexin A11 das fehlende Bindeglied sein.

1.3 Rab1b und ALG-2

Über *pull-downs* konnte die Interaktion von Annexin A11 und Zfp289 mit den *appendage*-Domänen von γ 2- bzw. γ 1-COP *in vitro* nachgewiesen werden. Die differentiellen Interaktionen können als guter Indikator für verschiedene Funktionen beider Isoformen herangezogen werden. Bei einem Experiment konnte eine Wechselwirkung von Rab1b mit γ 1- und γ 2-COP und eine γ 2-COP spezifische Interaktion mit ALG-2 identifiziert werden. Beiden Proteinen kann eine funktionelle Relevanz zugesprochen werden. Rab1 ist als *cis*-Golgi lokalisiertes Protein an der Regulation von *tethering* Proteinen und der Coatomer-Rekrutierung beteiligt (Alvarez et al. 2003; Satoh et al. 2003) und ALG-2 ist ein bekannter Interaktionspartner von Annexin A11 (Satoh et al. 2002). Zur Verifikation dieser Interaktionspartner ist vermutlich ein definiertes Ca^{2+} -Milieu notwendig, da sowohl die Aktivität von Rab1 (Pind et al. 1994) als auch die Interaktion von ALG-2 mit Annexin A11 (Satoh et al. 2002) Ca^{2+} -abhängig sind.

2. Nachweis isotypischer γ 1 ζ 2- und γ 2 ζ 1-COPI-Vesikel

2.1 Analyse der cytosolischen γ/ζ -COP Interaktionen

Es konnten Antikörper gewonnen werden, die spezifisch γ 1- und γ 2-COP im nativen Zustand erkennen. Dies erlaubte die Ko-Immünpräzipitation von γ 1- oder γ 2-COP enthaltenem Coatomer sowohl aus Rattenleber- als auch 3T3 Cytosol und damit die Identifizierung eines bislang unerkannten γ 2 ζ 2-Coatomer-Isotyps. Diese neue Interaktion deckt sich gut mit *yeast-two-hybrid* Studien, die eine γ 2 ζ 2-Interaktion nahelegten (Futatsumori et al. 2000; Takatsu et al. 2001). Da eine vorhergehende Quantifizierung der Coatomer-Isotypen γ 2 ζ 2-Coatomer unberücksichtigt ließ (Wegmann et al. 2004), war nun eine erneute Quantifizierung notwendig. Ferner erlaubten die gewonnenen Antikörper in Verbindung mit den aufgereinigten GST- $\text{my}1$ -app und GST- $\text{my}2$ -app Antigenen eine direkte Quantifizierung der γ 1- und γ 2-COP Coatomer Anteile durch Western Blot-Analyse aus 3T3/Maus Cytosol. Es wird deutlich, daß γ 2 ζ 2-Coatomer mit 5% den geringsten Anteil an der gesamten Coatomer Population hat. Ein Vergleich der neu erhaltenen Werte legt nahe, daß die zuvor auf 20% bestimmte γ 1/ ζ 2-Population nun um ca. 5% auf Kosten der neu identifizierten γ 2/ ζ 2-Population reduziert werden muß. Den größten Anteil an Coatomer macht nun der γ 1 ζ 1-Isotyp mit ca. 56% aus, während der Anteil von γ 2 ζ 1-Coatomer bei 25% liegt. Auch hier legt

ein Vergleich mit den zuvor gewonnenen Werten von 40% und 40% nahe, daß die Erhöhung des $\gamma 1\zeta 1$ -Isotyps auf Kosten einer Reduktion des $\gamma 2\zeta 1$ -Isotyps erfolgte.

Folgende Gründe können zur Erklärung der unterschiedlichen Werte herangezogen werden:

- a) Die Verschiebung der Anteile der $\gamma 1\zeta 1$ - und der $\gamma 2\zeta 1$ -Isotypen ist hauptsächlich in einer Erhöhung des relativen Anteils von $\gamma 1/\gamma 2$ -COP begründet (70/30 im Vergleich zu 60/40). Eine genauere Betrachtung der Fig. 3B (Wegmann et al. 2004), die ebenso wie in der vorliegenden Arbeit $\gamma 1/\gamma 2$ -COP ausgehend von einer CM1-IP ins Verhältnis setzt, legt allerdings ebenso ein Verhältnis von 70/30 nahe.
- b) Bei der Quantifizierung des $\zeta 1/\zeta 2$ -Anteils wurde Rattenlebercytosol eingesetzt, daß zuvor bei -80°C eingefroren war. Es konnte gezeigt werden, daß durch den Einfrier-/Auftauprozess eine verstärkte Dissoziation von $\zeta 1$ - und $\zeta 2$ -COP erfolgte. Alle hier gezeigten Quantifizierungen erfolgten aus frisch präpariertem 3T3 Cytosol.
- c) Der zuvor erbrachte Nachweis einer nicht vorhandenen Interaktion von $\gamma 2$ - mit $\zeta 2$ -COP wurde durch eine IP mit α - $\zeta 2$ -COP in Verbindung mit einer $\gamma 1\text{R}$ -Antikörper basierten Western Blot-Analyse erbracht. Zum einen bedingte dies eine Immobilisierung der $\zeta 2$ -COP enthaltenden Coatomer Isotypen über vermutlich lose assoziiertes $\zeta 2$ -COP (Kuge et al. 1993; Lowe und Kreis 1995), während die $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP spezifischen Antikörper eine γ -COP basierte Präzipitation ermöglichen. Ferner erlauben die neu gewonnenen $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP spezifischen Antikörper eine sensitivere Detektion in der Western Blot-Analyse als der zuvor verwendete $\gamma 1\text{R}$ -Antikörper (vgl. **Abbildung 33** und **Abbildung 11**).

Es besteht dennoch die Möglichkeit, daß während der IP auch die γ/ζ -Interaktionen partiell verloren gehen und die erhaltenen Stöchiometrien von der *in vivo* Situation leicht abweichen. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß z.B. α - und β' -COP bei Immunpräzipitationen von $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COP substöchiometrische Signale im Vergleich zu einer IP mit dem CM1-Antikörper zeigen (siehe **Abbildung 11**). Da sowohl $\gamma 1$ - als auch $\gamma 2$ -COP mit $\zeta 1$ - und $\zeta 2$ -COP interagieren, können die relativen Anteile der Coatomer-Isotypen auch direkt aus dem Verhältnis von $\gamma 1/\gamma 2$ - und $\zeta 1/2$ -COP, bestimmt aus IPs mit dem CM1-Antikörper, berechnet werden. Da der CM1-Antikörper definitionsgemäß Holo-Coatomer immunpräzipitiert, sind so bei der IP auftretende Dissoziationseffekte auszuschließen. Dieser alternative Rechenweg ist in **Tabelle 10** dargestellt:

Tabelle 10: Validierung der Coatomer-Stöchiometrie. Es wurde der relative Anteil von γ 1- und γ 2-COP sowie von ζ 1- und ζ 2-COP aus einer CM1-IP bestimmt. Der Anteil der Coatomer-Isotypen ergab sich dann aus dem Produkt der jeweiligen Anteile, z.B. γ 1 ζ 1 [%] = γ 1_{CM1-IP} [%] · ζ 1_{CM1-IP} [%].

Isoform	γ 1	γ 2	ζ 1	ζ 2
Anteil [%] aus einer CM1-IP	70 (diese Arbeit)	30 (diese Arbeit)	80 (Wegmann et al. 2004)	20 (Wegmann et al. 2004)
Coatomer-Isotyp	γ 1 ζ 1	γ 1 ζ 2	γ 2 ζ 1	γ 2 ζ 2
Anteil [%] (diese Arbeit)	56 +/- 15	14 +/- 3	26 +/- 9	5 +/- 4
Anteil [%] aus einer CM1-IP	56 (= 70% · 80%)	14 (= 70% · 20%)	24 (= 30% · 80%)	6 (= 30% · 20%)

Die erhaltenen Werte decken sich gut mit den zuvor berechneten Stöchiometrien (vgl. **Tabelle 4**). Dies unterstreicht die Gültigkeit der Quantifizierung.

Ferner konnte gezeigt werden, daß neben den vier Coatomer-Isotypen auch Coatomer-freies γ 1 ζ 2- und γ 2-COP mit einem Anteil von ca. 2% vorliegt (siehe **Abbildung 12** und **Abbildung 13**). Möglicherweise handelt es sich um bei der Coatomer-Biogenese benötigte Komponenten (Lowe und Kreis 1996). Auch war bislang unbekannt, daß ζ 2-COP in monomerer Form existiert, wobei der relative Anteil an Coatomer-freiem *pool* den von ζ 1-COP übersteigt. Eine funktionelle Relevanz für ζ 1-COP ist bislang nicht bekannt (Kuge et al. 1993).

2.2 Differentielle Verteilung von γ 1 ζ 2- und γ 2 ζ 1-COPI Vesikeln im Golgi-Apparat

Anhand von γ 1-, γ 2- und ζ 2-COP spezifischen Immunisolierungen von *in vitro* unter GTP γ S-Bedingungen generierten COPI-Vesikeln konnte gezeigt werden, daß es distinkte COPI-Vesikelpopulationen gibt (siehe **Abbildung 22**). Eine Quantifizierung der γ 1/ γ 2-COP Signale zeigte ein im Vergleich zum COPI-Vesikelinput relatives Verhältnis von 1,21 für die γ 1-COPI IP und von 0,5 für die γ 2-COP IP. Das Signalverhältnis von ζ 1/ ζ 2-COP war entsprechend 0 (hier konnte kein ζ 1-COP nachgewiesen werden) für die γ 1-COP IP und 3,03 für die γ 2-COP IP (**Abbildung 23**).

Unter Berücksichtigung einer γ_1/γ_2 -COP Stöchiometrie von 70%/30% und von ζ_1/ζ_2 -COP von 80%/20% im Cytosol und den bereits beschriebenen Western Blot-Signalverhältnissen (Wegmann et al. 2004) lassen sich folgende absolute Stöchiometrien berechnen (**Tabelle 11**):¹

Tabelle 11: Stöchiometrien von γ_1 -, γ_2 -, ζ_1 - und ζ_2 -COP in Coatomer, COPI-Vesikeln und γ_1 - und γ_2 -COPI Isolaten. Die in fetter Schrift markierten Zahlen markieren Anreicherungen der COP-Proteine im Vergleich zum vorhergehenden Schritt.

Quelle	Cytosol	→ COPI-Vesikel	→ γ_1 -COPI IP	→ γ_2 -COPI IP
Anteil γ_1 [%]	70	47	51	30
Anteil γ_2 [%]	30	53	49	70
Anteil ζ_1 [%]	80	85	0	94
Anteil ζ_2 [%]	20	15	100	6

Es wird deutlich, daß das γ_1/γ_2 - und das ζ_2/ζ_1 -COP Verhältnis von Coatomer in COPI-Vesikeln im Vergleich zum Cytosol deutlich abnimmt. Daher muß es bei der *in vitro*-Vesikelbiogenese zu einem Verlust von $\gamma_1\zeta_2$ -Coatomer kommen. Eine folgende γ_1 -COP IP dieser Vesikel bewirkt nur eine leichte Veränderung des γ_1/γ_2 -COP Verhältnisses, allerdings ist ζ_1 -COP nicht mehr detektierbar. Im Gegensatz dazu wird bei einer γ_2 -COP IP eine deutlichere Veränderung des γ_1/γ_2 - und ζ_1/ζ_2 -COP Verhältnisses erreicht: Der bereits bei der *in vitro*-Vesikelbiogenese auftretende Effekt einer γ_2/ζ_1 -COP Anreicherung wird nochmals signifikant verstärkt.

Demnach können mindestens dominante $\gamma_1\zeta_2$ - und auch $\gamma_2\zeta_1$ -COPI-Vesikel angenommen werden. Allerdings zeigen COPI-Vesikel keine Exklusivität der γ_1/γ_2 - bzw. der ζ_1/ζ_2 -Inkorporation wie Coatomer, denn in $\gamma_1\zeta_2$ -COPI Isolaten konnte auch γ_2 -COP gefunden werden und in $\gamma_2\zeta_1$ -COPI ebenfalls γ_1 - und ζ_2 -COP. Daher ist in $\gamma_1\zeta_2$ -COPI Vesikeln auch ein Einbau von $\gamma_2\zeta_2$ -Coatomer anzunehmen, während die Präsenz aller vier γ/ζ -Isoformen in γ_2 -COPI-Isolaten prinzipiell sowohl durch Kombinationen von zwei ($\gamma_1\zeta_1/\gamma_2\zeta_2$ und $\gamma_1\zeta_2/\gamma_2\zeta_1$), von drei ($\gamma_1\zeta_1/\gamma_1\zeta_2/\gamma_2\zeta_1$, $\gamma_1\zeta_1/\gamma_1\zeta_2/\gamma_2\zeta_2$, $\gamma_1\zeta_1/\gamma_2\zeta_1/\gamma_2\zeta_2$, $\gamma_2\zeta_1/\gamma_2\zeta_1/\gamma_2\zeta_2$) und aller vier Coatomer-Isotypen ($\gamma_1\zeta_1/\gamma_1\zeta_2/\gamma_2\zeta_1/\gamma_2\zeta_2$) erreicht werden kann. Die Überrepräsentation von $\gamma_1\zeta_2$ - und $\gamma_2\zeta_1$ -COP in den γ_1 - bzw. γ_2 -COP Isolaten legt jedenfalls eine präferentielle Inkorporation dieser beiden Coatomer-Isotypen in COPI-Vesikel nahe.

¹ Ausgehend von den cytosolischen Stöchiometrien und den damit korrelierenden Western Blot-Signalverhältnissen für γ_2/γ_1 - (0,6) und ζ_2/ζ_1 -COP (0,7) (Wegmann et al. 2004) wurden zunächst Proportionalitätsfaktoren bestimmt. Für cytosolischen Coatomer lauteten diese 1,4 für γ_2/γ_1 - und 2,8 für ζ_2/ζ_1 -COP. Damit konnten zunächst die Western Blot-Signalverhältnisse der COPI-Vesikel (1,6 für γ_2/γ_1 -COP und 0,5 für ζ_2/ζ_1 -COP) in die genannten Stöchiometrien umgerechnet werden. Unter der Annahme von vergleichbaren Stöchiometrien in den hier durchgeführten Versuchen konnten dann die o.g. Western Blot-Signalverhältnisse ebenfalls als Mengenverhältnis dargestellt werden.

Bedingt durch die verwendete Methode kann aber nicht weiter unterschieden werden. So sind ebenso COPI-Vesikel mit Präsenz bis zu allen vier Coatomer-Isotypen denkbar, allerdings in geringeren Mengen.

Unterstützt wird die Annahme von distinkten $\gamma 1\zeta 2$ - und $\gamma 2\zeta 1$ -COPI-Vesikeln durch eine EM-Analyse von $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - und $\zeta 2$ -COP, die die Lokalisierung dieser Proteine auf ultrastrukturellem Niveau zeigte. Aufgrund eines Mangels eines $\zeta 1$ -COP spezifischen Antikörpers war eine Analyse von $\zeta 1$ -COP noch nicht möglich. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß eine *in vivo*-Analyse erfolgt, bei der die betrachteten Strukturen definitionsgemäß unter GTP-Bedingungen entstanden sind. Hier konnte eine präferentielle *cis*-Golgi Lokalisierung von $\gamma 1$ - und $\zeta 2$ -COP und eine hauptsächlich *trans*-Golgi Lokalisierung von $\gamma 2$ -COP beobachtet werden. Da Coatomer-freie Anteile dieser Proteine vernachlässigbar sind (siehe **Abbildung 5**), ist davon auszugehen, daß $\gamma 1\zeta 2$ -Coatomer tendenziell im *cis*-Golgi und $\gamma 2\zeta 1$ -Coatomer präferentiell im *trans*-Golgi Bereich wirkt. Diese unterschiedliche Lokalisierung von $\gamma 1/\zeta 2$ -COP und $\gamma 2/\zeta 1$ -COP über den Golgi-Apparat schließt ebenso wie die biochemische Analyse nicht die Gegenwart von COPI-Vesikeln mit statistischer Coatomer-Inkorporation aus, aber auch hier wäre nur ein geringer Anteil dieser Spezies, beispielsweise im medialen Golgi-Bereich, am Gesamt-*pool* denkbar.

Der bereits beschriebene Effekt einer Anreicherung von $\gamma 2$ - und $\zeta 1$ -COP in COPI-Vesikel im Vergleich zum Cytosol/*primed* Golgi (siehe beispielsweise **Abbildung 35**) (Wegmann et al. 2004) steht mit einer funktionellen Unterscheidbarkeit von $\gamma 2\zeta 1$ - zu $\gamma 1\zeta 2$ -Coatomer in gutem Einklang. Unter Berücksichtigung der bevorzugten *cis*-Lokalisierung von $\gamma 1\zeta 2$ -Coatomer kann dieser Effekt möglicherweise durch einen bei der Golgi-Präparation bedingten Mangel von *cis*-Golgi-Komponenten oder des ERGIC bedingt sein.

Die präferentielle Verwendung von $\gamma 1\zeta 2$ - und $\gamma 2\zeta 1$ -COP in COPI-Vesikeln könnte eine zuvor nachgewiesene Heterogenität von COPI Vesikeln begründen (Orci et al. 1997; Orci et al. 2000; Malsam et al. 2005). Eine direkte Korrelation war an dieser Stelle noch nicht möglich, da eine Analyse von in obigen Publikationen verwendeten Heterogenitäts-Determinanten (p115, CASP, Gos28, ManI/II, RSA, p24 Proteine oder KDELR) durch das bei der Immunisolierung verwendete Detektionssystem (RG16/True Blot-Sekundärantikörper) nebst Hintergrund der Antikörper-Ketten erschwert wurde (Daten hier nicht gezeigt).

Die Ko-Immunisolierung von $\gamma 1$ - in $\gamma 2$ -COPI-Vesikel Isolaten steht allerdings im Widerspruch von zuvor durchgeführten Studien. Anhand von Epitop-markierten, konstitutiv

HA-hy2 überexprimierenden Zellen (Futatsumori et al. 2000) konnte eine exklusive Inkorporation von γ 2-COP in COPI-Vesikel gezeigt werden (Wegmann et al. 2004). Allerdings wurde eine parallele Vesikelkontrolle nicht durchgeführt und z.B. die Gegenwart von transmembranen Proteinen nicht gezeigt. Demnach wäre bei diesen Experimenten nicht auszuschließen, daß Coatomer und nicht COPI-Vesikel immunisoliert wurde. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde die Isolierung von Vesikeln einmal durch die Ko-Präzipitation der jeweils anderen Isoform und durch die Gegenwart des Transmembranproteins Tfr indiziert.

Interessant ist die Einbeziehung der in **Tabelle 10** nachgewiesenen Stöchiometrie der Coatomer-Isotypen. Während der Anteil von γ 2 ζ 1-Coatomer auf ca. 25% bestimmt wurde, ergab γ 1 ζ 2-Coatomer einen Anteil von ca. 15%. Denkbar wäre, daß der mit 5% vorhandene Anteil von γ 2 ζ 2-Coatomer in dem Überlappungsbereich zweier reziproker *cis/trans*-Gradienten wirkt. Was aber ist die Funktion und die Lokalisierung der Hauptpopulation (> 50%) von γ 1 ζ 1-Coatomer? Hier sind weitergehende *in vitro*-Analysen der isolierten Coatomer-Isotypen sowie eine EM-Analyse von ζ 1-COP unerlässlich. Es ist anzumerken, daß die durchgeführten EM-Studien die Topologie des Golgi-Apparates nicht berücksichtigen. Eine topologische Studie des Golgi-Apparates von *Pichia pastoris* zeigte, daß die Oberfläche der medialen Golgi-Cisterne vergleichsweise am größten war (Mogelsvang et al. 2003). Demnach wäre der mediale Golgi-Bereich in den hier durchgeführten EM-Studien unterrepräsentiert und ein Wirken von γ 1 ζ 1-Coatomer dort nicht auszuschließen. Eine Übersicht über die Verteilung und Stöchiometrien der Coatomer-Isotypen über den Golgi-Apparat ist in **Abbildung 38** gezeigt.

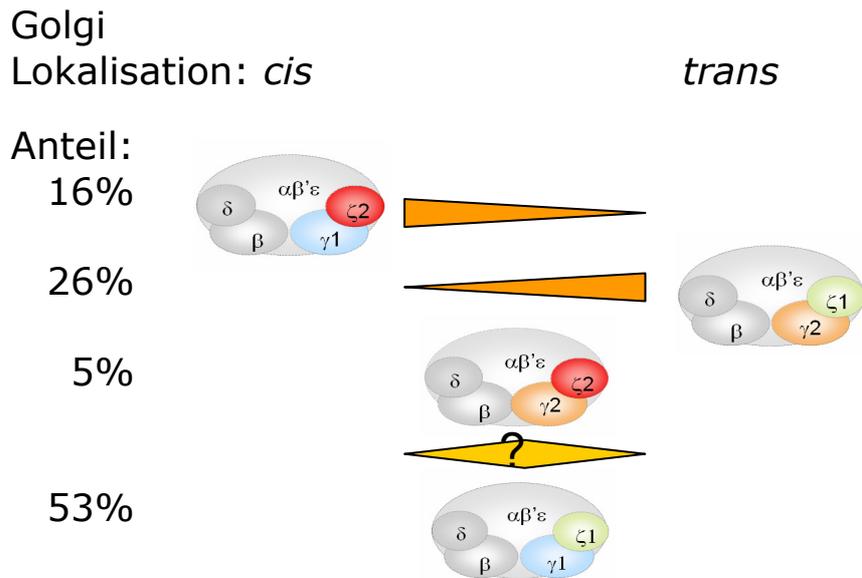


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Lokalisierung von $\gamma 1\zeta 2$ - und $\gamma 2\zeta 1$ -COPI-Vesikeln im Golgi-Apparat unter Einbeziehung der Coatomer-Isotyp Stöchiometrien. Möglichweise wirken $\gamma 2\zeta 2$ - und $\gamma 1\zeta 1$ -Coatomer im medialen Golgi-Bereich.

Zusammenfassend zeigen die angeführten Resultate eine *cis*-Golgi Lokalisierung von $\gamma 1\zeta 2$ - und eine *trans*-Golgi Lokalisierung von $\gamma 2\zeta 1$ -COPI Vesikeln. Somit konnte nicht nur eine Hüllprotein-determinierte isotypische Homogenität verschiedener COPI-Vesikel, sondern auch deren differentielle Lokalisierung eindeutig gezeigt werden. In Analogie zum Clathrin-System wird daher durch die den AP-Komplexen vergleichbaren Bestandteile von Coatomer, die unterschiedlichen $\gamma\zeta$ -Subkomplexe, Heterogenität und unterschiedliche Lokalisierung der Vesikel bewirkt. Ferner besteht Grund zu der Annahme, daß durch die unterschiedliche Verwendung der γ - und ζ -COP Isoformen eine Direktionalität des COPI-vermittelten Transports erreicht wird.

2.3 Differentielle Frachtaufnahme in $\gamma 1$ - und $\gamma 2$ -COPI Vesikel

Die Immunisolierung von dominanten $\gamma 2\zeta 1$ -COPI Vesikeln zeigte eine gegenüber von $\gamma 1\zeta 2$ -COPI Vesikeln erhöhte Präsenz einer anterograd gerichteten Proteinfracht (Transferrin Rezeptor). Allerdings fehlt an dieser Stelle eine konsistente Standardisierung. Während das $\zeta 2$ -COP Signal bei beiden Isolierungen vergleichbar ist, geht die Signalstärke von β' - und auch γ -COP mit der Tfr-Signalstärke einher. Daher kann keine verlässliche Aussage über eine γ -COP determinierte differentielle Frachtaufnahme gemacht werden. Eine Aufnahme von Tfr in $\gamma 2\zeta 1$ -COPI Vesikeln würde eine Beteiligung dieser Vesikel-Spezies am anterograden Transport nahelegen. Hier wird im weiteren ein Nachweis von ER/Golgi-zyklisierenden

Komponenten wie z.B. der p24 Proteine, ERGIC oder KDELr in γ 1-COPI Isolaten wichtig sein.

3. Etablierung eines *knock-down* Systems für γ 1- und γ 2-COP

Es wurden Zelllinien mit induzierbarem Epitop-markierten HA-h γ 1- und Myc-h γ 2-COP Phänotyp etabliert. Es konnten Expressionsbedingungen gefunden werden, die sowohl eine homogene Expression als auch ein günstiges Verhältnis von Coatomer-freiem zu Coatomer-inkorporiertem Protein erlaubten. Somit macht sich eine Induktion von 48 h mit einer 24 h Abklingphase (+/- Dox) vermutlich die unterschiedliche Halbwertszeit von freiem vs. Coatomer inkorporiertem γ -COP zunütze. Es konnte gezeigt werden, daß die exogenen Proteine funktionell und entsprechend den endogenen Pendanten in Coatomer eingebaut werden. Eine genauere Betrachtung der sowohl der endogenen als auch der exogenen Isoformen zeigte jedoch einen unerwarteten Effekt: Durch die Induktion jeweils beider exogener Proteine wurde die Expression sowohl von γ 1- als auch γ 2-COP herabreguliert, was netto zu einem γ 1- oder γ 2-COP *knock-down* führte. Somit wurde ein induzierbares *knock-down* System etabliert, daß für weitere geplante *loss-of-function* Studien unentbehrlich sein wird.

Ein leicht verändertes γ 1/ γ 2-COP Verhältnis konnte *in vivo* toleriert werden (siehe **Abbildung 32**). Dies spricht für eine partielle Anpassungsfähigkeit der Zelle hinsichtlich des γ 1- und γ 2-COP vermittelten Transports. Allerdings war die Präsenz nur einer Isoform, wie sie z.B. bei der FACS-basierten Vereinzelung der Zelllinien auftrat, nur temporär haltbar (siehe **Abbildung 27**). Ein simultaner RNAi-basierter *knock-down* von γ 1- und γ 2-COP war ebenso nur temporäre erreichbar (siehe **Abbildung 36**). Somit zeigte ein individueller *knock-down* von γ 1- oder γ 2-COP vermutlich ebenso Letalität wie die gleichzeitige Reduktion von γ 1- und γ 2-COP. Daher ist davon auszugehen, daß γ 1- und γ 2-COP nicht funktionell substituierbar sind. Dies ist übereinstimmend mit einer essentiellen, unterschiedlichen Beteiligung von γ 1- und γ 2-COP am sekretorischen Weg.

4. Ein Modell zur Funktion von γ 1- und γ 2-COP bei der COPI-Vesikelbiogenese

Ausgehend von der unterschiedlichen Bindung der ArfGAP- an die γ -COP-Isoformen sowie der Präsenz von distinkten γ 1- und γ 2-COPI-Vesikeln wird im weiteren ein Modell vorgestellt, daß eine mögliche γ -COP determinierte Frachtaufnahme begründen könnte:

γ -COP dient vermutlich ausschließlich als Bindepartner von Coatomer-Rezeptoren wie der p24 Familie (Béthune et al., Manuskript in Arbeit), während die Interaktion von Proteinfracht mit cytoplasmatischen Peptidschwänzen über die WD40-Domänen der α - und β' -COP Untereinheiten vermittelt wird (Letourneur et al. 1994; Eugster et al. 2004). Demnach würden die Coatomer-Isotypen, definiert durch die γ/ζ -COP Isoformen, keine direkte Rolle bei der differentiellen Frachtaufnahme spielen können. Allerdings könnte ein Einfluß von γ 1- oder γ 2-COP indirekt vermittelt sein: Isotyp-spezifische Bindepartner wären möglicherweise an einer selektiven Fracht-Aufnahme beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine differentielle Bindung von ArfGAP-Isoformen an die *appendage*-Domänen von γ 1- und γ 2-COP festgestellt werden (schematisch dargestellt in **Abbildung 37**). Somit könnten ArfGAP-Isoformen das fehlende Bindeglied sein. Demnach wären Zfp289 und ArfGAP3 direkt an der differentiellen Frachtaufnahme beteiligt (siehe **Abbildung 39 A** und **B #3b**). Unterstützt würde dies durch Befunde, die direkte Interaktionen von ArfGAPs mit Proteinfracht aufzeigten (Aoe et al. 1998; Aoe et al. 1999; Lanoix et al. 2001; Rein et al. 2002; Yang et al. 2002).

Ferner kann die Krümmungs-Sensitivität der ArfGAP-Isoformen einbezogen werden. Ein Aminosäure-Sequenz Vergleich legt nahe, daß Zfp289 und ArfGAP3 im Gegensatz zu ArfGAP1 nicht krümmungs-sensitiv sind (siehe Abschnitt 2. Vergleich von ArfGAPs hinsichtlich der krümmungs-sensitiven Domäne). Neben Zfp289 konnte kein weiteres, an γ 1-COP bindendes, Arf1-GAP identifiziert werden (unter der Annahme, daß Zfp289 identisch ist mit ArfGAP2). Daher wäre in γ 2-COPI-Vesikeln, vermittelt durch ArfGAP1, eine krümmungs-sensitive GAP-Aktivität vorhanden, nicht aber in γ 1-COPI-Vesikeln. Demnach würde die Dissoziation der COPI-Proteinhülle bei γ 2-enthaltenden COPI-Vesikeln der Abknospung entweder einhergehen oder schnell danach auftreten (**Abbildung 39 B**, #4 + #5). In γ 1-COPI-Vesikeln laufen beide Schritte, also die Abknospung der Vesikel und die Dissoziation der Proteinhülle, möglicherweise hintereinander ab (**Abbildung 39 A**, #4, dann #5). Eine Übersicht des hier skizzierten Modells ist in (**Abbildung 39**) dargestellt. Bereits etablierte Schritte der COPI-Vesikelbiogenese sind in Rosa unterlegt und bereits im Einleitungsteil diskutiert worden (siehe **Abbildung 2**).

Zukünftige Experimente sollten daher insbesondere eine Beteiligung der einzelnen Komponenten insbesondere unter Berücksichtigung der ArfGAP-Isoformen an den einzelnen Schritten der Vesikelbiogenese herausstellen. Hier bietet sich die *in vitro*-Herstellung von Vesikeln mit aufgereinigten Komponenten an (Bremser et al. 1999). Ferner sollten Interaktionen der ArfGAP-Isoformen mit unterschiedlicher Fracht analysiert werden (Aoe et

IV. Material

1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen BioRad (München), Calbiochem (Bad Soden/Taunus), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein) und Roche (Mannheim) bezogen. Das Doxycyclin stammte von Clontech (Palo Alto, USA) und wurde in einer 1000x Lösung in PBS_{tc} (1 mg/ml) bei -20°C aufbewahrt.

2. Antikörper

2.1 Primärantikörper

Die zur Western Blot-Analyse herangezogenen Antikörper wurden in PBST/1% (w/v) BSA verdünnt, für die Immunfluoreszenz wurde PBS-IF/1% BSA(w/v), für die Immunpräzipitation IP-Puffer und für die FACS-Färbung das entsprechende Zellkulturmedium verwendet. Die jeweiligen Rezepturen sind den entsprechenden Abschnitten zu entnehmen.

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Primärantikörper. NT = N-Terminus, CT = C-Terminus.

Bezeichnung	Antigen	Epitop	Spezies	Quelle	Verdünnung/ Bemerkung
α Annexin A11	Annexin A11 (human, Ratte, Maus)	N-terminales Peptid	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg	L-19 1:1.000 (WB) 1:250 (IF)
α ArfGAP1	ArfGAP1 (Ratte)	internes Peptid EPPKAKSPSSDSWTC	Kaninchen	FG Wieland	1:1.000 (WB)
α ArfGAP2 (#2097)	ArfGAP2		Kaninchen	(Watson et al. 2004)	1:1.000 (WB)
α ArfGAP3 (#1583)	ArfGAP3		Kaninchen	(Watson et al. 2004)	1:1.000 (WB)
GM130	GM130 (Ratte)	rekombinantes GM130 (Ratte)	Maus	(Nakamura et al. 1995)	monoklonal, IgG _{2a} Klon [NN 2C10/1] 1:100 (EM)
Okt4	humanes CD4		Maus	(Reinherz et al. 1979)	Hybridom- Überstand, 1:10 (IF) 1:10 (FACS)
Okt8	humanes CD8, α -Polypeptid		Maus	(Zarling und Kung 1980)	Hybridom- Überstand, 1:10 (IF) 1:10 (FACS)
YL1/2	α -Tubulin		Ratte	Chemicon, Temecula, California, USA	Monoklonal 1:1.000 (WB)
rHA		HA Epitop (YPYDVPDYA)	Ratte	Roche, Mannheim	monoklonal, IgG ₁ Klon 3F10 (<i>high affinity</i> , #1867423) 1:100 (IF) 5 μ l/10 μ l PGS (IP)

mHA		HA Epitop (YPYDVPDYA)	Maus	Covance, San Diego, USA	monoklonal, <i>raw ascites fluid</i> (Mono HA.11, #145914001) 1 :500 (WB)
mMyc		Myc Epitop (EQKLISEEDL)	Maus	(Kari et al. 1986)	Hybridom-Überstand Klon 9E10 1:10 (IF) 100 µl/10 µl PAS (IP) 1 :10 (WB)
CM1	Coatomer	nativer Coatomer	Maus	(Palmer et al. 1993)	Hybridom-Überstand, 1:10 (IF) 100 µl/10 µl PAS (IP)
1409 B	α -COP	CT-Peptid	Kaninchen	FG Wieland	1:5.000 (WB)
M3A5	β -COP		Maus	(Allan und Kreis 1986)	ASP aufgereinigt 1:100 (WB)
B1.2	β -COP	EAGELKPEEEITVGPVQK + QSALSSSRPTKKEEDR	Kaninchen	FG Wieland	5 µl/10 µl PAS (IP)
891	β^{\prime} -COP	CT-Peptid (LDEDILDD)	Kaninchen	(Harter et al. 1993)	1:10.000 (IF) 3 µl/10 µl PAS (IP) 1:5.000 (WB)
899	β^{\prime} -COP	CT-Peptid (LDEDILDD)	Kaninchen	FG Wieland	1:5.000 (WB)
C1PL	β^{\prime} -COP	PLRLDIKRKLTA	Kaninchen	FG Wieland	1:5.000 (WB)
γ 1R	γ 1/ γ 2-COP	rekombinantes γ 1-COP	Kaninchen	(Pavel et al. 1998)	1:10.000 (WB)
877	δ -COP	RPSGPSHALKLGAKGKE	Kaninchen	FG Wieland	1:1.000 (WB)
ϵ R	ϵ -COP	rekombinantes ϵ -COP	Kaninchen	FG Rothman	1:1.000 (WB)
ζ 1R	ζ 1- > ζ 2-COP	rekombinantes ζ 1-COP	Kaninchen	(Kuge et al. 1993)	1:5.000 (WB)
468.1	ζ 1-COP (human, Maus, bovin)	internes Peptid (VHRVALRGEDVP)	Kaninchen	FG Wieland	1:1.000 (WB)
ζ 2-gp (G442)	ζ 2-COP (human, Maus)	NT-Peptid (CQRPEAWPRPHPGE)	Meerschwein	(Wegmann et al. 2004)	1:50 (IF) nach Affinitätsaufreinigung mit Epitop 3 µl/10 µl PAS (IP) 1:1.000 (WB) unverdünnt (EM)
ζ 2-rb (R442)	ζ 2-COP (human, Maus)	NT-Peptid (CQRPEAWPRPHPGE)	Kaninchen	(Wegmann et al. 2004)	1:1.250 (WB) nach Affinitätsaufreinigung mit Epitop
r1.1	γ 1/ γ 2-COP (Maus, Ratte)	natives GST-my1-app	Kaninchen	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil 1:300 (EM)
r1.2	γ 1/ γ 2-COP (Maus, Ratte)	natives GST-my1-app	Kaninchen	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil
r1.3	γ 1/ γ 2-COP (Maus, Ratte)	natives GST-my1-app	Kaninchen	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil
g1.1	γ 1/ γ 2-COP (Maus, Ratte)	natives GST-my1-app	Meerschwein	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil

g1.2	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (Maus, Ratte)	natives GST-my1-app	Meerschwein	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil
c1	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (Maus, Ratte)	natives GST-my1-app	Huhn	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil
r2.1	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (Maus, Ratte)	natives GST-my2-app	Kaninchen	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil
r2.2	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (Maus, Ratte)	natives GST-my2-app	Kaninchen	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil 1:300 (EM)
r2.3	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (Maus, Ratte)	natives GST-my2-app	Kaninchen	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil
g2.1	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (Maus, Ratte)	natives GST-my2-app	Meerschwein	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil
g2.2	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (Maus, Ratte)	natives GST-my2-app	Meerschwein	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil
c2	$\gamma 1/\gamma 2$ -COP (Maus, Ratte)	natives GST-my2-app	Huhn	diese Arbeit	siehe Ergebnisteil

2.2 Sekundärantikörper

Die Verdünnung erfolgte in PBST/3% (w/v) BSA für den Western Blot, in PBS-IF/1% (w/v) BSA bei der Immunfluoreszenz und in Zellkulturmedium bei der FACS-Färbung. Die jeweiligen Rezepturen sind den entsprechenden Abschnitten zu entnehmen.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.

Bezeichnung	gekoppelt an	Quelle	Verdünnung
Ziege- α Maus	Alexa 488, Alexa 564	Molecular Probes, Leiden	1:1.000 (IF)
Ziege- α Ratte	Alexa 488	Molecular Probes, Leiden	1:1.000 (IF)
Ziege- α Kaninchen	Alexa 486, Alexa 546	Molecular Probes, Leiden	1:1.000 (IF)
Ziege- α Meerschwein	Alexa 488 Alexa 564	Molecular Probes, Leiden	1:1.000 (IF)
Ziege- α Huhn	Alexa 564	Molecular Probes, Leiden	1:1.000 (IF)
Esel- α Ziege	Alexa 488	Molecular Probes, Leiden	1:1.000 (IF)
Ziege- α Maus	APC	Molecular Probes, Leiden	1:300 (FACS)
Ziege- α Maus	HRP	Dianova, Hamburg	1:5.000 (WB)
Ziege- α Kaninchen	HRP	BioRad, München	1:5.000 (WB)
Kaninchen- α Huhn	HRP	Dianova, Hamburg	1:5.000 (WB)
Esel- α Meerschwein	HRP	Dianova, Hamburg	1:5.000 (WB)
RG16 (Maus- α Kaninchen-nativ)	HRP	Sigma Aldrich, Seelze	1:5.000 (WB)
True Blot (Maus- α Kaninchen-nativ)	HRP	eBiosciences, San Diego, USA	1:5.000 (WB)

3. Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von New England Biolabs (New England, USA) mit Ausnahme von *MunI* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Bei sequentiellen Zweienzym-Verdauen wurde die DNA-Lösung unter Verwendung des PCR *clean-up*TM Kits von Macherey-Nagel (Düren) umgepuffert.

4. Plasmide

Tabelle 14: Übersicht der eingesetzten Plasmide.

Plasmid Bezeichnung	Beschreibung	Quelle	Sequenzier-Primer	Resistenz
pET15b	prokaryontischer Expressionsvektor, N-terminale His-Markierung	Invitrogen, Karlsruhe	T7 Promotor, T7 Terminator	Ampicillin
pCR-Blunt	Subklonierungsvektor	Invitrogen, Karlsruhe	M13 for, M13 rev	Kanamycin, Zeocin
pETDuet-1	prokaryontischer, bicistronischer Expressionsvektor, N-terminale His-Markierung, N-terminale S-Markierung	Invitrogen, Karlsruhe	T7 Promotor, T7 Terminator	Ampicillin
pSuperiorNeo	RNAi-Plasmid	Oligoengine, Seattle, Washington, USA	T3	Ampicillin, Neomycin
pIRES	eukaryontischer, bicistronischer Expressionsvektor	Clontech, Heidelberg		Ampicillin, Neomycin
pPro-GST-TEV	prokaryontischer Expressionsvektor, N-terminale GST-TEV-Markierung	freundlich Gabe von Dr. Malik Lutzmann	pGEX5-FP, pTrcHIS-RP	Ampicillin
pVPack-GP	<i>gag-pol</i> -exprimierend	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA		Ampicillin, <i>hisD</i>
pVPack-Eco	<i>env</i> -exprimierend	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA		Ampicillin, Puromycin
pRevTRE2	MMLV-basierter Expressionsvektor	Clontech, Heidelberg		Ampicillin, Hygromycin
pRTi	MMLV-basierter Expressionsvektor für bicistronische eukaryontische Expression	diese Arbeit	MCS A 5', MCS A 3', MCS B 5', MCS B 3'	Ampicillin, Hygromycin
pHisA11M	prokaryontischer Maus Annexin A11 Expressionsvektor, N-terminale His-Markierung	(Lecona et al. 2003) freundliche Gabe von Dr. Maria Pilar Fernández	M13 for, M13 rev	Ampicillin
pTrcHis A-Zfp289	prokaryontischer humaner Zfp289 Expressionsvektor, N-terminale His-Markierung	(Singh et al. 2001) freundliche Gabe von Dr. Pierre Yves Desprez	pTrcHis for, pTrcHis rev	Ampicillin

5. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei Thermo Electron (Dreieich) bestellt.

5.1 PCR-Primer

Tabelle 15: Übersicht der bei der Polymerase Kettenreaktion eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3') Restriktions-Schnittstellen unterstrichen)	PCR-Bedingungen
MCS A (<u>Bam</u> HI, <u>Mlu</u> I, <u>Pac</u> I)	GCTAGCGGATCC <u>ACGCGTTAATTAAC</u> GAGCATGCATCTA GGGCGGCCAATTCGC	30x 60°C, 5% DMSO
MCS B (<u>Fse</u> I, <u>Sbf</u> I, <u>Cl</u> aI) V2	GCTAGCATCGATAA <u>CCTGCAGGCCGGCCTT</u> GTGGCAAGC TTATCATCGTGT <u>TTTTTCAAAGG</u>	

CD4 5' (FseI)	GCTAGCGGCCGGCCAGCCGCCACCATGGCTAACCGGGGA GTCCCTTTTAGG	30x 62/58°C
CD4 3' (ClaI)	GCTAGCATCGATTTATTAGCGCCTTCGGTGCCGGCACCT GACACAGAAGAAGATG	
CD8 5' (FseI)	TATTAAGGCCGGCCAGCCGCCACCATGGCCTTACCAGTG ACCGCCTTGCT	30x 62/58°C
CD8 3' (ClaI)	GCTAGCATCGATttaaTTAgacgtatctcgccgaaaggct gggettgtctccc	
g1 5' UTR V2 (NdeI)	GGAATTC <u>CATATGCC</u> CACCGACTCCACTATGTTGAAGAA ATTCGAC	30x 78/76/74°C
g1 3' UTR V2 (BamHI)	CCAGGTAGTGTGGGGAAGGGTAGGATCCCCTATGCAGG CTGGCCTC	
g2 5' UTR V2 (NdeI)	CCTGGGACGGTTGCGGTG <u>CATATGGG</u> CGCTGGGAAGTCG TCC	30x 76/74°C
g2 3' UTR V2 (BamHI)	GCCCACTGACCATGTAGTGT <u>GGATCCG</u> TTTCCTCTTGTC CAGTAAGCAT	
g2h 5' (NdeI)	TCGTCCCATATGATTA AAAAA ATTCGACAAGAAAGATGAG GAGTCTGG	3x 60°C
g2h OP 3'	GAGTGTGGTGCAGTCAAACGAAACACGATGTGATTGG TAAACATG	
Mycg2h OP 5' Pi	TTTCAGTTTGACTGCACCAACACTCTCAATGACCAGCTG	10x 45°C, 25x 50°C
Mycg2h 3' (PacI)	GCTAGCTTAATTAATTATTATCCAACAGAAGCTAAGATA ACATCTACAGGTGTTCTCTCTTTACTTCTGACAGTC	
g2h* sense L	CTTCTTTTGTGTCTGAAATCTCGGATGAATTCAAGGTGG TGGTTGTACAGGC	16x 55°C, Mutagenese Primer
g2h* anti sense L	GCCTGTACAACCACCACCTTGAATTCATCCGAGATTTCA GACACAAAAGAAG	
PreHAg1h 5'	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGTTGAAGAAA TTCGACAAGAAAGATGAGGAGTCAGGTGGAGGCTCC	2x 40°C, 30x 60°C
HAg1h 5' (BamHI)	TATTAAGGATCCGCCGCCACCATGGCTTACCCATACGAT GTTCCAGATTACGCTATGTTGAAGAAATTCGACAAGAAA GATG	30x 58/56/54°C
HAg1h 3' (PacI)	GCTAGCTTAATTAATTATTATCCCACAGATGCCAAGATG ATGTCTACTGGCAGCTCCTCCAAAC	
g1m 5' UTR (NdeI)	CTTCCTGCTGCGTGGAGCTACCGCTGACCATATGTTGAA GAAATT	35x 60°C
g1.1m 3' UTR	GCCCGAACTTCTTCATGCTCCAAGACCACACGGTTGTAG ATAAAG	
g1.1m 5' UTR	GAGTTCATTGAGGACTGCGAGTTCCTGTGCTGGCCACC	35x 60°C
g1m 3' UTR (PacI) V2	GGCATAGCAACATCACCCCTTCCCATTAATTAATTATCCC ACAGAAGTTAAG	
g2m 5' UTR (NdeI)	GTCTGGGCGCTGGGAAGCCGTCCCATATGATTA AAAAA TCGAC	35x 62/60/58°C
g2.1m 3' UTR	CCAAATTTAGCCAAAGCACTCACAGCAGCAGCTCTGACA GCCTC	
g2.1m 5' UTR	CATACCGTTCTGGCTACTAAAATTCTCCACTTATTGGGC AAAGAGGGCCCTAGAAC	35x 62/60/58°C
g2m 3' UTR (PacI) V2	GGACAAGATAGGAGTGGGGCTTATTAATTA AACT AGCCCA CGGATGCCAAGATGATATC	
5' mg1 app XbaI	TCTAGAATCCCTGGTCTGGAGAAAGCCCTG	30x 55°C
3' mg1 app BamHI	GGATTCCTAGCCCACGGATGCCAAGATGAT	
5' mg2 app NheI	GCTAGCATACCAGGGATGGAAAAGGCCTTA	30x 55°C

3' mg2 app GGATTCTTATCCACAGAAGCCAAGATAACATC
BamHI

Die unterstrichenen Bereiche der Sequenzen indizieren die angegebenen Restriktionsschnittstellen. Die Temperaturangaben der linken Spalte entsprechen den individuellen Anlagerungstemperaturen bei der PCR. Sind mehrere Anlagerungstemperaturen angegeben, so wurden diese in jedem Amplifikationszyklus in der angegebenen Reihenfolge verwendet. Der Multiplikator indiziert die Zyklenanzahl, sind zwei Multiplikatoren angegeben, so wurden Präamplifikationszyklen bei der angegebenen Temperatur durchgeführt.

5.2 Hybridisierungs-Oligonukleotide

Tabelle 16: Übersicht der zur Hybridisierung eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
Myc For (BamHI, NdeI)	GATCCGCCGCCACCATGGAGCAGAACTCATCTCTGAAG AGGATCTGCA	kodiert das Myc-Epitop
Myc Rev (BamHI, NdeI)	TATGCAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTCTGCTCCATGG TGGCGGCG	
5m12 s	GATCTCCattcgacaagaaggacgagTTCAAGAGA ctcgtccttcttgtcgaatTTTTTA	RNAi-Konstrukt gegen my1- und my2 (Position 12)
5m12 as	AGCTTAAAAAattcgacaagaaggacgagTCTCTTGAA ctcgtccttcttgtcgaatGGA	
6m12 s	GATCTCCttcgacaagaaggacgaggTTCAAGAGA cctcgtccttcttgtcgaatTTTTTA	RNAi-Konstrukt gegen my1- und my2 (Position 13)
6m12 as	AGCTTAAAAAattcgacaagaaggacgaggTCTCTTGAA cctcgtccttcttgtcgaatGGA	
7m12 s	GATCTCCgaaggacgaggagtctggTTCAGAGA accagactcctcgtccttcTTTTTA	RNAi-Konstrukt gegen my1- und my2 (Position 21)
7m12 as	AGCTTAAAAAgaaggacgaggagtctggTCTCTTGAA accagactcctcgtccttcGGA	
8m12 s	GATCTCCcagactcaaacaggagcatTTCAAGAGA atgctcctgttgagtctgTTTTTA	RNAi-Konstrukt gegen my1- und my2 (Position 1001)
8m12 as	AGCTTAAAAAcagactcaaacaggagcatTCTCTTGAA atgctcctgttgagtctgGGA	
9m12 s	GATCTCCtctcagatgagttcaaggtTTCAAGAGA accttgaactcatctgagaTTTTTA	RNAi-Konstrukt gegen my1- und my2 (Position 1012)
9m12 as	AGCTTAAAAAtctcagatgagttcaaggtTCTCTTGAA accttgaactcatctgagaGGA	
10m12 s	GATCTCCgatgagttcaaggtggTTCAGAGA ccaccaccttgaactcatcTTTTTA	RNAi-Konstrukt gegen my1- und my2 (Position 1017)
10m12 as	AGCTTAAAAAgatgagttcaaggtggTCTCTTGAA ccaccaccttgaactcatcGGA	

Die mit Kleinbuchstaben markierten Bereiche der RNAi-Konstrukte entsprechen den kodierenden DNA-Abschnitten von my1- und my2-COP in *sense* und *antisense*-Orientierung und wurden so ausgewählt, das sie gegen beide Isoformen gerichtet sind. Die angegebenen Positionen dieser Abschnitte sind auf die unmodifizierte Sequenz von my1- und my2-COP bezogen.

5.3 Sequenzier-Primer

Tabelle 17: In folgender Tabelle sind alle Nicht-Standard Sequenzierprimer aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position (Templat)	Leserichtung bezogen auf das Insert
MCS A 5'	CCACGCTGTTTTGACCTCCA	3251 (pRTi)	<i>sense</i>
MCS A 3'	CTTCGGCCAGTAACGTTAGG	3415 (pRTi)	<i>antisense</i>
MCS B 5'	GAACCACGGGGACGTGGTTTTTC	3929 (pRTi)	<i>sense</i>
MCS B 3'	CTACAGGTGGGGTCTTTCATTC	4040 (pRTi)	<i>antisense</i>
GATC-342462-2-24642	GACGTGGTCAAGCGCTGGG	513 (hy1)	<i>sense</i>
GATC-342462-3-24643	CCCAGCGCTTGACCACGTC	513 (hy1)	<i>antisense</i>
GATC-342462-4-24644	CCCTCCTTAAGACGGGCAG	1040 (hy1)	<i>sense</i>
GATC-342462-5-24645	CTGCCCCGTCTTAAGGAGGG	1040 (hy1)	<i>antisense</i>
GATC-342462-6-24646	GACAATGAAGTAAGGGACCG	1561 (hy1)	<i>sense</i>
GATC-342462-7-24647	CGGTCCCTTACTTCATTGTC	1561 (hy1)	<i>antisense</i>
GATC-342462-8-24648	GCCTGCCCCGAGCCTGC	2079 (hy1)	<i>sense</i>
GATC-342463-9-24649	GCAGGCTCCGGGCAGGC	2079 (hy1)	<i>antisense</i>
GATC-342463-1-24650	GATGTGGTTAAGCGCTGGA	513 (hy2)	<i>sense</i>
GATC-342463-2-24651	TCCAGCGCTTAACCACATC	513 (hy2)	<i>antisense</i>
GATC-342463-3-24652	GGAAGTGAGAGCAGTGTGG	1054 (hy2)	<i>sense</i>
GATC-342463-4-24653	CCACACTGCTCTCACTTCC	1054 (hy2)	<i>antisense</i>
GATC-342463-5-24654	GATGACGAGGTACGAGACAG	1561 (hy2)	<i>sense</i>
GATC-342463-6-24655	CTGTCTCGTACCTCGTCATC	1561 (hy2)	<i>antisense</i>
GATC-342462-7-24656	CCCAGCCCCCAGCCTTCCT	2079 (hy2)	<i>sense</i>
GATC-342463-8-24657	AGGAAGGCTGGGGGCTGGG	2079 (hy2)	<i>antisense</i>

Die mit GATC-bezeichneten Primer sind bei GATC (Konstanz) hinterlegt.

6. Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank der Firma Haereus (Hanau). Zellkulturmedien wurden von Biochrom KG und (fötales) Kälberserum CS bzw. KCS von PanTM bezogen. Waschschrte wurden mit PBS_{tc} durchgeführt (siehe zellbiologischer Methodenteil) und das Ablösen der Zellen erfolgte mit einer 0,2% (w/v) Trypsin/0,08% (w/v) EDTA-Lösung.

Tabelle 18: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Quelle	spezielle Kulturbedingungen
3T3/NIH rtTA-CD2	freundliche Gabe von Dr. Dirk Görlich	DMEM 10% CS
M3A5	(Allan und Kreis 1986)	RPMI 10% FCS
NRK		DMEM 10% FCS
Okt4	(Reinherz et al. 1979)	RPMI 20% FCS
Okt8	(Zarling und Kung 1980)	RPMI 20% FCS
Myc (9E10)	(Kari et al. 1986)	RPMI 20% FCS
HEK293T		DMEM 10% FCS kollagenisierte Platten

Zur Herstellung von kollagenisierten Platten wurde eine 2 mg/ml Kollagen R-Lösung (Serva, Heidelberg) 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt. Davon wurde 1 ml auf eine 10 cm Schale gegeben, verteilt und bei RT eingetrocknet. Die Aufbewahrung der kollagenisierten Platten erfolgte bei 4°C.

7. Protein-Molekulargewichtstandards und DNA-Größenstandards

Tabelle 19: Protein-Molekulargewichtsstandards. Zur Protein-Molekulargewichtsbestimmung wurde der BMW-Marker (*broad molecular weight*) und der *Precision-Prestained*TM-Marker von BioRad (München) verwendet.

Protein	BMW-Marker Molekulargewicht [kDa]	<i>Precision-Prestained</i> TM -Marker Molekulargewicht [kDa]
Myosin	200,0	250
β-Galactosidase	116,3	150
Phosphorylase B	97,4	100
Rinderserumalbumin	66,2	75
Ovalbumin	45,0	50
Carboanhydrase	31,0	37
Trypsin-Inhibitor	21,5	25
Lysozym	14,4	15
Aprotinin	6,5	10

Tabelle 20: Die DNA-Größe wurde durch die 100 bp-Leiter und die 1 kb-Leiter von New England Biolabs (New England, USA) bestimmt.

1 kb Leiter: Größe [kbp]	100 bp Leiter: Größe [bp]
10,0	1517
8,0	1200
6,0	1000
5,0	900
4,0	800
3,0	700
2,0	600
1,5	500/517
1,0	400
0,5	300
	200
	100

8. Antibiotika

Tabelle 21: Übersicht der verwendeten Antibiotika.

	finale Konzentration	eingesetzt bei
Ampicillin	100 µg/ml LB Medium (Agar)	<i>E. coli</i>
Chloramphenicol	20 µg/ml LB Medium (Agar)	<i>E. coli</i>
Kanamycin	50 µg/ml LB Medium (Agar)	<i>E. coli</i>
G418	800 µg/ml DMEM	3T3/NIH Fibroblasten

9. Geräte

Die verwendeten Geräte sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

V. Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

1.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

DEPC-H₂O

1 ml Diethylpyrocarbonat
mit H₂O auf 1 l auffüllen
3 h rühren, dann
autoklavieren

1.2 Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA

Die DNA (RNA) wurde 1:50 bis 1:100 in (DEPC)-H₂O verdünnt und bei 260 nm vermessen. Ein Absorptionswert von 1 entspricht 50 ng/μl DNA bzw. 40 ng/μl RNA Küvettenkonzentration.

1.3 Natrium-Acetat-Präzipitation

Zur DNA wurde 1 ml 100% (v/v) Ethanol und 0,1x Volumen steriler 3 M Natrium-Acetat-Lösung gegeben. Nach 30 min Inkubation bei -80°C wurde 10 min mit 12.000x g bei 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Zur Verwendung der Liposomen-basierten Transfektion wurde das Pellet eingetrocknet, für die Calcium-Phosphat-Präzipitation wurde das feuchte Pellet direkt eingesetzt.

1.4 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 5x DNA-Puffer auf einfache Konzentration eingestellt. In Abhängigkeit der zu trennenden DNA-Mischung wurden 0,6-2,0% (w/v) Agarose-Gele (Invitrogen, Karlsruhe) in 1x TAE unter Zusatz von 0,5 μg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 200 V konstanter Spannung durchgeführt.

Zur Präparation bestimmter DNA-Fragmente wurde die entsprechende Bande unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und mit dem Gel Extraction™ Kit von Macherey Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers prozessiert. Die Elution erfolgte standardmäßig in 50 μl dH₂O.

Bei Analyse von RNA wurden alle Puffer mit DEPC-H₂O vorbereitet.

50x TAE	5x DNA Probenpuffer
2 M Tris/HCl pH 7,0	50 mM Tris pH 8,0
1 M Essigsäure	4 M Harnstoff
50 mM EDTA	25% (w/v) Saccharose
	0,1% (w/v) Bromphenolblau
	100 mM EDTA

1.5 mRNA Isolierung

Die Isolierung erfolgte mit dem mRNA *direct* Kit™ nach dem Zellkultur-Protokoll von Dynal Biotech (Hamburg). Das zugrunde liegende Prinzip ist die Hybridisierung des Poly-Adenosyl-Endes der mRNA mit Poly-Thymidyl-Oligonukleotiden, die an magnetisches Trägermaterial gebunden sind.

Eine konfluente 10 cm Zellkulturschale mit ca. 5×10^6 Zellen (Hela als humane, 3T3/NIH als Maus mRNA-Quelle) wurde trypsiniert, zweimal mit PBS_{tc} gewaschen und in 1 ml Lyse/Bindungspuffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit je drei Passagen durch eine 21, 24 und dann 27 Gauge-Nadel. Das Lysat wurde zu 250 µl mit Lyse/Bindungspuffer äquilibrierten Oligo (dT)₂₅ Dynabeads gegeben und 20 min bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Abtrennung des ungebundenen Überstandes erfolgte durch 2 min Inkubation auf dem Magnetständer. Das Pellet wurde zweimal mit 750 µl Waschpuffer A, dann zweimal mit 750 µl Waschpuffer B gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgte durch 2 min Inkubation in 20 µl Elutionspuffer bei 80°C. Die mRNA-Gesamtausbeute betrug 2,65 µg (Hela) bzw. 1,24 µg (3T3/NIH). Die Regeneration der Dynabeads erfolgte durch dreimaliges Waschen mit 200 µl Rekonditionspuffer mit jeweils 2 min Inkubation bei 65°C und anschließendem dreimaligen Waschen mit 250 µl Lagerungspuffer. Die Dynabeads wurden bei 4°C gelagert.

Lyse/Bindungspuffer	Waschpuffer A	Waschpuffer B
100 mM Tris pH 7,5	10 mM Tris pH 7,5	10 mM Tris pH 7,5
500 mM LiCl	150 mM LiCl	150 mM LiCl
10 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM EDTA
1% LiDS	0,1 % LiDS	
5 mM DTT		
Elutionspuffer	Rekonditionspuffer	Lagerungspuffer
10 mM Tris pH 7,5	0,1 mM NaOH	250 mM Tris pH 7,5
		20 mM EDTA
		0,1% Tween-20
		0,02% Natriumazid

1.6 Reverse Transkription zur Herstellung von doppelsträngiger cDNA

Die reverse Transkription wurde mit dem 5' RACE System V 2.0™ von Life Technologies (Paisley, Schottland) durchgeführt, die Oligo dT- bzw. Hexanukleotid-Primer wurden dem cDNA Cycle Kit for RT-PCR™ von Invitrogen (Karlsruhe) entnommen. Bei der verwendeten reversen Transkriptase, bezeichnet als Superscript II™, handelt es sich um eine veränderte MMLV DNA-Polymerase, die eine reduzierte RNase H Aktivität aufweist. Die Polymerisierung kann sowohl RNA- als auch DNA-abhängig erfolgen.

Tabelle 22: Ansatz zur reversen Transkription doppelsträngiger cDNA.

Komponente	Volumen [μ l]
Oligo dT Primer C3 (0,2 μ g/ μ l) oder Hexanukleotid Primer C4 (1 μ g/ μ l) mRNA (0,5 – 1,5 μ g)	1
DEPC-H ₂ O	ad 15,5 μ l
10 min bei 70°C 1 min auf Eis	
10x PCR Puffer	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5
dNTP Mix (10 mM jeweils)	1
DTT (100 mM)	2,5

Nach 1 min Präinkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch 1 μ l (200 U) Superscript II RT gestartet und weitere 60 min inkubiert. Es erfolgte eine 15 min Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 70°C, dann wurde 1 μ l RNase Mix zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNA-Gesamtausbeute lag üblicherweise zwischen 10 – 20 μ g.

1.7 Polymerase-Kettenreaktion basierte Methoden

1.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es wurde die PfuTurbo DNA Polymerase™ von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet. Die so generierten Amplikons weisen stumpfe Enden auf. In folgenden Tabellen sind der Standard-Ansatz und der verwendete Temperatur-Algorithmus angegeben:

Tabelle 23: Standard-Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion.

Komponente	Volumen [μ l]
10x cloned PfuTurbo Puffer	10
dNTP Mix (10 mM jeweils)	2
<i>sense</i> Primer (100 pmol/ μ l)	1,25
<i>antisense</i> Primer (100 pmol/ μ l)	1,25
DNA Templat (ca. 100 ng)	
-/+ DMSO	5
PfuTurbo DNA Polymerase (2,5 U/ μ l)	1
dH ₂ O	ad 100

Tabelle 24: Temperaturprogramm der Polymerase-Kettenreaktion.

Zeit [min]	T [°C]	Zyklen
5	95	1x
1	95	
1	individuell	individuell
1 min/1000 bp	72	
10	72	1x
∞	4	

Der unterlegte Bereich gibt die eigentliche Amplifikationsphase der PCR an. Wurden stark modifizierende Primerpaare eingesetzt, wurde mitunter eine Präamplifikationsphase vorangestellt. Die individuellen Amplifikationsbedingungen sind in der Oligonukleotid-Übersicht angegeben.

1.7.2 PCR-basiertes Spleißen (Megaprimer PCR)

PCR-basiertes Spleißen erlaubt Deletionen von beliebig großen DNA Abschnitten. Im Prinzip wird hier die DNA vor und hinter dem zu deletierenden Bereich durch zwei PCR in zwei Fragmente unterteilt. Hierbei werden die Primerpaare *sense1/antisense2* und *sense3/antisense4* eingesetzt. Eine der beiden PCR sollte dabei so ausgerichtet sein, daß eins der beiden Fragmente unter Deletion des gewünschten DNA-Abschnitts das andere Fragment partiell überlappt, z.B. durch Wahl des Primer *antisense2*. Dieses Fragment entspricht dann einem (Mega)-Primer *sense5* einer dritten PCR-Reaktion, die ferner wieder *antisense4* verwendet. In **Abbildung 40** ist das Prinzip schematisch verdeutlicht:

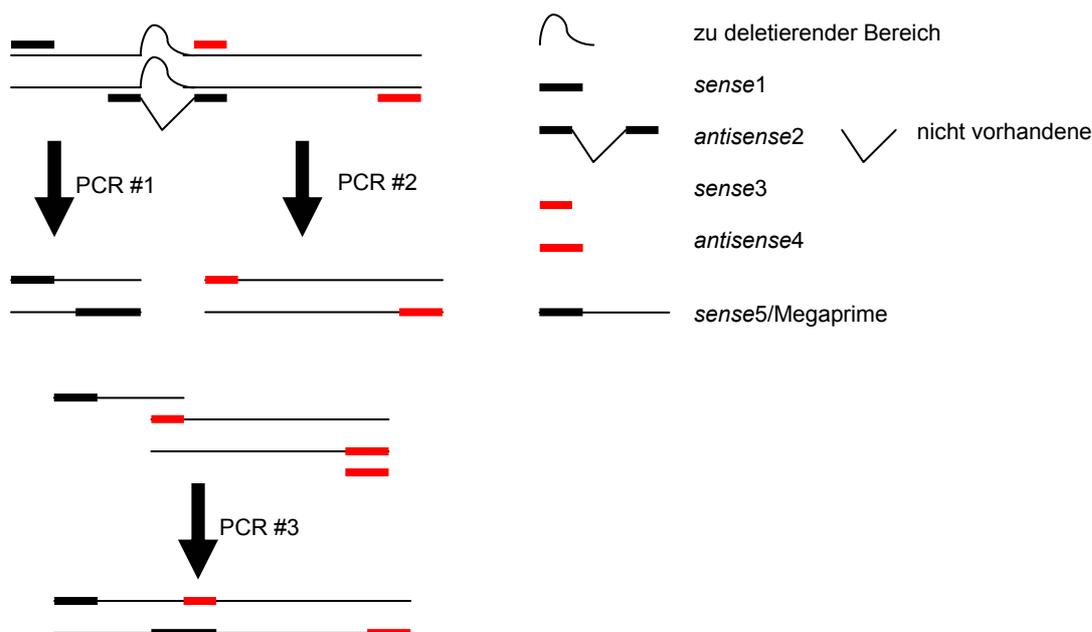


Abbildung 40: Prinzip der Megaprimer-PCR. Das Produkt der PCR #1 entspricht dem Megaprimer der PCR #3, während das Amplikon der PCR #2 als Templat der PCR #3 dient.

Zur Deletion einer 24 bp Sequenz von *hy2-COP* wurden folgende Primer eingesetzt:

Tabelle 25: Bei der Megaprimer-PCR eingesetzte Oligonukleotide.

methodische Bezeichnung	Bezeichnung des Primers
<i>sense1</i>	g2h 5' (NdeI)
<i>antisense2</i>	g2h OP 3'
<i>sense3</i>	Mycg2h OP 5' Pi
<i>antisense4</i>	Mycg2h 3' (PacI)

Das Produkt der Megaprimer-generierenden PCR wurde durch Agarose-Extraktion aufgereinigt und die Ausbeute durch photometrische DNA-Quantifizierung bestimmt. Die Ausbeute lag bei 2,3 µg.

1.7.3 Positions-spezifische Mutagenese

Es wurde das QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit™ von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet. Vergleichbar mit einer Standard-PCR werden hier zwei exakt komplementäre Primer, die die gewünschte Mutation aufweisen, so konstruiert, daß sie an dem zu mutagenisierenden Bereich binden. Nach der PCR ergibt sich ein DNA Doppelstrang mit überhängenden Enden, die intramolekular hybridisieren können. Nach *in vivo* Ligation resultiert das gewünschte, mutagenisierte Plasmid. In folgenden Tabellen sind der Standard-Ansatz der Positions-spezifischen Mutagenese und der Temperatur-Algorithmus angegeben:

Tabelle 26: Ansatz der Positions-spezifischen Mutagenese.

Komponente	Volumen [µl]
10x Reaktions-Puffer	5
100 ng Templat	
125 ng <i>sense</i> Primer	
125 ng <i>antisense</i> Primer	
dNTP Mix (10 mM jeweils)	1
PfuTurbo DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1
dH ₂ O	ad 50

Tabelle 27: Temperaturprogramm der Positions-spezifischen Mutagenese.

Zeit [min]	T [°C]	Zyklen
1	95	1x
1	95	
1	55	16x
1 min/1000 bp	68	
∞	4	

Der unterlegte Bereich gibt die Amplifikationsphase der PCR an. Zum Verdau des nicht mutagenisierten Templats wurde 1 µl *DpnI* (10 U/µl) direkt in den Ansatz gegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Mutagenese erfolgte nach Transformation in *E. coli* DH5α-Zellen und anschließender Kontrollsequenzierung der Klone.

10x Reaktions-Puffer

200 mM Tris pH 8,8
 100 mM KCl
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 20 mM MgSO₄
 1% Triton X-100
 1 mg/ml BSA

1.8 DNA-Ligation

a) Ligation des PCR-Amplikons in das pCR-Blunt-Plasmid

Zur Amplifikation von PCR-Amplikons mit stumpfen Enden wurde das Zero Blunt PCR Cloning Kit™ von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Durch diesen Subklonierungsschritt ist es möglich, den Restriktionsverdau der gewünschten DNA-Abschnitte zu verfolgen, ferner erlaubt das verwendete pCR-Blunt-Plasmid eine Sequenzierung des Inserts durch die Standard-Sequenzierprimer M13 revers und M13 forward.

Tabelle 28: Ligationsansatz von DNA-Fragmenten in das pCR-Blunt™-Plasmid.

Komponente	Volumen [μl]
Linearisiertes pCR-Blunt-Plasmid (25 ng)	1
PCR-Produkt	1-7
10x Ligationspuffer	1
T4 DNA Ligase (4 U/μl)	1
dH ₂ O	ad 10 μl

Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C konnte der Ligationsansatz direkt zur Transformation in *E. coli* DH5α eingesetzt werden.

b) Ligation von verdauten Fragmenten

Nach erfolgtem Restriktionsverdau wurde der Ansatz mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt und die gewünschten DNA-Fragmente wurden durch Gelextraktion aufgereinigt. Die DNA wurde mit dem TaKaRa™-Ligationskit (Otsu, Japan) ligiert:

Tabelle 29: Ligationsansatz des TaKaRa™-Kits.

Komponente	Volumen [μl]
Plasmid	
Insert	
	ad 10 μl
Takara-Lösung I	10 μl

Es wurde über Nacht bei 16°C ligiert. Der Ligationsansatz konnte entweder direkt zur Transformation eingesetzt werden oder wurde bei –20°C gelagert.

1.9 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Zur Amplifikation von DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet, während für Protein-Expressionen BL21* (DE3) eingesetzt wurde. Beide Stämme wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen, wobei als Transformationsmethode der Hitzeschock eingesetzt wurde. Die folgenden Angaben beziehen sich auf DH5 α (BL21* (DE3)). Wenn nicht anders angegeben wurden alle folgenden Schritte auf Eis durchgeführt.

Zu je 50 μ l der chemisch kompetenten *E. coli*-Aliquots wurden 1-5 μ l der Ligationsansätze zugegeben und 30 min inkubiert. Die Transformation erfolgte durch 20 s (30 s) Inkubation bei 37°C (42°C). Es wurde 2 min inkubiert und 250 μ l SOC-Medium ohne Antibiotika zugegeben. Die Expression der Resistenzgene wurde durch 1 h Inkubation mit 350 rpm bei 37°C erreicht. Sollten Klone vereinzelt werden, wurde der Ansatz auf Antibiotika-enthaltende LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert, ansonsten konnte der Ansatz direkt in Antibiotika-enthaltendes Medium (LB- oder NZCYM-Medium) gegeben werden (100 μ g/ml Ampicillin; 50 μ g/ml Kanamycin).

LB-Medium (LB-Agar)	SOC-Medium	NZCYM-Medium
10 g Bacto-Trypton	20 g Bacto-Trypton	23 g NCZYM broth
5 g Bacto-Hefe Extrakt	5 g Bacto-Hefe Extrakt	lösen und auf pH 7,0 einstellen
5 g NaCl	0,5 g NaCl	ad 1 L mit dH ₂ O
(14 g Agar)	0,2 g KCl	
ad 1 L mit dH ₂ O	ad 1 l mit dH ₂ O	
	sterile Zugabe nach dem	
	Autoklavieren:	
	10 mM MgCl ₂	
	20 mM Glucose	

1.10 Plasmid-Isolierung aus *E. coli* und PCR-Aufreinigung

a) Plasmid-Isolierung im kleinen Maßstab

Es wurde das Plasmid DNA *Purification* Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet (Stand März 2002), um aus 1-5 ml Kulturvolumen Plasmid-DNA bis zu einer Menge von 30 μ g zu gewinnen.

b) Plasmid-Isolierung im präparativen Maßstab

Zur Gewinnung von bis zu 100 μ g Plasmid-DNA aus 25-100 ml Kulturvolumen wurde das QIAfilter™ Plasmid Midi Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet (Stand August 2003).

c) PCR-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von PCR-Reaktionen und zur Umpufferung von Mehrenzym-DNA-Verdaus wurde das PCR *clean-up* Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet (Stand Juli 2003).

1.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Konstrukte wurde durch Seqlab (Göttingen) oder durch GATC (Konstanz) durchgeführt.

1.12 Hybridisierung einzelsträngiger DNA

Die zu hybridisierenden Oligonukleotide wurden gemäß folgendem Ansatz gelöst:

Tabelle 30: Ansatz zur Hybridisierung von Oligonukleotiden.

Komponente	Volumen [μ l]
Oligonukleotid for [1 μ g/ μ l]	2
Oligonukleotid rev [1 μ g/ μ l]	2
Hybridisierungspuffer	46

Der Ansatz wurde in kochendes Wasser gebracht und dann solange dort inkubiert, bis RT erreicht war. Ein langsames Abkühlung der Lösungen war insbesondere bei der Generierung von für RNAi bestimmte Konstrukte notwendig, um eine gewünschte intermolekulare Hybridisierung (thermodynamisch kontrolliert) über der intramolekularen Hybridisierung der *sense*- und *antisense*-Strukturen (kinetisch kontrolliert) zu favorisieren.

Hybridisierungspuffer

30 mM HEPES pH 7,4
100 mM Kaliumacetat
2 mM Magnesiumacetat

1.13 Klonierung der GST-TEV- $\text{my}1$ - und - $\text{my}2$ -*appendage* Expressionsplasmide

Zur Herstellung der Expressionsplasmide wurde der korrespondierende DNA-Bereich durch eine Standard-PCR bei 60°C Anlagerungstemperatur amplifiziert:

Tabelle 31: Bei der PCR verwendete Oligonukleotide zur Generierung der GST- $\text{my}1$ - und $\text{my}2$ -app-Expressionsplasmide.

	$\text{my}1$ - <i>appendage</i>	$\text{my}2$ - <i>appendage</i>
Templat	pCR-Blunt- $\text{my}1$ B	pCR-Blunt- $\text{my}2$ B
<i>sense</i> -Primer	5' $\text{mg}1$ app <i>Xba</i> I	5' $\text{mg}2$ app <i>Nhe</i> I
<i>antisense</i> -Primer	3' $\text{mg}1$ app <i>Bam</i> HI	3' $\text{mg}2$ app <i>Bam</i> HI

Das Amplikon wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und in das pCR-Blunt-Plasmid ligiert. Positive Klone wurden durch einen *EcoRI*-Verdau identifiziert. Der Expressionsvektor pPro-GST-TEV (freundliche Gabe von Dr. Malik Lutzmann, AG Hurt) wurde mit *NheI/BamHI*, das Maus- γ 1-*appendage* Insert mit *XbaI/BamHI* und das Maus- γ 2-*appendage* Insert mit *NheI/BamHI* verdaut. Nach Ligation und Transformation wurden positive Klone mit *NheI* ($\text{my}1$) bzw. *SacI* ($\text{my}2$) identifiziert. Die finalen Expressionsplasmide tragen die Bezeichnungen: pProGST-TEV- $\text{my}1$ -app bzw. pProGST-TEV- $\text{my}2$ -app, wobei durch TEV eine zwischen dem GST und der *appendage*-Domäne liegende Proteinspaltstelle der TEV Protease indiziert wird.

2. Biochemische Methoden

2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS

35,7 mM Na_2HPO_4

14,3 mM KH_2PO_4

136 mM NaCl

3 mM KCl

2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Die Proteinproben wurden durch Zugabe von 3x LSB auf einfache LSB-Konzentration eingestellt und durch 5 min Inkubation bei 95°C denaturiert und reduziert. Die Auftrennung der Proteine wurde unter SDS-denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli 1970). Dabei wurden in Abhängigkeit der zu trennenden Proteinmischung Trenngele zwischen 6 und 15% Acrylamid verwendet, die von einem 4% Acrylamid-Sammelgel überschichtet waren. Die verwendeten Volumina sind in **Tabelle 32** angegeben, wobei die Polymerisierung durch Zugabe von APS und TEMED gestartet wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V bzw. 180 V, sobald die Proteinlösung ins Trenngel eingewandert war und wurde in Elektrophorese-Puffer durchgeführt.

Tabelle 32: Übersicht der verwendeten Polyacrylamid-Gele. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf jeweils vier Trenngele und zwei Sammelgele (Mini Protean II, BioRad, München).

	dH ₂ O [ml]	1,5 M Tris pH 8,8 [ml]	0,5 M Tris pH 6,8 [ml]	30% (w/v) Acrylamid (37,5 :1) [ml]	10% (w/v) SDS [μl]	10% (w/v) APS [μl]	TEMED [μl]
Trenngel							
6%	5,35	2,5	-		2,0	50	100
12%	3,35	2,5	-		4,0	50	100
Sammelgel							
4%	6,1	-	2,5		1,4	50	100

3x LSB

10x Elektrophorese-Puffer

187,5 mM Tris pH 6,8

250 mM Tris

6% (w/v) SDS

1,92 M Glycin

15% (v/v) β-Mercaptoethanol

1% (w/v) SDS

30% (v/v) Glycerol

0,0675% (w/v) Bromphenolblau

2.2.1 Standard-Coomassie Färbung

Sollte die Gesamtprotein-Verteilung der Proteine betrachtet werden, wurden die Gele 30 min bei RT in Coomassie-Färbe-Lösung inkubiert und anschliessend nach Entfernung dieser durch wiederholten Austausch der Entfärbe-Lösung entfärbt.

Coomassie-Färbe-Lösung

Entfärbe-Lösung

40% (v/v) Ethanol

40% (v/v) Ethanol

25% (v/v) Essigsäure

25% (v/v) Essigsäure

0,25% (w/v) Coomassie Blau R-250

2.2.2 Färbung mit kolloidalem Coomassie für die MALDI-Analyse

Für die MALDI-Analyse wurden 4-12% Novex NuPage BisTris-Gele (Invitrogen, Karlsruhe) mit MES-Puffer verwendet. Die Fixierung erfolgte in 1 h mit 2% Essigsäure/40% Methanol und die Färbung über Nacht mit mit 20 ml kolloidalem Coomassie (Brilliant Blue GTM, Sigma, Deisenhofen) + 5 ml Methanol. Es wurde 5 min mit 5% Essigsäure/25% Methanol gewaschen und mindestens 15 min mit 25% Methanol entfärbt. Die gewünschten Proteinbanden wurden dann ausgeschnitten und es wurde ein in-Gel-Verdau mit Trypsin durchgeführt. Nach Elution der erhaltenen Peptide erfolgte die Detektion der Banden durch MALDI-TOF-Analyse (AG Lechner, BZH).

2.3 Western-Blot (WB)

Zur spezifischen, größenabhängigen Detektion von Proteinen wurden diese erst einer gelelektrophoretischen Auftrennung unterzogen (siehe obiger Abschnitt) und dann durch das *semi dry*-Verfahren auf PVDF-Membranen transferiert, wo dann die Antikörper-abhängige Detektion erfolgte.

a) Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Es wurden sieben Whatman-3-MM-Filterpapiere und eine Immobilon-P-PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) passend der Gelgröße zugeschnitten und dann wie folgt aufeinander geschichtet:

Zwei Filterpapiere wurden in Anoden-Puffer I getränkt und auf die untere Elektrodenplatte gelegt, gefolgt von zwei weiteren Filterpapieren, die in Anoden-Puffer II äquilibriert wurden. Nach Benetzen der PVDF-Membran in Methanol wurde diese in Anoden-Puffer II getränkt und auf den Filterstapel gelegt. Es folgte das in Anoden-Puffer II getauchte Gel und drei weitere Filterpapiere, die mit Kathoden-Puffer äquilibriert waren. Nach Aufsetzen der Kathodenplatte erfolgte der Transfer bei 24 V konstanter Spannung in 90 min.

Wurde als Proteingrößen-Standard der BMW-Marker verwendet, wurde die PVDF-Membran anschließend kurz in Ponceau S-Lösung unter Schütteln inkubiert und unter fließendem Wasser solange entfärbt, bis der gewünschte Kontrast erreicht war. Die BMW-Markerbanden bekannter Größe wurden durch einen Kugelschreiber nachgezeichnet.

Anoden-Puffer I

300 mM Tris pH 10,4
20% (v/v) Methanol

Kathoden-Puffer

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

PBST

PBS mit
0,05% (v/v) Tween 20

Anoden-Puffer II

25 mM Tris pH 10,4
20% (v/v) Methanol

Ponceau-S Lösung

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

b) Immunochemischer Nachweis auf PVDF-Membranen

Die PVDF-Membran wurde 1 h bei RT in 5% (w/v) Milchpulver-Lösung in PBS geschwenkt, kurz in PBS gewaschen und dann 1 h mit der Primäantikörper-Lösung unter Schütteln

inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls bei RT durchgeführt. Die Primärantikörper wurden in PBST mit 3% (w/v) BSA verdünnt und wurden nach Verwendung bei -20°C gelagert. Die jeweiligen Verdünnungen können der **Tabelle 12** entnommen werden. Es wurde dreimal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen und dann die Sekundärantikörper-Lösung, verdünnt in PBST mit 1% (w/v) für 30 min zugesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für jeweils 5 min wurde der Blot entwickelt.

Zur Detektion der Proteine wurden das ECL-System von Pharmacia (Freiburg) nach Angaben des Herstellers, CEA (Strängnäs, Schweden) Medical *X-ray*-Filme RP *new* und eine Entwicklermaschine SRX-101A der Firma Konika-Minolta (Tokyo, Japan) verwendet. Alle Quantifizierungen von Proteinbanden wurden durch die ImageJ Software Version 1.34h (Wayne Rasband, NIH, USA) durchgeführt.

2.4 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (Bradford 1976) wurde mit dem System der Firma BioRad (München) durchgeführt. Dazu wurden die Proben sowie eine Eichreihe von 0 – 25 μg BSA mit dH_2O auf 800 μl aufgefüllt und anschließend mit 200 μl BioRad Reagenz vermischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 620 nm vermessen.

2.5 Gewinnung von Cytosol

2.5.1 Cytosol-Gewinnung aus adhärent wachsenden Zellen

a) Kleiner Maßstab für die Immunpräzipitation und Gelfiltration

Zur Gewinnung von Cytosol wurden jeweils zwei konfluente 15 cm-Schalen mit PBS_{TC} gewaschen und mit 0,5 ml IP-Puffer versetzt (Rezept siehe im Abschnitt 2.6.2 Immunpräzipitation). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden durch jeweils 20 Passagen mit einer 21 und dann 27 Gauge-Nadel lysiert und 5 min mit 800x g zentrifugiert. Der (perinukleäre) Überstand wurde 1 h bei 100.000x g zentrifugiert und der Überstand entnommen. Wenn nicht anders angegeben, wurde das Cytosol direkt für weitere Experimente eingesetzt. Die typische Gesamtproteinausbeute lag bei ca. 1,5 mg/15 cm Schale.

b) Großer Maßstab für die Generierung von COPI-Vesikeln

Es wurden ca. zwölf konfluente 500 cm^2 Schalen mit PBS_{TC} gewaschen, jeweils mit 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in insgesamt 40 ml PBS_{TC} mit Protease Inhibitoren

(Complete, EDTA-free, Roche, Mannheim) resuspendiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 40 ml PBS_{TC} mit Protease Inhibitoren und in 4 ml Dialyse-Puffer II (siehe Abschnitt 2.5.2 Gewinnung von Cytosol aus Rattenleber) aufgenommen. Die weiteren Schritte sind denen des obigen Abschnitts analog. Die typische Gesamtproteinausbeute lag bei ca. 30 mg.

2.5.2 Gewinnung von Cytosol aus Rattenleber

Es wurden 18 männliche Wistar Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g 24 h auf Hunger gesetzt, nach Ether-Narkotisierung per cervikaler Dislokation getötet und ausgeblutet. Die Lebern wurden entfernt (Gesamtgewicht ca. 80 g) und mit eiskaltem 300 ml/100 g Homogenisierungspuffer, der Protease Inhibitoren (Complete, EDTA-free, Roche, Mannheim) enthielt, versetzt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Homogenisierung erfolgte mit einem Waring Blender (2x 30 s *high speed*, dazwischen 2 min Inkubation auf Eis). Es wurde 10 min mit 6.000x g zentrifugiert, der Überstand durch vier Lagen Mull passiert und erst 1 h mit 33.000 rpm und dann 90 min mit 44.000 rpm (TFT55.38 Rotor) zentrifugiert. Nach Absaugen des Fettfilms wurde der Überstand durch 60% Sättigung mit Ammoniumsulfat (39 g/100 ml) 30 min unter Rühren inkubiert und in 30 min bei 7.000x g gefällt. Das Pellet wurde in 50 ml Dialyse-Puffer mit Protease Inhibitor aufgenommen, einmal 4 h gegen Dialyse-Puffer I und zweimal jeweils 4 h gegen 5 l Dialyse-Puffer II mit einem *cut off* von 12 – 14 kDa dialysiert. Dann wurde 1 h mit 33.000 rpm (TFT55.38 Rotor) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Aufbewahrung des Rattenlebercytosols bei -80°C. Die Ausbeute lag bei ca. 1,8 g Gesamtprotein.

Homogenisierungspuffer	Dialyse-Puffer I	Dialyse-Puffer II
50 mM HEPES pH 7,55	25 mM HEPES pH 7,2	25 mM HEPES pH 7,2
165 mM KOH	100 mM KCl	50 mM KCl
2 mM Magnesiumacetat	1 mM DTT	1 mM DTT
1 mM DTT		

2.6 Spezifische und unspezifische Proteinaufkonzentrierung

2.6.1 TCA-Präzipitation

Die Proben wurden mit einer 2% (w/v) Desoxycholatlösung auf eine Endkonzentration von 0,02% eingestellt. Die Präzipitation der Proteine erfolgte durch Zugabe einer 72% (w/v) TCA-Lösung in einer finalen Konzentration von 12% für mindestens 30 min auf Eis. Nach 10 min Zentrifugation mit 3.000x g bei 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg) wurde der

Überstand verworfen und das Pellet mit 3x LSB versetzt. Zur vollständigen Neutralisierung wurde die Probe entweder mit Ammoniak bedampft oder der Überstand einer gesättigten Tris-Lösung zugesetzt. Vor der Elektrophorese wurde die Probe 10 min bei 70°C inkubiert.

2.6.2 Immunpräzipitation (IP)

Bei Immunpräzipitationen wurden die angegebenen Massen von Cytosol ohne vorhergehendes Einfrieren direkt eingesetzt. Es wurden pro IP 20 µl einer mit IP-Puffer äquilibrierten sedimentierten 1:1-Mischung aus Protein A- (PAS) oder Protein G-Sepharose (PGS) und Cl4B-Sepharose (alles von Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) zu dem zu koppelnden Antikörper gegeben, das Volumen auf 300 µl mit IP-Puffer aufgefüllt und 1 h bei RT auf dem Überkopf-Schüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit je 1 ml IP-Puffer. Das sedimentierte Sepharose-Trägermaterial wurde mit dem Cytosol versetzt, auf mindestens 500 µl mit IP-Puffer aufgefüllt und 1 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht bindende Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit IP-Puffer durch Absaugen entfernt. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 20 µl 3x LSB und Erhitzen von 10 min bei 70°C eluiert. Zur Abtrennung der Protein A/G Sepharose wurde das Reaktionsgefäß unten mit einer 27 G Nadel angestochen, auf ein zweites Reaktionsgefäß gesetzt und 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert.

Wurde die IP mit Kaninchen-Antikörpern durchgeführt und zugleich Kaninchen-Primärantikörper bei der Western Blot-Analyse eingesetzt, wurden als Sekundärantikörper die monoklonalen Maus- α Kaninchen-HRP-Antikörper RG16 (Sigma Aldrich, Seelze) oder True Blot (eBiosciences, San Diego, USA) verwendet. Diese erkennen nahezu ausschließlich nativen Kaninchen-Antikörper und erlauben so ein günstiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

IP-Puffer

25 mM Tris pH 7,4
150 mM NaCl
1 mM EDTA

2.6.3 Immunisolierung von COPI-Vesikeln

Nach Durchführung einer COPI-Vesikelbiogenese (siehe Abschnitt 2.8 Herstellung von COPI-Vesikeln) wurden die Fraktionen im Bereich 40% (w/w) Saccharose vereinigt, 1:2 mit 0,2 M Saccharose/25 mM HEPES pH 7,2 verdünnt und mit in 0,2 M Saccharose/25 mM

HEPES pH 7,2-präinkubierter Antikörper-Protein A-Sepharose Suspension versetzt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde wie oben beschrieben gewaschen und durch Zugabe von 3x LSB eluiert.

2.6.4 GST-my1- und my2-app *pull-downs*

Es wurden je 100 µg von zuvor 1 h mit 45.000 rpm bei 4°C zentrifugierter GST-, GST-my1-app- und GST-my2-app-Lösung auf 20 µl Bettvolumen Glutathion Sepharose 4 FF (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gegeben, die in PBS/1 mM DTT äquilibriert war. Die Bindung der Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Dann wurde einmal mit je 1 ml PBS/1 mM DTT und zweimal mit je 1 ml Dialyse-Puffer II (siehe folgenden Abschnitt) gewaschen und 80 mg Gesamtprotein von zuvor ultrazentrifugiertem Rattenlebercytosol zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde dreimal mit je 1 ml Dialyse-Puffer II gewaschen (Rezept siehe Abschnitt 2.5.2 Gewinnung von Cytosol aus Rattenleber). Die Abspaltung der *appendage*-Domänen sowie der daran bindenden Proteine erfolgte durch Zugabe von 2 µg His₆-TEV-Protease (freundlicherweise überlassen von Julien Béthune) in 100 µl Dialyse-Puffer II in 1 h bei 16°C. Nach Zugabe von 10 µl Bettvolumen Ni-NTA (Qiagen, Hilden) wurde der Überstand entnommen, auf einem PAA-Gel aufgetrennt, dieses mit Coomassie abgefärbt und einzelne Polypeptidbanden nach Trypsin-Verdau durch MALDI-TOF Analyse untersucht (FG Johannes Lechner, BZH).

2.6.5 His₆-mAnnexin A11 und His₆-mZfp289 *pull-downs*

In Ermangelung von αZfp289-Antikörpern wurde die ca. 66 kDa entsprechende Bande der His₆-mZfp289-Aufreinigung durch MALDI-Analyse verifiziert. Ebenso wurde mit der His₆-mAnnexinA11 Aufreinigung verfahren. Eine Quantifizierung der Coomassie-Banden erlaubte dann eine Abschätzung des Reinheitsgrades der erhaltenen Protein-Lösungen. Es wurden je 100 µg (normalisiert auf die entsprechenden rekombinanten Vollängen-Proteine) von zuvor 1 h mit 45.000 rpm bei 4°C zentrifugierter His₆-mAnnexin A11- und His₆-hZfp289 -Lösung auf 20 µl Bettvolumen Ni-NTA (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gegeben, die in *pull-down*-Puffer äquilibriert war. Die Bindung der Proteine erfolgte in 10 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Dann wurde dreimal mit je 1 ml *pull-down*-Puffer gewaschen und 80 mg Gesamtprotein von zuvor ultrazentrifugiertem und durch Gelfiltration (PD-10 Säule, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) auf *pull-down*-Puffer umgestelltem Rattenlebercytosol zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde dreimal mit je 1 ml *pull-down*-Puffer gewaschen und durch Zugabe von 100 µl 3x LSB eluiert.

pull-down-Puffer

25 mM HEPES pH 7,2
50 mM KCl
1,5 mM β -Mercaptoethanol

2.7 Isolierung von Golgi aus Rattenleber

Die Golgi-Präparation erfolgte nach dem Protokoll von Tabas und Kornfeld (Tabas und Kornfeld 1979). Es wurden 10 männliche Wistar Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g 6 h auf Hunger gesetzt, nach Ether-Narkotisierung per cervikaler Dislokation getötet und ausgeblutet. Die Lebern wurden entfernt (Gesamtgewicht ca. 48 g) und mit eiskaltem 300 ml/100 g Homogenisierungspuffer II versetzt. Die Lyse der Zellen erfolgte analog der Cytosol-Gewinnung. Es wurde 10 min mit 2.200 rpm (Rotor JLA 10.500) zentrifugiert und der Überstand durch vier Lagen Mull gepresst. Das Homogenat wurde mit 1,25 M Saccharose-Puffer unterschichtet (8 ml/30 ml Homogenat) und 90 min mit 25.000 rpm (SW28-Rotor) zentrifugiert. Nach Entfernung des Fettilms wurden die Golgi-Membranen von der 0,5 M – 1,25 M Saccharose Interphase geerntet, vereinigt und deren Saccharose-Konzentration refraktrometrisch bestimmt. Durch 2 M Saccharose-Puffer wurde eine Saccharose-Konzentration von 1,2 M eingestellt. Maximal 14 ml wurden nun mit je 10 ml 1,1 M, 1,0 M und 0,5 M Saccharose-Puffer überschichtet und 2,5 h mit 25.000 rpm zentrifugiert (SW28-Rotor). Die 0,5 M – 1,0 M Saccharose Interphase (als L-Fraktion bezeichnet, entspricht dem Golgi-Isolat) sowie die 1,0 M – 1,1 M Saccharose Interphase (H-Fraktion) wurde geerntet und die Gesamtproteinkonzentration bestimmt. Lag diese unter 1,0 mg/ml wurden die Golgi-Membranen 1:3 mit 10 mM Tris pH 7,4 verdünnt und durch 45 min Zentrifugation bei 45.000 rpm (SW28-Rotor) auf ein 1 ml 35% (w/w) Saccharose-Kissen mit 10 mM Tris pH 7,4 pelletiert. Das Pellet wurde dann in 0,25 M Saccharose-Puffer aufgenommen, nach Saccharose- und Gesamtproteinbestimmung aliquotiert und nach Einfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahrt.

Homogenisierungspuffer II

10 mM Tris pH 7,4
0,5 M Saccharose
5 mM EDTA
5 mM DTT

x M Saccharose-Puffer

10 mM Tris pH 7,4
x M Saccharose

2.8 Herstellung von COPI-Vesikeln

Zur *in vitro*-Herstellung von COPI-Vesikeln nach Serafini (Serafini et al. 1991a) wurden isolierte Golgimembranen der Ratte (L-Fraktion) entweder mit Cytosol der Rattenleber (RLC) oder aus adhärent wachsenden Zellen (3T3), einem ATP-regenerierenden System und einem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analog versetzt.

Tabelle 33: 8 ml Ansatz zur Generierung von COPI-Vesikeln. Die eingesetzten Volumina von Golgimembranen und Cytosol bestimmten diejenigen der Saccharose- und KCl-Lösungen.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
5x Assaypuffer	1600	
H ₂ O	ad 8000	
1 M DTT	8	1 mM
500 mM Creatinphosphat	80	5 mM
2 mg/ml Creatinkinase	40	10 μ g/ml
40 mM ATP	10	50 μ M
2 M Saccharose		200 mM
2 M KCl		20 mM
Rattenleber Golgi (variable Saccharose Konzentration)		126 μ g/ml
Cytosol (50 mM KCl)		(RLC) 4,8 mg/ml (3T3) 2,0 mg/ml
10 mM GTP γ S	80	100 μ M

Es wurde 25 min bei 37°C inkubiert und dann die Reaktion durch zehnmünütige Inkubation auf Eis gestoppt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C. Die Membranen und assoziierte Vesikel wurden in 20 min bei 10.500 rpm (SS-34 Rotor) pelletiert und in 600 μ l LSSB resuspendiert. Nach zehnmünütiger Inkubation auf Eis wurde erneut in 15 min mit 17.000 rpm (Haereus Zentrifuge, Hanau) zentrifugiert und das Pellet in 600 μ l HSSB aufgenommen. Durch 15 min Inkubation auf Eis dissoziieren die über *tethering* Proteine assoziierten Vesikel von der Golgimembran und verbleiben nach 10 min Zentrifugation mit 13.000 rpm und 15 min mit 17.000 rpm im Überstand. Dieser wird mit 55% (w/w) Saccharose-Lösung in HSSB2 auf 20% eingestellt und in einem SW-55 Röhrchen auf einen Saccharose-Gradienten ausgehend von je 720 μ l 50%, 45%, 40%, 35%, 30% zu 25% in HSSB2-geladen. Es wird 18 h mit 33.000 rpm (SW-55 Rotor) zentrifugiert und der Gradient durch Anstechen von unten gezapft. Die Fraktionsgröße beträgt 250 μ l. Nach refraktrometrischer Bestimmung der Saccharose-Konzentration wurden die Vesikel in 60 min mit 100.000x g pelletiert und in 3x LSB aufgenommen. Zur Immunisolierung der Vesikel wurden die Fraktionen im Bereich 39 – 42% Saccharose vereinigt und 1:2 mit IP-Puffer II verdünnt.

5x Assaypuffer	LSSB
125 mM HEPES pH 7,2 12,5 mM Magnesiumacetat	25 mM HEPES pH 7,2 2,5 mM Magnesiumacetat 50 mM KCl 0,2 M Saccharose
HSSB	HSSB2
25 mM HEPES pH 7,2 2,5 mM Magnesiumacetat 250 mM KCl	25 mM HEPES pH 7,2 2,5 mM Magnesiumacetat 250 mM NaCl
IP-Puffer II	
25 mM HEPES pH 7,2 0,2 M Saccharose	

2.9 Antikörper-kompatible SDS-Denaturierung von Proteinen

Die Proteinlösung wird auf 1% SDS (w/v) eingestellt und 5 min bei 95°C inkubiert. Dann wird sie 1/10 so mit einer TX-100 Lösung verdünnt, daß die finalen Konzentrationen von 0,1% (w/v) SDS und 1% (w/v) TX-100 resultieren. Zur Spezifitätsbestimmung der Antiseren wurden diese Lösungen 1/8 in PBST verdünnt.

2.10 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

2.10.1 Aufreinigung der GST- γ 1- und γ 2-*appendage* Fusionsproteine

Die Plasmide pProGST-TEV- γ 1app. oder pProGST-TEV- γ 2app wurden in *E. coli* BL21* (DE3) transformiert. Die Expression erfolgte bei einer OD600 von 0,8 in jeweils 6 l LB-Medium in 4 Stunden bei 1 mM IPTG. Die Zellen wurden mit 4000 rpm in 20 min in einer RC12 BP-Zentrifuge (Sorvall, Langensfeld) pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Jedes 6 l-Pellet wurde in 100 ml Lysepuffer, versetzt mit Protease Inhibitor-Tabletten (Complete, EDTA-free, Roche, Mannheim), resuspendiert und fünfmal durch einen Emulsiflex (Avestin, Ottawa, Canada) bei 15.000 - 20.000 psi bei 4°C passagiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C, wenn nicht anders angegeben. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen wurden durch eine 10 min Zentrifugation mit 11.000 rpm abgetrennt, der Überstand wurde dann 1 h mit 100.000x g (45.000 rpm, SW 50.2 Ti) ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden mit 5 ml GSH-Sepharose (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) versetzt und über Nacht auf dem Überkopf-Schüttler

inkubiert. Es wurde anschließend jeweils dreimal mit 100 ml Lysepuffer gewaschen, wobei das Sepharose-Trägermaterial mit 4000 rpm in 5 min pelletiert wurde. Insgesamt wurde dreimal mit 5 ml Elutionspuffer nach jeweils 10 min Inkubation bei RT auf dem Überkopfschüttler eluiert. Alle drei Eluate wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Biomax, 30 kDa MW Ausschlußgröße, 15 ml, Millipore, Schwalbach) auf ca. 10 mg/ml konzentriert. Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie auf einer FPLC-Anlage (BioLogic Workstation, BioRad, München) mit Elutionspuffer ohne Glutathion durchgeführt (Superdex 75, XK16/30).

Lysepuffer

1x PBS
1 mM DTT

Elutionspuffer

50 mM Tris pH 8,0
150 mM KCl
1 mM DTT
20 mM Glutathion

2.10.2 Native Aufreinigung von His₆-mAnnexin A11

Das Expressionsplasmid pPROEX HTb-Annexin A11 (pHisA11M) war eine freundliche Gabe von Dr. Maria Pilar Fernández (Lecona et al. 2003). His₆-mAnnexin A11 wurde in Anlehnung an das dort beschriebene Aufreinigungsprotokoll mit folgenden Modifizierungen aufgereinigt: Zur Reduktion von Protein-Degradation wurde die Expression in 4 h bei 25°C im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLys durchgeführt, wobei mit 0,5 mM IPTG induziert wurde. Um geplante Ni-NTA-basierte *pull-downs* durchführen zu können, wurde das Protein nicht durch die TEV-Protease von der 1 ml Bettvolumen Ni-NTA-Säule (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) eluiert, sondern durch einen Imidazol-Gradienten von 20 – 250 mM gefolgt von einer Dialyse gegen *pull-down*-Puffer (50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM KCl, 1,5 mM β-Mercaptoethanol). Nach anschließender Ultrazentrifugation mit 100.000x g in 1 h bei 4°C lag die Ausbeute bei ca. 2 mg/6 l Kultur.

2.10.3 Denaturierende Aufreinigung von His₆-mZfp289

Das Expressionsplasmid pTrcHis A-Zfp289 war eine freundliche Gabe von Dr. Pierre Yves Desprez (Singh et al. 2001). Die Expression erfolgte in DH5α- *E. coli* Kultur durch 4 h Inkubation bei 37°C in Gegenwart von 1 mM IPTG.

Die Kulturpellets wurden in Lysepuffer II resuspendiert (35 ml/3 l Kultur) und 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Es wurde 30 min mit 10.000x g zentrifugiert und der Überstand auf eine 1 ml Bettvolumen Ni-NTA-Säule

(Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) geladen. Es wurde mit 20 ml Waschpuffer gewaschen und dann durch Wechsel auf 15 ml Renaturierungspuffer renaturiert. Es wurde durch einen Imidazol-Gradienten von 25 – 250 mM eluiert und anschließend dreimal gegen 500 ml *pull-down*-Puffer dialysiert (50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM KCl, 1,5 mM β -Mercaptoethanol). Nach anschließender Ultrazentrifugation mit 100.000x g in 1 h bei 4°C lag die Ausbeute bei ca. 1,2 mg/3 l Kultur.

Lysepuffer II	Waschpuffer	Renaturierungspuffer
100 mM Na ₂ PO ₄ pH 8,0	100 mM Na ₂ PO ₄ pH 8,0	100 mM Na ₂ PO ₄ pH 8,0
6 M Guanidinium/HCl	6 M Guanidinium/HCl	5 mM β -Mercaptoethanol
5 mM β -Mercaptoethanol	5 mM β -Mercaptoethanol	25 mM Imidazol
	25 mM Imidazol	

2.11 Gelfiltrationschromatographie von Cytosol

Es wurde ca. 1,5 mg Gesamtprotein von nicht zuvor eingefrorenem Cytosol von 3T3 Zellen eingesetzt und auf einer Superose-6 HR 17/30 (24 ml Säulenvolumen) in IP-Puffer mit einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetrennt. Es wurden 250 μ l Fraktionen in einem Elutionsvolumen von acht bis 18 ml gesammelt. Die Kalibrierung der Säule erfolgt durch den BioRad Gelfiltrations Standard (BioRad, München).

2.12 Antikörper-Aufreinigungen

2.12.1 Affinitätsaufreinigung der ζ 2-Antikörper

Die Aufreinigung wurde weitgehend nach dem Protokoll von Dominik Wegmann (Dissertation Februar 2003) durchgeführt. Es wurden 125 mg Thiopropylsepharose 6B (Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) über Nacht bei RT mit 750 nmol des Peptids CQRPEAWPRPHPGE, entsprechend dem N-terminalen Überhang von ζ 2-COP der Spezies Mensch und Maus, in Kopplungspuffer gekoppelt. Die Überstände sowie der Überstand eines 1 ml mit Blockierungspuffer durchgeführten Waschschrtes wurden vereinigt, sodaß die Kopplungsausbeute durch photometrische Bestimmung des freigesetzten Thiopyridons bestimmt werden konnte ($\epsilon_{343 \text{ nm}} = 8,08 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Thiopropylsepharose wurde dreimal mit je 10 ml Blockierungspuffer gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden in 20 min Inkubation bei RT mit 20 mM β -Mercaptoethanol-Lösung in 10 ml Blockierungspuffer blockiert. Anschließend wurde fünfmal mit je 10 ml Blockierungspuffer und dann dreimal mit je 10 ml Kopplungspuffer gewaschen. An das so immobilisierte Peptid wurden 1,5 ml des

Meerschweinchen- oder Kaninchen Serums G442 bzw. R442 gebunden. Es wurde mit 20 ml PBS gewaschen und in 250 μ l Fraktionen mit Elutionspuffer eluiert, wobei mit 8 μ l vorgelegten Neutralisationspuffer neutralisiert wurde. Es hat sich als günstig herausgestellt, insbesondere die erste Fraktion bei der Immunfluoreszenz bzw. Elektronenmikroskopie zu verwenden, da spätere Fraktionen, vermutlich aufgrund längerer Exposition des Elutionspuffers, neben der typischen perinukleäre Färbung ein starkes unspezifisches cytoplasmatisches Signal zeigten.

Kopplungspuffer

100 mM Tris pH 7,5
500 mM NaCl
1 mM EDTA

Elutionspuffer

0,1 M Glycin pH 2,8

Blockierungspuffer

100 mM Natriumacetat pH 4,5
500 mM NaCl

Neutralisationspuffer

1,5 M Tris pH 8,8

2.12.2 Negative Affinitätsaufreinigung der γ 1- und γ 2-Antikörper

Es wurden je 2,5 mg GST- γ 1-app und GST- γ 2-app 1 h mit 45.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand auf 300 μ l Bettvolumen von GSH-Sepharose gegeben, die zuvor in PBS/1 mM DTT äquilibriert wurde. Es wurde über Nacht auf dem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert, dreimal mit je 1 ml PBS (alle weiteren Schritte DTT-frei) gewaschen und 7,5 ml des gegen γ 1-COP gerichteten Antiserums, das zuvor mit 750 μ l 10x PBS versetzt wurde, auf die GST- γ 2-app enthaltenden GSH-Sepharose gegeben und umgekehrt (**Abbildung 41**). Es wurde 2 h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert und die Eluate durch Passage der Resuspensionen über eine 1 ml Biorad Säule gesammelt. Die Eluate wurden mit 40% Sättigung (24,3 g/100 ml) von Ammoniumsulfat bei 4°C behandelt. Nach 30 min Zentrifugation mit 7.000 g bei 4°C wurden die Pellets in 5 ml PBS resuspendiert und dreimal mit je 500 ml PBS gegen einen *cut-off* von 14-16 kDa dialysiert. Nach 1h Zentrifugation mit 45.000 rpm bei 4°C wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

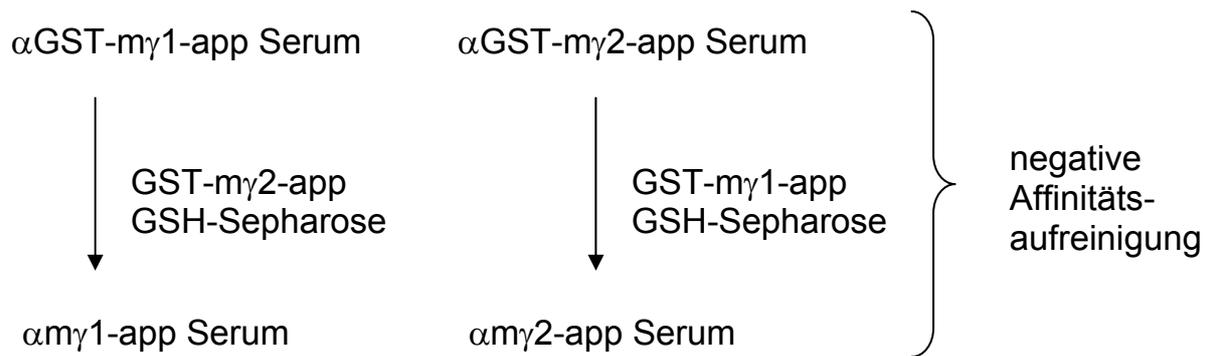


Abbildung 41: Schema der Negativ Affinitätsaufreinigung. Die Inkubation der Antiseren mit dem jeweils reziproken GST-Antigen erlaubt einmal eine Reduzierung von Kreuzreaktivität hinsichtlich der γ 1- und γ 2-COP Diskriminierung, ferner sollten auch potentiell gegen GST-gerichtete Antikörper depletiert werden.

2.12.3 Gewinnung von Antikörpern aus Hybridom-Überstand

Die Hybridom-Zelllinien wurden in Suspensionskultur auf das gewünschte Kulturvolumen expandiert. Die Inkubation wurde bei einem Farbumschlag des RPMI-Mediums beendet. Die Zellen wurden 20 min mit 1.000x g bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde anschließend 1h mit 100.000x g bei 4°C zentrifugiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -20°C. Sollte der Antikörperenthaltende Überstand bei einer präparativen FACS-Färbung verwendet werden wurde dieser vor dem Einfrieren durch Passage durch einen 0,22 μ m Filter sterilisiert.

3. Zellbiologische Methoden

3.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS_{tc}

8,1 mM Na₂HPO₄
 1,1 mM KH₂PO₄
 136,9 mM NaCl
 2,7 mM KCl

3.2 Transformation von DNA durch Calcium-Phosphat-Präzipitation

Die Calcium-Phosphat-Präzipitation wurde mit dem MBS Mammalian Transfection Kit™ von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Die zu transfizierende Zelllinie sollte ca. 80% konfluent sein. Das Medium wurde dann gegen MBS-enthaltendes Medium (= Medium ohne Serum, aber mit 7% MBS) ausgetauscht und die

Zellkulturschale 20 – 30 min vor Zugabe der DNA-Suspension im 37°C Inkubator aufbewahrt. Alle Volumenangaben sind vom verwendeten Zellkulturformat abhängig und in Tabelle 34 angegeben.

Die DNA wurde in sterilem Wasser von Braun (Melsungen) gelöst und erst mit MBS Lösung I und dann mit MBS Lösung II versetzt. Nach vorsichtigem Resuspendieren wurde 10 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde dann tropfenweise zugegeben, und anschließend erfolgte eine 3 stündige Inkubation im 37°C Inkubator. Nach dreimaligem Waschen mit PBS_{tc} wurden die Zellen dann wieder mit Vollmedium versetzt.

Tabelle 34: Ansatz der Calcium-Phosphat-Präzipitation.

	6-Loch Platte	10 cm Schale
MBS-enhaltendes Medium	3 ml	10 ml
steriles Wasser	450 µl	1350 µl
MBS Lösung I	50 µl	150 µl
MBS Lösung II	500 µl	1500 µl

3.3 Transformation von DNA durch Effectene™

Bei der Effectene™-Transformation (Qiagen, Hilden) werden DNA-Kondensat enthaltende Micellen als Reagenz verwendet.

Zunächst wurden 0,8 µg der zu transfizierenden DNA mit der Natrium-Acetat-Präzipitation sterilisiert und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 120 µl DNA-kondensierendem Puffer EC gelöst, es wurden 6,4 µl *enhancer* dazugegeben, 1 s gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Zur Komplex-Bildung entsprechend einem DNA-Effectene-Reagenz-Verhältnis von 1:10 wurden 8 µl Effectene-Reagenz zugegeben, 10 s gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml Medium wurde dann der Ansatz auf eine ca. 50% konfluente 3T3-enhaltende 6-Loch Schale gegeben, die zuvor einmal mit PBS und dann mit frischem Medium versetzt wurde. Nach 48 h Inkubation wurde dann Selektionsmedium (Antibiotikum-enhaltendes Medium) zugegeben. Bei den verwendeten pSuperior-Neo RNAi-Ansätzen wurde in Gegenwart von 800 ng/ml G418 selektioniert. Als Kontrollen dienten hier nicht-transfizierte Zellen, die innerhalb von fünf Tagen vollständig abgestorben waren. Üblicherweise konnten die Zellen nach 7-14 Tagen soweit expandiert werden, um damit biochemische Experimente durchführen zu können.

3.4 Retrovirale Transduktion

Es wurde das pVPack Vector™-System von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet. Im Prinzip wird dabei zunächst eine Virus-produzierende Zelle (HEK293T)

generiert und mit dem Virus-enthaltenden Überstand dann die Zielzelllinie transduziert (3T3/NIH).

Jeweils 3/9 μg (6-Lochplatte/10 cm Schale) der Plasmide pVPack-GP (*gag-pol*-exprimierend), pVPack-Eco (*env*-exprimierend; erlaubt Herstellung von ekotrophem Virus) und pRTi (MMLV-basiert; erlaubt die Tetracyclin-abhängige Expression des interessierenden Gens: Tet-On™ System) wurden durch Natrium-Acetat-Präzipitation sterilisiert. Alle drei feuchten Plasmid-Pellets wurden durch Calcium-Phosphat-Präzipitation in HEK293T-Zellen ko-transfiziert, wobei hier das MBS-enthaltende Medium 25 μM Chloroquin enthielt. Ferner wurde das Medium nach 3 stündiger Inkubation durch Serum-enthaltendes Medium, versetzt mit 25 μM Chloroquin, ausgetauscht. Nach weiteren 6-7 Stunden wurde über Nacht mit Serum-enthaltendem Medium ohne Chloroquin inkubiert. Nach erneutem Mediumwechsel wurden die HEK293T-Zellen dann 48 Stunden inkubiert. Zur Abtrennung der HEK293T-Zellen wurde der Virus-enthaltenden Überstand durch einen 0,45 μm Filter passagiert. Nach Zugabe von DEAE-Dextran in einer finalen Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zum gefilterten Überstand wurden dann die Zielzellen bei 50% Konfluenz mit diesem unverdünnt versetzt und 72 Stunden inkubiert. Die weitere Inkubation der transduzierten Zelllinie erfolgte dann im jeweils individuellen Medium.

3.5 Immunfluoreszenz (IF)

Zellen von einer konfluenten 10 cm Schale wurden trypsiniert und in 10 ml Medium suspendiert. Diese Suspension wurde 1:20 in Medium verdünnt und es wurden je 500 μl auf Deckgläschen in eine 24-Loch Schale gegeben. Es folgte eine Inkubation für drei Tage.

Die Deckgläschen wurden zweimal je 5 min mit 37°C-warmem PBS_{tc} gewaschen und dann 20 min mit 3% PFA in PBS_{IF} bei RT fixiert. Andere Fixierungsbedingungen sind den jeweiligen Experimenten zu entnehmen. Alle weiteren Schritte wurden bei RT durchgeführt. Es wurde einmal kurz mit PBS_{IF} gewaschen und dann mit 0,5% Triton X-100 in 10 min permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschschritten für jeweils 5 min wurde 30 min mit 45 μl der primären Antikörperlösung in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe von jeweils 10 min bevor mit der Sekundärantikörper-Lösung analog dem Primärantikörper inkubiert wurde. Letztlich folgten zwei weitere Waschschriffe von jeweils 10 min mit PBS_{IF}, es wurde kurz mit dH₂O gewaschen und die Zellen dann mit jeweils 7 μl Moviol/Deckglas eingebettet. Nach dem Aushärten des Moviol über Nacht bei 4°C wurden die Immunfluoreszenzen dann mit einem konfokalen Lasermikroskop „LSM 510 Meta Laser Scanning Microscope“ (Carl Zeiss, Obrekochen) vermessen.

5x PBS _{IF}	Moviol
500 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7,4	6 g Glycerol p.a.
750 mM NaCl	2,4 g Moviol 4-88
12,5 mM KCl	+ 6 ml dH ₂ O
(81,0 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2 h Inkubation bei RT
6,21 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	+ 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5
43,8 g NaCl	Inkubation bei 53°C
0,93 g KCl ad 1 l)	20 min Zentrifugation mit 5000 rpm,
	Überstand aliquotieren und bei -20°C
	einfrieren

3.6 Elektronenmikroskopie (EM)

Die Elektronenmikroskopie wurde von Dr. Jörg Malsam durchgeführt. Dabei wurden NRK Zellen eingesetzt, die durch eine 24 h Inkubation mit 4% (w/w) PFA in 250 mM HEPES pH 7,4 bei 4°C fixiert wurden. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Zellen in 10% (w/w) Gelatine in PBS eingebettet und über Nacht mit 2,3 M Saccharose in PBS infiltriert. Die Gelatine-Stückchen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Ultramikrotom bei -120°C in 50 nm dicke Schnitte unterteilt. Die Schnitte wurden in einer 1:1 Mischung von 2% (w/v) Methylcellulose und 2,3 M Saccharose-Lösung in PBS auf Kohle-bedampfte Nickel-Gitter überführt. Es wurde 10 min mit 0,1 M NH₄Cl in PBS inkubiert und in 20 min mit einer 1% (w/v) Fischhaut-Gelatine in PBS (Sigma Aldrich) geblockt (Folsch et al. 2001). Zur Detektion von γ 1- und γ 2-COP wurden negativ affinitätsaufgereinigte Antiseren des 165. Tages in einer Verdünnung von 1:300 verwendet (r1.1 und r2.2), ζ 2-COP wurde mit affinitätsaufgereinigtem, unverdünnten G442 Antikörper analysiert. Es folgte eine 30 min Inkubation bei RT mit 15 nm Protein A-Gold (*department of cell biology*, Universität Utrecht, Holland). Dann wurde 10 min bei RT mit 1% (w/v) Glutaraldehyd fixiert und mit dem GM130-Antikörper dekoriert. Nach 30 min Dekoration mit Kaninchen- α Maus-Antikörper wurde mit 10 nm Protein A-Gold inkubiert. Die Schnitte wurden nach Infiltration mit 0,5% (w/v) Uranylacetat/1,8% Methylcellulose in PBS luftgetrocknet (Folsch et al. 2003) und durch ein LEO 906E (Zeiss/Leica) analysiert.

3.7 Analytische und präparative FACS-Färbung

Für jede FACS-Färbung wurde mindestens eine konfluente 6-Loch-Schale herangezogen, die zuvor 24 h mit 1 μ g/ml Dox inkubiert wurde. Die Zellen wurden mit PBS_{TC} gewaschen, es wurde 0,5 ml CDB-Puffer zugegeben und 10 – 20 min bei 37°C inkubiert. Der CDB-Puffer (Gibco BRL, Eggenstein) löst adhärent wachsende Zellen von der Schale ab, läßt aber

Zelloberflächenproteine intakt. Dann wurden die Zellen eines Ansatzes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 min mit 200x g bei 4°C zentrifugiert. Um Internalisierung der Zelloberflächenproteine zu inhibieren, wurden alle weiteren Schritte bei 4°C durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 300 µl Medium, in das der Primärantikörper verdünnt wurde, resuspendiert und 60 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Dann erfolgte die direkte Zugabe von 300 µl Sekundärantikörper-enhaltendem Medium und eine weitere Inkubation von 30 min. Es wurde 2 min mit 200x g zentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl *Sorting* Medium resuspendiert. Zur Anfärbung von toten Zellen wurde eine Propidium-Iodid-Lösung (1 mg/ml) 1:1000 verdünnt zugegeben. Die so präparierten Proben wurden dann in FACS-Röhrchen überführt und konnten dann mit einem FACS-Calibur von Becton-Dickinson (Heidelberg) vermessen werden.

Bei präparativen FACS-Ansätzen erfolgten alle Schritte unter sterilen Bedingungen, insbesondere Antikörper-enthaltende Hybridom-Überstände wurden zuvor durch einen 0,22 µm Filter sterilisiert. Ferner wurden die Zellen durch ein *cell strainer cup* in das FACS-Röhrchen überführt. Hier wurde ein FACS-Vantage™ von Becton-Dickinson (Heidelberg) eingesetzt.

Die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper sind der **Tabelle 12** im Methoden-Teil zu entnehmen.

Sorting Medium

Medium

- Serum

+ 5% CDB-Puffer

VI. Anhang

1. Übersicht der vorgenommenen Modifikationen von γ 1- und γ 2-COP

Im folgenden ist ein Vergleich sowohl der Protein- als und DNA-Sequenzen von γ 1- und γ 2-COP des Menschen (h) und der Maus (m) dargestellt. Die zusätzlich eingeführten Epitop-Markierungen (HA und Myc) sind in grün und der zur Herstellung der Antikörper verwendete *appendage*-Bereich in gelb unterlegt. Die eingeführten stillen Mutationen sind durch eine Box indiziert. Die Stelle, an der durch Megaprimer-PCR ein einem Oktapeptid-entsprechender Bereich entfernt werden mußte, markiert das Symbol Δ , die my1- und my2-COP Fragmente A und B sind durch die Symbole \leftarrow/\rightarrow indiziert und der Bereich der gegen my1- und my2-COP gerichteten RNAi-Zielsequenz wurde unterstrichen.

		1	42
my1 (DNA)		ATGTTGAAGAAATTCGACAAGAAGGACGAGGAGTCTGGTGGAA	
my1 (Protein)		M L K K F D K K D E E S G G	
HA-hy1 (DNA)	ATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGTTGAAGAAATTCGACAAGAA	A	GATGAGGAGTCAGGTGGAA
HA-hy1 (Protein)	M A Y P Y D V P D Y A		M L K K F D K K D E E S G G
my2 (DNA)		ATGATTAATAAATTCGACAAGAAGGACGAGGAGTCTGGTAGT	
my2 (Protein)		M I K K F D K K D E E S G S	
Myc-hy2 (DNA)	ATGGAGCAGAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGCATATGATTAATAAATTCGACAAGAA	A	GATGAGGAGTCTGGTAGT
Myc-hy2 (Protein)	M E Q K L I S E E D I		H M I K K F D K K D E E S G S
my1 (DNA)	GGCTCCAACCCCTCCAGCACCTGGAGAAGAGTGCCGTACTCCAAGAGGCTCGGGTCTTTAACGAAACTCCCATC		
my1 (Protein)	G S N P L Q H L E K S A V L Q E A R V F N E T P I		
HA-hy1 (DNA)	GGCTCCAACCCATTCAGCACCTTGAGAAGAGTGCCGTACTCCAAGAGGCTCGGGTCTTTAACGAAACTCCCATC		
HA-hy1 (Protein)	G S N P F Q H L E K S A V L Q E A R V F N E T P I		
my2 (DNA)	GGTTCGAATCCTTTCCAGCATTTGGAGAAGAGTGCTGTCTTGCAGGAGGCACGCATATTTCAACGAAACGCCCATC		
my2 (Protein)	G S N P F Q H L E K S A V L Q E A R I F N E T P I		
Myc-hy2 (DNA)	GGCTCCAATCCTTTCCAGCATCTGGAGAAGAGTGCTGTCTTACAGGAGGCTCGTATATTTCAATGAAACTCCAATC		
Myc-hy2 (Protein)	G S N P F Q H L E K S A V L Q E A R I F N E T P I		
my1 (DNA)	AATCCCCGAAATGTGCTCACATCCTCACCAGATCCTTTATCTCATAAACCAGGGGAGCACCTGGGGACCACG		
my1 (Protein)	N P R K C A H I L T K I L Y L I N Q G E H L G T T		
HA-hy1 (DNA)	AACCTCGGAAATGTGCCACATCCTCACCAGATCCTTTATCTCATAAACCAGGGGAGCACCTGGGGACCACG		
HA-hy1 (Protein)	N P R K C A H I L T K I L Y L I N Q G E H L G T T		
my2 (DNA)	AATCCAAGAAGATGCTTGCCATCTTGACAAAGATTCTTTACTTACTCAACCAGGGTGAACACTTCGGAATATG		
my2 (Protein)	N P R R C L H I L T K I L Y L L N Q G E H F G T M		
Myc-hy2 (DNA)	AATCCAAGAAGATGTTTGCCATCTTTACAAAGATTCTTTACTTACTGAACCAGGGTGAACACTTTGGAACAACG		
Myc-hy2 (Protein)	N P R R C L H I L T K I L Y L L N Q G E H F G T T		
my1 (DNA)	GAAGCAACTGAGGCTTTCTTTGCCATGACCAAGCTCTTCCAGTCCAATGATCCCACACTCCGCCGATGTGCTAT		
my1 (Protein)	E A T E A F F A M T K L F Q S N D P T L R R M C Y		
HA-hy1 (DNA)	GAAGCGACCGAGGCTTTCTTTGCCATGACCAAGCTCTTTCAGTCCAATGATCCCACACTCCGCCGATGTGCTAC		
HA-hy1 (Protein)	E A T E A F F A M T K L F Q S N D P T L R R M C Y		
my2 (DNA)	GAAGCTACAGAAGCCTTTTGCAATGACTCGATTGTTTCAATCTAATGATCAAAACGCTGAGGGCGATGTGCTAC		
my2 (Protein)	E A T E A F F A M T R L F Q S N D Q T L R R M C Y		
Myc-hy2 (DNA)	GAAGCTACAGAAGCCTTTTGCAATGACGCGATTGTTTCAATCTAATGATCAAAACATTGAGGAGAATGTGCTAC		
Myc-hy2 (Protein)	E A T E A F F A M T R L F Q S N D Q T L R R M C Y		
my1 (DNA)	TTGACCATCAAGGAGATGTCTGCATCGCTGAGGATGTGCATCATTTGTGACAAGCAGCCTGACAAAAGACATGACT		
my1 (Protein)	L T I K E M S C I A E D V I I V T S S L T K D M T		
HA-hy1 (DNA)	TTGACCATCAAGGAGATGTCTGCATCGCTGAGGATGTGCATCATTTGTGACAAGCAGCCTAACAAGACATGACT		
HA-hy1 (Protein)	L T I K E M S C I A E D V I I V T S S L T K D M T		
my2 (DNA)	CTCACCATCAAGGAAATGGCCACCATCTCTGAGGATGTGCATCATTTGTGACAAGCAGTCTGACCAAGGACATGACT		
my2 (Protein)	L T I K E M A T I S E D V I I V T S S L T K D M T		
Myc-hy2 (DNA)	CTTACCATCAAGGAAATGGCTACCATCTCTGAGGATGTGATAATTGTGACAAGCAGTCTGACTAAAGACATGACT		
Myc-hy2 (Protein)	L T I K E M A T I S E D V I I V T S S L T K D M T		

my1 (DNA)	GGGAAAGAGGATAATTACCGCGGTCTCTGTGCTCCGTGCCCTCTGCCAGATCACTGACAGCACCATGCTGCAGGCT
my1 (Protein)	G K E D N Y R G P A V R A L C Q I T D S T M L Q A
HA-hy1 (DNA)	GGGAAAGAAGACAACACTACCGGGGCCCGGTGCGAGCCCTCTGCCAGATCACTGATAGCACCATGCTGCAGGCT
HA-hy1 (Protein)	G K E D N Y R G P A V R A L C Q I T D S T M L Q A
my2 (DNA)	GGAAAGGAAGATGTATACCGAGGCCAGCCATCAGGGCTCTCTGCAGAATCAGATGGAACAATGTTGCAAGCC
my2 (Protein)	G K E D V Y R G P A I R A L C R I T D G T M L Q A
Myc-hy2 (DNA)	GGAAAAGAAGATGTATACCGAGGCCCGCCATCAGAGCTCTCTGCAGGATCACCATGGAACAATGTTGCAAGCC
Myc-hy2 (Protein)	G K E D V Y R G P A I R A L C R I T D G T M L Q A
my1 (DNA)	GTTGAACGCTACATGAAACAAGCAATTGTGGACAAGGTTCCAGTGTCTCCAGCTCCGCCCTCGTGTCTTCCCTG
my1 (Protein)	V E R Y M K Q A I V D K V P S V S S S A L V S S L
HA-hy1 (DNA)	ATTGAGCGCTACATGAAACAAGCCATTGTGGACAAGGTTGCCAGTGTCTCCAGCTCTGCCCTCGTGTCTTCCCTG
HA-hy1 (Protein)	I E R Y M K Q A I V D K V P S V S S S A L V S S L
my2 (DNA)	GTTGAAAGGTACATGAAGCAGGCCATTGTGGATAAAGTATCCAGTGTAGCCAGCTCAGCGCTGGTCTCTTCCCTA
my2 (Protein)	V E R Y M K Q A I V D K V S S V A S S A L V S S L
Myc-hy2 (DNA)	ATTGAAAGATACATGAAGCAGGCCATTGTGGATAAAGTATCCAGTGTATCCAGTTCAGACTGGTATCTTCCCTG
Myc-hy2 (Protein)	I E R Y M K Q A I V D K V S S V S S S A L V S S L
my1 (DNA)	CACCTGCTGAAATGCAGCTTCGATGTGGTCAAGCGCTGGGTGAACGAGGCCAGGAGGCCGCTCCAGTACAAC
my1 (Protein)	H L L K C S F D V V K R W V N E A Q E A A S S D N
HA-hy1 (DNA)	CACCTGCTGAAGTGCAGCTTTGACGTGGTCAAGCGCTGGGTGAATGAGGCTCAGGAGGCAGCATCCAGTATAAC
HA-hy1 (Protein)	H L L K C S F D V V K R W V N E A Q E A A S S D N
my2 (DNA)	CACATGATGAAGATAAGCTATGATGTGGTTAAACGATGGATAAATGAAGCCCAAGAAGTGCATCAAGTACAAT
my2 (Protein)	H M M K I S Y D V V K R W I N E A Q E A A S S D N
Myc-hy2 (DNA)	CACATGATGAAGATAAGCTATGATGTGGTTAAACGCTGGATCAATGAAGCCCAAGAAGTGCATCAAGTATAAT
Myc-hy2 (Protein)	H M M K I S Y D V V K R W I N E A Q E A A S S D N
my1 (DNA)	ATCATGGTCCAGTACCATGCCCTAGGACTTCTGTACCATGTGCGGAAGAATGACCGACTGGCCGTGAGTAAGATG
my1 (Protein)	I M V Q Y H A L G L L Y H V R K N D R L A V S K M
HA-hy1 (DNA)	ATCATGGTCCAGTACCACGCCTAGGGCTCTGTACCATGTGCGTAAGAATGACCGCTAGCCGTCAATAGATG
HA-hy1 (Protein)	I M V Q Y H A L G L L Y H V R K N D R L A V N K M
my2 (DNA)	ATCATGGTGCAGTACCATGCCTAGGAGTGTCTATCACCTTAGGAAGAATGATCGGCTTGCTGTCTCCAAGATG
my2 (Protein)	I M V Q Y H A L G V L Y H L R K N D R L A V S K M
Myc-hy2 (DNA)	ATTATGGTCCAGTACCATGCCTAGGGAGTCTGTATCACCTTAGAAAGAATGATCGACTTGCTGTTCCAAGATG
Myc-hy2 (Protein)	I M V Q Y H A L G V L Y H L R K N D R L A V S K M
my1 (DNA)	ATCAGTAAGTTTACCCGGCACGGCCTCAAGTCCCCCTTTGCCTACTGCATGATGATCCGAGTGGCCAGCAAGCAA
my1 (Protein)	I S K F T R H G L K S P F A Y C M M I R V A A S K Q
HA-hy1 (DNA)	ATCAGCAAGGTCACACGGCACGGCCTTAAGTCTCCCTTTGCCTACTGCATGATGATCCGGTGGCCAGCAAGCAG
HA-hy1 (Protein)	I S K V T R H A L G V L Y H L R K N D R L A V A S K Q
my2 (DNA)	TTAAATAAGTTTACCAATCTGGTCTCAAATCACAGTTTGCATACTGTATGCTGATTGCAATTGCTAGTCGCTTA
my2 (Protein)	L N K F T K S G L K S Q F A Y C M L I R I A S R L
Myc-hy2 (DNA)	TTGAATAAGTTTACTAAATCTGGTCTCAAGTACAGTTTGCCTACTGCATGCTGATCCGAATTGCCAGTCGCTTA
Myc-hy2 (Protein)	L N K F T K S G L K S Q F A Y C M L I R I A S R L
my1 (DNA)	CTAGAGGAAGAAGACGGCAGCCGTGACAGCCCGTGTGTTGACTTCATCGAGAGCTGCCTGCGTAACAAGCATGAG
my1 (Protein)	L E E E D G S R D S P L F D F I E S C L R N K H E
HA-hy1 (DNA)	CTGGAAGAGGAGGATGGCAGCCGTGACAGCCCACTGTTGACTTCATCGAGAGCTGCTTGCACAACAAGCACGAG
HA-hy1 (Protein)	L E E E D G S R D S P L F D F I E S C L R N K H E
my2 (DNA)	CTGAAAGAAAGCGAGGATGGTCATGAAAGTCCACTCTTTGATTTCAATTGAGAGCTGCTTGCAGAAATAAACAGAA
my2 (Protein)	L K E S E D G H E S P L F D F I E S C L R N K H E
Myc-hy2 (DNA)	CTAAAAGAAACTGAGGATGGCCATGAAAGTCCACTGTTGATTTCAATTGAGAGCTGCTTGCAGAAATAAACATGAA
Myc-hy2 (Protein)	L K E T E D G H E S P L F D F I E S C L R N K H E
my1 (DNA)	ATGGTGGTGTATGAAGCTGCCTCAGCCATTGTCAACCTGCCAGGCTGCAGTGCCAAAGAGCTGGCCCTGCTGTG
my1 (Protein)	M V V Y E A A S A I V N L P G C S A K E L A P A V
HA-hy1 (DNA)	ATGGTGGTGTATGAAGCCGCTCGCCATCGTCAATCTGCCAGGCTGCAGTGCCAAAGAGCTGGCCCGGCTGTG
HA-hy1 (Protein)	M V V Y E A A S A I V N L P G C S A K E L A P A V
my2 (DNA)	ATGGTTATTTATGAAGCTGCTTCTGCCATTATTCATCTTCCCACTGTACTGCAAGAGAGCTGGCACCTGCTGTG
my2 (Protein)	M V I Y E A A S A I I H L P N C T A R E L A P A V
Myc-hy2 (DNA)	ATGGTTATTTATGAAGCTGCCTCAGCTATCATCTTCCCTAACTGCAGTGCAGAGAGTTGGCACCTGCTGTT
Myc-hy2 (Protein)	M V I Y E A A S A I I H L P N C T A R E L A P A V

my1 (DNA)	TCAGTGCTCCAGCTTTTCTGTAGCTCACCCAAGGCTGCACTTCGCTATGCTGCTGTGCGCACCCCTCAATAAGGTG
my1 (Protein)	S V L Q L F C S S P K A A L R Y A A V R T L N K V
HA-hy1 (DNA)	TCAGTGCTCCAGCTTTTCTGCAGCTCACCCAAGGCTGCTCTCCGCTATGCTGCTGTTCCGTACCCTCAATAAGGTT
HA-hy1 (Protein)	S V L Q L F C S S P K A A L R Y A A V R T L N K V
my2 (DNA)	TCAGTTCTTCAACTTTTCTGTAGCTCTCCTAAACCAGCCTTGAGATATGCAGCTGTGAGACCCCTGAACAAGGTG
my2 (Protein)	S V L Q L F C S S P K P A L R Y A A V R T L N K V
Myc-hy2 (DNA)	TCAGTTCTTCAACTTTTCTGTAGTTCTCCTAAGCCAGCCTTGAGATATGCAGCTGTGAGACCTTGAACAAGGTG
Myc-hy2 (Protein)	S V L Q L F C S S P K P A L R Y A A V R T L N K V
my1 (DNA)	GCTATGAAGCACCCCTTCAGCGGTGACTGCCTGCAATCTAGATCTGGAAAACCTGGTTACAGACTCAAACAGGAGC
my1 (Protein)	A M K H P S A V T A C N L D L E N L V T D S N R S
HA-hy1 (DNA)	GCCATGAAGCATCCGTCAGCTGTGACAGCTTGTAACTCTGGATCTGGAGAACCTGGTCACAGATTCAAACCCGAGC
HA-hy1 (Protein)	A M K H P S A V T A C N L D L E N L V T D S N R S
my2 (DNA)	GCAATGAAGCACCCCTCTGCTGTTACTGCCTGCAATCTGGACTTAGAAAACCTTAATCACAGACTCAAACAGGAGC
my2 (Protein)	A M K H P S A V T A C N L D L E N L I T D S N R S
Myc-hy2 (DNA)	GCAATGAAGCACCCCTCTGCTGTTACTGCCTGCAATCTGGACTTAGAAAACCTTAATCACAGACTCAAACAGAAGC
Myc-hy2 (Protein)	A M K H P S A V T A C N L D L E N L I T D S N R S
my1 (DNA)	ATCGCCACATTGGCCATCACACCCTGCTCAAGACAGGGAGCGAGAGCAGCATTGACCGCCTTATGAAGCAGATT
my1 (Protein)	I A T L A I T T L L K T G S E S S I D R L M K Q I
HA-hy1 (DNA)	ATTGCCACGCTGGCCATCACACCCTCCTTAAGACGGGCAGCGAGAGCAGCATCGACCGCCTCATGAAGCAGATC
HA-hy1 (Protein)	I A T L A I T T L L K T G S E S S I D R L M K Q I
my2 (DNA)	ATTGCTACCCTGGCCATTACAACATTGCTCAAAAACAGGAAGCGAGAGCAGTGTAGACAGGCTTATGAAGCAGATA
my2 (Protein)	I A T L A I T T L L K T G S E S S V D R L M K Q I
Myc-hy2 (DNA)	ATTGCTACCCTTAGCCATTACTACACTCCTCAAAAACAGGAAGTGTAGAGCAGTGTGGACCGCCTCATGAAGCAGATA
Myc-hy2 (Protein)	I A T L A I T T L L K T G S E S S V D R L M K Q I
my1 (DNA)	TCCTCCTTCATGTGCGAGATCTCAGATGAGTTCAAGGTGGTGGTTGTCCAGGCCATCAGTGCCTGTGCCAGAAG
my1 (Protein)	S S F M S E I S D E F K V V V V Q A I S A L C Q K
HA-hy1 (DNA)	TCCTCCTTCATGTGCGAAATCTCGGATGAATTCAAGGTGGTGGTTGTCCAGGCCATCAGTGCCTGTGTGAGAAA
HA-hy1 (Protein)	S S F M S E I S D E F K V V V V Q A I S A L C Q K
my2 (DNA)	TCTTCTTTTGTGCTGAAATCTCAGATGAGTTCAAGGTGGTGGTGTGCAGGCCATCAGTGTCTCTGTGCACAAG
my2 (Protein)	S S F V S E I S D E F K V V V V Q A I S A L C Q K
Myc-hy2 (DNA)	TCTTCTTTTGTGCTGAAATCTCAGATGAGTTCAAGGTGGTGGTGTACAGGCAATTAGTGTCTCTGTGCAGAAA
Myc-hy2 (Protein)	S S F V S E I S D E F K V V V V Q A I S A L C Q K
my1 (DNA)	TATCCTCGAAAGCATGCTGTGCTCATGAACTTCCTGTTACCATGCTAAGGGAAGAGGGTGGCTTTGAGTACAAG
my1 (Protein)	Y P R K H A V L M N F L F T M L R E E G G F E Y K
HA-hy1 (DNA)	TATCCTCGAAACACGCGCTCCTTATGAACTTCCTGTTACCATGCTGCGGGAAGAGGGTGGCTTTGAGTATAAG
HA-hy1 (Protein)	Y P R K H A V L M N F L F T M L R E E G G F E Y K
my2 (DNA)	TACCCTCGAAGCACAGCGTCATGATGACTTTTCTTTCCAACATGCTTCGAGATGATGGAGGTTTTGAATACAAA
my2 (Protein)	Y P R K H S V M M T F L S N M L R D D G G F E Y K
Myc-hy2 (DNA)	TACCCTCGAAGCACAGTGTGATGATGACTTTCTCTCCAACATGCTCCGAGATGATGGAGGCTTTGAGTACAAG
Myc-hy2 (Protein)	Y P R K H S V M M T F L S N M L R D D G G F E Y K
my1 (DNA)	CGTGCCATTGTGGACTGCATCATCAGCATCATCGAGGAGAACTCAGAGAGCAAGGAGACAGGATTGTCACACCTG
my1 (Protein)	R A I V D C I I S I I E E N S E S K E T G L S H L
HA-hy1 (DNA)	CGCGCTATCGTGGACTGCATCATCAGCATCATTTGAAGAGAACTCAGAGAGCAAGGAGACAGGGCTGTACATCTG
HA-hy1 (Protein)	R A I V D C I I S I I E E N S E S K E T G L S H L
my2 (DNA)	AAGGCCATTGTGGACTGCATAATCAGCATTGTGGAAGAGAACCCTGAGAGTAAAGAAGCTGGTCTAGCCCACCTC
my2 (Protein)	K A I V D C I I S I V E E N P E S K E A G L A H L
Myc-hy2 (DNA)	CGGGCCATTGTGGACTGTATAATCAGCATTGTGGAAGAGAACCCTGAGAGTAAAGAAGCAGGCCCTAGCCCACCTT
Myc-hy2 (Protein)	R A I V D C I I S I V E E N P E S K E A G L A H L
	→ Start my1-B → Start my2-B
my1 (DNA)	TGCGAGTTCATTGAGGACTGCGAGTTCAGTGTGCTGGCCACCCGCATCCTGCACCTGTTGGGCCAGGAGGGCCCC
my1 (Protein)	C E F I E D C E F T V L A T R I L H L L G Q E G P
HA-hy1 (DNA)	TGCGAGTTCATTGAGGACTGCGAGTTCACAGTGTGCGCCACCCGTATTCTACATCTCCTGGGCCAGGAGGGCCCC
HA-hy1 (Protein)	C E F I E D C E F T V L A T R I L H L L G Q E G P
my2 (DNA)	TGTGAATTCATTGAGGACTGTGAACATACCGTTCTGGCTACTAAAATTCCTCACTTATTGGGCAAGAGGGCCCT
my2 (Protein)	C E F I E D C E H T V L A T K I L H L L G K E G P
Myc-hy2 (DNA)	TGTGAATTCATTGAGGACTGTGAACACTGTTCTGGCTACTAAGATTCTACACTTGTGGGCAAGAGGGCCCT
Myc-hy2 (Protein)	C E F I E D C E H T V L A T K I L H L L G K E G P

Stop my1-A ←

my1 (DNA) AAGACCAACAACCCCTTCCAAGTACATTTCGCTTTATCTACAACCGTGTGGTCTTGGAGCATGAAGAAGTTCGGGCA
my1 (Protein) K T N N P S K Y I R F I Y N R V V L E H E E V R A
HA-hy1 (DNA) AAGACCACCAATCCCTCAAAGTATATCCGCTTCATCTATAACCGAGTGGTCTTGGAGCATGAGGAGGTCCGGGCA
HA-hy1 (Protein) K T T N P S K Y I R F I Y N R V V L E H E E V R A
my2 (DNA) AGAACTCCTGTTCCCTCCAAGTATATCAGATTCAATTTTTAATAGGGTGGTCTGGAGAATGAGGCTGTCAGAGCT
my2 (Protein) R T P V P S K Y I R F I F N R V V L E N E A V R A
Myc-hy2 (DNA) AGAACGCCTGTCCCTCCAATATATCCGCTTTTATTTTTAATAGGGTGGTCTGGAGAATGAGGCTGTCAGAGCT
Myc-hy2 (Protein) R T P V P S K Y I R F I F N R V V L E N E A V R A

Stop my2-A ←

my1 (DNA) GGTGCAGTAAGTGTCTGGCCAAGTTTGGAGCTCAGAACGAAGAGATGTGCCTAGTATCTTGGTGTGCTGAAG
my1 (Protein) G A V S A L A K F G A Q N E E M L P S I L V L L K
HA-hy1 (DNA) GGTGCTGTGAGTGTCTGGCGAAGTTTGGAGCCCAGAATGAAGAGATGTACCCAGTATCTTGGTGTGCTGAAG
HA-hy1 (Protein) G A V S A L A K F G A Q N E E M L P S I L V L L K
my2 (DNA) GCTGCTGTGAGTGTCTTGGCTAAATTTGGGGCTCAGAATGAGAGCCTTCTCCCCAGCATCCTTGTACTCTTACAA
my2 (Protein) A A V S A L A K F G A Q N E S L L P S I L V L L Q
Myc-hy2 (DNA) GCTGCTGTGAGTGTCTTGGCTAAATTTGGGGCTCAGAATGAGAGTCTTCTCCCAAGCATCCTTGTACTCTTACAG
Myc-hy2 (Protein) A A V S A L A K F G A Q N E S L L P S I L V L L Q

my1 (DNA) AGGTGTGTGATGGACGACGACAATGAAGTGAAGACAGAGCCACCTTCTATCTGAACGTTCTGGAACAGAAGCAG
my1 (Protein) R C V M D D D N E V R D R A T F Y L N V L E Q K Q
HA-hy1 (DNA) AGGTGTGTGATGGATGATGACAATGAAGTAAGGACCGACCCCTTCTACCTAAATGTCTGGAGCAGAGCAG
HA-hy1 (Protein) R C V M D D D N E V R D R A T F Y L N V L E Q K Q
my2 (DNA) AGGTGTATGATGGATACTGATGATGAGGTACGGGACCGAGCTACCTTCTACCTGAATGTGCTACAGCAGAGCAG
my2 (Protein) R C M M D T D D E V R D R A T F Y L N V L Q Q R Q
Myc-hy2 (DNA) AGGTGTATGATGGATACTGATGACGAGGTACGACAGAGCTACCTTCTATCTGAATGTGCTGCAGCAGAGGCAG
Myc-hy2 (Protein) R C M M D T D D E V R D R A T F Y L N V L Q Q R Q

my1 (DNA) AAGGCTCTCAACGCAGGTTACATCCTAAATGGTCTGACCGTGTCCATCCCTGGTCTGGAGAAAGCCCTGCAGCAG
my1 (Protein) K A L N A G Y I L N G L T V S I P G L E K A L Q Q
HA-hy1 (DNA) AAGGCCCTTAATGCAGGCTATATCCTAAATGGTCTGACTGTGTCCATCCCTGGTCTGGAGAGGGCTCTGCAGCAG
HA-hy1 (Protein) K A L N A G Y I L N G L T V S I P G L E R A L Q Q
my2 (DNA) ATGGCCCTGAATGCTACATATACTTCAATGGTCTGACAGTCTCTATACCAGGGATGGAAAAGCCCTTACACCAG
my2 (Protein) M A L N A T Y I F N G L T V S I P G M E K A L H Q
Myc-hy2 (DNA) ATGGCACTAAATGCCACATATATCTTTAATGGTTGACAGTCTCTGTACCAGGGATGGAAAAGCCCTTACACCAG
Myc-hy2 (Protein) M A L N A T Y I F N G L T V S V P G M E K A L H Q

my1 (DNA) TACACACTCGAACCATCAGAGAAGCCATTTGACCTCAAGTCTGTGCCTCTGGCCACCAGCCTATGGCAGAGCAG
my1 (Protein) Y T L E P S E K P F D L K S V P L A T T P M A E Q
HA-hy1 (DNA) TACACTCTAGAACCATCAGAAAAACCTTTTGGACCTCAAGTCTGTGCCCCCTGGCCACGGCGCCCATGGCAGAGCAG
HA-hy1 (Protein) Y T L E P S E K P F D L K S V P L A T A P M A E Q
my2 (DNA) TATACATTGGAGCCTTCAGAAAAACCTTTGATATGAAGTCAATTCCTCTTGCTATGGCTCCTGTCTTTGAGCAG
my2 (Protein) Y T L E P S E K P F D M K S I P L A M A P V F E Q
Myc-hy2 (DNA) TACACGTTGGAGCCTTCAGAAAAACCTTTGACATGAAATCAATTCCTCTTGCTATGGCTCCTGTCTTTGAACAG
Myc-hy2 (Protein) Y T L E P S E K P F D M K S I P L A M A P V F E Q

my1 (DNA) AGACCAGAAAGCACCGCCACCGCAGCAGTCAAACAGCCGGAGAAGGTAGCAGCCACACGGCAGGAGATTTTCCAA
my1 (Protein) R P E S T A T A A V K Q P E K V A A T R Q E I F Q
HA-hy1 (DNA) AGAACAGAAAGTACCCCATCACAGCAGTCAAACAGCCGTGAGAAAGTGGCAGCTACCAGGCAGGAGATCTCCAG
HA-hy1 (Protein) R T E S T P I T A V K Q P E K V A A T R Q E I F Q
my2 (DNA) AAGTCAGAAAATTACACTTGTGACTCCTAAG-----CCAGAGAAGTTGGCTCCTTCCAGGCAAGACATTTTCCAA
my2 (Protein) K S E I T L V T P K - - P E K L A P S R Q D I F Q
Myc-hy2 (DNA) AAAGCAGAAATCACACTTGTGGCTACTAAG-----CCAGAGAAGTTGGCTCCTTCCAGGCAAGACATTTTCCAA
Myc-hy2 (Protein) K A E I T L V A T K - - P E K L A P S R Q D I F Q

my1 (DNA) GAGCAGCTAGCAGCGGTGCTGAGTTCAGGGACTAGGGCCTCTTCAAGTCTCTCCTGAGCCAGTGGCCCTC
my1 (Protein) E Q L A A V P E F Q G L G P L F K S S P E P V A L
HA-hy1 (DNA) GAGCAGTTGGCAGCAGTGCAGAGTTCGCGGTCTTGGGCCCCCTTCAAGTCTCCTGAGCCGCTGGCCCTC
HA-hy1 (Protein) E Q L A A V P E F R G L G L G P L F K S S P E P V A L
my2 (DNA) GAACAGTTAGCTGCATTCCTGAGTTTATGAACCTGGGACCCTTGTTTAAAGTCTTCT---GAGCCTGTGACGCTT
my2 (Protein) E Q L A A I P E F M N L G Y P L F K S S - E P V Q L
Myc-hy2 (DNA) GAACAATTGGCTGCCATTCCTGAGTTTCTGAATATAGGACCCTTGTTCAAGTCTTCT---GAGCCTGTTCACCTT
Myc-hy2 (Protein) E Q L A A I P E F L N I G P L F K S S - E P V Q L

my1 (DNA)	ACAGAGTCCGAGACCGAGTATGTCATCCGTTGCACCAAAACACACCTTCTCTGATCACTTGGTGTTCAGTTTGAC
my1 (Protein)	T E S E T E Y V I R C T K H T F S D H L V F Q F D
HA-hy1 (DNA)	ACCGAGTCAGAGACGGAGTATGTCATCCGCTGCACAAACACACCTTCCACCAACCACATGGTTTTTCAGTTTGAC
HA-hy1 (Protein)	T E S E T E Y V I R C T K H T F T N H M V F Q F D
my2 (DNA)	ACAGAAGCAGAGACAGAGTATTTTCGTTTCGCTGTGTGAAGCACATGTTTACTGACCATATGTATTCCAGTTTGAC
my2 (Protein)	T E A E T E Y F V R C V K H M F T D H I V F Q F D
Myc-hy2 (DNA)	ACAGAAGCAGAGACAGAATATTTTGTTCGATGTATCAAGCACATGTTTACCAATCACATCGTGTTCAGTTTGAC
Myc-hy2 (Protein)	T E A E T E Y F V R C I K H M F T N H I V F ΔQ F D
my1 (DNA)	TGCACAAACACCCTCAATGACCAGACTCTGGAGAATGTACAGTGCAGATGGAGCCACTGAGGCATACGAAGTG
my1 (Protein)	C T N T L N D Q T L E N V T V Q M E P T E A Y E V
HA-hy1 (DNA)	TGCACAAACACACTCAATGACCAGACTTGGAGAATGTACAGTGCAGATGGAGCCACTGAGGCATACGAAGTG
HA-hy1 (Protein)	C T N T L N D Q T L E N V T V Q M E P T E A Y E V
my2 (DNA)	TGTACCAACACTCTAAATGACCAGCTGCTGGAGAAAGTAAACAGTGCAGATGGAACCATCCGATTCTATGAAGTG
my2 (Protein)	C T N T L N D Q L L E K V T V Q M E P S D S Y E V
Myc-hy2 (DNA)	TGCACCAACACTCTCAATGACCAGCTGCTGGAAAAAGTACAGTGCAGATGGAGCCACTGAGGCATACGAAGTG
Myc-hy2 (Protein)	C T N T L N D Q L L E K V T V Q M E P S D S Y E V
my1 (DNA)	CTCTCGTATGTGCCTGCGCGGAGCTTGCCTTACAACCAGCCTGGGACCTGCTACACACTAGTGGCTCTGCCCACT
my1 (Protein)	L S Y V P A R S L P Y N Q P G T C Y T L V A L P T
HA-hy1 (DNA)	CTCTGTTACGTGCCTGCCCGGAGCTTGCCTTACAACCAGCCCGGACCTGCTACACACTGGTGGCACTGCCCAAA
HA-hy1 (Protein)	L C Y V P A R S L P Y N Q P G T C Y T L V A L P K
my2 (DNA)	CTGTGCTGTATCCCAGCTCCCAGCCTCCCTTACAATCAGCCAGGAATATGCTACACACTGTTTCGATTGCCAGAT
my2 (Protein)	L C C I P A P S L P Y N Q P G I C Y T L V R L P D
Myc-hy2 (DNA)	CTGTCTTGTATCCCAGCCCGCCTTCCCTTATAACCAACCAGGAATATGTTACACTCTGTTCCGTTTGGCTGAT
Myc-hy2 (Protein)	L S C I P A P S L P Y N Q P G I C Y T L V R L P D
my1 (DNA)	GAAGACCCACAGCTGTGGCATGCACGTTACAGCTGTGTGATGAAGTTCACTGTTAAGGACTGTGATCCCAACACA
my1 (Protein)	E D P T A V A C T F S C V M K F T V K D C D P N T
HA-hy1 (DNA)	GAAGACCCACAGCTGTGGCCTGCACATTCAGCTGCATGAAGTTCACTGTCAAGGACTGTGATCCCAACT
HA-hy1 (Protein)	E D P T A V A C T F S C M M K F T V K D C D P T T
my2 (DNA)	GAAGATCCTACAGCAGTTGCAGGCACCTTTAGCTGTACCATGAAGTTTACAGTCCGGGATTGTGACCCTAATACT
my2 (Protein)	E D P T A V A G T F S C T M K F T V R D C D P N T
Myc-hy2 (DNA)	GATGACCCTACAGCAGTTGCAGGCTCCTTTAGCTGCACCATGAAGTTTACAGTCCGGGACTGTGACCCTAACACT
Myc-hy2 (Protein)	D D P T A V A G S F S C T M K F T V R D C D P N T
my1 (DNA)	GGAGAAATCGATGAAGAAGGCTATGAGGATGAGTATGTGCTGGAGGATCTGGAAGTTACTGTGGCTGATCACATC
my1 (Protein)	G E I D E E G Y E D E Y V L E D L E V T V A D H I
HA-hy1 (DNA)	GGGGAGACTGATGACGAAGGCTATGAGGATGAGTATGTGCTGGAAGATCTGGAAGTTACTGTAGCTGATCACATT
HA-hy1 (Protein)	G E T D D E G Y E D E Y V L E D L E V T V A D H I
my2 (DNA)	GGAGTTCAGATGAAGATGGATATGATGATGAATATGTGCTGGAAGATCTTGAAGTAACTGTGTCTGATCATATT
my2 (Protein)	G V P D E D G Y D D E Y V L E D L E V T V S D H I
Myc-hy2 (DNA)	GGAGTTCAGATGAGGATGGGTATGATGATGAGTATGTGCTGGAAGATCTCGAAGTACTGTGTCTGACCATATT
Myc-hy2 (Protein)	G V P D E D G Y D D E Y V L E D L E V T V S D H I
my1 (DNA)	CAAAAAGTCATGAAAGTGAACCTTTGAGGCAGCCTGGGATGAGGTTGGGGATGAATTTGAGAAGGAGGAAACGTTT
my1 (Protein)	Q K V M K V N F E A A W D E V G D E F E K E E T F
HA-hy1 (DNA)	CAAAAGGTCATGAAACTGAACCTTGAAGCAGCCTGGGATGAGGTTAGGGATGAATTTGAGAAGGAGGAAACGTTT
HA-hy1 (Protein)	Q K V M K L N F E A A W D E V G D E F E K E E T F
my2 (DNA)	CAGAAGATACTAAAACCTTTCGCTGCTGCCTGGGAAGAGGTTGGGAGATGCCTTTGAAAAAGAAACCTTT
my2 (Protein)	Q K I L K P N F A A A W E E V G D A F E K E E T F
Myc-hy2 (DNA)	CAGAAAGTACTGAAGCCTAACCTTTGCTGCTGCTTGGGAAGAGGTTGGGAGATACCTTTGAGAAAGAGGAAACCTTT
Myc-hy2 (Protein)	Q K V L K P N F A A A W E E V G D T F E K E E T F
my1 (DNA)	ACCTGTCTACTATCAAGACACTCGAAGAGGCTGTGGGCAATATGTGAAGTTCTGGGAATGCATCCTTTGTGAG
my1 (Protein)	T L S T I K T L E E A V G N I V K F L G M H P C E
HA-hy1 (DNA)	ACCTGTCTACTATCAAGACACTCGAAGAGGCTGTGGGTAATATGTGAAGTTCTGGGAATGCACCTTTGTGAG
HA-hy1 (Protein)	T L S T I K T L E E A V G N I V K F L G M H P C E
my2 (DNA)	GCCTGAGCTCTACAAAACCTTGAAGAGCTGTCAACAACATCATCATCATTTCTGGTATGCACCCATGTGAG
my2 (Protein)	A L S S T K T L E E A V N N I I T F L G M Q P C E
Myc-hy2 (DNA)	GCCTCAGTTCTACAAAACCTTGAAGAGGCTGTCAACAATATCATCATCATTTCTGGGATGCAGCCATGTGAG
Myc-hy2 (Protein)	A L S S T K T L E E A V N N I I T F L G M Q P C E

my1 (DNA)	AGGTCAGACAAAGTGCCAGAAAACAAGAACCACACACGCTGCTGCTAGCTGGAGTATTCCGGGGTGGTCATGAC
my1 (Protein)	R S D K V P E N K N T H T L L L A G V F R G G H D
HA-hy1 (DNA)	AGGTCAGACAAAGTGCCGGATAACAAGAACCACACGTTGCTCCTGGCTGGTGTTCGGGGTGGTCATGAC
HA-hy1 (Protein)	R S D K V P D N K N T H T L L L A G V F R G G H D
my2 (DNA)	AGGTCAGATAAAGTCCCCGAGAATAAGAACTCCCACTCCCTCTATCTAGCAGGTGTATACAGAGGTGGCTATGAC
my2 (Protein)	R S D K V P E N K N S H S L Y L A G V Y R G G Y D
Myc-hy2 (DNA)	AGGTCAGATAAAGTACCTGAGAACAAGAATTCCTATTCGCTCTATCTGCGAGGTATATTAGAGGTGGCTATGAC
Myc-hy2 (Protein)	R S D K V P E N K N S H S L Y L A G I F R G G Y D
my1 (DNA)	ATCCTTGTGCGTTCTCGGCTTCTGCTTTTGGACACAGTGACGATGCAGGTGACAGCCAGAAGCTCAGAGGAGCTG
my1 (Protein)	I L V R S R L L L L D T V T M Q V T A R S S E E L
HA-hy1 (DNA)	ATCCTGGTGCCTCCCGGCTGCTGCTTTTGGACACAGTGACAATGCAGGTGACAGCCAGAAGTTTGGAGGAGCTG
HA-hy1 (Protein)	I L V R S R L L L L D T V T M Q V T A R S L E E L
my2 (DNA)	TTATTGGTGCCTCCAGGCTGGCCCTAGCTGATGGAGTGACCATGCAGGTGACTGTGAGAGCAAGAGAGAACC
my2 (Protein)	L L V R S R L A L A D G V T M Q V T V R S K E R T
Myc-hy2 (DNA)	TTATTGGTGCCTCCAGGCTGGCCCTAGCCGATGGAGTGACCATGCAGGTGACTGTGAGAGCAAGAGAGAACA
Myc-hy2 (Protein)	L L V R S R L A L A D G V T M Q V T V R S K E R T
my1 (DNA)	CCAGTAGATATCATCTTGGCATCCGTGGGC 2616 bp
my1 (Protein)	P V D I I L A S V G 103,3 kDa
HA-hy1 (DNA)	CCAGTAGACATCATCTTGGCATCTGTGGGA 2655 bp
HA-hy1 (Protein)	P V D I I L A S V G 105,5 kDa
my2 (DNA)	CCTGTGGATGTTATCTTGGCTTCTGTGGGA 2625 bp
my2 (Protein)	P V D V I L A S V G 104,8 kDa
Myc-hy2 (DNA)	CCTGTAGATGTTATCTTGGCATCCGTGGGC 2649 bp
Myc-hy2 (Protein)	P V D V I L A S V G 105,8 kDa

2. Vergleich von ArfGAPs hinsichtlich der krümmungs-sensitiven Domäne

Im folgenden ist ein Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der krümmungs-sensitiven ArfGAP-Isoformen ArfGAP1 (Ratte) und Gcs1p (Hefe) mit Zfp289 (Ratte) und ArfGAP3 (human) dargestellt. Der unterstrichene Bereich markiert die katalytische GAP-Domäne von ArfGAP1 (Cukierman et al. 1995), während die eingeboxten, grün unterlegten Aminosäuren die für die Krümmungs-Sensitivität relevanten Seitenketten indizieren (L207, W211 und F214) (Bigay et al. 2005). Ein Vergleich der Sequenzen schlägt korrespondierende Positionen von Zfp289 und ArfGAP3 vor (eingeboxt, nicht grün unterlegt).

ArfGAP1 (r)	<u>MASPRTRKVLKEVRAQDENNVCFECGAFNPQWVSVTYGIWICLECSGRHRGLGVHL</u>
Gcs1p (y)	MSDWKVDPDTRRRLLQLQKIGANKKCMDCGAPNPQWATPKFGAFICLECAGIHRGLGVHI
Zfp289 (r)	MAAGPSKSEIQTFLFKRLRAIPTNKACFDGAKSPSWASITYGVFLCIDCSGVHRSRLGVHL
ArfGAP3 (h)	MGDPSKQ-DILTIFKRLRSVPTNKVCFDCGAKNPSWASITYGVFLCIDCSGSHRSRLGVHL
ArfGAP1 (r)	<u>SFVRSVTMDKWKDIELEKMKAG-GNAKFREFLEAQDDYEPSWSLQDKYSSRAAALFRDKVA</u>
Gcs1p (y)	SFVRSITMDQFKPEELLRMEKG-GNEPLTEWFKSH-NIDLSPQKVYDNPVAEDYKEKLT
Zfp289 (r)	SFIRSTELDSNWSWLQLRCMQVGGANATAFFRQHGCCLANDANT--KYNSRAAQMYREKIRQ
ArfGAP3 (h)	SFIRSTELDSNWSWFLRCMQVGGNASASSFFHQHGCSTNDTNA--KYNSRAAQLYREKIKS
ArfGAP1 (r)	<u>TLAEGKEWSLESSPAQNWTTPQPKTLQFTAHRPAGQPQNVTTSGDKAFEDWLNDLGSYQ</u>
Gcs1p (y)	CLCEDRVFEEREHLDFDASKLSATSQTAASATPGVAQSREGTPLENRRSATPANSNNGAN
Zfp289 (r)	LGSTALARHGTDLWIDNMNSAPSHSPEKKDSDFEHTQAPAWDTAATDPSGTQQPALP
ArfGAP3 (h)	LASQATRKHGTDLWLDSCVPPPLSPPPKEEDFFASHVSPVSDTAWASAIAPSSLTSRP
ArfGAP1 (r)	-----GAQENRYVGFNT--VPPQKRE-----
Gcs1p (y)	FQKEKNEAYFAELGKKNQSRPDHLPSPQGGKYQGFSTPAKPPQERSAGSSNTLSL----
Zfp289 (r)	SESSSLAQPEPGPNTDLLGTSPQASLELKSSIIIGKKKPAAAKGLGAKKGLGAQKVSNSQS
ArfGAP3 (h)	VETTLENNEGGQEQGPSVEGLNVPTKATLEVSSIIGKKKPNQAKKGLGAKKGLGAQKLANTC

```

ArfGAP1 (r) -----DDFLNSAMSS----YSGWSSFTTGASKFASAAK
Gcslp (y) -----ENFQADPLGT----SRGWGLFSSAVTKSFEDVN
Zfp289 (r) FTEIERQAQVAEKLREQQAAADAKKQAEESMVASMLRAYQELQIDRKKFEKKLQNLGKRR
ArfGAP3 (h) FNEIEKQAQAADKMKEQEDLAKVVSKEESIVSSSLRLAYKDLLEIQMKKDEKMNISGKKNVD

ArfGAP1 (r) EGATKFGSQASQKASELGHSLNENVLKPAQEKVKEGRIFDDVSSGVSQLASKVQGVGSKG
Gcslp (y) ETVSKPHVQQWQSGELSEETKRAAAQFGQKFQETSSYGFQAFSNFTKNFNNGNAEDSSTAG
Zfp289 (r) EQAERSESSSLAQPEPGPNTDLLGTSPQASLELKSIIIGKKKPAAAKKGGLGAKKGLGAQKV
ArfGAP3 (h) SDRLGMGFNCRSVISHSVTSDMQTIEQESPIMAKPRKKYNDDSDDSYFTSSSRYFDEPV

ArfGAP1 (r) WRDVTTFSGKAEDTSDRPLEGHSYQNSSGDNSQNSTIDQSFWETFGSAEPPKAKSPSSD
Gcslp (y) ---NTTHTHEYQKIDNNDKKNEQDEDEKWDFF
Zfp289 (r) SNQSLGMGLVSRSSISHSVLSEMOMIEQETPLSAKSSRSQDLDFDDVGTTFASGPPKYKDN
ArfGAP3 (h) ELRSSFSSWDDSSDSYWKKETSKDTEIVLKTGTGYSRPTARRKPDYEPVENTDEAQKKF

ArfGAP1 (r) SWTCADASTGRRSSDSWDIWGSGSASNKNKNSNSDGWESWEGASGEGRAKATKKAAPSTAA
Gcslp (y)
Zfp289 (r) PFSLGETFGRWDSDAAWGMDRVEEKEPEVTISSIRPISERTTSRREVESRISGLESSEA
ArfGAP3 (h) GNVKAISSDMYFGRQSQADYETRARLERLSASSSISSADLFEEPRKQPAGNYSLSSVLPN

ArfGAP1 (r) DEGWDNQNW
Gcslp (y)
Zfp289 (r) RQKFAGAKAISSDMFFGREVDSEYEARSRLQQLSGSSAISSSDLFGDVDGAHGGGTVSLG
ArfGAP3 (h) APDMAQFKQGVRSVAGKLSVFANGVVTISIQDRYGS

ArfGAP1 (r) 352 AS
Gcslp (y) 415 AS
Zfp289 (r) NVLPTADIAQFKQGVKSVAGKMAVLANGVMNSLQDRYGSY 520 AS
ArfGAP3 (h) 516 AS

```

VII. Literaturverzeichnis

- Aguilar, R. C., M. Boehm, et al.** (2001). "Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4." *J Biol Chem* 276(16): 13145-52.
- Ahle, S., A. Mann, et al.** (1988). "Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane." *Embo J* 7(4): 919-29.
- Ahluwalia, J. P., J. D. Topp, et al.** (2001). "A role for calcium in stabilizing transport vesicle coats." *J Biol Chem* 276(36): 34148-55.
- Allan, V. J. und T. E. Kreis** (1986). "A microtubule-binding protein associated with membranes of the Golgi apparatus." *J Cell Biol* 103(6 Pt 1): 2229-39.
- Alvarez, C., R. Garcia-Mata, et al.** (2003). "COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism." *Mol Biol Cell* 14(5): 2116-27.
- Aniento, F., F. Gu, et al.** (1996). "An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes." *J Cell Biol* 133(1): 29-41.
- Antonny, B.** (2004). "SNARE filtering by dynamin." *Cell* 119(5): 581-2.
- Antonny, B., D. Madden, et al.** (2001). "Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues." *Nat Cell Biol* 3(6): 531-7.
- Aoe, T., I. Huber, et al.** (1999). "The KDEL receptor regulates a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor 1 by interacting with its non-catalytic domain." *J Biol Chem* 274(29): 20545-9.
- Aoe, T., A. J. Lee, et al.** (1998). "Modulation of intracellular transport by transported proteins: insight from regulation of COPI-mediated transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1624-9.
- Bannykh, S. I. und W. E. Balch** (1998). "Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments." *Histochem Cell Biol* 109(5-6): 463-75.
- Barlowe, C.** (2003). "Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out?" *Trends Cell Biol* 13(6): 295-300.
- Barlowe, C., L. Orci, et al.** (1994). "COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum." *Cell* 77(6): 895-907.
- Barr, F. A. und B. Short** (2003). "Golbins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus." *Curr Opin Cell Biol* 15(4): 405-13.
- Ben-Tekaya, H., K. Miura, et al.** (2005). "Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC." *J Cell Sci* 118(Pt 2): 357-67.
- Bi, X., R. A. Corpina, et al.** (2002). "Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat." *Nature* 419(6904): 271-7.
- Bigay, J., J. F. Casella, et al.** (2005). "ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif." *Embo J*.
- Bigay, J., P. Gounon, et al.** (2003). "Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature." *Nature* 426(6966): 563-6.
- Blagitko, N., U. Schulz, et al.** (1999). "gamma2-COP, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome." *Hum Mol Genet* 8(13): 2387-96.
- Blobel, G. und B. Dobberstein** (1975a). "Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma." *J Cell Biol* 67(3): 835-51.
- Blobel, G. und B. Dobberstein** (1975b). "Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components." *J Cell Biol* 67(3): 852-62.
- Blobel, G. und V. R. Potter** (1967a). "Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. I. Distribution as related to total cellular RNA." *J Mol Biol* 26(2): 279-92.
- Blobel, G. und V. R. Potter** (1967b). "Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. II. Interaction of ribosomes and membranes." *J Mol Biol* 26(2): 293-301.
- Boehm, M. und J. S. Bonifacino** (2001). "Adaptins: the final recount." *Mol Biol Cell* 12(10): 2907-20.
- Bonifacino, J. S. und B. S. Glick** (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." *Cell* 116(2): 153-66.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Bremser, M., W. Nickel, et al.** (1999). "Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors." *Cell* 96(4): 495-506.
- Caras, I. W. und G. N. Weddell** (1989). "Signal peptide for protein secretion directing glycopospholipid membrane anchor attachment." *Science* 243(4895): 1196-8.
- Caro, L. G. und G. E. Palade** (1964). "Protein Synthesis, Storage, and Discharge in the Pancreatic Exocrine Cell. An Autoradiographic Study." *J Cell Biol* 20: 473-95.
- Chardin, P., S. Paris, et al.** (1996). "A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains." *Nature* 384(6608): 481-4.

- Chen, J. L., J. P. Ahluwalia, et al.** (2002). "Selective effects of calcium chelators on anterograde and retrograde protein transport in the cell." *J Biol Chem* 277(38): 35682-7.
- Collawn, J. F., M. Stangel, et al.** (1990). "Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis." *Cell* 63(5): 1061-72.
- Cosson, P., C. Demolliere, et al.** (1996). "Delta- and zeta-COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval." *Embo J* 15(8): 1792-8.
- Cosson, P., Y. Lefkir, et al.** (1998). "New COP1-binding motifs involved in ER retrieval." *Embo J* 17(23): 6863-70.
- Cukierman, E., I. Huber, et al.** (1995). "The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization." *Science* 270(5244): 1999-2002.
- Dell'Angelica, E. C., C. Mullins, et al.** (1999). "AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors." *J Biol Chem* 274(11): 7278-85.
- Dell'Angelica, E. C., H. Ohno, et al.** (1997). "AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression." *Embo J* 16(5): 917-28.
- Dell'Angelica, E. C., R. Puertollano, et al.** (2000). "GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex." *J Cell Biol* 149(1): 81-94.
- Deshaies, R. J., S. L. Sanders, et al.** (1991). "Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex." *Nature* 349(6312): 806-8.
- Deshaies, R. J. und R. Schekman** (1989). "SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* 109(6 Pt 1): 2653-64.
- Dominguez, M., K. Dejgaard, et al.** (1998). "gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer." *J Cell Biol* 140(4): 751-65.
- Duden, R., L. Kajikawa, et al.** (1998). "epsilon-COP is a structural component of coatomer that functions to stabilize alpha-COP." *Embo J* 17(4): 985-95.
- Dunphy, W. G., E. Fries, et al.** (1981). "Early and late functions associated with the Golgi apparatus reside in distinct compartments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12): 7453-7.
- Emery, G., M. Rojo, et al.** (2000). "Coupled transport of p24 family members." *J Cell Sci* 113 (Pt 13): 2507-16.
- Eugster, A., G. Frigerio, et al.** (2000). "COP I domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP." *Embo J* 19(15): 3905-17.
- Eugster, A., G. Frigerio, et al.** (2004). "The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs." *Mol Biol Cell* 15(3): 1011-23.
- Farnaes, L. und H. J. Ditzel** (2003). "Dissecting the cellular functions of annexin XI using recombinant human annexin XI-specific autoantibodies cloned by phage display." *J Biol Chem* 278(35): 33120-6.
- Faulstich, D., S. Auerbach, et al.** (1996). "Architecture of coatomer: molecular characterization of delta-COP and protein interactions within the complex." *J Cell Biol* 135(1): 53-61.
- Fischer, H. D., A. Gonzalez-Noriega, et al.** (1980). "Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver. Subcellular distribution and role in intracellular transport of lysosomal enzymes." *J Biol Chem* 255(20): 9608-15.
- Folsch, H., M. Pypaert, et al.** (2003). "The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains." *J Cell Biol* 163(2): 351-62.
- Folsch, H., M. Pypaert, et al.** (2001). "Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells." *J Cell Biol* 152(3): 595-606.
- Forler, D., T. Kocher, et al.** (2003). "An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes." *Nat Biotechnol* 21(1): 89-92.
- Franco, M., P. Chardin, et al.** (1996). "Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor." *J Biol Chem* 271(3): 1573-8.
- Freedman, R. B., N. J. Bulleid, et al.** (1989). "Role of protein disulphide-isomerase in the expression of native proteins." *Biochem Soc Symp* 55: 167-92.
- Friedlander, R., E. Jarosch, et al.** (2000). "A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response." *Nat Cell Biol* 2(7): 379-84.
- Fucini, R. V., A. Navarrete, et al.** (2000). "Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes." *J Biol Chem* 275(25): 18824-9.
- Fullekrug, J., T. Saganuma, et al.** (1999). "Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members." *Mol Biol Cell* 10(6): 1939-55.
- Futatsumori, M., K. Kasai, et al.** (2000). "Identification and characterization of novel isoforms of COP I subunits." *J Biochem (Tokyo)* 128(5): 793-801.
- Ganoth, D., E. Leshinsky, et al.** (1988). "A multicomponent system that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Resolution of factors and evidence for ATP-dependent complex formation." *J Biol Chem* 263(25): 12412-9.

- Gerke, V., C. E. Creutz, et al.** (2005). "Annexins: linking Ca(2+) signalling to membrane dynamics." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 449-61.
- Gerke, V. und S. E. Moss** (2002). "Annexins: from structure to function." *Physiol Rev* 82(2): 331-71.
- Gilmore, R., G. Blobel, et al.** (1982). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle." *J Cell Biol* 95(2 Pt 1): 463-9.
- Godi, A., I. Santone, et al.** (1998). "ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8607-12.
- Goldberg, J.** (1999). "Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis." *Cell* 96(6): 893-902.
- Goldberg, J.** (2000). "Decoding of sorting signals by coatomer through a GTPase switch in the COPI coat complex." *Cell* 100(6): 671-9.
- Gommel, D., L. Orci, et al.** (1999). "p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated transport vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between the organelles of the early secretory pathway." *FEBS Lett* 447(2-3): 179-85.
- Gommel, D. U., A. R. Memon, et al.** (2001). "Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23." *Embo J* 20(23): 6751-60.
- Griffiths, G. und K. Simons** (1986). "The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex." *Science* 234(4775): 438-43.
- Gu, F., C. M. Crump, et al.** (2001). "Trans-Golgi network sorting." *Cell Mol Life Sci* 58(8): 1067-84.
- Guo, Q., M. Penman, et al.** (1996). "A single point mutation in epsilon-COP results in temperature-sensitive, lethal defects in membrane transport in a Chinese hamster ovary cell mutant." *J Biol Chem* 271(19): 11191-6.
- Haass, C. und P. M. Kloetzel** (1989). "The Drosophila proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development." *Exp Cell Res* 180(1): 243-52.
- Hahn, Y., Y. J. Lee, et al.** (2000). "Duplication of genes encoding non-clathrin coat protein gamma-COP in vertebrate, insect and plant evolution." *FEBS Lett* 482(1-2): 31-6.
- Hara-Kuge, S., O. Kuge, et al.** (1994). "En bloc incorporation of coatomer subunits during the assembly of COP-coated vesicles." *J Cell Biol* 124(6): 883-92.
- Hardwick, K. G., M. J. Lewis, et al.** (1990). "ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus." *Embo J* 9(3): 623-30.
- Harter, C., E. Draken, et al.** (1993). "Yeast coatomer contains a subunit homologous to mammalian beta'-COP." *FEBS Lett* 332(1-2): 71-3.
- Harter, C., J. Pavel, et al.** (1996). "Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatomer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5): 1902-6.
- Harter, C. und F. T. Wieland** (1998). "A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatomer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11649-54.
- Hauri, H. P., F. Kappeler, et al.** (2000). "ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway." *J Cell Sci* 113 (Pt 4): 587-96.
- Hershko, A., A. Ciechanover, et al.** (1979). "Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3107-10.
- Hoffman, G. R., P. B. Rahl, et al.** (2003). "Conserved structural motifs in intracellular trafficking pathways: structure of the gammaCOP appendage domain." *Mol Cell* 12(3): 615-25.
- Holstein, S. E., H. Ungewickell, et al.** (1996). "Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin." *J Cell Biol* 135(4): 925-37.
- Hosobuchi, M., T. Kreis, et al.** (1992). "SEC21 is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer." *Nature* 360(6404): 603-5.
- Ivessa, N. E., C. De Lemos-Chiarandini, et al.** (1995). "The Brefeldin A-induced retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum depends on calcium sequestered to intracellular stores." *J Biol Chem* 270(43): 25960-7.
- Jamieson, J. D. und G. E. Palade** (1966). "Role of the Golgi complex in the intracellular transport of secretory proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 55(2): 424-31.
- Jenne, N., K. Frey, et al.** (2002). "Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway." *J Biol Chem* 277(48): 46504-11.
- Jha, A., N. R. Agostinelli, et al.** (2004). "A novel AP-2 adaptor interaction motif initially identified in the long-splice isoform of synaptojanin 1, SJ170." *J Biol Chem* 279(3): 2281-90.
- Kahn, R. A. und A. G. Gilman** (1984). "Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin." *J Biol Chem* 259(10): 6228-34.
- Kari, B., N. Lussenhop, et al.** (1986). "Characterization of monoclonal antibodies reactive to several biochemically distinct human cytomegalovirus glycoprotein complexes." *J Virol* 60(2): 345-52.
- Karrenbauer, A., D. Jeckel, et al.** (1990). "The rate of bulk flow from the Golgi to the plasma membrane." *Cell* 63(2): 259-67.
- Kirchhausen, T.** (2000). "Clathrin." *Annu Rev Biochem* 69: 699-727.

- Kornfeld, R. und S. Kornfeld** (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* 54: 631-64.
- Kuge, O., S. Hara-Kuge, et al.** (1993). "zeta-COP, a subunit of coatomer, is required for COP-coated vesicle assembly." *J Cell Biol* 123(6 Pt 2): 1727-34.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lanoix, J., J. Ouwendijk, et al.** (1999). "GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles." *Embo J* 18(18): 4935-48.
- Lanoix, J., J. Ouwendijk, et al.** (2001). "Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1." *J Cell Biol* 155(7): 1199-212.
- Lecona, E., J. Turnay, et al.** (2003). "Structural and functional characterization of recombinant mouse annexin A11: influence of calcium binding." *Biochem J* 373(Pt 2): 437-49.
- Lee, M. C., E. A. Miller, et al.** (2004). "Bi-Directional Protein Transport Between the ER and Golgi." *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Lee, M. C., L. Orci, et al.** (2005a). "Sar1p N-Terminal Helix Initiates Membrane Curvature and Completes the Fission of a COPII Vesicle." *Cell* 122(4): 605-17.
- Lee, S. Y., J. S. Yang, et al.** (2005b). "ARFGAP1 plays a central role in coupling COPI cargo sorting with vesicle formation." *J Cell Biol* 168(2): 281-90.
- Letourneur, F., E. C. Gaynor, et al.** (1994). "Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum." *Cell* 79(7): 1199-207.
- Lewis, M. J. und H. R. Pelham** (1990). "A human homologue of the yeast HDEL receptor." *Nature* 348(6297): 162-3.
- Lewis, S. M., P. P. Poon, et al.** (2004). "The ArfGAP Glo3 is required for the generation of COPI vesicles." *Mol Biol Cell* 15(9): 4064-72.
- Liu, W., R. Duden, et al.** (2005). "ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells." *J Cell Biol* 168(7): 1053-63.
- Liu, X., C. Zhang, et al.** (2001). "Functional characterization of novel human ARFGAP3." *FEBS Lett* 490(1-2): 79-83.
- Lowe, M. und T. E. Kreis** (1995). "In vitro assembly and disassembly of coatomer." *J Biol Chem* 270(52): 31364-71.
- Lowe, M. und T. E. Kreis** (1996). "In vivo assembly of coatomer, the COP-I coat precursor." *J Biol Chem* 271(48): 30725-30.
- Makler, V., E. Cukierman, et al.** (1995). "ADP-ribosylation factor-directed GTPase-activating protein. Purification and partial characterization." *J Biol Chem* 270(10): 5232-7.
- Malhotra, V., T. Serafini, et al.** (1989). "Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack." *Cell* 58(2): 329-36.
- Malkus, P., F. Jiang, et al.** (2002). "Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles." *J Cell Biol* 159(6): 915-21.
- Malsam, J., D. Gommel, et al.** (1999). "A role for ADP ribosylation factor in the control of cargo uptake during COPI-coated vesicle biogenesis." *FEBS Lett* 462(3): 267-72.
- Malsam, J., A. Satoh, et al.** (2005). "Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles." *Science* 307(5712): 1095-8.
- Martinez-Menarguez, J. A., H. J. Geuze, et al.** (1999). "Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles." *Cell* 98(1): 81-90.
- Marzioch, M., D. C. Henthorn, et al.** (1999). "Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex." *Mol Biol Cell* 10(6): 1923-38.
- Massari, M. E. und C. Murre** (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." *Mol Cell Biol* 20(2): 429-40.
- Matsuoka, K., L. Orci, et al.** (1998). "COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes." *Cell* 93(2): 263-75.
- McMahon, H. T. und I. G. Mills** (2004). "COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches." *Curr Opin Cell Biol* 16(4): 379-91.
- McNew, J. A., F. Parlati, et al.** (2000). "Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins." *Nature* 407(6801): 153-9.
- Miller, E. A., T. H. Beilharz, et al.** (2003). "Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles." *Cell* 114(4): 497-509.
- Mizutani, A., H. Tokumitsu, et al.** (1993). "Phosphorylation of annexin XI (CAP-50) in SR-3Y1 cells." *J Biol Chem* 268(21): 15517-22.
- Mizutani, A., N. Usuda, et al.** (1992). "CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells." *J Biol Chem* 267(19): 13498-504.
- Mogelsvang, S., N. Gomez-Ospina, et al.** (2003). "Tomographic evidence for continuous turnover of Golgi cisternae in *Pichia pastoris*." *Mol Biol Cell* 14(6): 2277-91.

- Mossessova, E., L. C. Bickford, et al.** (2003). "SNARE selectivity of the COPII coat." *Cell* 114(4): 483-95.
- Munro, S.und H. R. Pelham** (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." *Cell* 48(5): 899-907.
- Nakamura, N., C. Rabouille, et al.** (1995). "Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130." *J Cell Biol* 131(6 Pt 2): 1715-26.
- Nakano, A.und M. Muramatsu** (1989). "A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus." *J Cell Biol* 109(6 Pt 1): 2677-91.
- Nickel, W., B. Brugger, et al.** (2002). "Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding." *J Cell Sci* 115(Pt 16): 3235-40.
- Nickel, W., J. Malsam, et al.** (1998). "Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro." *J Cell Sci* 111 (Pt 20): 3081-90.
- Nie, Z., D. S. Hirsch, et al.** (2003). "Arf and its many interactors." *Curr Opin Cell Biol* 15(4): 396-404.
- Nilsson, T., M. Jackson, et al.** (1989). "Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum." *Cell* 58(4): 707-18.
- Niu, T. K., A. C. Pfeifer, et al.** (2005). "Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi." *Mol Biol Cell* 16(3): 1213-22.
- Ohno, H., J. Stewart, et al.** (1995). "Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins." *Science* 269(5232): 1872-5.
- Ooi, C. E., E. C. Dell'Angelica, et al.** (1998). "ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes." *J Cell Biol* 142(2): 391-402.
- Orci, L., M. Ravazzola, et al.** (2000). "Anterograde flow of cargo across the golgi stack potentially mediated via bidirectional "percolating" COPI vesicles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19): 10400-5.
- Orci, L., M. Starnes, et al.** (1997). "Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles." *Cell* 90(2): 335-49.
- Owen, D. J., B. M. Collins, et al.** (2004). "Adaptors for clathrin coats: structure and function." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 153-91.
- Pagano, A., F. Letourneur, et al.** (1999). "Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 274(12): 7833-40.
- Paleotti, O., E. Macia, et al.** (2005). "The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes." *J Biol Chem* 280(22): 21661-6.
- Palmer, D. J., J. B. Helms, et al.** (1993). "Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor." *J Biol Chem* 268(16): 12083-9.
- Parlati, F., J. A. McNew, et al.** (2000). "Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion." *Nature* 407(6801): 194-8.
- Pavel, J., C. Harter, et al.** (1998). "Reversible dissociation of coatomer: functional characterization of a beta/delta-coat protein subcomplex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2140-5.
- Pearse, B. M.** (1975). "Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization." *J Mol Biol* 97(1): 93-8.
- Pelham, H. R.** (1988). "Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment." *Embo J* 7(4): 913-8.
- Peng, R., A. De Antoni, et al.** (2000). "Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members." *J Biol Chem* 275(15): 11521-8.
- Pepperkok, R., J. A. Whitney, et al.** (2000). "COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo." *J Cell Sci* 113 (Pt 1): 135-44.
- Peter, B. J., H. M. Kent, et al.** (2004). "BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure." *Science* 303(5657): 495-9.
- Pind, S. N., C. Nuoffer, et al.** (1994). "Rab1 and Ca²⁺ are required for the fusion of carrier vesicles mediating endoplasmic reticulum to Golgi transport." *J Cell Biol* 125(2): 239-52.
- Plempner, R. K., J. Bordallo, et al.** (1999). "Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation." *J Cell Sci* 112 (Pt 22): 4123-34.
- Poon, P. P., D. Cassel, et al.** (1999). "Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function." *Embo J* 18(3): 555-64.
- Poon, P. P., S. F. Nothwehr, et al.** (2001). "The Gcs1 and Age2 ArfGAP proteins provide overlapping essential function for transport from the yeast trans-Golgi network." *J Cell Biol* 155(7): 1239-50.
- Porat, A.und Z. Elazar** (2000). "Regulation of intra-Golgi membrane transport by calcium." *J Biol Chem* 275(38): 29233-7.
- Praefcke, G. J., M. G. Ford, et al.** (2004). "Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis." *Embo J* 23(22): 4371-83.
- Presley, J. F., N. B. Cole, et al.** (1997). "ER-to-Golgi transport visualized in living cells." *Nature* 389(6646): 81-5.

- Rambourg, A. und Y. Clermont** (1990). "Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus." Eur J Cell Biol 51(2): 189-200.
- Randazzo, P. A.** (1997). "Resolution of two ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating proteins from rat liver." Biochem J 324 (Pt 2): 413-9.
- Randazzo, P. A. und D. S. Hirsch** (2004). "Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling." Cell Signal 16(4): 401-13.
- Rapoport, I., Y. C. Chen, et al.** (1998). "Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site." Embo J 17(8): 2148-55.
- Rein, U., U. Andag, et al.** (2002). "ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat." J Cell Biol 157(3): 395-404.
- Reinhard, C., C. Harter, et al.** (1999). "Receptor-induced polymerization of coatomer." Proc Natl Acad Sci U S A 96(4): 1224-8.
- Reinhard, C., M. Schweikert, et al.** (2003). "Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components." Proc Natl Acad Sci U S A 100(14): 8253-7.
- Reinherz, E. L., P. C. Kung, et al.** (1979). "Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody." Proc Natl Acad Sci U S A 76(8): 4061-5.
- Robinson, M. S. und B. M. Pearse** (1986). "Immunofluorescent localization of 100K coated vesicle proteins." J Cell Biol 102(1): 48-54.
- Rothman, J. E.** (1981). "The golgi apparatus: two organelles in tandem." Science 213(4513): 1212-9.
- Rothman, J. E.** (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport." Nature 372(6501): 55-63.
- Rothman, J. E., R. L. Miller, et al.** (1984a). "Intercompartmental transport in the Golgi complex is a dissociative process: facile transfer of membrane protein between two Golgi populations." J Cell Biol 99(1 Pt 1): 260-71.
- Rothman, J. E., L. J. Urbani, et al.** (1984b). "Transport of protein between cytoplasmic membranes of fused cells: correspondence to processes reconstituted in a cell-free system." J Cell Biol 99(1 Pt 1): 248-59.
- Rothman, J. E. und F. T. Wieland** (1996). "Protein sorting by transport vesicles." Science 272(5259): 227-34.
- Satoh, A., Y. Wang, et al.** (2003). "Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure." Traffic 4(3): 153-61.
- Satoh, H., Y. Nakano, et al.** (2002). "The penta-EF-hand domain of ALG-2 interacts with amino-terminal domains of both annexin VII and annexin XI in a Ca²⁺-dependent manner." Biochim Biophys Acta 1600(1-2): 61-7.
- Scales, S. J., R. Pepperkok, et al.** (1997). "Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI." Cell 90(6): 1137-48.
- Schledzewski, K., H. Brinkmann, et al.** (1999). "Phylogenetic analysis of components of the eukaryotic vesicle transport system reveals a common origin of adaptor protein complexes 1, 2, and 3 and the F subcomplex of the coatomer COPI." J Mol Evol 48(6): 770-8.
- Schroder-Kohne, S., F. Letourneur, et al.** (1998). "Alpha-COP can discriminate between distinct, functional di-lysine signals in vitro and regulates access into retrograde transport." J Cell Sci 111 (Pt 23): 3459-70.
- Schutze, M. P., P. A. Peterson, et al.** (1994). "An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum." Embo J 13(7): 1696-705.
- Serafini, T., L. Orci, et al.** (1991a). "ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein." Cell 67(2): 239-53.
- Serafini, T., G. Stenbeck, et al.** (1991b). "A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin." Nature 349(6306): 215-20.
- Sheff, D., M. Lowe, et al.** (1996). "Biochemical heterogeneity and phosphorylation of coatomer subunits." J Biol Chem 271(12): 7230-6.
- Short, B. und F. A. Barr** (2003). "Membrane traffic: a glitch in the Golgi matrix." Curr Biol 13(8): R311-3.
- Singh, J., Y. Itahana, et al.** (2001). "Molecular cloning and characterization of a zinc finger protein involved in Id-1-stimulated mammary epithelial cell growth." J Biol Chem 276(15): 11852-8.
- Sohn, K., L. Orci, et al.** (1996). "A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding." J Cell Biol 135(5): 1239-48.
- Sollner, T., M. K. Bennett, et al.** (1993a). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." Cell 75(3): 409-18.
- Sollner, T., S. W. Whiteheart, et al.** (1993b). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature 362(6418): 318-24.
- Stamnes, M. A., M. W. Craighead, et al.** (1995). "An integral membrane component of coatomer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding." Proc Natl Acad Sci U S A 92(17): 8011-5.
- Stamnes, M. A. und J. E. Rothman** (1993). "The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein." Cell 73(5): 999-1005.
- Stenbeck, G., C. Harter, et al.** (1993). "beta'-COP, a novel subunit of coatomer." Embo J 12(7): 2841-5.
- Sudo, T. und H. Hidaka** (1998). "Regulation of calyculin (S100A6) binding by alternative splicing in the N-terminal regulatory domain of annexin XI isoforms." J Biol Chem 273(11): 6351-7.

- Szafer, E., M. Rotman, et al.** (2001). "Regulation of GTP hydrolysis on ADP-ribosylation factor-1 at the Golgi membrane." *J Biol Chem* 276(51): 47834-9.
- Tabas, I. und S. Kornfeld** (1979). "Purification and characterization of a rat liver Golgi alpha-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides." *J Biol Chem* 254(22): 11655-63.
- Takatsu, H., M. Futatsumori, et al.** (2001). "Similar subunit interactions contribute to assembly of clathrin adaptor complexes and COPI complex: analysis using yeast three-hybrid system." *Biochem Biophys Res Commun* 284(4): 1083-9.
- Tokumitsu, H., A. Mizutani, et al.** (1993). "Calycyclin-binding site located on the NH2-terminal domain of rabbit CAP-50 (annexin XI): functional expression of CAP-50 in Escherichia coli." *Arch Biochem Biophys* 303(2): 302-6.
- Tomas, A., C. Futter, et al.** (2004). "Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis." *J Cell Biol* 165(6): 813-22.
- Tomas, A. und S. E. Moss** (2003). "Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope." *J Biol Chem* 278(22): 20210-6.
- Tooze, S. A., G. J. Martens, et al.** (2001). "Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE." *Trends Cell Biol* 11(3): 116-22.
- Tooze, S. A., J. Tooze, et al.** (1988). "Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59." *J Cell Biol* 106(5): 1475-87.
- Traub, L. M., J. A. Ostrom, et al.** (1993). "Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes." *J Cell Biol* 123(3): 561-73.
- Travers, K. J., C. K. Patil, et al.** (2000). "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." *Cell* 101(3): 249-58.
- Urlinger, S., U. Baron, et al.** (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7963-8.
- Walter, P. und G. Blobel** (1980). "Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(12): 7112-6.
- Walter, P. und G. Blobel** (1981a). "Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes." *J Cell Biol* 91(2 Pt 1): 557-61.
- Walter, P. und G. Blobel** (1981b). "Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein." *J Cell Biol* 91(2 Pt 1): 551-6.
- Walter, P., I. Ibrahimi, et al.** (1981). "Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein." *J Cell Biol* 91(2 Pt 1): 545-50.
- Wang, L. H., T. C. Sudhof, et al.** (1995). "The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin." *J Biol Chem* 270(17): 10079-83.
- Waters, M. G., T. Serafini, et al.** (1991). "'Coatome': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles." *Nature* 349(6306): 248-51.
- Watson, P. J., G. Frigerio, et al.** (2004). "Gamma-COP appendage domain - structure and function." *Traffic* 5(2): 79-88.
- Weber, T., B. V. Zemelman, et al.** (1998). "SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion." *Cell* 92(6): 759-72.
- Wegmann, D., P. Hess, et al.** (2004). "Novel isotopic gamma/zeta subunits reveal three coatome complexes in mammals." *Mol Cell Biol* 24(3): 1070-80.
- Whitney, J. A., M. Gomez, et al.** (1995). "Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function." *Cell* 83(5): 703-13.
- Whyte, J. R. und S. Munro** (2002). "Vesicle tethering complexes in membrane traffic." *J Cell Sci* 115(Pt 13): 2627-37.
- Wieland, F. T., M. L. Gleason, et al.** (1987). "The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface." *Cell* 50(2): 289-300.
- Wu, W. J., J. W. Erickson, et al.** (2000). "The gamma-subunit of the coatome complex binds Cdc42 to mediate transformation." *Nature* 405(6788): 800-4.
- Yang, J. S., S. Y. Lee, et al.** (2002). "ARFGAP1 promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat." *J Cell Biol* 159(1): 69-78.
- Zarling, J. M. und P. C. Kung** (1980). "Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *Nature* 288(5789): 394-6.
- Zerangue, N., B. Schwappach, et al.** (1999). "A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels." *Neuron* 22(3): 537-48.
- Zhao, L., J. B. Helms, et al.** (1997). "Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatome subunit beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4418-23.

-
- Zhao, L., J. B. Helms, et al.** (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(20): 14198-203.
- Zimmerberg, J. und S. McLaughlin** (2004). "Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers." Curr Biol 14(6): R250-2.

VIII. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. Felix Wieland für die interessante Themenstellung, die wertvollen Anregungen und die freundschaftliche Unterstützung in allen Aspekten während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Walter Nickel für die Übernahme des Zweitgutachtens und die spannenden Kicker-Spiele.

Dr. Britta Brügger, Julien Béthune, Dr. Constanze Reinhard und Dr. Dominik Wegmann für die große Hilfsbereitschaft und viele motivierende und konstruktive Vorschläge.

Dr. Jörg Malsam, Prof. Dr. Sigrid Berger-Seidel und Andrea Hellwig für die unermüdliche Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen.

Dr. Johannes Lechner und Petra Ihrig für die schnellen und zuverlässigen MALDI-Analysen.

Dr. Britta Brügger, Dr. Dominik Wegmann, Dr. Matthias Reiß und Julian Langer für das gründliche und schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Ingeborg Reckmann und Ingrid Meissner möchte ich mich für die hervorragende technische Unterstützung bedanken. Erst durch ihre Hilfe ist diese Arbeit durchführbar geworden.

Großer Dank geht an Gabi Weiß für ihre Hilfe in allen Belangen, die die Zellkultur betrafen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Catrin Müller für ihre Unterstützung bei der Herstellung von γ -COP-cDNA aus der Maus.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wieland, des dritten Stockwerks und des Biochemie Zentrums der Universität Heidelberg für eine große Hilfsbereitschaft, eine ausgezeichnete Atmosphäre und die vielen guten Parties und Kickerspiele.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit!