

Monika Christine Sahlmüller
Dr. med.

Rekombinante Expression von Coatomer, eines heptameren Multiprotein-Komplexes, und Analyse seiner Funktion

Geboren am 19.04.1979 in Köln
Saatsexamen am 26.05.2005 an der Humboldt-Universität zu Berlin

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Herr Prof. Dr. rer. nat. Felix T. Wieland

COPI-Vesikel vermitteln Transportprozesse zwischen intermediärem Kompartiment und Golgi-Apparat, Golgi und Endoplasmatischem Retikulum sowie innerhalb der Golgi-Zisternen. Die Proteinhülle der COPI-Vesikel besteht aus ARF-GTP und Coatomer. Zur COPI-Vesikelbildung wird Coatomer über Interaktionen mit ARF-GTP und Oligomeren der p24-Familienmitglieder an die Donormembran rekrutiert.

Coatomer ist ein ca. 550 kDa großer heteroheptamerer Proteinkomplex bestehend aus den Untereinheiten α -, β -, β' -, δ -, ϵ -, γ - und ζ -COP. Die Untereinheiten γ - und ζ -COP existieren in Säugern in jeweils zwei Isoformen (γ_1 , γ_2 und ζ_1 , ζ_2). Bislang sind drei Coatomer-Isotypen bekannt, die sich über ihre γ/ζ -Isotyp-Kombination definieren: der γ_1/ζ_1 -, der γ_1/ζ_2 - und der γ_2/ζ_1 -Coatomer. Die Isotypen liegen in einem Verhältnis von 10:3:5 vor und zeigen unterschiedliche präferentielle Lokalisationen innerhalb der Zelle. Bislang ist noch unklar, ob dem γ_2/ζ_2 -Coatomer auch eine relevante Rolle im sekretorischen Weg zukommt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten alle vier Coatomer-Komplexe rekombinant hergestellt werden. Hierfür wurde das Baculovirus-Expressionssystem gewählt, das eukaryotische Proteine in hoher Authentizität und Ausbeute exprimiert. Das von PD Dr. Imre Berger entwickelte und für die Coatomer-Expression genutzte BEVS MultiBac ermöglichte die Expression jedes der vier Coatomer-Komplexe (die cDNA der COPs stammt von der Spezies Maus (*Mus musculus*)) durch Infektion von Insektenzellen mit je einem Baculovirus, der für alle Untereinheiten eines individuellen Komplexes kodierte. Die Generierung dieser vier Isotyp-spezifischen Viren wurde - nach erfolgter Amplifikation sowie Sequenzierung der COP-cDNAs im pCR-Blunt-Vektor - durch Klonierung der COP-cDNA-Sequenzen in die MultiBac-Transfervektoren pFBDM und pUCDM(-YFP) ermöglicht. Diese erlauben über Nutzung des integrierten *Multiplication Module* die Generierung polycistronischer Expressionskassetten. Durch Rekombination zwischen baculoviraler DNA (MultiBac Bacmid) und den pUCDM(-YFP)-Konstrukten, die mit den unterschiedlichen γ/ζ -COP-

cDNA-Sequenzen beladen worden waren, sowie durch anschließende Tn7-Transposition der α -, β -, β' -, δ - und ε -COP-cDNAs vom pFBDM-Vektor auf die „ γ/ζ -rekombinierten MultiBac-Bacmide“ konnten vier Coatomer-Isotyp-spezifische MultiBac-Bacmide hergestellt werden. Durch Transfektion der aufgereinigten, rekombinanten Bacmid-DNAs in *Sf9*-Zellen wurden vier Isotyp-spezifische Viren generiert, die in nachfolgenden Infektionszyklen amplifiziert und als hochtitrige Virus-Stocks in der Expression eingesetzt wurden. Der $\gamma1/\zeta1$ -, der $\gamma1/\zeta2$ -, der $\gamma2/\zeta1$ - und der $\gamma2/\zeta2$ -Coatomer-Komplex konnten exprimiert werden. Der $\gamma1/\zeta1$ -Coatomer-Isotyp wurde bei an α - und β -COP angefügtem His₆-Tag mit TEV-Schnittstelle über Nickel-Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltration in hoher Ausbeute aufgereinigt. Die Funktionalität des Komplexes wurde durch *in vitro*-Generierung von homogen mit dem $\gamma1/\zeta1$ -Coatomer-Isotyp umhüllter COPI-Vesikel aufgezeigt. Die Vesikel konnten nach Negativkontrastierung mittels Elektronenmikroskopie visualisiert werden.

Die erfolgreiche Expression der Coatomer-Isotypen als lösliche, funktionell aktive Komplexe zeigt die Leistungstärke des Baculovirus-Systems in der Expression rekombinanter Multiproteinkomplexe auf. Das MultiBac-System ermöglichte durch Generierung je eines Coatomer-Isotyp-spezifischen Virus eine stärkere Expression der Komplexe in Insektenzellen als dies mit einer Co-Infektion mehrerer Viren bei mehr Aufwand möglich gewesen wäre. Die erfolgreiche Expression rekombinanten, isotypenreinen Coatomers erlaubt eine genaue biochemische und biophysikalische Charakterisierung des Komplexes. Interaktionen zwischen individuellen Coatomer-Isotypen und den zahlreichen Partnerproteinen können näher untersucht werden, Frachtmoleküle und Transportrouten können distinkten Vesikelpopulationen zugeordnet werden. So stellt der rekombinante Coatomer ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von Bildung und Funktion von Transportvesikeln dar und kann durch eine nun mögliche Vielzahl an Experimenten dazu beitragen, ein besseres Verständnis des Golgi-Apparates in Säugern zu erlangen.