

AUS DEM INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE

(PROF. DR. RER. NAT. B. SCHWAPPACH)

IM ZENTRUM BIOCHEMIE UND MOLEKULARE ZELLBIOLOGIE

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT  
GÖTTINGEN

---

**Rolle der  $\delta$ -COP-Untereinheit im  
frühen sekretorischen Pfad**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kora Pauline Richter

aus

Halle an der Saale

Göttingen 2015

**Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer**

**I. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. B. Schwappach**

**II. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. S. Thoms**

**Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juni 2015**

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>II. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Vernetzung von Kompartimenten und sekretorischer Weg.....	1
1.2 Das endoplasmatische Retikulum (ER).....	2
1.2.1 Qualitätskontrolle des ER .....	2
1.2.2 ER-Lokalisationssignale .....	4
1.3 KDEL-Retentionssignale und KDEL-Proteine .....	5
1.4 KDEL-Rezeptor .....	6
1.5 Hüllvesikel.....	9
1.6 COPI-Vesikel .....	11
1.6.1 Bildung von COPI-Vesikeln .....	11
1.6.2 COPI-Funktion .....	13
1.6.3 COPI-Struktur .....	14
1.7 Bäckerhefe als eukaryontischer Modellorganismus .....	15
1.8 Biologische und klinische Auswirkungen von Störungen im sekretorischen Weg .....	16
1.9 nur17-Mäuse.....	17
1.10 Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	18
<b>2 Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
2.1 Austausch von RET2 gegen Säuger $\delta$ -COP in Bäckerhefe.....	20
2.2 Expressionskontrolle von $\delta$ -COP in KR_wt_COPD.....	25
2.3 Ret2-Gen rettet Sekretion im Ret2-ko-Stamm .....	27
2.4 Konstruktion der Chimären.....	30
2.4.1 Ablauf des Klonierens.....	30
2.4.2 Kontrolle des Klonierens.....	33
2.5 Expression der Chimären .....	34
2.6 Sekretionsassay mit p415-Chimären .....	37
<b>3 Diskussion.....</b>	<b>40</b>
<b>4 Ausblick.....</b>	<b>44</b>
<b>5 Material und Methoden .....</b>	<b>45</b>
5.1 Material .....	45
5.1.1 Standardmedien und –puffer .....	45
5.1.2 Enzyme .....	47
5.1.3 Kits und andere Materialien .....	48
5.1.4 Geräte .....	48
5.1.5 Antikörper .....	49
5.1.6 Bakterienstämme.....	49
5.1.7 Hefestämme .....	49
5.1.8 Oligonukleotide (Primer) .....	50

---

5.1.9 Plasmide .....	51
5.2 Methoden .....	52
5.2.1 Allgemeine DNA-Techniken .....	53
5.2.1.1 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen.....	53
5.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese: Auftrennung von DNA-Molekülen.....	53
5.2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	54
5.2.1.4 Aufreinigung von DNA .....	56
5.2.1.4.1 Aus Agarosegelen .....	56
5.2.1.4.2 Aus PCR-Produkten und Verdau .....	56
5.2.1.5 Ligation von DNA.....	56
5.2.1.6 Elektroporation: Transformation von Bakterienzellen .....	57
5.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (Minipräparation).....	58
5.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	58
5.2.1.9 Sequenzierung der DNA.....	59
5.2.2 Allgemeine Proteinbiochemie-Methoden.....	59
5.2.2.1 Zelldichte bei Hefezellen .....	59
5.2.2.2 Alkalische Natriumhydroxid-Lyse von Zellen.....	59
5.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	59
5.2.2.4 Western Blot und Antikörper-Detektion .....	62
5.2.3 Experimente mit Hefe .....	63
5.2.3.1 Transformation von Hefezellen.....	63
5.2.3.2 Kar2-Sekretionsassay .....	63
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>

## I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 KDEL-Rezeptor-Struktur.....	7
Abb. 2 Konstruktion des KR_wt_COPD-Stamms.....	22
Abb. 3 Wachstumskurve des KR_wt_COPD-Stamms.....	23
Abb. 4 Verdopplungszeiten KR_wt_COPD.....	24
Abb. 5 KR_wt_COPD-Stamm-Herstellung.....	26
Abb. 6 Sekretionsrevidierung durch RET2-Plasmid.....	28
Abb. 7 Sekretionsstatistiken.....	29
Abb. 8 Konstruktion der Chimären.....	31
Abb. 9 Verdau der Chimären.....	33
Abb. 10 Expression der Chimären.....	35
Abb. 11 Sekretionsassay p415-Chimären.....	38
Abb. 12 Sekretionsstatistiken.....	39
Abb. 13 Alignment von $\delta$ -COP und Ret2.....	42
Abb. 14 Ablauf Klonieren.....	52

## II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Proteine.....	6
Tab. 2 KDEL-Rezeptor-Unterformen.....	8
Tab. 3 Vergleich der funktionell analogen Untereinheiten.....	10
Tab. 4 Zusammenfassung der intermolekularen Interaktionen.....	12
Tab. 5 COPI-Untereinheiten in Mensch und Hefe.....	16
Tab. 6 Fragmentgrößen in Basenpaaren.....	32
Tab. 7 Zusammensetzung Restriktionsverdau.....	53
Tab. 8 PCR-Protokoll.....	55
Tab. 9 Ligationsprotokoll.....	57
Tab. 10 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	61

# 1 Einleitung

Eine typische eukaryontische Zelle besitzt einen ausdifferenzierten sekretorischen Weg, welcher aus diversen intrazellulären Komponenten besteht. Membranproteine, die durch den sekretorischen Weg gehen, starten am endoplasmatischen Retikulum (ER), wo sie gefaltet und – im Falle von multimeren Membranproteinen – zusammengesetzt („assembliert“) werden. Die Proteine, die für andere Kompartimente wie z.B. die Plasmamembran bestimmt sind, werden aus dem ER geschleust und zum Golgi-Apparat transportiert. Dabei durchlaufen sie die Golgi-Zisternen und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Nachdem sie ggf. dort modifiziert wurden, treten Proteine, die für die Membran bestimmt sind, ihren Weg zur Plasmamembran an.

Wie die Proteine zu ihren vorgesehenen Zielorten kommen, welche Signale dafür notwendig sind und wer diese Wege steuert, sind Grundfragen der Zellbiologie von großer biomedizinischer Relevanz. Mit dieser Arbeit möchte ich zu einem besseren Verständnis dieser Transportwege beitragen.

## 1.1 Vernetzung von Kompartimenten und sekretorischer Weg

In der eukaryontischen Zelle gibt es zahlreiche molekulare Mechanismen, die für die Kommunikation zwischen unterschiedlichen Kompartimenten verantwortlich sind. Transportvesikel – eine Möglichkeit der zellulären Vernetzung – vermitteln den Fluss von Membranen und Cargoproteinen. Lipide und Proteine werden in diese Vesikel sortiert und durch stetigen Membranfluss von einem zu anderen Kompartiment versandt: Das Vesikel wird am Spenderkompartiment abgeschnürt, wandert durch das Zytoplasma und fusioniert mit der Membran des Zielkompartiments. Dieser intrazelluläre Transport verteilt neu synthetisierte Proteine, nimmt extrazelluläre Komponenten auf oder übernimmt regulatorische Funktionen (Popoff et al. 2011).

Das endoplasmatische Retikulum (ER) und der Golgi-Apparat stellen zwei wichtige Kompartimente der eukaryontischen Zelle dar und sind Teile des sekretorischen Weges. Während das perinukleäre ER für die Synthese von

Membran- und sekretierten Proteinen verantwortlich ist, agiert der Golgi-Apparat als Zwischenstation des sekretorischen Weges zwischen ER und Zellaußenmembran (Popoff et al. 2011). Membran- und sekretorische Proteine werden an ER-ständigen Ribosomen hergestellt und co- bzw. posttranslational ins ER eingeschleust, in den meisten Fällen unter Beteiligung des Sec61p-Komplexes (Corsi und Schekman 1996, Rapoport et al. 1999). Im ER werden die neu synthetisierten Proteine gefaltet, assembliert und für ihren weiteren Transport im sekretorischen Weg verpackt. Die Moleküle werden anschließend selektiv sortiert, d.h. in der Regel in COPII-Transportvesikel verpackt, welche den anterograden Transport zu intermediären Kompartimenten und zum Golgi-Apparat vermitteln (Aridor et al. 1995, Scales et al. 1997).

Extrazelluläre Cargo (z.B. Toxine) oder fälschlich aus dem ER verschickte, eigentlich ER-ansässige Proteine können durch retrograden Transport vom Golgi oder anderen post-ER-Kompartimenten zum ER (zurück-) sortiert werden. Wegweisend sind dabei Retrievalsignale der Proteine. Vermittelt wird der retrograde Transport durch COPI-Vesikel (Cosson und Letourneur 1994).

## **1.2 Das endoplasmatische Retikulum (ER)**

### **1.2.1 Qualitätskontrolle des ER**

Das endoplasmatische Retikulum beteiligt sich maßgeblich an der zellulären Qualitätskontrolle von neu synthetisierten Proteinen. Dabei wird es von den vesikulär-tubulären Clustern (VTCs), auch ER-Golgi intermediäres Kompartiment (ERGIC), und dem Golgi-Apparat unterstützt (Ellgaard et al. 1999). Qualitätskontrolle ist ein wichtiger Mechanismus für die Genauigkeit von Genexpression auf posttranskriptionellem Niveau (Ellgaard et al. 1999). Dabei wird kontrolliert, ob multimere Proteine vor dem Austritt aus dem ER durch *exit sites* richtig und vollständig zusammengesetzt sind (Ellgaard und Helenius 2003, Murshid und Presley 2004). Ohne strikte Qualitätskontrolle würde es zu einer Akkumulierung von partiell zusammengesetzten Untereinheiten an der Zelloberfläche kommen – mit katastrophalen Folgen für die Zelle. Daher ist die peinlich genaue Bearbeitung und Sortierung jeder

einzelnen Komponente wichtig, um eine akkurate Proteinfaltung sowie eine korrekte Zusammensetzung von Untereinheiten und Funktionalität der multimeren Komplexe zu gewährleisten (Hurtley und Helenius 1989).

Folgende Komponenten tragen zur Qualitätskontrolle am ER bei:

- Zurückhaltung von Proteinen und Aggregation (Hammond und Helenius 1995, Ellgaard et al. 1999);
- Ausschleusen der Proteine und Abbau im Proteasom nach Ubiquitylierung im Rahmen von ER-assoziiertes Degradation (ERAD) (Werner et al. 1996, Hiller et al. 1996), dadurch wird Akkumulation im ER verhindert (Gething und Sambrook 1992);
- Zurückführung von Proteinen bzw. Proteinen-Anteilen aus nachgeschalteten Kompartimenten des ER;
- Umleiten von Proteinen vom Golgi-Apparat zu Lysosomen oder Vakuolen;
- selektives Abfangen von Cargo an ER-*exit sites* (Ellgaard et al. 1999)

Die Qualitätskontrolle des ER lässt sich in zwei mechanistisch unterschiedliche Prozesse einteilen: 1. primäre Qualitätskontrolle – für alle Proteine, unabhängig von Herkunft und strukturellen Charakteristiken – und 2. sekundäre Qualitätskontrolle – für ausgewählte Proteine/Proteinfamilie (Ellgaard und Helenius 2003, Ellgaard et al. 1999).

Primäre Qualitätskontrolle greift auf gängige strukturelle und biophysikalische Charakteristiken zu. Diese tragen zur Unterscheidung zwischen gefalteten und ungefalteten Konformationen bei. Die Erkennung ungefalteter Proteine geschieht durch molekulare Chaperone und Faltungssensoren auf Grundlage von hydrophoben Regionen, ungepaarten Cysteinen, fehlerhafter Glykosylierung und Aggregationstendenz (Ellgaard und Helenius 2003). Dabei assoziieren Chaperone und Faltungsenzyme im ER mit neu synthetisierten Proteinen und helfen diesen bei Faltung und Zusammenbau. Weiterhin halten sie unreife Proteine zurück. Die Bindung an diese Moleküle scheint den anterograden Transport der neu synthetisierten Proteine zu verhindern (Ellgaard et al. 1999). Viele multimere Proteine müssen weitere Kriterien als die der primären Qualitätskontrolle erfüllen, bevor sie das ER

verlassen dürfen und zum Golgi-Apparat wandern (Ellgaard und Helenius 2003, Ma und Jan 2002, Michelsen et al. 2005).

Bei der sekundären Qualitätskontrolle kommen diverse Kontrollpunkte dazu, die den Transport der Proteine regulieren (Ellgaard et al. 1999). Dies findet zellspezifisch statt und ER-Retention und Export sind involviert (Ellgaard und Helenius 2003). Sekundäre Qualitätskontrolle wird durch Proteine aus folgenden drei Kategorien umgesetzt (Herrmann et al. 1999):

- Outfitters: Proteine für Faltung und Assemblierung spezifischer Proteine
- Escorts: Proteine, die das ER mit der Cargo verlassen
- Guides: Proteine, die für die Aufnahme in Transportvesikel notwendige Informationen bereitstellen

Neu synthetisierte Proteine verlassen das ER an *exit sites* oder sog. translationalen Elementen (Lotti et al. 1996, Palade 1975) und werden von ER-ansässigen Proteinen und Varianten ihrer Konformation wegsortiert (Ellgaard et al. 1999). Grund dafür, dass Proteine nicht in Transportvesikel aufgenommen werden, ist entweder, dass Moleküle im ER sie abhalten, die *exit sites* zu betreten, oder, dass Cargo-Rezeptoren an den *exit sites* sie aufgrund ihrer Unvollständigkeit nicht erkennen (Kühn und Schekman 1997, Pfeffer und Rothman 1987). Verlassen partiell zusammengesetzte Untereinheiten dennoch das ER, werden sie durch Retrievalsignale zurückgeholt.

## 1.2.2 ER-Lokalisationssignale

Die Identifikation und Retention von inkorrekten oder nicht assemblierten Proteinen wird durch eine Vielzahl an Mechanismen kontrolliert und vermittelt. Fehler in diesen Mechanismen führen zu Stress im ER und wirken proapoptotisch.

ER-Lokalisationssignale werden in zwei Gruppen eingeteilt:

- Zurückhaltung bzw. direkte Retention geschieht durch Chaperone, welche nicht assemblierte Untereinheiten, inkorrekt zusammengesetzte Komplexe oder ER Retentionssignale erkennen. Retentionssignale

sind Peptid-Transport-Signale, welche dem Protein den Zugang zu Transportvesikeln des anterograden Transportwegs verwehren.

- Zurückbringung bzw. Recycling-Mechanismen von Proteinen werden durch Komponenten des retrograden Transportwegs vermittelt, die Retrievalsignale erkennen. Dabei werden die Retrievalsignale erst nach Verlassen des Kompartiments wichtig, in dem das Protein ansässig ist (Nilsson und Warren 1994).

Wichtige Retrievalsignale sind dabei:

- LRKL: Arginin-basierte Signale (Zerangue et al. 1999). Dabei stellt der COPI-vermittelte Transport einen Hauptmechanismus für diese ER Lokalisationssignale dar (Yuan et al. 2003). 14-3-3 Proteine spielen bei der Inaktivierung von COPI-vermitteltem Rücktransport eine Rolle (Heusser et al. 2006, Michelsen et al. 2006, Michelsen et al. 2007)
- KKXX: C-terminal gelegene Di-Lysin-Signale an Membranproteinen vom Typ 1 (Jackson et al. 1990)
- KDEL: C-terminal gelegene Signale an luminal löslichen Proteinen im Golgi-Apparat

### 1.3 KDEL-Retentionssignale und KDEL-Proteine

Das KDEL-Motiv ist eines der wichtigsten Retrievalsignale in der Zelle. Erkannt werden die vier C-terminalen Aminosäuren Lysin (K), Aspartat (D), Glutaminsäure (E) und Leucin (L) vom KDEL-Rezeptor (Munro und Pelham 1987). Die KDEL-Proteine sind im ER ansässig. Verlassen sie dieses Kompartiment versehentlich über *ER-exit sites* in COPII-Vesikeln und gelangen zum intermediären Kompartiment oder Golgi-Apparat, werden sie dort vom KDEL-Rezeptor erkannt und zurückgebracht. Dabei erkennt dieser die KDEL-Sequenz. Proteine können auch im Komplex mit ER-ansässigen Faltungshelfern, welche die KDEL-Sequenz besitzen, ins ER zurückgeführt werden (Lewis et al. 1990, Semenza et al. 1990).

Die KDEL-abhängige Rückführung ins ER ist evolutionär hochkonserviert und läuft sehr ähnlich im Modellorganismus Bäckerhefe ab. Hier lautet die

Sequenz des Retrievalsignals HDEL (Histidin statt Lysin) und wird vom ebenfalls als KDEL-benannten Rezeptor erkannt.

Eine Auswahl einiger KDEL-Proteine ist:

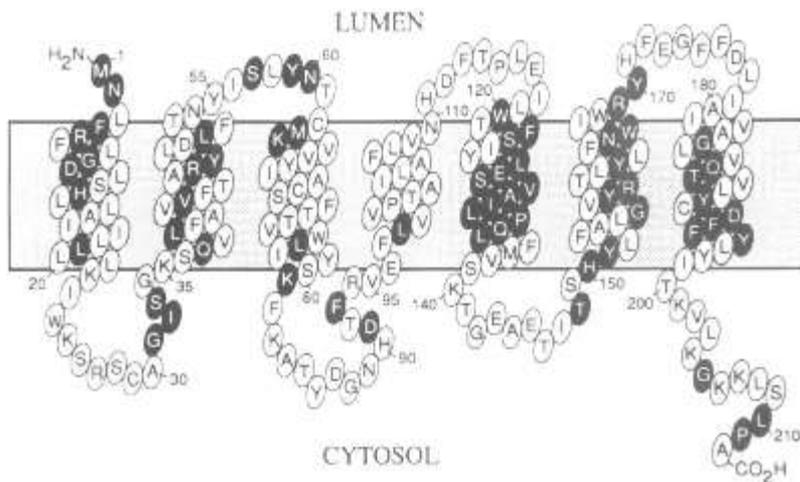
Protein	ProSite Referenz	Zelluläre Lokalisation (SGD)	Molekulare Funktion
<i>in Homo sapiens</i>			
PDIA1_HUMAN	P07237	ER-Lumen	Elektronentransporter, Protein-Disulfid-Isomerase
ERP29_HUMAN	P30040	ER-Lumen	Protein-Disulfid-Isomerase
KDEL1_HUMAN	Q6UW63	ER-Lumen	
MANF_HUMAN	P55145	ER	Wachstumsfaktor
P3H1_HUMAN	Q32P28	ER-Lumen	Eisenionen-Bindung, Oxidoreduktase
GRP78_HUMAN	P11021	ER-Lumen	ATPase, Chaperon
<i>in Saccharomyces cerevisiae</i>			
CYPD_YEAST	P35176	Zytoplasma, ER	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
EUG1_YEAST	P32474	ER	Proteinfaltung
GRP78_YEAST bzw. KAR2	P16474	ER, luminal surveillance complex	ATPase, Bindung ungefaltener Proteine
KRE5_YEAST	P22023	ER	UDP-Glucosyltransferase
MPD1_YEAST	Q12404	Pilz-ähnliche Vakuole	Protein-Disulfid-Isomerase & Oxidoreduktase
PDI_YEAST	P17967	ER-Lumen	Protein-Disulfid-Isomerase & Oxidoreduktase

**Tab. 1 Proteine.** Bioinformatische Suche bei ExPasy mit Scan Prosite Algorithmus und dem von mir definierten Motiv [KHR]-[DEST]-[DE]-L>. Die Suche wurde speziesgetrennt durchgeführt, *H. sapiens* erbrachte 96 Treffer, *S. cerevisiae* erreichte 13 Treffer. Aufgeführt sind die für diese Arbeit relevanten und in der Literatur viel zitierten Proteine (Takagi et al. 2012).

## 1.4 KDEL-Rezeptor

Erkannt werden die KDEL-Sequenz tragenden Proteine vom KDEL-Rezeptor. Dieser helikale Rezeptor mit einer Molekülmasse von 26 kDa (Townsend et al. 1993) weist sieben membrandurchspannende konservierte hydrophobe Regionen auf (Lewis und Pelham 1990, Scheel und Pelham 1997). Das Modell mit sechs Transmembransegmenten und zwei zytosolischen Enden wurde verworfen (Singh et al. 1993). Stattdessen hat sich die Theorie eines luminalen Aminoterminus und eines zytosolischen Carboxyterminus durchgesetzt. Diese Struktur weist Ähnlichkeiten mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf, jedoch wurden keine konservierten Regionen gefunden

(siehe Abbildung 1, Townsley et al. 1993, Scheel und Pelham 1997). Der Rezeptor wird nicht N-glykosyliert (Lewis und Pelham 1990).



**Abb. 1 KDEL-Rezeptor-Struktur.** Schematische Darstellung der erd2-Struktur. Abgebildet ist das humane erd2.1, um die sieben membrandurchspannende Domäne darzustellen. Die schwarzen Ovale sind im Menschen bei erd2.2. und bei *S. cerevisiae*, *K.lactis*, *P.falciparum* und *D. melanogaster* in erd2 konserviert (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von EMBO, aus Townsley et al. 1993)

Die zytoplasmatischen Schleifen des Rezeptors spielen in der subzellulären Verteilung des Rezeptors eine Rolle und Veränderungen an ihnen beeinträchtigen den Rücktransport zum Golgi-Apparat (Townsley et al. 1993). Die luminalen Anteile hingegen sind für die Bindung der KDEL-Sequenz-tragenden Proteine verantwortlich. Sie besitzen konservierte saure oder basische Anteile und bilden so eine hydrophile Bindungstasche (Townsley et al. 1993). An der Ausbildung der Bindungstasche sind die luminal zugänglichen Aminosäuren Arg-5 (luminal), Asp-50 (luminal), Tyr-162, Asn-165 beteiligt (Scheel und Pelham 1997). Dabei kommt Asp-50 eine besondere Rolle zu, denn diese Aminosäure bestimmt die Ligandenspezifität, und es wird eine direkte Bindung an die KDEL-Sequenz diskutiert (Scheel und Pelham 1997). Zur Bindung der Proteine wird eine leicht saure pH-Umgebung benötigt, welche im Golgi-Apparat (cis-Golgi pH 6,5) vorhanden ist, nicht aber im neutralen ER (pH 7,0), wo die Bindung aufgehoben wird (Wilson et al. 1993).

Neben der Bindung und Rückführung der KDEL-Proteine und der Beteiligung an der Qualitätskontrolle wird für den KDEL-Rezeptor auch eine aktive Aufgabe in der COPI-abhängigen Sortierung und bei der Regulation des

COPI-Vesikel-Transports vorgeschlagen (Aoe et al. 1997). Die Bindung eines KDEL-Proteins an den Rezeptor führt zur Rekrutierung der GTPase ARF1 an die zytosolische Seite der Membran (Cukierman et al. 1995).

Kodiert wird der KDEL-Rezeptor durch das ERD2-Gen: *Endoplasmatic Reticulum Lumen Protein Retaining Receptor*. Im Menschen wurden durch bioinformatische Analyse drei KDEL-Rezeptoren erkannt: Erd21\_HUMAN (Lewis und Pelham 1990), Erd22\_HUMAN (Lewis und Pelham 1992 b) und Erd23\_HUMAN. Dabei zeigen ERD21 und ERD23 ein breiteres Bindungsmuster als der spezifische ERD22 (Raykhel et al. 2007).

Species	Eingetragener Name	Gen-name	Proteinlänge	Geläufiger Proteinname	Quelle
<i>H. sapiens</i>	ERD21_HUMAN	ERD2.1 KDELR1	212	KDEL-Rezeptor 1	(Lewis et al. 1990)
	ERD22_HUMAN	ERD2.2 KDELR2	212	KDEL-Rezeptor 2	(Lewis und Pelham 1992b)
	ERD23_HUMAN	KDELR3	214	KDEL-Rezeptor 3	Prosite
<i>S. cerevisiae</i>	ERD2_YEAST	ERD2	219	HDEL-Rezeptor	

**Tab. 2 KDEL-Rezeptor-Unterformen**

Über den eigentlichen molekularen Ablauf des Rücktransports von KDEL-Rezeptor in COPI-Vesikeln ist bisher noch nicht viel bekannt. Eine PKA-abhängige Phosphorylierung der Aminosäure Serin an Position 209 des Rezeptors ist notwendig für den retrograden Transport (Cabrera et al. 2003).

## 1.5 Hüllvesikel

Die Mehrheit an Proteinen und Membranlipiden wird in Eukaryonten in Protein-umhüllten Vesikeln transportiert. Dieser intrazelluläre Transport ist hoch selektiv, strikt reguliert und schnell. Es gibt noch andere Transportmöglichkeiten, aber *coated vesicles* werden heute als das wichtigste Medium angesehen.

Drei verschiedene Typen von Transportvesikeln wurden charakterisiert, abhängig von deren Hüllproteinen: Coatomer (COPI), COPII und Clathrin. Clathrin-verpackte Vesikel (CCVs) vermitteln im späten sekretorischen Weg zwischen Golgi, Endosomen und Plasmamembran. COPI und COPII arbeiten im frühen sekretorischen Weg. Dabei ist COPI für den retrograden Transport zwischen Golgi und ER bzw. zwischen den Golgi-Cisternae verantwortlich, während COPII den anterograden Weg vom ER zum Golgi vermittelt (Rothman 1994, Schekman und Orci 1996, Schmid 1997).

Da hoch selektiver Transport zwischen intrazellulären Organellen stattfindet, arbeiten die Hüllproteinkomplexe einerseits für die Vermittlung des Transports, andererseits aber in der Aufrechterhaltung der Identität der Organellen mit, indem sie verhindern, dass die Komponenten vermischt werden (Kirchhausen 2000). Obwohl die Hüllproteine an unterschiedlichen Orten wirken, teilen sie doch viele Gemeinsamkeiten. Allgemein betrachtet läuft die Vesikelbildung in drei Phasen ab:

- Rekrutierung und Assemblierung der wesentlichen Bestandteile an den Membranen durch eine regulatorische membranaktive GTPase und ihren funktionell assoziierten GTP-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs), Erkennung und Sortierung von Cargo
- Ein Adaptorproteinkomplex wird durch die GTPase zur Membran rekrutiert und wirkt dort stabilisierend; Membrankrümmung; Hüllkomponenten werden stabilisiert durch membrangebundene Signale; dies führt zur Ausbildung eines Käfigs um das Vesikel
- Abspaltung am Vesikelhals durch den Käfigkomplex oder assoziierte Proteine, was die Loslösung des Vesikels von der Spendermembran zur Folge hat (Kirchhausen 2000, Pucadyil und Schmid 2009).

Nachdem sich das Vesikel gebildet hat, wird die Proteinhülle abgeworfen, damit das Vesikel mit der Ziellmembran fusionieren kann. Der Prozess des sogenannten *uncoating* geschieht durch Umbau der Hüllproteine als Antwort auf die GTP-Hydrolyse durch die membranaktive GTPase (Arf1) (Tanigawa et al. 1993, Yoshihisa et al. 1993). Bei dem *uncoating* von Clathrinvesikeln ist dieser Prozess anders, da hier Proteine, die nicht am Vesikelbildungsprozess beteiligt sind, nur für das *Uncoating* rekrutiert werden (Schlossman et al. 1984). Die genauen Abläufe des *uncoating*, z.B. wann der Hüllproteinkomplex abgeworfen wird und wie das *uncoating* reguliert wird, werden noch diskutiert (Trahey und Hay 2010).

COPI nimmt hierbei wieder eine Sonderrolle ein, da ein einziger Multi-Untereinheiten-Komplex, der den Adaptor- und Käfigkomplex beinhaltet, als Ganzes an die Membran rekrutiert wird (Hara-Kuge et al. 1994, Lowe und Kreis 1996).

<b>Vesikel Komponente</b>	<b>COPI</b>	<b>COPII</b>	<b>Clathrin</b>
<b>GTPase</b>	Arf1	Sar1	Arf1 (AP1/3/4) Arf6 (AP2)
<b>GEF</b>	GBF1	Sec12	Sec7 domain Protein
<b>GAP</b>	ArfGAP1 ArfGAP2/3	Sec23	ArfGAPs
<b>Mantelkomplex</b>	$\alpha\beta'\epsilon$ -COP Coatomer Subkomplex	Sec13/Sec31	Clathrin
<b>Adaptorkomplex</b>	$\beta\gamma\delta\zeta$ -COP Coatomer Subkomplex	Sec23/Sec24	AP1-4

**Tab. 3 Vergleich der funktionell analogen Untereinheiten**, die in der Hüllvesikel-Formation eine Rolle spielen (Béthune et al. 2006 a, Béthune et al. 2006 b)

## 1.6 COPI-Vesikel

### 1.6.1 Bildung von COPI-Vesikeln

Die Bildung eines COPI-Vesikels wird durch Hüllproteinkomplexe vermittelt. Diese Coatomer-Proteine werden durch Arf1, ein Mitglied der Ras Superfamilie der GTPasen, an die Membran rekrutiert (Gillingham und Munro 2007, Donaldson et al. 1992, Palmer et al. 1993). Arf1 wird durch GEFs (Guaninnukleotid-Austauschfaktoren) aktiviert und von GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) deaktiviert. Durch Verformung der Membran und Vesikelabspaltung werden COPI-Vesikel gebildet (Rothman 1994).

Arf1 bindet mit gebundenem GTP so, dass es seine Konformation ändert und an die Membran bindet. Durch die Freilegung seiner Glycin-myristoylierten N-terminalen amphiphatischen Helix interagiert es mit der Membran (Franco et al. 1996, Liu et al. 2009). Die Membranbindung und -funktion sind von dieser posttranslationalen Modifikation des Glycins abhängig (Kahn et al. 1991). Die ArfGTP-Bindung wird gefördert durch GBF1, ein im Golgi lokalisiertes ArfGEF mit Sec7-Domäne. Es assoziiert mit Membranen durch Interaktionen mit Golgi-ansässigen Proteinen und stellt den primären Nukleotid-Austausch Faktor für die COPI-Vesikelbildung dar.

Da Arf1 Membranen neu modellieren kann, wird angenommen, dass die Kombination aus Arf1-Bindung und Hüllprotein-Polymerisation zur Verformung und Krümmung der Membran führt (Krauss et al. 2008).

ArfGAP1, welches im Golgi lokalisiert ist, nimmt die Rolle des GAPs in der Biogenese von COPI-Vesikeln ein und reguliert Arf1 (Chardin et al. 1996, Cukierman et al. 1995, Reinhard et al. 2003). ARFGAP1 bindet stark gekrümmte Membranen durch einen *amphipathic lipid packing sensor* (ALPS) (Zhao et al. 2002, Bigay et al. 2003).

Coatomer, der Hüllproteinkomplex der 75 nm großen COPI-Vesikel (Malhotra et al. 1989), ist ein ca. 550 kDa schwerer, zytosolischer heptamerer Proteinkomplex, bestehend aus  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und  $\zeta$ -COP (Duden et al. 1991, Serafini et al. 1991, Waters et al. 1991). Er wird en bloc ARF- und GTP-abhängig zu Membranen rekrutiert (Hara-Kuge et al. 1994, Lowe und Kreis 1996). Der *in vivo* stabile Komplex kann in einen heterotetrameren F-

Subkomplex aus  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\zeta$ -COP und einen heterotrimären B-Subkomplex aus  $\alpha$ -,  $\beta'$ - und  $\varepsilon$ -COP aufgegliedert werden (Fiedler et al. 1996). Experimentell wurde herausgefunden, dass Dimethyl-Malat-Anhydrid (DMMA) oder hohe Salzkonzentrationen zur partiellen Dissoziation führen können und Coatomer in drei Subkomplexe zerteilen: einen  $\alpha\beta'\varepsilon$ -Subkomplex, einen  $\beta\delta$ -Subkomplex und einen  $\gamma\zeta$ -Subkomplex (Lowe und Kreis 1995, Pavel et al. 1998). Dabei interagieren der  $\alpha\beta'\varepsilon$ -Subkomplex mit dem KKXX-Motiv (Cosson und Letourneur 1994, Lowe und Kreis 1995), und der  $\beta\delta$ -Subkomplex kann Golgimembranen ArfGTP abhängig binden (Pavel et al. 1998). Die COPI-Domänen, die notwendig sind, um die molekulare Architektur von Coatomer aufrecht zu erhalten, wurde systematisch mit dem Hefe-2-Hybrid-System kartiert (Eugster et al. 2000). Die intermolekularen Interaktionen wurden dabei wie folgt festgestellt (Arakel 2011):

Interaktion von Coatomer-Untereinheit (Region)...	...mit...	Referenz
<b>Intermolekulare Interaktionen</b>		
$\alpha$ -COP (686-1201)	$\varepsilon$ -COP	(Eugster et al. 2000)
$\alpha$ -COP (534-1034)	$\beta'$ -COP (281-889)	(Eugster et al. 2000)
$\beta$ -COP (526-973)	$\alpha$ -COP	(Eugster et al. 2000)
$\beta$ -COP (526-973)	$\beta'$ -COP	(Eugster et al. 2000)
$\beta$ -COP (1-525)	$\delta$ -COP	(Eugster et al. 2000)
$\gamma$ -COP (421-935)	$\varepsilon$ -COP	(Eugster et al. 2000)
$\gamma$ -COP (1-467)	$\zeta$ -COP	(Eugster et al. 2000)
$\gamma$ -COP (1-935)	$\beta'$ -COP	(Eugster et al. 2000)
<b>Signale</b>		
$\alpha$ -COP WD40 (1-285)	-KKXX	(Eugster et al. 2004)
$\beta'$ -COP WD40 (1-285)	-KKXX	(Eugster et al. 2004)
$\gamma$ -COP (1-554)	-KKXX auf Cdc42	(Wu et al. 2000)
$\gamma$ -COP	Diphenyl Alanin Motiv (FFXX(KR)(KR))X <sub>n</sub>	(Fiedler et al. 1996)
$\beta$ -COP (318-338)	-RXR	(Michelsen et al. 2007)
$\delta$ -COP (414-435)	-RXR	(Michelsen et al. 2007)
$\delta$ -COP	dL Motiv (WXXXW/Y/F)	(Cosson et al. 1998)
???	-KDEL	

**Tab. 4 Zusammenfassung der intermolekularen Interaktionen**, die Coatomer stabilisieren und die Regionen von Coatomer, die verantwortlich sind für die Erkennung von Retrievalsignalen (Arakel 2011)

Eine Familie von 23-24 kDa Typ1-Transmembranproteinen (p24 Familie) ist durch ihren zytosolischen Anteil partiell verantwortlich für die Coatomer-Rekrutierung zur Golgimembran (Nickel et al. 1997, Stamnes et al. 1995). Diese Proteine spielen auch eine wichtige Rolle in der Cargosortierung (Goldberg 2000, Lanoix et al. 2001). Die Oligomere der p24 Proteine arbeiten hierbei zusammen mit aktivierten dimeren Arf1-Proteinen, um eine Bindungsfläche für Coatomer durch individuelle Bindungsorte auf COPI zu garantieren (Béthune et al. 2006 a, Zhao et al. 1997).

Nach der Bindung von Coatomer bewirken die zytoplasmatischen Enden von p24-Oligomeren eine Konformationsänderung im Hüllproteinkomplex, welche die Polymerisation von Coatomer auslöst (Reinhard et al. 1999). Im Anschluss an die Vesikelabspaltung von den membrankoordinierten Motorproteinen vermitteln sogenannte *tethering*-Faktoren, sowie Rab-GTPasen, den Transport von COPI-Vesikeln zur Zielmembran (Stenmark 2009, Söllner et al. 1993). Nach dem *uncoating* vermitteln SNAREs (*soluble NSF attachment protein receptors*) die Fusion mit dem Zielkompartiment.

### 1.6.2 COPI-Funktion

Die am besten charakterisierte Funktion von COPI ist der retrograde Transport von Membran- und luminalen Proteinen im frühen sekretorischen Weg. Dieser wird durch diverse Sortierungsmotive und -signale vermittelt.

Lösliche ER-ansässige Proteine werden normalerweise durch Interaktion mit einem Transmembranrezeptor zurückgebracht, bei dem der KDEL-Rezeptor eines der am besten untersuchten Beispiele ist. Der Rezeptor bindet lösliche Cargoproteine durch Erkennung der Vier-Aminosäure-Sequenz KDEL. Der Rücktransport geschieht durch Interaktion mit Coatomer (Lewis und Pelham 1992 a, Semenza et al. 1990).

Andererseits gibt es cytosolisch präsentierte Sortierungssignale, wie das C-terminale –KKXX Motiv von Membranproteinen, welches direkt mit Coat-Untereinheiten interagiert (Cosson und Letourneur 1994, Letourneur et al. 1994). Es wurde herausgefunden, dass die WD40-Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ '-COP-Untereinheiten an –KKXX oder –KXKXX Sequenzen binden (Eugster et

al. 2004). Es wird diskutiert, dass konstitutiv wiederverwendete Proteine, wie p24 oder ERGIC-53, zusammen mit anderen Signalen,  $\gamma$ -COP binden (Wu et al. 2000, Béthune et al. 2006 a, Harter und Wielad 1998). Zum Beispiel bindet eine Diphenylalanin-Signatur mit dem Konsensus FFX(KR)(KR) $X_n$  ( $n$  größer 2) C-terminal in der p24 Familie ebenfalls mit  $\gamma$ -COP (Goldberg 2000, Fiedler et al. 1996, Sohn et al. 1996).

### 1.6.3 COPI-Struktur

Sowohl der Käfigkomplex von COPII (Sec 13/31) als auch derjenige von Clathrin können sich *in vitro* spontan in leere sphärische Käfige in Abwesenheit oder Anwesenheit von Adaptorproteinkomplexen zusammenlagern (Edeling et al. 2006, Fath et al. 2007, Stagg et al. 2006, Stagg et al. 2008). Die Käfige existieren in unterschiedlichen Größen, Formen und Symmetrien. Leider sind im Gegensatz zu COPII und Clathrin für COPI nur partielle Strukturen bekannt (Lee und Goldberg 2010, Yu et al. 2009, Watson et al. 2004, Hsia und Hoelz 2010). Unter anderem wird diskutiert, dass COPI unterschiedliche Konformationen annehmen kann und sich dadurch an unterschiedliche Größen und Formen des Cargos anpasst (Faini et al. 2012). Es ist jedoch weithin akzeptiert (aufgrund von Sequenz-Homologien, biochemischen Daten und partiellen Kristallstrukturen), dass der Coatomer F-Subkomplex ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ) ein Adaptin homolog ist (Schledzewski et al. 1999). Zum Vergleich sei hier die Struktur von Clathrin-Adaptinkomplexen beschrieben.

Adaptinkomplexe nehmen eine charakteristische Struktur mit einem zentralen Stamm und zwei Anhangsdomänen an. Zwei große Adaptinuntereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  in AP2) dimerisieren, um den Stamm des Komplexes zu formen. Die mittelgroße  $\mu$ -Einheit und die kleine  $\sigma$ -Untereinheit liegen eingelagert im Stamm an den Zwischenflächen des Komplexes aus den zwei großen Adaptinuntereinheiten (Zolov und Lupashin 2005). Der C-Terminus, der zwei Stamm-bildenden Untereinheiten endet in der Anhangsdomäne und ist durch einen flexiblen Linker mit dem Stamm verbunden (Edeling et al. 2006, Heldwein et al. 2004). Der C-Terminus der Linkerregion der  $\beta$ -Untereinheit ist verantwortlich für die Bindung von Clathrin. Weder die Stammdomäne, noch

die Anhangsdomäne, binden Clathrin allein (Shih et al. 1995). Der Clathrin-Käfigkomplex existiert als Triskelion, und besteht aus drei schweren und drei leichten Ketten (Fotin et al. 2004).

## 1.7 Bäckerhefe als eukaryontischer Modellorganismus

In dieser Arbeit wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) als Modellsystem benutzt. Schon seit Jahren findet diese Bäckerhefe vielseitige Verwendung in der Forschung. Wie auch *E. coli*, weist Bäckerhefe im Laboralltag viele Vorteile auf: schnelles Wachstum (geringe Verdopplungszeit), Zellen in Suspensionskultur, einfache Konstruktion von mutanten Organismen. Das Genom ist gut charakterisiert und einfach manipulierbar. *S. cerevisiae* beansprucht keine komplizierten Sicherheitsvorkehrungen und das Arbeiten ist in S1-Laboren möglich. Weiterhin ist dieses Modellsystem preislich sehr günstig, und eine Lagerung ist bis -80 °C möglich (Barnett 2003, Sherman 2002).

Hefe ist ein Eukaryont mit den typischen Zellorganellen, die sich auch in Säugerzellen finden. Es gibt eine Vielzahl an Stammsammlungen zur systematischen Suche nach interessanten Mutanten. Der Zusammenhang zwischen zahlreichen zellulären Grundfunktionen (z.B. Funktion des sekretorischen Wegs) und charakteristischen Phänotypen ist gut untersucht. Darüber hinaus existieren für viele Phänotypen standardisierte Nachweisverfahren.

Der COP-Komplex ist zwischen Säugern und dem Hefe-Modellorganismus stark konserviert, sodass sich die Verwendung dieses Modellsystems bei der Forschung an Transportvesikeln anbietet und eignet. Die Hefeanaloga des COPI-Komplexes und die jeweiligen Molekulargewichte sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

<b>Mensch (<i>Homo sapiens</i>)</b>		<b>Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)</b>	
Standard Protein Name	Molekulargewicht (kDa)	Standard Protein Name (Gaynor 1998)	Molekulargewicht (kDa)
$\alpha$ -COP	138	Cop1p/Ret2p	136
$\beta$ -COP	107	Sec26p	109
$\beta$ -COP	102	Sec27p	99
$\gamma$ -COP	98	Sec21p	105
$\delta$ -COP	57	Ret2p	60
$\varepsilon$ -COP	34	Sec28p	42
$\zeta$ -COP	24	Ret3p	22

**Tab. 5 COPI-Untereinheiten in Mensch und Hefe**

## 1.8 Biologische und klinische Auswirkungen von Störungen im sekretorischen Weg

Der sekretorische Weg ist ein empfindliches System, Einschränkungen und Störungen können sich u.a. phänotypisch und klinisch bemerkbar machen. Im Mausmodell führte eine Punktmutation im ARCN1 Gen, welche für die  $\delta$ -Untereinheit des COPI-Coat-Proteins codiert, phänotypisch zu Ataxie und Pigmentstörung (Xu et al. 2010).

Auch für den KDEL-Rezeptor kann Funktionsverlust mit Krankheiten assoziiert werden. Mutiert man dieses Protein, können fehlgefaltete Proteine weder repariert noch akkumuliert werden. Dies führt zu Stress im ER und leitet zelluläre Dysfunktionen ein. Symptome im Mausmodell sind kardiale Dilatation und Herzversagen, interstitielle Fibrose, myozytäre Heterogenität, Vakuolenbildung und Apoptose. All diese Symptome decken sich mit denen der dilatativen Kardiomyopathie (Hamada et al. 2004).

Wang et al. fanden heraus, dass die KDEL-Rezeptor-mRNA bei ER-Stress hochreguliert wird. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass der Rezeptor Autophagie induziert, aber auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen steht (Wang et al. 2011). So wird durch Überexpression von Proteinen, die mit amylotrrophischer Lateralsklerose (SOD1 - G93A Superoxiddismutase), Morbus Parkinson (A53T  $\alpha$ -Synuclein) oder Chorea Huntington (Huntingtin) assoziiert werden, die mRNA des KDEL-Rezeptors ebenfalls hochreguliert. Es scheint schließlich deutlich zu werden, dass dadurch die Degradation dieser Pathogenität verursachenden Proteine durch

den Autophagie-induzierenden KDEL-Rezeptor gefördert wird (Wang et al. 2011).

Die KDEL-Sequenz spielt auch in der Krankheit Osteogenesis imperfecta eine entscheidende Rolle. Die für die posttranslationale Modifikation verantwortliche Prolyl 3-Hydroxylase 1 (P3H1) trägt eine C-terminale KDEL-Sequenz. Wird das kodierende Gen LEPRE1 am ER-Retentionssignal mutiert und andere Domänen des Proteins jedoch intakt belassen wird die Funktionalität von P3H1 beeinträchtigt. Dieser Defekt trägt zum Ausbruch von nicht-lethaler Osteogenesis imperfecta bei (Takagi et al. 2012).

Die Arbeitsgruppe um Brandon Harvey fand in ihrer im Februar 2013 erschienen Publikation heraus, dass das neuroprotektive MANF-Protein mit dem KDEL-Rezeptor interagiert (Henderson et al. 2013). Die C-terminale, KDEL-Sequenz-ähnliche RTDL-Sequenz des MANF-Proteins ist für die Lokalisierung des Proteins in das ER verantwortlich. Es konnte bestätigt werden, dass die MANF-Sekretion durch den KDEL-Rezeptor reguliert wird.

## 1.9 nur17-Mäuse

Die nur17-Mäuse besitzen eine N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU)-induzierte Mutation, welche als nur17 (neurological 17) bezeichnet wird (Xu et al. 2010). Die Mäuse zeigen als Phänotyp eine Veränderung der Fellfarbe und Ataxie. Letztere wird durch die Degeneration der Purkinje-Zellen im Kleinhirn hervorgerufen. Störungen im vesikulären Transportweg wurden bereits mehrfach als mögliche Ursachen für beide Phänotypen beschrieben (Jeans et al. 2007, Assoum et al. 2010). Zusätzlich zu diesen Phänotypen wurde bei der nur17-Maus jedoch eine Induktion von Markerproteinen für ER-Stress, unnormale Proteinaggregation und filamentöse Läsionen in Form von neurofibrillären Tangels im Kleinhirn festgestellt.

Die Mutation befindet sich im Arcn1-Gen ( $\delta$ -COP) und besteht im Austausch eines einzelnen Nukleotides. Die Missense-Mutation von T zu C im zehnten Exon des Arcn1-Gens bewirkt eine Substitution von Isoleucin zu Threonin in Aminosäure 422. Die transgene Expression der Wildtyp-Form von  $\delta$ -COP revidierte beide Phänotypen der nur17-Maus, was die Annahme unterstützt,

dass allein die Arcn1-Mutation verantwortlich für die beobachteten Phänotypen ist.

Die Verfasser der Studie berichten weder von Unterschieden in der subzellulären Lokalisation von  $\delta$ -COP in Wildtyp- und nur17-Maus-Melanozyten noch vom KDEL-Rezeptor. Sie schlagen aufgrund einer Störung in der Glykosylierung vor, dass in nur17-Mäusen entweder die Effizienz des anterograden Transports oder aber der retrograde Transport von Oligosaccharid-Transferasen in den Golgi-Cisternae betroffen ist.

### **1.10 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Bis heute ist unklar, wie der KDEL-Rezeptor mit dem COPI-Komplex interagiert und welche Untereinheiten von Coatomer dabei eine Rolle spielen. Dass der COPI-Komplex große medizinische Relevanz besitzt, zeigen die im nur17-Mausmodell beobachteten phänoypischen Symptomen. Vor allem die beobachtete Ataxie unterstreicht die Rolle von COPI bei der Entstehung oder Manifestation von neurodegenerativen Erkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die evolutionäre Konservierung des COPI- und des KDEL-Systems zwischen Säuger und Bäckerhefe ausgenutzt, um die zellulären Konsequenzen der COPI-Dysfunktion in der nur17-Maus zu charakterisieren. Weil die nur17-Mutation nicht in einem hochkonservierten Bereich liegt, war die Voraussetzung dafür zunächst der Austausch des  $\delta$ -COP kodierenden Gens der Hefe (RET2) durch das Säugeräquivalent zu etablieren.

Dieser Hefe-Stamm wurde im Rahmen dieser Arbeit konstruiert und phänotypisch charakterisiert. Interessanterweise war in diesem Stamm die Sekretion von KDEL-Proteinen zu beobachten, was auf eine Dysfunktion dieses Transportwegs hinweist. Aus dieser Entdeckung ergab sich die Hypothese, dass ein definierter (nicht zwischen Hefe und Säugern konservierter) Bereich der  $\delta$ -COP-Untereinheit essenziell für die Erkennung oder effiziente Rückführung des KDEL-Rezeptors durch COPI ist. Diese Hypothese wurde daraufhin in einem Komplementationsansatz mit chimären

Proteinen unterschiedlicher C- und N-terminaler Anteile von Ret2 und  $\delta$ -COP getestet.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Austausch von RET2 gegen Säuger $\delta$ -COP in Bäckerhefe

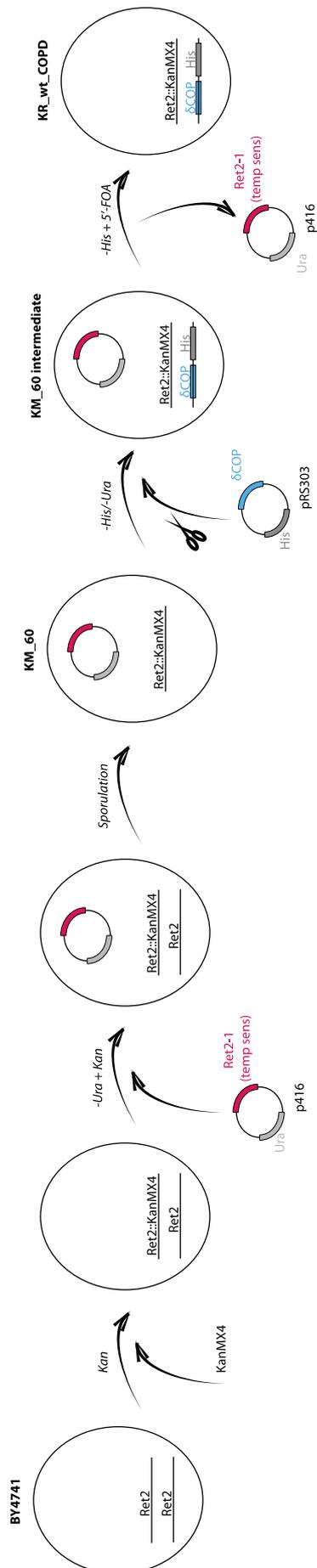
Es ist bisher nicht bekannt, ob das Säuger- $\delta$ -COP-Gen das RET2-Hefegen, das für das  $\delta$ -COP der Bäckerhefe codiert, funktionell ersetzen kann. Da RET2 ein essenzielles Gen ist, würde schon das Überleben eines Hefestammes nach Austausch der Gene auf eine zumindest teilweise erfolgreiche funktionelle Komplementation hinweisen. Da bei der Manipulation eines essenziellen Gens mit hohem Selektionsdruck zu rechnen ist, war es für die im folgenden beschriebenen Experimente von großem Vorteil, dass die Expression der entsprechenden Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen wurde. Die Strategie zum Austausch des RET2-Gens beruhte auf einer Kombination von homologer Rekombination und Expression des RET2-Gens von einem Plasmid aus. Selektivmedien ermöglichen die Selektion von Kolonien, in denen die gewünschten Rekombinationsereignisse stattgefunden haben bzw. das RET2-Plasmid an- oder abwesend ist.

Der Hefestamm KM\_60 wurde als Ausgangspunkt für den Austausch von RET2 genommen und wurde auf folgende Weise konstruiert: In den diploiden Wildtypstamm BY4743 wurde das RET2-Gen durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Durch das Wachstum auf Kanamycin-haltigem Selektivagar wurden alle Zellen selektiert, in denen der Austausch stattgefunden hatte. Gleichzeitig trug der Stamm ein Plasmid, von dem aus eine temperatursensitive Ret2-Variante exprimiert wurde (p416 ret2-1). Das auf dem Plasmid enthaltene URA3-Marker-Gen ermöglichte positive und negative Selektion. Anschließend wurde der diploide Stamm zur Sporulation gebracht, um haploide Sporen zu erhalten. Die Selektion der Zellen geschah durch Wachstum auf Kanamycin-haltigem Selektivagar, um die Anwesenheit der Resistenz-Kassette an Stelle des RET2-Gens sicherzustellen und um die Expression des p416-ret2-1 zu garantieren (KM\_60).

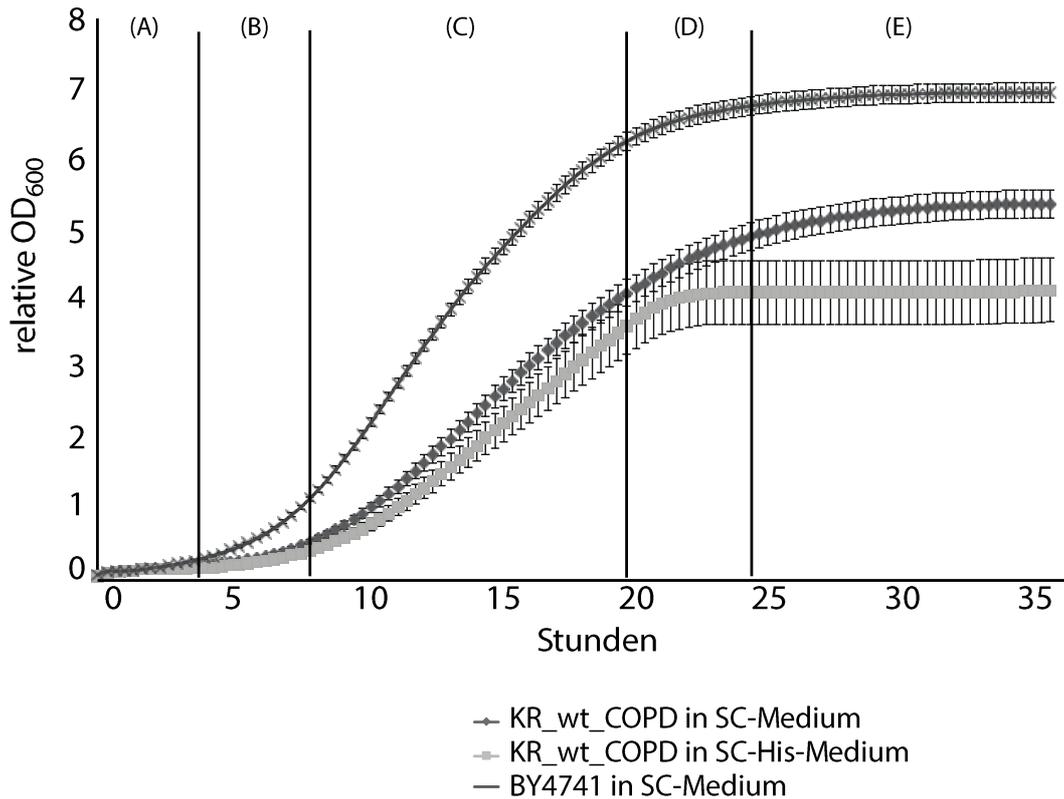
Von diesem Stamm ausgehend wurde das  $\delta$ -COP-Gen, welches sich in einem pRS303-Vektor befand, in das Genom der Hefe integriert. Der sich

daraus ergebende Stamm (KM\_60\_intermediate) enthielt dadurch neben der ret2-1-Variante das Säugetieräquivalent  $\delta$ -COP. Selektiert wurde hierbei auf Selektivagar ohne Uracil für die Anwesenheit vom p416-ret2-1-Gen (URA3-Marker-Gen) sowie ohne Histidin als Selektion auf das HIS3-Marker-Gen des  $\delta$ -COP-Konstrukts. Abschließend wurde gegen das Plasmid mit der Hefeversion des  $\delta$ -COP-Gens ret2-1 selektioniert. Diese Selektion wurde mit Wachstum auf Selektivagar ohne Histidin aber mit 5-FOA (5-Fluorouracil) durchgeführt. Das durch das URA3-Gen codierte Enzym setzt 5-FOA in ein toxisches Produkt um, so dass nur Zellen, die das URA3-markierte Plasmid verloren haben, diese Selektion überleben können. Der erzielte Stamm wurde nach Kora Richter (KR) benannt und erhielt den wissenschaftlichen Namen KR\_wt\_COPD. Dieser enthielt nur das Säugetieräquivalent  $\delta$ -COP. Die Lebensfähigkeit dieses Stammes ist ein interessantes Ergebnis, weil eine funktionelle Komplementation durch Säuger-COP-Untereinheiten bisher nur für eine einzige Deletionsmutante von Hefe-COP-Genen gezeigt werden konnte. Der konstruierte Stamm wächst auf Selektivagar ohne Histidin (Abbildung 2 veranschaulicht die Konstruktion).

Um diesen konstruierten KR\_wt\_COPD-Stamm zu charakterisieren, wurde ein quantitativer Wachstumsassay durchgeführt. Die Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Dabei wurde KR\_wt\_COPD einmal in Selektivmedium ohne Histidin und einmal in mit allen Aminosäuren und Nukleinbasen supplementiertem Minimalmedium (SC für *synthetic complete*) angesetzt. Zur Kontrolle wurde der Wildtypstamm BY4741 in SC-Medium herangezogen. Die Kulturen wurden anschließend auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt. Je 200  $\mu$ l der Verdünnungen wurden auf eine 96-Lochplatte aufgetragen. Mit Hilfe des BioTek Synergy HAT Platereaders wurden alle 20 Minuten Extinktionsmessungen bei 600 nm vorgenommen. Die Zellen wurden über 20 Stunden bei 30 °C analysiert. Für jeden Stamm wurden Triplikate gemessen. In Abbildung 3 sind die Mittelwerte aufgetragen.



**Abb. 2 Konstruktion des KR\_wt\_COPD-Stamms.** Darstellung der Vorgehensweise zum Austausch von RET2 gegen Säuger  $\delta$ -COP in *S. cerevisiae*. Dabei stellen die ovalen Kreise die Zelle dar und die runden Kreise die eingebrachten oder ausgeworfenen Plasmide. Pfeile symbolisieren die Transformation eines Plasmids in die Hefezelle. In der Zelle sind die Plasmide entweder Genom-integrierend (als Strich symbolisiert) oder nicht-integrierend (als Kreis verdeutlicht).

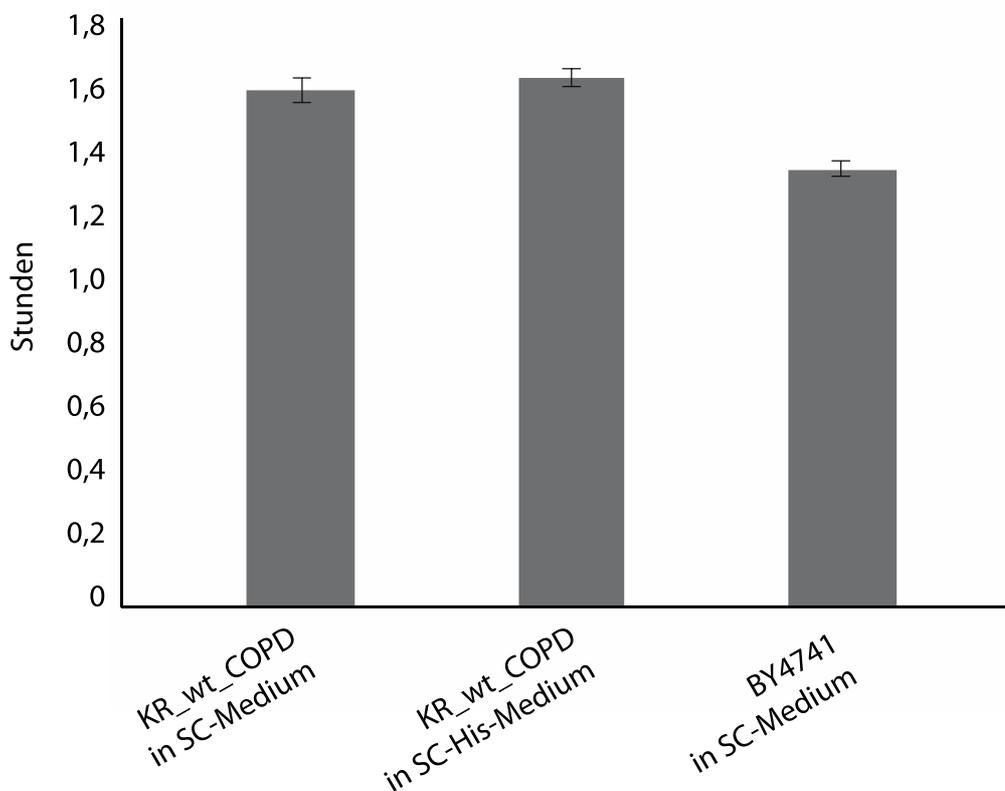


**Abb. 3 Wachstumskurve des KR\_wt\_COPD-Stamms.** Die Hefezellen wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Dabei wurde KR\_wt\_COPD einmal in Selektivmedium ohne Histidin und einmal in mit allen Aminosäuren und Nucleinbasen supplementiertem Minimalmedium (SC für *synthetic complete*) angesetzt. Zur Kontrolle wurde der Wildtypstamm BY4741 in SC-Medium herangezogen. Die Kulturen wurden dann auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt. Je 200 µl der Verdünnungen wurden auf eine 96-Lochplatte aufgetragen. Mit Hilfe des BioTek Synergy HAT Platereaders wurden alle 20 Minuten Extinktionsmessungen bei 600 nm vorgenommen. Die Zellen wurden über 36 Stunden bei 30 °C analysiert. Für jeden Stamm wurden Triplikate gemessen und die Werte geglättet. In der Abbildung sind die Mittelwerte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Die Analyse des Wachstums von KR\_wt\_COPD ergab eine für Hefe typisch geformte Wachstumskurve (Abbildung 3). Der Stamm weist wie auch der Wildtyp-Stamm BY4741 die charakteristischen Phasen des Hefewachstums auf: lag-Phase (A), Beschleunigungsphase (B), log-Phase/exponentielles Wachstum (C), limitiertes Wachstum (D), stationäre Phase (E). Allerdings scheint die log-Phase beim KR\_wt\_COPD in beiden Medien später einzusetzen. Bei allen drei Stämmen findet der Übergang in die stationäre Phase nach einer etwa gleich langen log-Phase statt. Der Wildtyp-Stamm zeigt jedoch eine höhere Zellzahl in der stationären Phase, was wiederum auf eine größere Fähigkeit schließen lässt, die Ressourcen des Mediums voll auszuschöpfen. Für den praktischen Umgang bedeutet dies, dass durch den

verspäteten Anfang des exponentiellen Wachstums den Säuger- $\delta$ -COP-exprimierenden Zellen mehr Zeit gegeben werden muss, um die benötigte optische Dichte (OD) für ein gegebenes Experiment zu erreichen.

Weiterhin ist festzuhalten, dass das Wachstum in Vollmedium schneller vonstattengeht. In der stationäre Phase wird eine höhere Zellzahl erreicht. Die Zelldichte erreicht für den BY4741-Wildtypstamm in SC nach 20 Stunden ihren Höhepunkt, während das Erreichen dieses Punktes für den KR\_wt\_COPD-Stamm 25 Stunden braucht (in Selektiv-Medium ohne Histidin 22 Stunden). In SC verlässt der KR\_wt\_COPD-Stamm die lag-Phase eher. Die stationäre Phase hat eine Phase mit langsamen Wachstum vor Erreichen des Zelldichtemaximums. Betrachtet man die Verdopplungszeit des KR\_wt\_COPD-Stamms (Abbildung 4) wird deutlich, dass im Gegensatz zu einem Wildtyp-Stamm (1,35 Stunden) die Verdopplungszeit um 0,3 Stunden (18 Minuten) langsamer ist (KR\_wt\_COPD in SC – 1,58 Stunden; KR\_wt\_COPD in –His – 1,62 Stunden).



**Abb. 4 Verdopplungszeiten KR\_wt\_COPD.** Die Daten der Wachstumskurve (Abbildung 3) wurden zur Basis 10 logarithmiert, die Steigung der Werte in 40 Minuten Intervallen berechnet. Die dritt- bis siebthöchsten Steigungswerte wurden gemittelt und exponenziert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

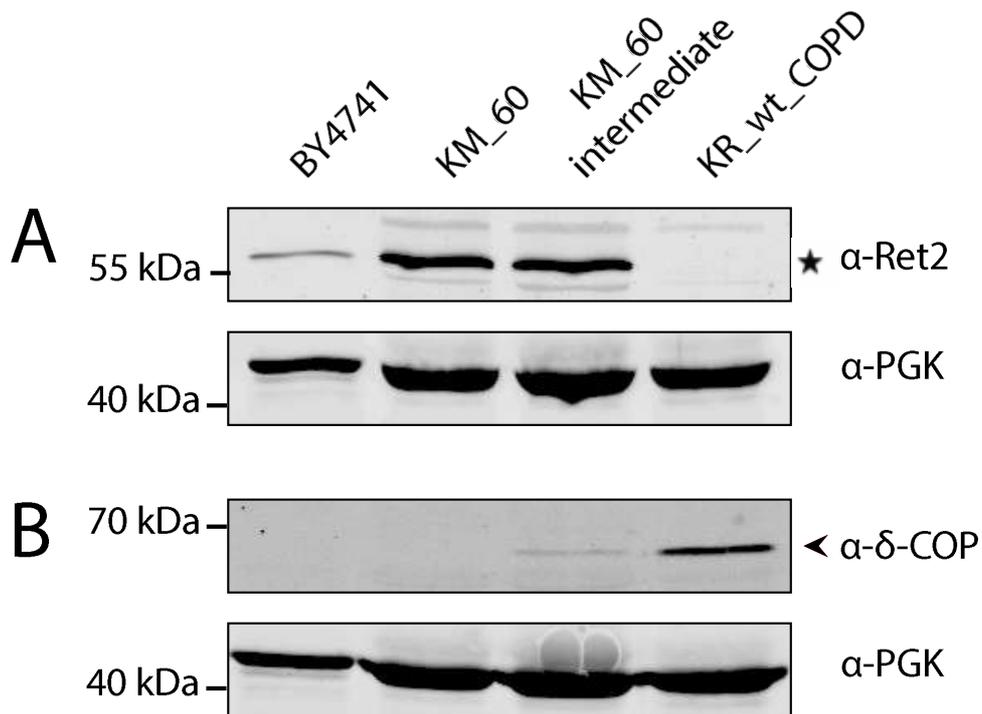
## 2.2 Expressionskontrolle von $\delta$ -COP in KR\_wt\_COPD

Die Manipulation von essenziellen Genen setzt die Zellen einem hohen Selektionsdruck aus. Daher ist es denkbar, dass bei der in etlichen Selektionsschritten durchgeführten Konstruktion des Stammes KR\_wt\_COPD nicht vorhergesehene Integrationsereignisse zu einer Expression der jeweiligen Markergene geführt haben. Daher war es wichtig, durch Nachweis des Ret2- und des Säuger- $\delta$ -COP-Proteins die Abwesenheit des einen und die Anwesenheit des anderen im konstruierten Stamm zu bestätigen. Dafür wurden die Zwischenprodukt-Stämme als Positivkontrollen verwendet. Die Expression wurde durch das Western Blot-Verfahren mit spezifischen Antikörpern überprüft.

Im BY4741-Stamm konnte wie erwartet Ret2 nachgewiesen werden (Abbildung 5). KM\_60 und KM\_60\_intermediate sind Zwischenprodukte in der Herstellung des KR\_wt\_COPD-Stamms. Der KM\_60-Stamm enthält das mutierte ret2-1 Gen auf dem nicht-integrierten p416-Plasmid und diente als Kontrolle von ret2-1 (welches der Ret2-Antikörper auch erkennt, da das erkannte Epitop von der Trunkation nicht betroffen ist). Der KM\_60\_intermediate-Stamm enthielt bereits das  $\delta$ -COP-Gen und konnte damit als Kontrolle verwendet werden. Der neu hergestellte KR\_wt\_COPD-Stamm sollte nur  $\delta$ -COP enthalten und kein Ret2-Protein.

Die Stämme wurden am Vorabend in 3 ml des Selektivmediums inkubiert. Der BY4741-Stamm wuchs in Vollmedium SC, KM\_60 und KM\_60\_intermediate in -Ura und KR\_wt\_COPD in -His-Medium. Alle Stämme wuchsen für 16 Stunden über Nacht bei 30 °C.

Nach Lyse der Zellen wurden die Proteinextrakte auf ein 12 %-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Übertragung des Gels auf eine Nitrozellulose-Membrane erfolgte die Detektion mit  $\alpha$ -Ret2 und  $\alpha$ - $\delta$ -COP-Antikörpern.



**Abb. 5 KR\_wt\_COPD-Stamm-Herstellung.** Auf ein 12 %-SDS-Gel wurden Proteinextrakte der Stämme BY4741, KM\_60, KM\_60 intermediate und KR\_wt\_COPD aufgetragen. Die ersten drei genannten wurden benutzt, um den KR\_wt\_COPD-Stamm zu konstruieren. Nach der Gelelektrophorese wurde die Proteine nach Western Blot mit den Antikörpern  $\alpha$ -Ret2 und  $\alpha$ - $\delta$ -COP detektiert. Als Ladekontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit  $\alpha$ -PGK inkubiert und detektiert.

Der BY4741-Stamm und der KM\_60-Stamm zeigen eine Bande im Nachweis gegen das Ret2-Antigen (A) und keine Bande bei der Detektion des  $\delta$ -COP-Gens (B). Dabei ist eine Verschiebung bzw. stärkere Expression des Ret2-Gens beim KM\_60, und auch beim KM\_60\_intermediate zu erkennen. Das Protein wird überexprimiert, da es nicht von seinem genomischen Locus sondern von einem *low-copy*-Plasmid (p416) exprimiert wird (unter der Kontrolle des RET2-Promoters). Im KM\_60\_intermediate-Stamm ist weiterhin eine schwache Bande in der Detektion gegen das  $\delta$ -COP-Gen erkennbar. Die schwächere Expression als im KR\_wt\_COPD-Stamm ist möglicherweise durch die Anwesenheit von Ret2 und  $\delta$ -COP zu erklären. Da es sich um einen Hefeorganismus handelt, wird Ret2 vermutlich bevorzugt in den heptameren COP-Komplex eingebaut und stabilisiert. Im finalen KR\_wt\_COPD-Stamm ist keine Expression des Ret2-Gens erkennbar, da es im Genom deaktiviert (ausgeknockt) und auf dem p416-Plasmid gegenselektioniert wurde. Dagegen

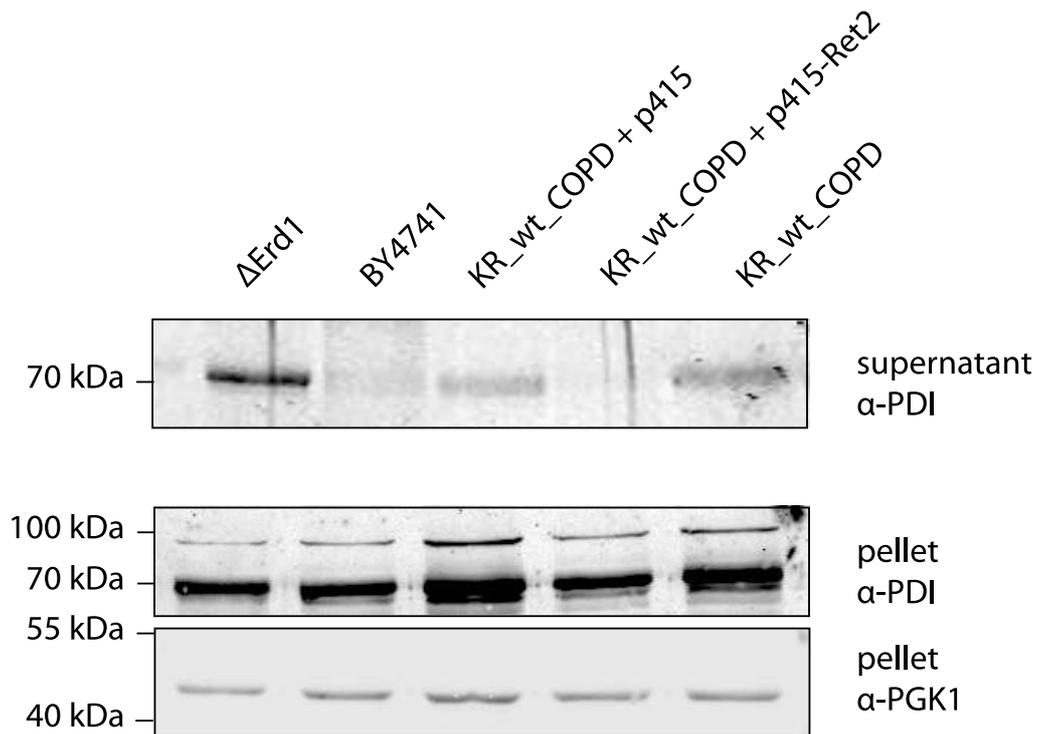
kann man aber deutlich die starke Expression des  $\delta$ -COP-Gens erkennen. Als Ladekontrollen wurden die Blots in einem zweiten Durchlauf gegen das Glykolyse-Enzym PGK1 detektiert.

### 2.3 Ret2-Gen rettet Sekretion im Ret2-ko-Stamm

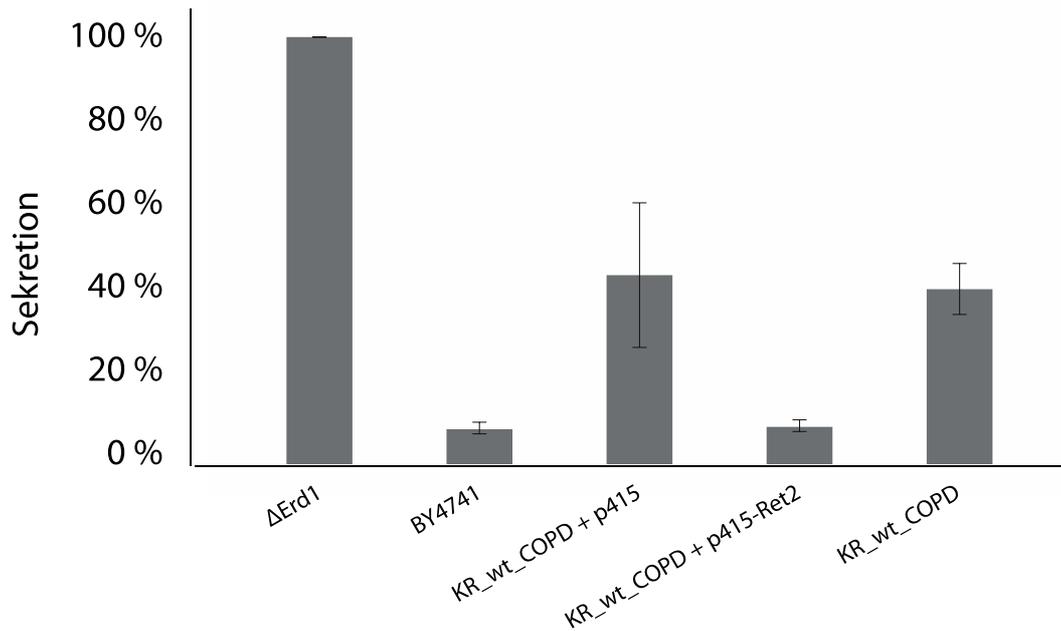
Die Lebensfähigkeit des neu etablierten und konstruierten Stammes KR\_wt\_COPD und sein zwar verlangsamtes, aber robustes Wachstum bestätigte eine partielle funktionelle Komplementation der Ret2-Deletionsmutante durch das  $\delta$ -COP Säugeräquivalent. Es gibt verschiedene existierende Standard-Nachweisverfahren, um die Integrität der Transportvorgänge im Endomembransystem der Bäckerhefe zu beweisen. Aufgrund der Beteiligung von COPI am Retrieval von HDEL-tragenden luminalen Proteinen über den KDEL-Rezeptor, wurde das Kar2-Assay als Nachweisverfahren gewählt, um den KR\_wt\_COPD-Stamm auf Defekte zu testen. Bei Beeinträchtigung des Transportwegs kam es zu einer Sekretion von KDEL-Proteinen ins Medium (siehe Kapitel 5.2.3.2) (Schuldiner et al. 2005). Mit diesem Ansatz bot sich die Chance, eine mögliche Beteiligung von  $\delta$ -COP bei der Erkennung des KDEL-Rezeptors zu untersuchen.

Beim Sekretionsassay (Abbildung 6) wurde als Positivkontrolle für Maximalsekretion ein  $\Delta$ Erd1-Stamm benutzt, der nachweislich einen Sekretionsphänotypen aufweist, da sein Sekretionsweg gestört ist (Auer 2008). Der BY4741-Stamm wurde als Negativkontrolle eingesetzt, da hier kein Phänotyp vorliegt. Für den KR\_wt\_COPD-Stamm wurde bereits bewiesen, dass er kein Ret2-Gen mehr und stattdessen das Säugeräquivalent  $\delta$ -COP enthielt (Kapitel 2.2 und Abbildung 5). Es sollte daher gleichzeitig getestet werden, ob der möglicherweise vorhandene Sekretionsphänotyp rückgängig gemacht werden könnte, wenn Ret2 auf einem Plasmid wieder eingeführt werden würde. Das Ret2-Gen wurde auf einem p415-Vektor eingebracht. Einmal wird der leere Vektor getestet, um nachzuweisen, dass dieser nicht an der „Rettung der Sekretion“ beteiligt ist (KR\_wt\_COPD + p415) und zum anderen wurde das komplette RET2-Gen im Vektor (KR\_wt\_COPD + p415-Ret2) verwendet.

Als Antikörper wurde  $\alpha$ -PDI verwendet. Dieses KDEL-Protein ist ein Haushaltsprotein des endoplasmatischen Retikulums und kann daher im Pellet nachgewiesen werden. Es ist jedoch als KDEL-Sequenz-tragendes Protein ebenfalls im Medium der Zelle vertreten und wurde hier als Nachweis für sekretierende KDEL-Proteine verwendet.



**Abb. 6 Sekretionsrevidierung durch RET2-Plasmid.** Die Stämme  $\Delta$ ERD1, BY4741, KR\_wt\_COPD + p415, KR\_wt\_COPD + p415-Ret2 und KR\_wt\_COPD wurden im Wachstum normalisiert und schließlich zentrifugiert. Der Überstand wurde TCA-Präzipitiert, mit Ladepuffer versetzt und auf ein 12 %-SDS-Gel aufgetragen. Der Rückstand mit den Proteinextrakten wurde direkt mit Ladepuffer versetzt und ebenfalls auf ein 12 %-SDS-Gel aufgetragen. Nach der Größenauftrennung wurden die Proteine per Western Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Detektion wurde im ersten Durchgang  $\alpha$ -PDI und im zweiten Schritt  $\alpha$ -PGK als Ladekontrolle verwendet.



**Abb. 7 Sekretionsstatistiken.** Die Membranen der Sekretionsassays wurden mit dem Licor-Gerät gescannt. Die Intensität der einzelnen Banden wurden auf der mit  $\alpha$ -PDI und auf der mit  $\alpha$ -PGK-inkubierten Membran der Sekretionsassays (Abbildung 6) berechnet. Das relative Verhältnis wurde durch den PDI-Wert zum PGK-Wert berechnet. Das absolute Verhältnis wurde durch Relativierung zum  $\Delta$ Erd1-Stamm berechnet. Die Werte aus  $n=3$  wurden gemittelt und aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Durch das mehrfach durchgeführte Experiment ( $n=3$ ; Fehlerbalken zeigen den Standardfehler) wird deutlich, dass der  $\Delta$ Erd1-Stamm am meisten sekretiert (auf 100 % festgelegt und stets als Bezugspunkt benutzt) und der Wildtyp-Stamm BY4741 nicht nachweisbar war (Abbildung 7). Die Sekretion des KR\_wt\_COPD (einmal ohne Plasmid und einmal mit leerem p415-Vektor) liegt bei ca. 40 % der Maximalsekretion. Bringt man das RET2-ORF unter Kontrolle des MET25-Promotors auf einem Plasmid ein (KR\_wt\_COPD + p415-RET2) ist eine Rettung der Sekretion deutlich erkennbar. Die KDEL-Sekretion liegt wie auch beim Wildtyp-Stamm BY4741 bei ca. 8 %.

Aus dem KDEL-Sekretionstest ergibt sich, dass der Prozess des Retrievals von KDEL-Proteinen gestört ist, wenn der Hefestamm Säuger- $\delta$ -COP statt Ret2 exprimiert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass zwischen den beiden Proteinen nicht-konservierte Bereiche entweder direkt an der molekularen Erkennung des KDEL-Rezeptors beteiligt sind oder zu einer größeren Region in der Struktur des Coatomer-Komplexes gehören, die für diese Erkennung verantwortlich ist. Diese Erkenntnisse erlauben uns über

einen so genannten chimären Ansatz, den verantwortlichen Bereich in  $\delta$ -COP näher einzugrenzen.

Dafür wurde bereits nachgewiesen, dass die Expression von Ret2 von einem eingeführten Plasmid, p415, zu einer vollen Komplementation des Sekretionsphänotyps führt. Damit ist diese Form der Expression eine geeignete Strategie für die Expression von Ret2/Säuger- $\delta$ -COP-Chimären und die Bestimmung der durch sie erreichten funktionellen Komplementation in diesem Prozess.

## **2.4 Konstruktion der Chimären**

### **2.4.1 Ablauf des Klonierens**

Es wurden acht Chimären zwischen Ret2 und Säuger- $\delta$ -COP konstruiert (Schema der jeweiligen Bruchpunkte in Abbildung 8, Ablauf des Klonierens in Abbildung 14 dargestellt). Die Chimären 1-4 enthielten dabei das C-terminale Ende des Ret2-Gens, während die Chimäre 5-8 das C-terminale Ende des  $\delta$ -COP-Gens beinhalteten.

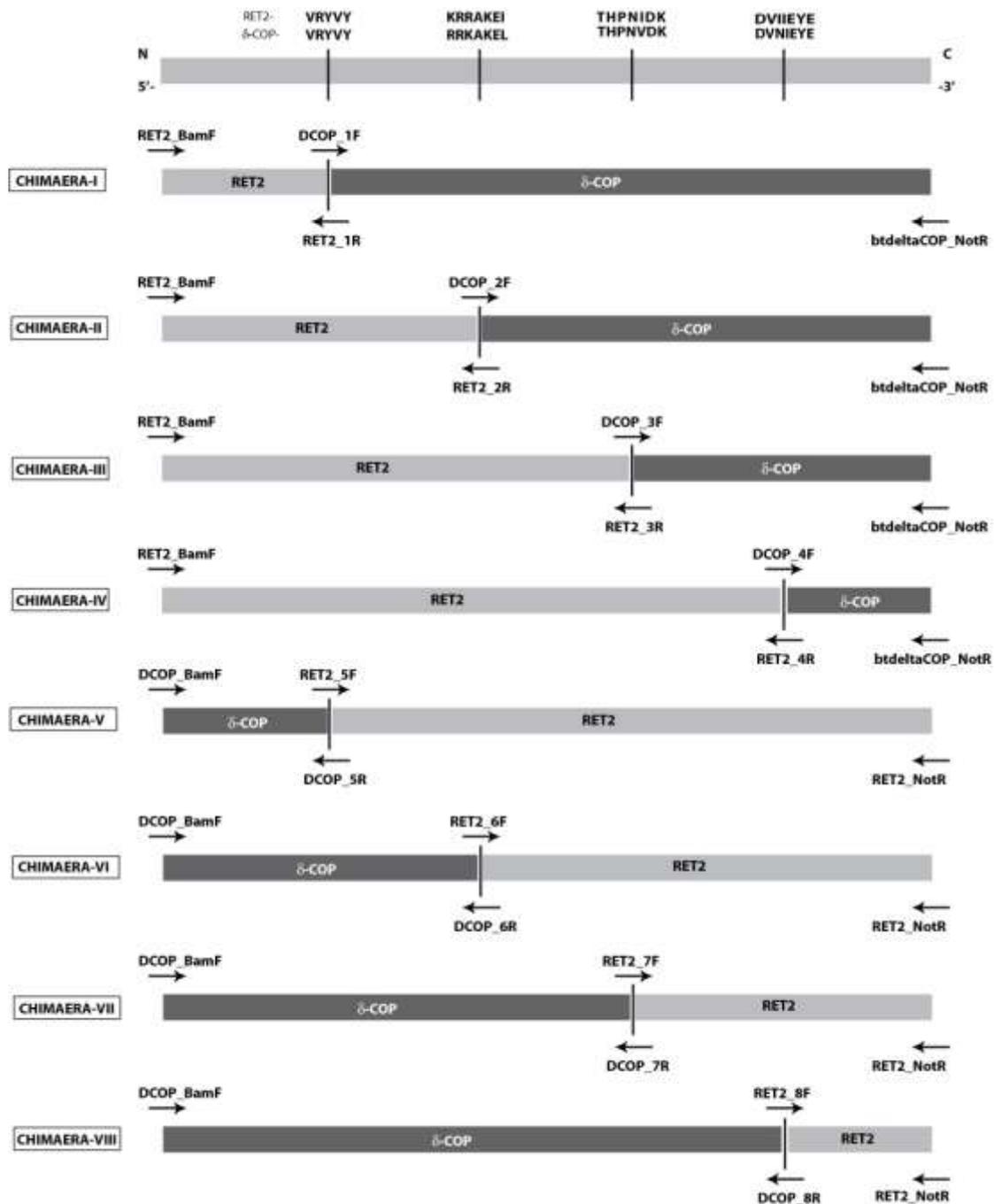


Abb. 8 Konstruktion der Chimären

Zuerst wurden die Fragmente durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Für den Ret2-Anteil wurde dafür ein BFGIII-Ret2-Plasmid benutzt, für  $\delta$ -COP ein von Dr. Arakel gestelltes BFGIII Plasmid. Die PCR-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und auf ihre Größe überprüft. Es konnten dabei die Fragmentlängen bestätigt werden (Tabelle 6). Nach Aufreinigung der herausgetrennten DNA-enthaltenden Gelstücke, wurde eine zweite PCR

durchgeführt. Dafür wurde das Ret2-Fragment mit dem  $\delta$ -COP-Fragment zusammengesetzt und amplifiziert. Die verwendeten Primer waren Ret2\_BamF/btdeltaCOP\_NotR und DCOP\_BamF/Ret2\_NotR (Sequenzen Kapitel 5.1.8). Durch die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese konnten anschließend die Größen der Inserts verglichen und bestätigt werden.

Chimär	PCR-Fragmente nach 1. PCR		PCR-Fragmente nach 2. PCR
	Ret2	$\delta$ -COP	
<b>Chimär 1</b>	178	1362	1540
<b>Chimär 2</b>	504	1038	1542
<b>Chimär 3</b>	1065	531	1596
<b>Chimär 4</b>	1263	348	1611
<b>Chimär 5</b>	174	1464	1638
<b>Chimär 6</b>	498	1137	1635
<b>Chimär 7</b>	1005	582	1587
<b>Chimär 8</b>	1188	384	1572

Tab. 6 Fragmentgrößen in Basenpaaren

Anschließend wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mit Restriktionsendnucleasen geschnitten. Dadurch entstanden *sticky ends* und die Inserts konnten in einen ebenfalls geschnittenen BFGIII-Vektor hineinligiert werden. Die verwendeten Restriktionsenzyme waren NotI und BamHI. Die Restriktionsprodukte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Dort konnten die Fragmente mit der korrekten Länge von anderen DNA-Molekülen getrennt werden, sie wurden ausgeschnitten und aufgereinigt.

Anschließend folgte die Ligation des Inserts in den Vektor. Nach 16 Stunden wurden die Ligationen in *E.coli*-Zellen durch Elektroporation transformiert und auf Ampicillinplatten selektiert, bis Kolonien gewachsen waren. Nach weiterem Wachstum der Zellen in Flüssigkultur wurden die Plasmide per Minipräparation isoliert und zur Kontrolle sowohl mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten als auch sequenziert (durch GATC-Firma).

Da sichergestellt werden sollte, dass eine möglicherweise vorhandene Funktionalität der Chimären nicht durch den HA-Tag am N-Terminus gestört wird, wurden alle Inserts nach Fertigstellung der BFGIII-Konstrukte in den p415-Vektor religiert, um eine N-terminal nicht markierte Version der

Chimären zu konstruieren. Sowohl alle 8 Chimären als auch BFGIII-Ret2, wurden so umklontiert. Dazu wurden sie mit BamHI und XhoI aus den Plasmiden geschnitten und, wie oben beschrieben, in den Vektor ligiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden in den Experimenten die p415-Konstrukte verwendet.

### 2.4.2 Kontrolle des Klonierens

Die Ergebnisse des Klonierens der Chimäre wurden zum einen durch Testverdau und zum anderen durch Sequenzierung kontrolliert. Für die Sequenzierung wurden die ermittelten Sequenzen mit CLUSTALW zur Originalsequenz aus der Datenbank mittels Alignment in Beziehung gesetzt und überprüft. Bei Punktmutationen wurde geprüft, ob es sich eventuell um eine stille Mutation handelt, indem die aus den DNA-Sequenzen übersetzten Aminosäure-Sequenzen der Chimären mit Ret2 bzw.  $\delta$ -COP verglichen wurden.

Für den analytischen Restriktionsansatz wurden die Plasmide mit den Chimären mit BamHI und NotI gespalten und im Anschluss auf einprozentiges Agarosegel aufgetragen. Die Detektion im Transluminator bewies die erwartete Größe des Vektors sowie der Inserts (siehe Abbildung 9, Fragmentgrößen siehe Tabelle 6)

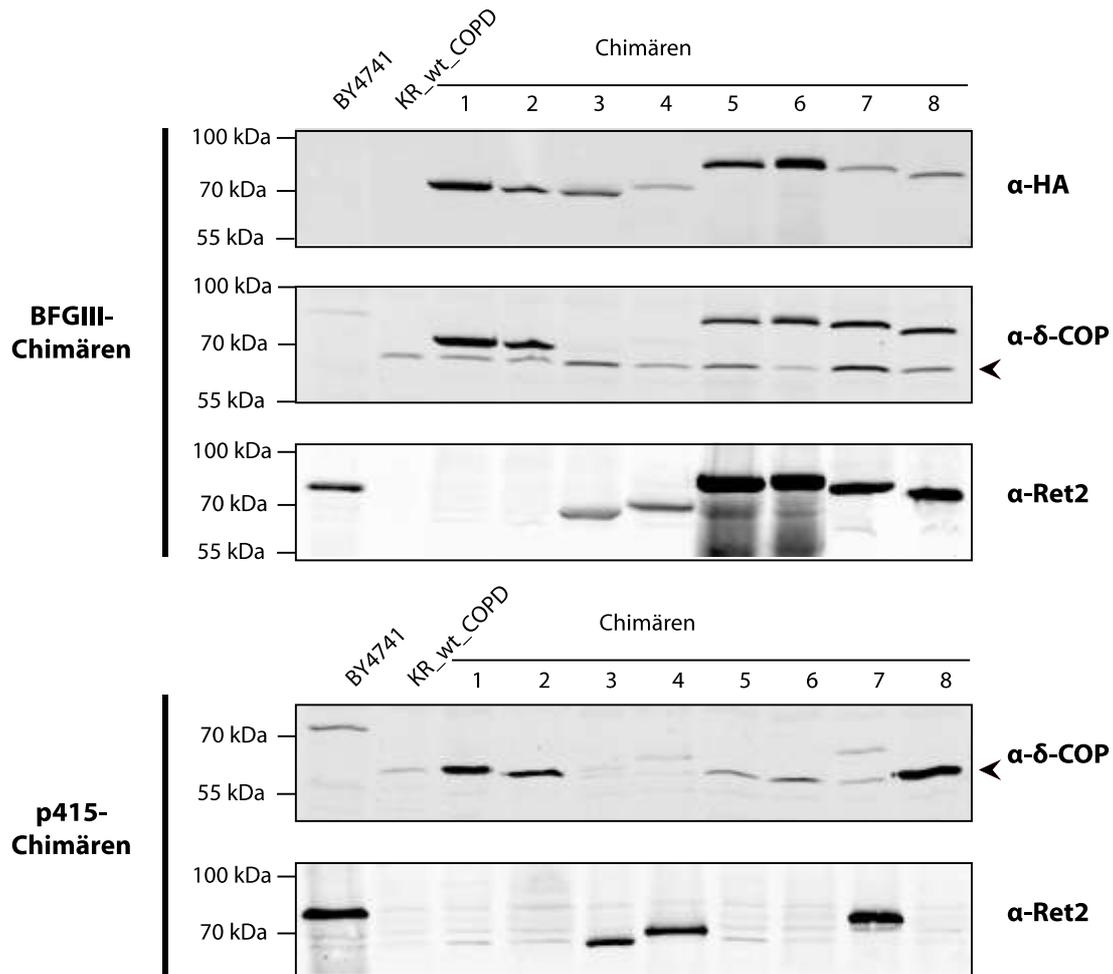


**Abb. 9 Verdau der Chimären.** Die BFGIII-Chimären wurden mit den Restriktionsenzymen NotI und BamHI verdaut und auf einem 1 %-Agarosegel mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Durch den hinzugefügten interkalierenden Farbstoff konnten die geschnittenen DNA-Fragmente mittels UV-Licht-Transluminator visualisiert werden. Der aufgetragene Größen-Marker gab Rückschlüsse auf die Größe der DNA-Abschnitte. Die Vektoren haben eine Größe von über 6000 bp, die Inserts sind im Größenbereich von 1500 bp zu finden.

## 2.5 Expression der Chimären

Die acht Plasmide mit den Chimären wurden jeweils in Hefe transformiert und die Expression der entsprechenden Proteine per SDS-Gelelektrophorese kontrolliert. Da jede Chimäre einen anderen Bruchpunkt zwischen Ret2-Gen und  $\delta$ -COP-Gen aufwies, binden die jeweils spezifischen Antikörper nicht an alle Chimären. Je nachdem, ob die Erkennungssequenz im Protein enthalten ist oder nicht, gibt es stets ein anderes Bindungsmuster der Antikörper.

Die Chimären wurden zunächst im BFGIII-Vektor konstruiert, um eine N-terminal HA-markierte Variante (HA-Tag) zu erhalten. Dieser Schritt war wichtig, um die Expression der Chimären kontrollieren zu können. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser mit der Sekretion interferiert. Daher wurden die Chimären für den Sekretions-Nachweis in ein anderes Plasmid, p415MET25, umgesetzt, von wo aus sie ohne N-terminales HA-Tag exprimiert wurden.



**Abb. 10 Expression der Chimären.** Die konstruierten BFGIII- und p415-Plasmide wurden in den Kora Richter KR\_wt\_Stamm transformiert. Die Proteinextrakte dieser Stämme wurden auf 12 %-SDS-Gele aufgetragen und mittels Western Blot-Verfahren auf eine Membran transferiert. Die Membranen mit den BFGIII-Chimären im KR\_wt\_COPD-Stamm wurden mit  $\alpha$ -HA,  $\alpha$ -Ret2 und  $\alpha$ - $\delta$ -COP inkubiert und detektiert. Die KR\_wt\_COPD-Stämme, welche die p415-Plasmide enthielten, wurden aufgrund des fehlenden HA-Tags nur mit  $\alpha$ -Ret2 und  $\alpha$ - $\delta$ -COP inkubiert und detektiert. Die Pfeile in den  $\delta$ -COP-Blots markieren das  $\delta$ -COP-Protein des KR\_wt-Stamms.

Aus den Expressionsblots wird deutlich, dass die Chimären sowohl unterschiedlich exprimieren als auch unterschiedlich von den Antikörpern erkannt werden. Die Durchführung der Expressions-Blots geschah dreimal, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse statistisch signifikant sind.

Der monoklonale HA-Antikörper kann für die in BFGIII konstruierten Chimären die Expression aller acht chimären Proteine bestätigen. Aufgrund bekannter Konzentration und Affinität des Antikörpers zum Protein korreliert die

Signalstärke mit der Expression des Proteins. Die Proteine weisen jeweils ähnliche Größen zwischen 70-90 kDa auf. Die Anwesenheit des HA-Tags macht es denkbar, dass die Proteine ein höheres Molekulargewicht aufweisen als sich aus dem reinen Ret2/ $\delta$ -COP-Anteil errechnen lässt.

Der  $\delta$ -COP-Antikörper ist polyklonal und erkennt verschiedene Epitope. Die Membranen, die mit dem  $\delta$ -COP-Antikörper detektiert wurden, weisen zwei Banden auf. Die untere Bande, die mit dem Pfeil ( $\blacktriangleleft$ ) in Abbildung 10 markiert ist, erkennt das im Kora Richter Wildtyp-Stamm KR\_wt\_COPD integrierte, gegen das Ret2 ausgetauschte,  $\delta$ -COP-Protein. Die obere Bande hingegen ist mit dem  $\delta$ -COP-Anteil der Chimären assoziiert. In allen acht Chimären sind unterschiedliche Anteile des  $\delta$ -COP-Gen vorhanden. Der Antikörper kann daher an unterschiedlichen, Epitopen binden. Es ist nicht bekannt, welche Genabschnitte welche Epitope besitzen und an welchen Stellen der Antikörper bindet. Die Stärke der Bande gibt daher keine Rückschlüsse auf die Expressionsstärke. Sie beweist, wie stark die Affinität des  $\delta$ -COP-Antikörpers und wie hoch der Proteinanteil bzw. die Größe der Konzentration des spezifischen Antikörpers in der  $\delta$ -COP-Antikörper-Mischung ist. Der  $\delta$ -COP-Antikörper wurde in diesem Zusammenhang nicht für die Expression verwendet, sondern um die Anwesenheit des  $\delta$ -COP-Proteins bzw. eines Anteils davon zu beweisen. Die Expression der Chimären kann daher nur mit dem HA-Antikörper nachgewiesen werden. Festgehalten werden kann jedoch, dass im KR\_wt\_COPD-Stamm trotz transformierten Chimären das integrierte  $\delta$ -COP-Protein (Abbildung 10,  $\blacktriangleleft$ ) nachweisbar ist und jeweils eine Bande auf gleicher Höhe aufweist. Die berechnete Größe der  $\delta$ -COP-Untereinheit beträgt 57 kDa (Uniprot).

Der anti- $\delta$ -COP-Antikörper ( $\alpha$ - $\delta$ -COP) erkennt weiterhin die in den Chimären enthaltenen unterschiedlich großen Anteile des  $\delta$ -COP-Proteins. Alle BFGIII-Chimären können von dem  $\delta$ -COP-Antikörper erkannt werden, zeigen jedoch unterschiedlich starke Signale abhängig davon, welcher Abschnitt der  $\delta$ -COP-Sequenz in der Chimäre präsent ist. So ist die Bande für das  $\delta$ -COP-Protein der Chimären 3 und 4 nur sehr schwach ausgeprägt, bei Chimäre 1 dagegen stärker. In den p415-Chimären ist die Erkennung der  $\delta$ -COP-Proteine

ebenfalls in allen Stämmen erkennbar. Die Bande der hier integrierten  $\delta$ -COP-Gene ist schwächer erkennbar ( $\blacktriangleleft$ ), aber dennoch immer nachweisbar. Da die Proteine ohne HA-Tag kleiner sein, überlagern sich bei den Chimären 1,2,5,6,8 die Banden des zweiten  $\delta$ -COP-Proteins. Dies wird durch eine starke Bande deutlich. Liegen zwei Banden vor, wie z.B. bei den Chimären 2,4,7, ist eine deutlich schwächere Bande zu vernehmen. Interessant ist, dass die Chimären 1 und 2 in beiden Vektoren starke Banden aufweisen, wogegen die Chimären 3 und 4 im BFGIII- und p415-Vektor beide schwach. Die erkennbaren Banden sind in beiden Vektoren gleichermaßen verschoben und weisen die gleiche Stufung auf.

Der  $\alpha$ -Ret2-Antikörper erkennt die Epitope bei den BFGIII-Chimären Nr. 3 – 8 sehr gut, die Ret2-Protein-Anteile der Chimären 1 und 2 weisen sehr schwache Banden auf. Die Chimären 5 und 6, welche den längsten C-terminalen Anteil des Ret2-Gens tragen, weisen die stärksten Banden auf. Sind die Chimäre in den p415-Vektor integriert, sind die Chimären 3, 4 und 7 mit starken Banden vertreten. Die anderen Chimären weisen schwache Banden auf. Während in den BFGIII-Vektor-Chimären Nr. 5 und 6 sehr starke Banden erkennbar sind, sind diese Banden in den p415-Vektor-integrierten Chimären 5 und 6 nur sehr schwach erkennbar. Der Vektor scheint also eine bedeutende Rolle in der Erkennung der Proteinanteile durch den Antikörper zu spielen. Hingegen ist der Shift von der Chimäre 3 und zu Chimäre 4 in beiden verwendeten Vektoren gleich.

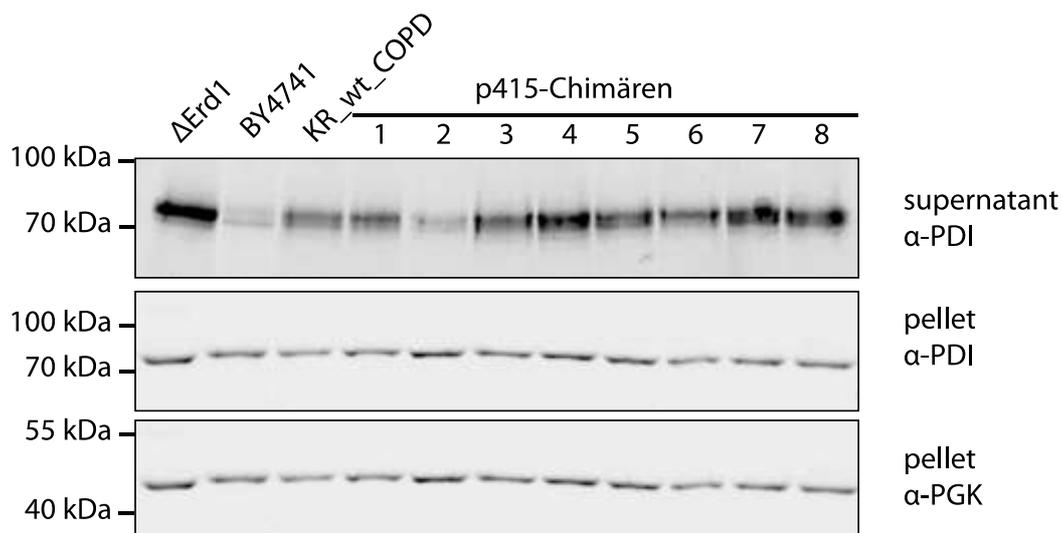
Als Positivkontrolle für Ret2 fungiert hierbei der BY47471-Stamm. Für  $\delta$ -COP wurde der KR\_wt\_COPD-Stamm benutzt.

## 2.6 Sekretionsassay mit p415-Chimären

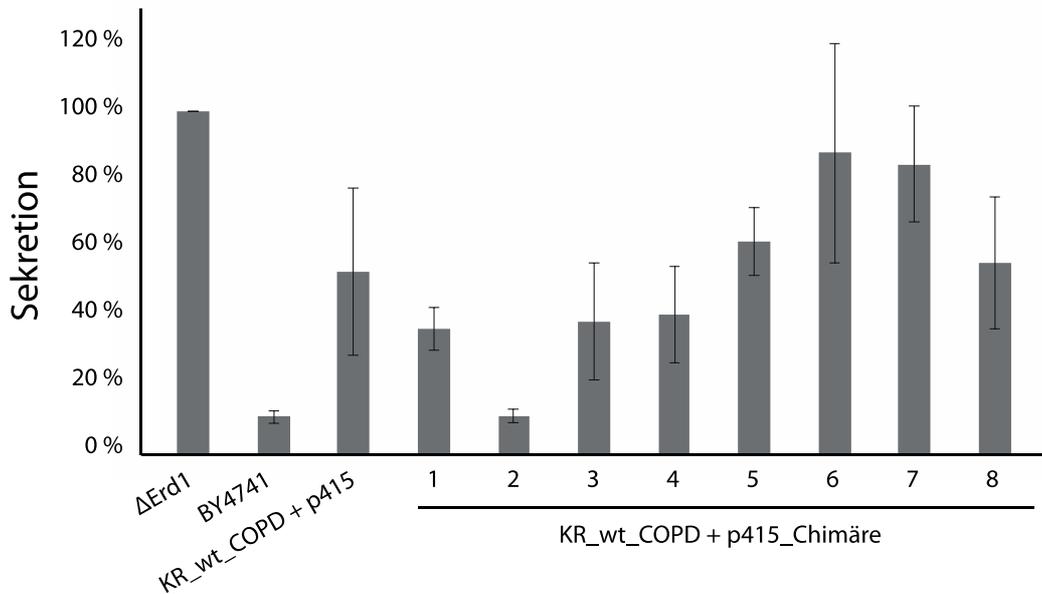
Nach dem Klonieren der Chimären und der Überprüfung ihrer Expression konnte das eigentliche Experiment, das KDEL-Sekretionsassay, durchgeführt werden (Abbildung 11).

Die Stämme wuchsen über mehrere Stunden bei 30 °C, die OD<sub>600</sub> wurde mehrmals gemessen und die Stämme entsprechend verdünnt. Damit wurde sichergestellt, dass die Kulturen zum Startpunkt des Experimentes gleiche

Zelldichten besaßen. Nach Zentrifugation wurde das Protein im Überstand der Zellen mit Trichloressigsäure präzipitiert, während das Pellet nach Lyse der Zellen als Kontrolle verwendet wurde. Das Präzipitat des Überstandes und das lysierte Pellet wurden dann mit SDS-Ladepuffer versetzt und auf 12 %-SDS-Gele aufgetragen. Nach Ablauf der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Membran geblottet und immunodetektiert. Als Ladekontrolle für die Gesamtzahl der Zellen wurde der  $\alpha$ -PGK1-Antikörper verwendet. Das Nachweisverfahren wurde fünfmal wiederholt. Als Marker für die maximal zu erwartende Sekretion wurde der  $\Delta$ erd1-Stamm benutzt, für die Kontrolle der Hintergrund-Sekretion wurde der Wildtyp-Stamm BY4741 verwendet. Um das Ausmaß des Sekretionsdefekts in dem mit Säuger- $\delta$ -COP komplementierten Stamm für jedes Experiment als Referenzpunkt zu messen wurde der KR\_wt\_COPD-Stamm aufgetragen.



**Abb. 11 Sekretionsassay p415-Chimären.** Durchgeführt wurde ein Sekretionsassay mit den acht klonierten Chimären im p415-Vektor, transformiert in KR\_wt\_COPD. Als Positivkontrolle für Maximalsekretion wurde  $\Delta$ ERD1 verwendet, als Negativkontrolle BY4741 und zur Darstellung der basalen Sekretion des verwendeten Stamms der KR\_wt\_COPD-Stamm selbst. Auf einem 12 %-SDS-Gel wurden die Überstände und die Pellets dieser o.g. Stämme aufgetragen. Nach Transferieren der Proteine auf eine Membran mittels Western Blot wurden die Membranen mit  $\alpha$ -PDI und im Anschluss mit  $\alpha$ -PGK inkubiert.



**Abb. 12 Sekretionsstatistiken.** Die Membranen der Sekretionsassays wurden mit dem Licor-Gerät gescannt. Die Intensität der einzelnen Banden wurden auf der mit  $\alpha$ -PDI und auf der mit  $\alpha$ -PGK-inkubierten Membran der Sekretionsassays (Abbildung 11) berechnet. Das relative Verhältnis wurde durch den PDI-Wert zum PGK-Wert berechnet. Das absolute Verhältnis wurde durch Relativierung zum  $\Delta$ Erd1-Stamm berechnet. Die Werte aus  $n=5$  wurden gemittelt und aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Das Sekretionsassay zeigt deutliche Unterschiede in der KDEL-Sekretion der verschiedenen Hefestämme. Alle Stämme wurden auf die im  $\Delta$ erd1-Stamm beobachtete Sekretion normalisiert.

Die p415-Chimären sekretieren in unterschiedlichen Ausmaßen. Während die KR\_wt\_COPD-Stämme mit den Chimären 5 – 8 mehr als die Kontrolle KR\_wt\_COPD + p415 aufwiesen, kann man bei den Chimären 1 – 4 eine niedrigere Sekretion feststellen. Allerdings sind einzig die Ergebnisse der Chimäre 2 signifikant. Mit einer Minimalsekretion von ca. 10 % entspricht dies einem gleichen Wert wie bei dem Wildtyp BY4741 (Abbildung 12).

### 3 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ermöglichen zunächst zwei wesentliche Schlussfolgerungen:

- 1) Das  $\delta$ -COP-Gen des Rindes (hochkonserviert in allen Säugetieren) kann das essenzielle Hefegen *Ret2*, das ebenfalls für die  $\delta$ -COP-Untereinheit codiert, aber zu den Säugergenen wenig Sequenzähnlichkeit aufweist, insoweit funktionell ersetzen, als das die resultierenden Hefezellen überleben (im Unterschied zu einer Deletionsmutante ohne *RET2*-Gen).
- 2) Der so komplementierte Stamm sezerniert Proteine, die normalerweise über eine Interaktion mit dem KDEL-Rezeptor im frühen sekretorischen Weg zurückgehalten werden.

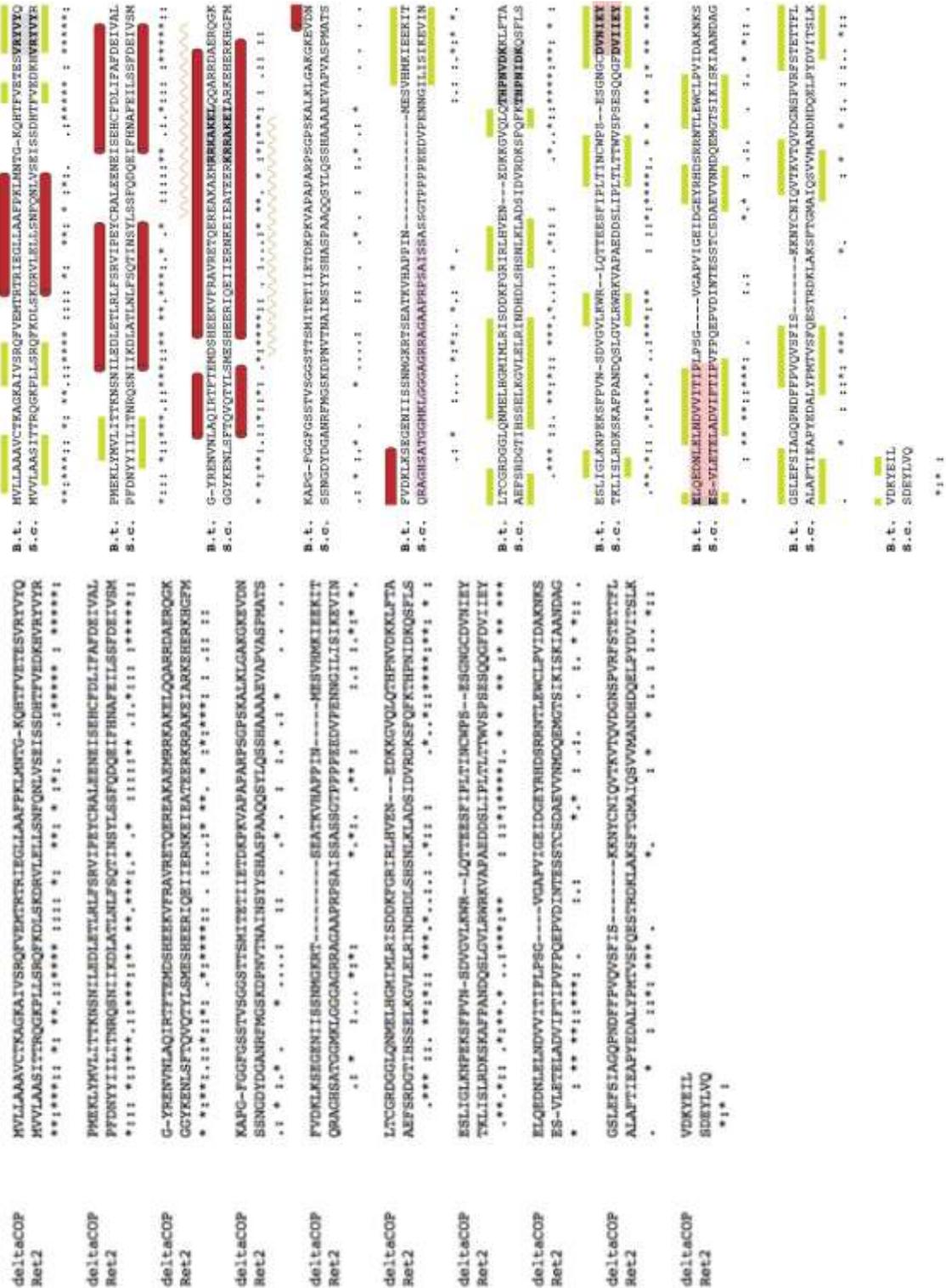
Eine wichtige Funktion von COPI-Vesikeln ist die Rückführung von Cargo-Proteinen ins ER. Diese werden häufig über Peptid-Sortierungssignale in zytosolischen Domänen erkannt. Anhand der am Mikroskop von A. Clancy (AG Schwappach) erhobenen Daten kann bestätigt werden, dass COPI weiterhin die ER-Retrievalssignale KKXX und RXR erkennt. Daher scheint eine gewisse funktionelle Intaktheit der COPI-Vesikelhülle vorzuliegen. Der Sekretionsphänotyp ist also nicht über grundlegende Defekte in der COPI-Vesikelbildung zu erklären.

Da der KDEL-Rezeptor strukturell nicht verändert wurde, kann man davon ausgehen, dass die Bindung der KDEL-Proteine nicht beeinträchtigt ist. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine für das Retrieval von KDEL-Proteinen relevante Funktion von *Ret2* durch  $\delta$ -COP aus Säugern nicht ersetzt werden kann. In einem auf Chimären beruhenden Ansatz wurden die Sequenzunterschiede der beiden Gene genutzt, um den relevanten Bereich einzugrenzen.

Unabhängig vom genauen Mechanismus, der zu einer Störung der Retention von KDEL-Proteinen führt, kann man aus dem Komplementationsverhalten der konstruierten und funktionell getesteten Chimären klar auf den relevanten Bereich von *Ret2*/ $\delta$ -COP schließen: Betrachtet man das Ausmaß der Sekretion, ist es bei Chimäre 2 am geringsten. Der Abschnitt zwischen

Aminosäure 55 und 166 von Ret2 hat also eine wichtige Rolle bei der gesuchten Funktion von COPI, die zwar nicht essenziell, aber für eine normale Retention von KDEL-Proteinen erforderlich ist. Auf diesem Bereich kartiert die sogenannte Longin-Domäne, die in  $\delta$ -COP bioinformatisch identifiziert wurde.

Betrachtet man im Alignment von  $\delta$ -COP und Ret2 die Primärstruktur, wird nur eine 23 %-Identität deutlich. Die Sekundärstruktur hingegen weist interessante Parallelen auf (Abbildung 13).



**Abb. 13 Alignment von  $\delta$ -COP und Ret2.** Die Aminosäure-Sequenz für  $\delta$ -COP wurde aus der UniProt-Datenbank (Entry P48444) bezogen. Für Ret2 wurde die Saccharomyces Genome Database benutzt (Systematic Name YFR051C). Das Alignment wurde mit ClustalW durchgeführt. Folgende Anwendungen fanden Verwendung: „Pairwise Alignment Slow/Accurate Protein“, „Gap Open Penalty 15“. (\*) bedeutet gleiche Aminosäure, (:) bedeutet stark konserviert; (.) bedeutet schwach konserviert. Die Sekundärstruktur im rechten Bild wurde mit dem Jpred3-Algorithmus vorausgesagt. Die grünen Balken symbolisieren  $\alpha$ -Helices, die roten Balken  $\beta$ -Faltblätter

Man findet am N-terminalen Ende eine Profilin-ähnliche Faltung. Gekennzeichnet wird sie durch ein fünffaches  $\beta$ -Faltblatt und 2  $\alpha$ -Helices auf der einen und eine  $\alpha$ -Helix auf der anderen Seite (Topologie  $\beta_1\beta_2\alpha_1\beta_3\beta_4\beta_5\alpha_2\alpha_3$ ). Dieses Faltungsmuster wurde als Longin-Domäne bezeichnet und ist in der Regel 100-120 Aminosäuren lang (Rossi et al. 2004).

Longin-Domänen sind evolutionär hochkonserviert und wurden nach bioinformatischen Recherchen zuerst in folgenden drei Proteinen gefunden:

- VAMP (*vesicle associated membrane proteins, tetanus-neurotoxin-insensitive* TI-VAMP oder VAMP7) (Galli et al. 1998)
- Sec22 (Sacher et al. 1997)
- Ykt6 (McNew et al. 1997)

Später fiel die Struktur weiterhin in Rab-GEFs (DENNs, MON1/CCZ1, BLOC-3, TRAPP-Komplex) und anderen GEFs auf (Levine et al. 2013, Schäfer et al. 2012).

Namentlich entstammen die sog. Longin-Domänen den *longins*, auch long-VAMPs genannt. Bei der Erforschung von klassischen VAMPs fiel beim humanen VAMP SYBL1 eine doppelte Länge des N-Terminus auf (Galli et al. 1998, D'Esposito et al. 1996). Dieser N-terminale Teil stellte sich als hochkonserviert in diversen Species heraus und wurde daraufhin aufgrund seiner Länge als Longin-Domäne bezeichnet, die verlängerten VAMPs tragen den Namen *longins* (Filippini et al. 2001). Diese zählen zu einer Untergruppe der R-SNAREs wie auch die *short* VAMPs/brevis. R-SNAREs können gemeinsam mit drei Q-SNAREs einen SNARE-Komplex bilden (Rossi et al. 2004).

Evolutionsbiologisch sind Longin-Domänen zwischen Tieren, Pilzen und Pflanzen konserviert. Dies weist darauf hin, dass die Longin-Domäne für diesen Typ von SNAREs bzw. andere am Vesikeltransport beteiligte Proteinfunktionen wichtig ist.

Über die genaue Funktion der Domäne im zellulären Geschehen ist bisher noch nicht viel bekannt. Bei t-SNAREs wurde eine autoinhibitorische Funktion durch Zurückklappen der Domäne entdeckt (Vivona et al. 2010).

Interessant ist nun, dass erstens genau dort, wo die Domäne im  $\delta$ -COP und RET2-Gen zu finden ist, der Austausch in der Chimäre 2 stattgefunden hat, und das zweitens diese Position bei  $\delta$ -COP eine besondere Rolle zu spielen scheint. Die genaue Aufklärung dieser Rolle durch weitere Experimente wird wesentlich zum Verständnis der Longin-Domänen der Dynamik des COPI-Vesikelhüllkomplexes und seiner Interaktion mit dem KDEL-Rezeptor beitragen.

## 4 Ausblick

Das Klonieren der Chimären und die anschließenden Sekretionsassays führten zu der Entdeckung, dass die Longin-Domäne der  $\delta$ -COP-Untereinheit eine wichtige Rolle beim Retrieval von KDEL-Proteinen spielt. Nun gilt es, diese weiter zu untersuchen. An diesem Punkt endet diese Arbeit, doch sie wirft eine Vielzahl an neuen Fragen auf: Welche Rolle spielt die Longin-Domäne in der Struktur und Dynamik des gesamten COPI-Komplexes? Rekrutiert diese Domäne über Protein-Protein-Interaktionen weitere Bindungspartner an den COPI-Komplex? Interagiert sie eventuell direkt mit dem KDEL-Rezeptor oder mit der kleinen ATPase Arf, die die Membranassoziation des COPI-Vesikelhüllkomplexes reguliert?

Die Beantwortung all dieser Fragen mit weiteren Experimenten könnte wertvolle Erkenntnisse zur Struktur und Funktion von COPI sowie zum Retrieval von luminalen Proteinen mit Hilfe des KDEL-Rezeptors im frühen sekretorischen Pfad geben. Störungen dieses Systems im Säugerorganismus haben pathophysiologische Konsequenzen, deren genaue Ursachen noch nicht geklärt sind. Langfristig wird ein tieferer Einblick in das Wechselspiel zwischen COPI und KDEL-Rezeptor auch das Verständnis solcher pathophysiologischer Zustände, die vom frühen sekretorischen Pfad ausgehen, wesentlich verbessern.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Standardmedien und –puffer

BEZEICHNUNG	KONZEN- TRATION	INHALT
Ampicillin Stocklösung	100 mg/ml	Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O, steril filtriert, Lagerung bei -20 °C
Ammoniumpersulfat 10 %	10 % (w/v)	Ammoniumpersulfat-Pulver
Bakterien-Agar (LB-Agar)	15 g/l 80 µg/ml	Agar in LB-Medium, autoklavieren Ampicillin
Blocking-Lösung für Western Blot	1x 5 % (w/v) 0.02 % (v/v)	TBS in H <sub>2</sub> O Milchpulver NP-40
DNA-Ladepuffer 6fach	30 % (v/v) 0.2 % (w/v)	Glycerol Bromphenolblau
Hefeagar	40 g/l	Bactoagar für Hefe in H <sub>2</sub> O oder YPAD, autoklavieren
Hefemedium YPAD	10 g/l 20g/l 40 mg/l 20 g/l	Hefeextrakt Peptonwasserstoff Adeninsulfat Glukose H <sub>2</sub> O ad 1l, autoklavieren
Hefemedium selektiv	6,7 g/l 0.57 g/l 20 g/l 20 mg/l 30 mg/l 40 mg/l 50 mg/l 100 mg/l	Hefestickstoffbasis Aminosäuregemisch XY (je nach Bedarf) Glukose L-Arginin, L-Methionin, l-Histidin, L-Uracil L-Lysin, L-Tyrosin Adeninhemisulfat L-Phenylalanin, L-Tryptophan L-Aspartat, L-Glutamat, L-Leucin In H <sub>2</sub> O, steril filtrieren
Hefeplatten	50 % (v/v) 50 % (v/v)	Hefeagar, autoklaviert Hefemedium, steril filtriert
LB-Medium für Bakterien	15 g/l 5 g/l 5 g/l	Trypton Hefeextrakt NaCl H <sub>2</sub> O ad 1 l

	z.B. 100 ug/ml	Nach dem Autoklavieren: Ampicillin
<b>Lithium Acetat 10fach (1M)</b>	102 g/l	Lithium Acetat H <sub>2</sub> O ad 1l, steril filtriert
<b>Lithium Acetat -Mix</b>	1 x 1 x 8 x	10x TE pH 7,5 10x Lithium Acetat pH 7,5 H <sub>2</sub> O
<b>PBS (phosphate buffered saline) 1fach</b>	140 mM 3 mM 8 mM 1.5 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4 H <sub>2</sub> O ad 1l
<b>PEG-Stocklösung (50 %)</b>	500 g/l	PEG (Polyethylglycol) 4000 in H <sub>2</sub> O, steril filtrieren
<b>PEG-Mix</b>	8 x 1 x 1 x	50 % PEG 10 x TE pH 7,5 10 x Lithium Acetat
<b>Ponceau-S-Stocklösung 10fach</b>	20 g/l 300 g/l 300 g/l	Ponceau-S Trichloressigsäure Schwefelsalicylsäure In H <sub>2</sub> O
<b>SDS-Ladepuffer Proteingel 5fach</b>	250 mM 5 % (w/v) 0.5 % (w/v) 50 % (v/v) 250 mM	Tris-HCl pH 6,8 SDS 10 % Bromphenolblau Glycerol DTT (Dithiotreitol)
<b>SDS-Laufpuffer Proteingel 5fach</b>	250 mM 125 mM 0.1 % (v/v)	Glycin pH 8,3 Tris 10 % SDS H <sub>2</sub> O ad 1l
<b>SOC-Medium für Bakterien</b>	20 g/l 5 g/l 0.5 g/l 2.5 mM 10 mM 20 mM	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl H <sub>2</sub> O, nach dem Autoklavieren MgCl <sub>2</sub> Glukose
<b>SDS 10 %</b>	100 g/l	Natriumdodecylsulfat
<b>T4-Ligase-Puffer</b>	50 mM 10 mM 1 mM 1 mM 50 mg/ml	Tris-HCl pH 7,6 MgCl <sub>2</sub> ATP DTT PEG-8000 H <sub>2</sub> O, Aliquots bei -20 °C lagern

<b>Trichloressigsäure (TCA)</b>	50 % w/v	Trichloressigsäure-Pulver
<b>TAE-Puffer (DNA-Gel-Laufpuffer) 20fach</b>	800 mM 200 mM 20 mM	Tris-HCl pH 7,5 Natrium-Acetat EDTA pH 8,0
<b>TE 10fach</b>	100 mM 10 mM	Tris-HCl pH 7,5 EDTA pH 7,5 mit HCl
<b>TBS 10fach</b>	240 mM 1.36 M 30 mM	Tris pH 7,4 (HCl) NaCl KCl H <sub>2</sub> O ad 1l
<b>Transferpuffer 10fach</b>	390 mM 480 mM 3.7 g/l	Glycin Tris pH 8,3 SDS + 20 % (v/v) Methanol in 1x Puffer
<b>TBS-Tween 20</b>	0.02 % v/v 1 x	Tween-20 TBS

## 5.1.2 Enzyme

### Restriktionsenzyme (Hersteller)

BamHI, EcoRI, HindIII, NcoI, NotI, XhoI ( Fermentas, New England BioLabs)

### Polymerasen und andere Enzyme (Hersteller)

Expand High Fidelity DNA-Polymerase, PCR System, thermostabil 3,5 U/μl (Roche)

T4-DNA Ligase, 200 CEU/μl (Fermentas)

T4-DNA Polymerase (Fermentas)

### 5.1.3 Kits und andere Materialien

<b>ECL™ Western Blotting Detection Reagents:</b>	Amersham Bioscience (Katalognummern RPN2106/8/9; RPN2209; RPN2134)
<b>High Pure PCR Product Purification Kit:</b>	Roche (Katalognummer 11732676001)
<b>Hybond™-ECL™ Nitrocellulosemembran:</b>	Amersham Bioscience (Katalognummern RPN3032d)
<b>Nucleo Spin® Plasmid Mini-Kit:</b>	Machery-Nagel (Katalognummer 740588.250)
<b>Page Ruler Prestained Protein Ladder:</b>	Thermo Scientific (Katalognummer 26616)

### 5.1.4 Geräte

	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Elektroporator	Gene Pulser II	BioRad
SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	Multiple Gel Caster, Mighty Small 250	Hoefer
Western Blot-Apparatur	Mighty Small Transfer System T22	Amersham Biosciences
Tisch-Zentrifuge, Eppendorf	Biofuge pico	Heraeus
Ultra-Zentrifuge	4K15	Sigma
PCR-Gerät	Thermocycler PTC-200	MJ Research
NanoDrop	NanoDrop 2000c	ThermoScientific
Membrandetektion	Odyssey	Licor
Agarosegelelektrophorese Apparatur	PowerPac Basic	BioRad
Agarosegel-Detektion	GelStick	Intas
Spektralphotometer	BioMate5	ThermoScience

### 5.1.5 Antikörper

<b>Primärantikörper</b>				
<b>Name</b>	<b>Hersteller-organismus</b>	<b>Katalog-nummer</b>	<b>Verhältnis</b>	<b>Herkunft</b>
$\alpha$ - $\delta$ -COP	Kaninchen		1:1000	Prof. Dr. F. Wieland
$\alpha$ -Ret2p	Kaninchen		1:1000	H.D.Schmidt
$\alpha$ -HA	Maus	H3663	1:1000	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -PDI	Kaninchen		1:1000	Dr Maya Schuldiner
$\alpha$ -PGK1	Maus	459250	1:1000	Molecular Probes

<b>Sekundärantikörper</b>			
<b>Name</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Verhältnis</b>	<b>Herkunft</b>
<b>Horseradish Peroxidase-unkonjugierter IgG</b>	323-005-021	1:5000	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
<b>IRDye 680LT Donkey anti-Mouse IgG (H+L)</b>	926-68072	1:5000	LI-COR Biosciences
<b>IRDye 680LT Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)</b>	926-68073	1:5000	LI-COR Biosciences
<b>IRDye 800CW Donkey anti-Mouse IgG (H+L)</b>	926-32212	1:5000	LI-COR Biosciences
<b>IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)</b>	926-32213	1:5000	LI-COR Biosciences

### 5.1.6 Bakterienstämme

**DH5 $\alpha$**  hdsR17 supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) recA1 endA1 gyrA96 thi 1 rela1 $\Delta$

### 5.1.7 Hefestämme

<b>Name</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Herkunft</b>
<b>KR_wt_COPD</b>	MATa, his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, YFRO51c::kanMX, pRS303COPD	In dieser Dissertation hergestellt, mit Hilfe von Dr. Arakel
<b>KM_60</b>	MATa, his3 $\Delta$ 0, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, YFRO51c::kanMX, p416RET2-1	Kai Michelsen
<b>BY4741</b>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0	EUROSCARF

### 5.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Die Primer sind jeweils nach dem zu amplifizierenden Gen-Namen benannt. Sie sind in 5'-3'-Richtung angegeben und wurde von der Firma GATC (Koblenz) hergestellt.

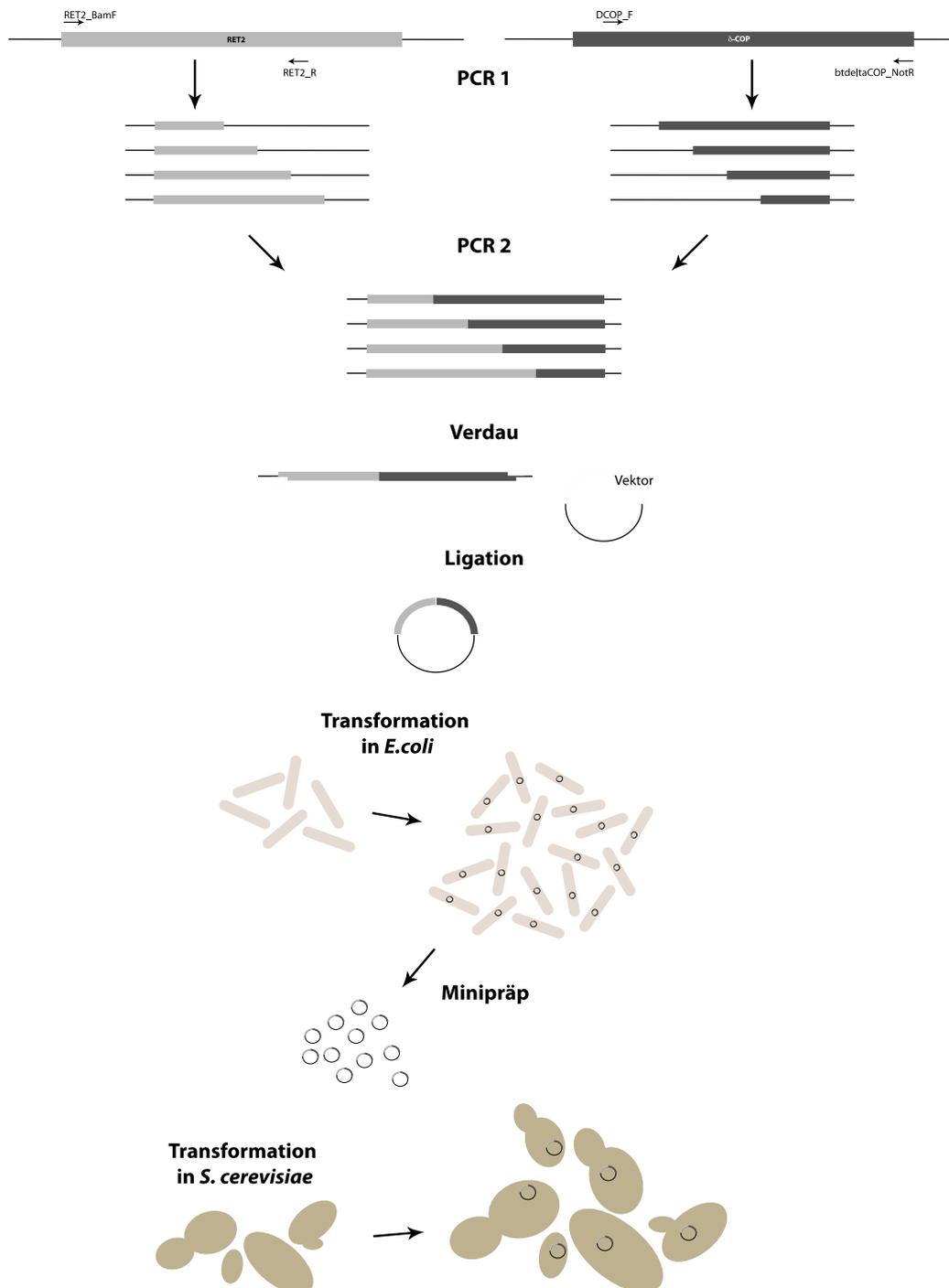
F=Vorwärtsprimer, R=Rückprimer

<b>Ret2_BamF</b>	CGCGGATCCATGGTGGTTTTGGCTGC
<b>btdeltaCOP_NotR</b>	ATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTATCTACAGAATTCATACT TATC
<b>DCOP_BamF</b>	CGCGGATCCATGGTGCTGTTGGCAGCA
<b>Ret2_NotR</b>	ATAAGAATCCGGCCGCCTATTGGACAAGATATTCATC
<b>DCOP_1F</b>	CACGTCCGCTACGTGTATCAGCCTATGGAGAAATTG
<b>Ret2_1R</b>	CAATTTCTCCATAGGCTGATACACGTAGCGGACGTG
<b>DCOP_2F</b>	CGCCGTGCTAAGGAAATTCAGCAGGCCCGAAGAGAT
<b>Ret2_2R</b>	ATCTCTTCGGGCCTGCTGAATTTCTTAGCACGGCG
<b>DCOP_3F</b>	CATCCAAACATAGATAAAAACTTTTCACTGCAGAA
<b>Ret2_3R</b>	TTCTGCAGTGAAAAGTTTTTATCTATGTTTGGATG
<b>DCOP_4F</b>	GTCATTATTGAGTATGAGCTACAAGAAGATAATTTA
<b>Ret2_4R</b>	TAAATTATCTTCTTGTAGCTCATACTCAATAATGAC
<b>Ret2_5F</b>	AGTGTGAGATATGTTTACAGGCCCTTTGATAACTAC
<b>DCOP_5R</b>	GTAGTTATCAAAGGGCCTGTAAACATATCTGACACT
<b>Ret2_6F</b>	CGTAAAGCAAAGAATTAGCTAGAAAAGAACATGAA
<b>DCOP_6R</b>	TTCATGTTCTTTTCTAGCTAATTCTTTTGCTTTACG
<b>Ret2_7F</b>	CATCCAAATGTGGATAAACAATCGTTCCTATCCACT
<b>DCOP_7R</b>	AGTGGATAGGAACGATTGTTTATCCACATTTGGATG
<b>Ret2_8F</b>	GTCAACATAGAATATGAGAGCGTCCTGGAAACAGAA
<b>DCOP_8R</b>	TTCTGTTTCCAGGACGCTCTCATATTCTATGTTGAC
<b>ERD21_Bam_F</b>	CGCGGATCCATGAATCTCTTCCGATTC
<b>ERD22_Bam_F</b>	CGCGGATCCATGAACATTTTCCGGCTG
<b>ERD23_Bam_F</b>	CGCGGATCCATGAACGTGTTCCGAATC
<b>ERD21_Not1_R</b>	ATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTATCTATGCCGGCAAAC TCAACT
<b>ERD22_Not1_R</b>	ATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTATTTATGCTGGCAAAC TGA GCTT
<b>ERD23_Not1_R</b>	ATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTATTCAGATTGGCATTGGAA GACT

### 5.1.9 Plasmide

<b>Name</b>	<b>Beschreibung/Plasmid</b>	<b>Herkunft</b>
<b>pRS303</b>	als Vektor verwendet	(Sikorski und Hieter 1989)
<b>p415</b>	als Vektor verwendet	(Mumberg et al. 1994)
<b>p416</b>	als Vektor verwendet	(Mumberg et al. 1994)
<b>BFGIII</b>	als Vektor verwendet	Anne Clancy (AG Schwappach)
<b>p415CHI1</b>	Chimär 1 in p415	diese Arbeit
<b>p415CHI2</b>	Chimär 2 in p415	diese Arbeit
<b>p415CHI3</b>	Chimär 3 in p415	diese Arbeit
<b>p415CHI4</b>	Chimär 4 in p415	diese Arbeit
<b>p415CHI5</b>	Chimär 5 in p415	diese Arbeit
<b>p415CHI6</b>	Chimär 6 in p415	diese Arbeit
<b>p415CHI7</b>	Chimär 7 in p415	diese Arbeit
<b>p415CHI8</b>	Chimär 8 in p415	diese Arbeit
<b>p415RET2</b>	RET2 in p415	diese Arbeit
<b>BFGIII CHI1</b>	Chimär 1 in BFGIII	diese Arbeit
<b>BFGIII CHI2</b>	Chimär 2 in BFGIII	diese Arbeit
<b>BFGIII CHI3</b>	Chimär 3 in BFGIII	diese Arbeit
<b>BFGIII CHI4</b>	Chimär 4 in BFGIII	diese Arbeit
<b>BFGIII CHI5</b>	Chimär 5 in BFGIII	diese Arbeit
<b>BFGIII CHI6</b>	Chimär 6 in BFGIII	diese Arbeit
<b>BFGIII CHI7</b>	Chimär 7 in BFGIII	diese Arbeit
<b>BFGIII CHI8</b>	Chimär 8 in BFGIII	diese Arbeit
<b>BFGIII RET2</b>	Ret2 in BFGIII	AG Schwappach

## 5.2 Methoden



**Abb. 14 Ablauf Klonieren.** Schematisierte Darstellung des Klonierungsvergangs mit anschließender Transformation in *S. cerevisiae*. Die Produkte der 1. PCR-Reaktion werden mit einer 2. PCR-Reaktion verbunden, anschließend wird das rekombinierte DNA-Fragment restriktionsverdaut. Es wird in einen Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Aus einzelnen Kolonien werden Plasmide präpariert und sequenziert. Bei richtiger Sequenz wird jeweils ein Klon amplifiziert und in *S. cerevisiae* transformiert.

## 5.2.1 Allgemeine DNA-Techniken

### 5.2.1.1 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Um gezielt Abschnitte aus DNA-Molekülen einzusetzen, die beispielsweise für ein bestimmtes Gen codieren, muss eine konkrete Länge an Basenpaaren aus dem gesamten Molekül geschnitten werden. Dazu werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die an bekannten Stellen, sogenannte Palindromen, das Zerschneiden des DNA-Doppelstrangs katalysieren. Nach dem Verdau können die Spaltprodukte in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und im Anschluss aufgereinigt werden.

Beim Ansetzen eines Restriktionsverdaues unterscheidet man zwischen dem PCR-Produkt-Verdau und dem Aufschneiden eines Plasmids.

Es wurden zu 2 µg Plasmid-DNA (ca. 7 – 10 kb Länge) oder PCR-Produkt, je nach Angaben des Herstellers (New England BioLabs), 1 - 1,5 Units an Enzym gegeben. BSA wurde nach Bedarf hinzugefügt. Weiterhin wurde enzym-abhängig einer von verschiedenen Puffern für Restriktionsendonukleasen verwendet. Verdaut wurde für 120 Minuten bei 37 °C. Um die Reaktion zu beenden, wurden den Proben DNA-Ladepuffer hinzugefügt und sie wurden der Größe nach auf einem Agarosegel aufgetrennt.

<b>Ansatz</b>	<b>PCR-Produkt Chimär-Klonierung</b>	<b>Vektor BFGIII</b>
<b>DNA-Moleküle</b>	50 µl PCR-Produkt	1,5 - 2,0 µg Vektor
<b>Puffer</b>	8 µl Puffer 2	2 µl Puffer 2
<b>BSA</b>	8 µl 10x BSA	2 µl 10x BSA
<b>Enzym 1</b>	1,5 µl NotI	1 µl NotI
<b>Enzym 2</b>	1,5 µl BamHI	1 µl BamHI
<b>Steriles Wasser</b>	64 µl ddH <sub>2</sub> O	10 µl ddH <sub>2</sub> O
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>80 µl</b>	<b>20 µl</b>

Tab. 7 Zusammensetzung Restriktionsverdau

### 5.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese: Auftrennung von DNA-Molekülen

Bei der Agarosegelelektrophorese wird die negative elektrische Ladung des Phosphat-Rückgrates der DNA ausgenutzt. Diese bewirkt, dass DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld zur Anode wandern und so der Größe nach aufgetrennt werden. Kleine DNA-Moleküle wandern im Geflecht des Agarosegels schneller zum Positivpol. Die Größe der Proben kann mit Hilfe

eines Längenstandards analysiert werden. Die Konzentration des Agarosegels kann dabei variiert werden: niedrige Konzentrationen eignen sich für die Aufreinigung größerer Moleküle und umgekehrt. Die Agarosegelelektrophorese wird eingesetzt, um den weiteren Verdau durch Restriktionsenzyme zu stoppen, um DNA-Fragmente zu separieren, sie später aufzureinigen und um die Ausbeute und Reinheit von DNA-Molekülen nach Aufreinigung oder PCR zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wurden einprozentige Gele benutzt, welche aus 1,5 g Agarose, 150 ml TAE-Puffer und 15 µl SafeView (färbt die DNA; die Fluoreszenz-Emission des SafeViews nach Anregung mit UV-Licht beträgt 490 nm) zusammengesetzt waren. Die Lösung wurde in der Mikrowelle für 3 Minuten bis zur vollständigen Auflösung des Pulvers erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurde die Flüssigkeit in die Form gegossen und erstarrte durch Erkalten.

Im Anschluss konnte das Gel in die Kammer gelegt und mit TAE-Puffer bedeckt werden. Die Proben wurden mit 6fach DNA-Puffer vermischt und bis zu 80 µl Volumen in die Taschen gegeben. Weiterhin wurde ein Längenstandard (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder 0,5 µg/µl von Fermentas) aufgetragen, um später die Größen vergleichen zu können. Die Laufzeit betrug ca. 50 Minuten bei einer konstanten Spannung von 200 V. Die Analyse erfolgte im Transluminator.

#### 5.2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein *In-Vitro*-Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von bestimmten Abschnitten der DNA. Die hitzestabile Taq-Polymerase benötigt als DNA-Polymerase einen Primer am Matrizenstrang, es werden hierfür zwei Oligonukleotid-Primer eingesetzt: ein Primer am 5'-Ende und einer am 3'-Ende des zu amplifizierenden Fragmentes, jeweils komplementär zu einem der beiden Stränge im Doppelstrang der Matrizen-DNA.

Im ersten Schritt, der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzung auf 95 °C aufgetrennt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagern sich die Primer durch Temperaturabsenkung an die komplementären Stränge

der Matrizen-DNA an. Dabei werden die Primer im Überschuss eingesetzt, damit sich die Matrizen-DNA nicht selbst erneut zusammenlagert. Außerdem wird die Temperatur für die Anlagerung der Primer eingestellt (Annealing-Temperatur). Im abschließenden dritten Schritt, der Elongation, kann die Taq-Polymerase durch das auf sie eingestellte Temperaturoptimum neue komplementäre Basenpaare in 5'-3'-Richtung synthetisieren. Im Anschluss wird der erste Schritt erneut wiederholt und durch wiederkehrende Anlagerung der Primer und Neusynthese der Stränge nimmt die Menge dieses DNA-Abschnitts zu. Dieser Zyklus wird so lange wiederholt, bis die gewünschte Menge an Produkt entstanden ist bzw. bis die Reaktanden aufgebraucht sind.

Ein Reaktionsansatz enthielt neben ca. 0,1 µg der DNA-Matrize 600 µM desoxygenierte Nukleotriphosphate (2,5 mM jedes Nukleotids im 10 mM Grundstock von Fermentas), 3-5 Units Polymerase (Expand High Fidelity PCR System, 10fach Puffer mit MgCl<sub>2</sub> von Roche), 10fach Polymerase Puffer, 400 nM jedes Primers und steriles Wasser zum Auffüllen. Die Primer wurden mit 30-40 Basenpaarlängen hergestellt. Diese sind etwas länger als normalerweise empfohlen, da die flankierenden Abschnitte (Restriktionsschnittstellen, chimärer Anteil) mit eingerechnet wurden. Der GC-Anteil lag bei 40-60 %.

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt angesetzt:

	<b>PCR mit einer Matrize</b>	<b>PCR mit zwei Matrizen</b>
<b>DNA/Matrize</b>	0,1 µg (4 µl)	Je 0,1 µg (je 1 µl)
<b>Primer 1</b>	10 µM (2 µl)	10 µM (2µl)
<b>Primer 2</b>	10 µM (2 µl)	10 µM (2 µl)
<b>dNTPs</b>	2,5 mM (4 µl)	25 mM (4 µl)
<b>10fach Puffer</b>	5 µl	5 µl
<b>Steriles Wasser</b>	32,5 µl	34,5 µl
<b>Enzym</b>	0,5 µl (Units)	0,5 µl (Units)
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>

Tab. 8 PCR-Protokoll

Die PCRs wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<b>Denaturierung</b>	95 °C 2:00 Minuten	
<b>Annealing</b>	95 °C 0:20 Minuten	} 25 Zyklen
	48 °C 0:30 Minuten	
	72 °C 1:30 Minuten	
<b>Elongation</b>	72 °C 2:00 Minuten	
	4 °C ∞	

#### 5.2.1.4 Aufreinigung von DNA

##### 5.2.1.4.1 Aus Agarosegelen

Möchte man die in der Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennten DNA-Moleküle weiter verwenden, müssen sie aus dem Gel entnommen und von der Agarose gereinigt werden.

Es wurde dazu das „Roche High Pure PCR Product Purification Kit“ (siehe Kapitel 5.1.3) und das empfohlene Protokoll verwendet, in welchem man zunächst durch Erhitzung der Gelstücke auf 55 °C die Agarose zum Schmelzen bringt. Im Anschluss wurden die Proben auf eine Silica-Matrix aufgetragen und nach Waschschritten durch einen Puffer mit geringer Salzkonzentrationen eluiert.

##### 5.2.1.4.2 Aus PCR-Produkten und Verdau

PCR- und Verdau-Produkte enthalten nach Ende des Reaktionszeitraums noch Substanzen, die die DNA verunreinigen. Dazu gehören z.B. dNTPs, Primer, Enzyme, oder Puffer-Ionen. Um die DNA davon zu trennen, müssen auch diese Proben aufgereinigt werden. Auch hierfür wurde das „Roche High Pure PCR Product Purification Kit“ (siehe Kapitel 5.1.3) verwendet.

##### 5.2.1.5 Ligation von DNA

Neben PCR-Reaktionen und Restriktionsverdau stellt die Ligation von DNA eine weitere wichtige molekularbiologische Methode dar. Sie wird verwendet,

um zwei DNA-Fragmente, z.B. einen Vektor und einen mittels PCR vermehrten und mit Restriktionsendonukleasen verdauten DNA-Abschnitt zu einer Einheit zu verknüpfen.

Ein 30 µl Ansatz beinhaltete 200-300 ng linearisierten Vektor, die drei- bis zehnfache molare Menge an linearisiertem Insert, 1-2 Units T4-DNA-Ligase (Fermentas), 10fach T4-Ligations-Puffer und steriles Wasser zum Auffüllen. Die Kontrolle diente der Bestimmung des Hintergrunds, beruhend z.B. auf unvollständig geschnittenem Vektor.

	<b>Ligation</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>Vector</b>	200-300 ng (6 µl)	200-300 ng
<b>Insert/Einlage</b>	4 µl	-
<b>10fach T4 Puffer</b>	3 µl	3 µl
<b>Steriles Wasser</b>	16,5 µl	20,4 µl
<b>T4-Ligase</b>	0,5 µl	0,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>

Tab. 9 Ligationsprotokoll

Die Ligation fand in folgenden Schritten statt:

18 °C	16 Stunden
65 °C	10 Minuten
4 °C	∞

#### 5.2.1.6 Elektroporation: Transformation von Bakterienzellen

Elektroporation ist ein Verfahren zum Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Dabei wird die Membran des E.coli-Bakteriums vorübergehend permeabel gemacht, um der DNA den Zugang zu ermöglichen. Bakterienzellen, die ein Plasmid aufgenommen haben, werden auf einer Agarplatte mit einem Selektivmedium (z.B. ein Antibiotikum enthaltend) selektioniert. Durch das anschließende Wachstum der Kolonie kann mit Hilfe einer sogenannten Minipräparation Plasmid-DNA gewonnen werden.

Es wurde 2,3 µl des Ligationsansatzes in 50 µl DH5α kompetente Zellen (siehe Kapitel 5.1.6) gegeben und vermischt. Unter Vermeidung von

Bläschenbildung wurden 45 µl entnommen und in eine vorgekühlte Küvette gegeben. Das Elektroporationsgerät war auf 25 µF und 2,5 kV kalibriert. Der Stromstoßprüfer wurde auf 400 Ω eingestellt. Es wurde ein Stromstoß ausgelöst. Gleich im Anschluss wurde die Lösung in 1 ml bei 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium (siehe Kapitel 5.1.1) zur Regeneration der Bakterien gegeben. Die Bakterien wurden für 30 Minuten bei 37 °C ruhen gelassen, abzentrifugiert und anschliessend auf selektiven LB-Agar-Platten (minus Ampicillin) ausgestrichen. Das Wachstum der Zellen dauerte ca. 12 Stunden bei 37 °C.

#### 5.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (Minipräparation)

Die auf Selektivmedium gewachsenen Kolonien wurden in Flüssigmedium geimpft und bei 37 °C inkubiert um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen. Im Anschluss wurde eine Plasmidpräparation/Minipräparation durchgeführt. Dazu wurde das „Nucleo Spin® Plasmid Mini-Kit“ von Machery-Nagel (siehe Kapitel 5.1.3) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

#### 5.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Mit dem „NanoDrop“-Gerät der Firma ThermoScientific (siehe Kapitel 5.1.4) wurde die Extinktion der von DNA-Proben gemessen. Die DNA-Konzentration ( $c$ ) der Proben wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$E = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_\lambda \times c \times d$$

(E: Extinktion;  $I_1$ : Intensität des transmittierten Lichtes;  $I_0$ : Intensität des einfallenden Lichtes;  $c$ : Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz,  $\varepsilon$ : dekadischer Extinktionskoeffizient,  $d$ : Schichtdicke der Küvette)

Der Quotient der Extinktionen  $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$  wurde verwendet, um die Reinheit der DNA-Proben von Proteinen zu überprüfen.

### 5.2.1.9 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, HRB 381757) durchgeführt und nach der Technik von Sanger durchgeführt (Sanger und Coulson 1975).

## 5.2.2 Allgemeine Proteinbiochemie-Methoden

### 5.2.2.1 Zelldichte bei Hefezellen

Die Zelldichte von Hefe wurde im Spektralphotometer (siehe Kapitel 5.1.4) gemessen.

Die optische Dichte (OD) gibt die Dichte von Zellen in einem flüssigen Medium an, die bei 600 nm gemessen wurde ( $OD_{600}$ ). Es wird die Extinktion unabhängig von der Schichtdicke angegeben.

### 5.2.2.2 Alkalische Natriumhydroxid-Lyse von Zellen

Zur Herstellung eines Proteinextraktes mit allen zellulären Proteinen musste die Zelle lysiert werden. Durch Zugabe einer alkalischen Lösung werden die Zellmembran und andere Organellen aufgebrochen, und der Inhalt der Zelle wird frei. Die Natriumhydroxid (NaOH)-Lyse wurde für alle Proben angewendet, die auf einem SDS-Gel aufgetragen wurden.

Die aufzutragenden Zellen wurden bei 13,000 Upm herunterzentrifugiert (Tischzentrifuge, siehe Kapitel 5.1.4) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200  $\mu$ l 100 mM Natriumhydroxid-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Probe erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die dadurch lysierten Zellen wurden mit SDS-Ladepuffer (siehe Kapitel 5.1.1) vermischt.

### 5.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein analytisches Verfahren der Proteinbiochemie (Laemmli 1970). Das Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe und Ladung beruht auf dem

Prinzip des Molekularsieb- und des Konzentrierungseffekts. Die drei Komponenten des Elektrophoresesystems sind:

- Sammelgel (siehe Tabelle 10): große Poren, pH 6,8; hier wird die Probe konzentriert
- Trenngel (siehe Tabelle 10): kleine Poren, pH 8,8; hier wird die Probe nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (Wandergeschwindigkeit verringert sich mit zunehmendem Molekulargewicht)
- Elektrodenpuffer: incl. Glycin, Chlorid-Ionen

Nach Anfärben mit SDS-Ladepuffer (siehe Kapitel 5.1.1) wandern die negativ geladenen Proteine durch das Anlegen von Spannung zum positiven Pol. Auch die Chlorid-Ionen bewegen sich als Leitonen mit hoher Mobilität zur Anode. Bei einem pH-Wert von 6,8 liegen die Glycin-Ionen als Zwitterionen vor und bewegen sich als Folgeionen kaum. Die Proteine reihen sich zwischen diesem sich ergebenden Spannungsgradienten auf.

Erreichen die Moleküle das Trenngel, ändert sich durch den erhöhten pH-Wert von 8,8 die Ladung des Glycins: es liegt jetzt vollständig dissoziiert vor. Das Glycin ist nun negativ geladen und überholt die Proteine beim Laufen durch das Trenngel. Die engeren Poren des Trenngels lassen die Proteine je nach Molekulargewicht durchwandern. Abschließend findet man kleine Proteine am Ende des Gels und große Proteine in der Nähe des Sammel-/Trenngelübergangs.

Essenzieller Bestandteil der SDS-PAGE ist die Anwesenheit von Natriumduodecylsulfat. SDS bindet mit 1,4 g SDS/g Protein an die Proteinmoleküle und die Menge an SDS bindet damit linear zum Molekulargewicht. Zwar sind die Proteine negativ geladen, durch das dissoziiert vorliegende und gebundene SDS wird diese aber vernachlässigbar klein. Die Proteine wandern demnach entsprechend der Negativladung des SDS und nicht der eigenen Ladung nach zur Anode. Außerdem wirkt SDS denaturierend und trägt zur Freilegung der Primärstruktur für bessere Vergleichbarkeit bei. SDS-PAGE wird daher nur für die Bestimmung der Proteingröße von Proteinuntereinheiten verwendet und nicht für multimere Proteinkomplexe.

Die Glasplatten wurden vor jedem Gebrauch gewaschen, mit Ethanol gereinigt und in der Kammer zusammengesetzt. Mit destilliertem Wasser wurde ein Test auf Dichtheit durchgeführt.

Soweit nicht anderweitig erwähnt, wurden 12 %-Gele nach folgendem Protokoll gegossen (für 4 Gele):

	<b>Sammelgel (ml)</b>	<b>Trenngel (ml)</b>
<b>Steriles Wasser</b>	2,1	6,6
<b>30 % Acrylamid</b>	0,5	8,0
<b>1,5 M HCl-Tris-Puffer</b>	0,38 (pH 6,8)	5,0 (pH 8,8)
<b>10 % SDS</b>	0,03	0,2
<b>10 % APS</b>	0,03	0,2
<b>TEMED</b>	0,003	0,008

**Tab. 10 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele**

Nachdem zuerst das Trenngel zusammengemischt und je 3,5 ml zwischen die Glasplatten gegossen wurde, benötigte es ca. 45 Minuten, um zu polymerisieren. Für einen glatten Rand wurde die Oberkante mit 100 % Isopropanol bedeckt. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und durch mehrmaliges Spülen mit sterilem dessen absolute Abwesenheit sichergestellt. Das Sammelgel wurde zusammengemischt und 1 ml auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Ein Kamm für die Taschen wurde eingesetzt und das Polymerisieren wurde abgewartet.

Die Proben wurden mit 5fachen SDS-Ladepuffer vermischt und je nach Taschenmenge und -größe wurden bis zu 15 µl der Probe aufgetragen. Falls nicht anders erwähnt, wurde dem SDS-Ladepuffer zuvor 100 mM (Endkonzentration) hinzugefügt, um intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zu spalten. Als Längenstandard wurde die "Page Ruler Prestained Protein Ladder" von ThermoScientific (siehe Kapitel 5.1.3) verwendet. Während sich die Proteine im Sammelgel befanden, lag die Spannung bei 15 mA pro Gel (ca. 15 Minuten). Bei der Wanderung der Moleküle durch das Trenngel wurde der Strom auf 30 mA pro Gel erhöht (ca. 45 Minuten).

#### 5.2.2.4 Western Blot und Antikörper-Detektion

Die Western Blot-Detektion ermöglicht die Analyse der im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine. Dabei ist eine spezifische Erkennung und Visualisierung von Proteinen möglich.

Das Gel wird nach Abschluss der Elektrophorese in Transferpuffer (siehe Kapitel 5.1.1) gelegt. Danach wird ein Stapel aus Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel und wieder Filterpapier gebaut. Dieser wird mit Transferpuffer getränkt und umgeben und in eine Kammer eingeklemmt. Nach Anlegen einer Spannung wandern die Proteine vom Gel durch die Anziehung vom Pluspol auf die Membran. Diese Membran besteht aus hydrophobem Material und hat dadurch eine hohe und stabile Bindungskapazität, die für Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen interessant ist.

Nach Abschluss des Blottens wird die Proteinanwesenheit auf der Membran durch Ponceau-Färbung (siehe Kapitel 5.1.1) bestätigt. Die Membran wird dann in Blocklösung gelegt, damit alle nicht von Proteinen besetzten Flächen blockiert werden. Im Anschluss wird die Membran mit einer Primär-Antikörperlösung inkubiert, welche sich spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet. Nach einem Waschgang wird der Sekundär-Antikörper aufgetragen, welcher unter Fluoreszenz leuchtet und somit die Proteinbanden in einem Fluoreszenz-Scanner sichtbar macht.

Für das Western Blotting wurde die „Mighty Small Transfer System T22“-Kammer von Amersham Biosciences (siehe Kapitel 5.1.4) verwendet. Die Gele wurden auf Nitrocellulose-Membran gelegt und für 60 Minuten bei 500 mA, 60 V geblottet. Die Membran lag für 12 Stunden in der Blocking-Lösung (siehe Kapitel 5.1.1) aus Magermilchpulver. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Kapitel 5.1.5 aufgelistet. Als Ladekontrolle wurde – soweit nicht anders beschrieben – immer ein Antikörper gegen das Glykolyse-Enzym Phosphoglycerat-Kinase ( $\alpha$ -PGK1, 1:1000) verwendet. Die Inkubation für die Primärantikörper betrug 1,5 Stunden, der 1. Waschgang erfolgte in Blocklösung für 3 x 7 Minuten. Der Sekundärantikörper blieb für 60 Minuten auf der Membran und der 2. Waschgang erfolgt mit TBS-Tween 20 (siehe Kapitel 5.1.1), für 5 x 5 Minuten. Um Bakterienwachstum in der

Antikörper-Lösung zu verhindern, wurde diese mit 200 mM Natrium-Acid versetzt.

### 5.2.3 Experimente mit Hefe

#### 5.2.3.1 Transformation von Hefezellen

Um DNA in Hefezellen einzubringen, muss diese transformiert werden. Dafür wird der Stamm über Nacht in 4 ml Flüssigmedium bei 30 °C inkubiert. Die Dauer ist dabei anhängig von den Eigenschaften des Stamms als auch davon, dass die Kultur zum Zeitpunkt der Verwendung eine  $OD_{600}$  0,5 – 1,2 haben sollte (mittleres bis spätes logarithmisches Wachstum). Dazu kann die Kultur vor Verwendung noch einmal auf  $OD_{600}$  0,2 verdünnt und für 3 Stunden inkubiert werden.

5 ml der Zellen wurden bei 2000 Upm für 5 Minuten abzentrifugiert und in 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Der Niederschlag wurde in 200 µl Lithium-Acetat-Mix (siehe Kapitel 5.1.1) resuspendiert. Nun wurden 0,5 – 1,0 µg DNA und 18 µl Carrier-DNA (10 mg/ml, vorgekocht) hinzugefügt. Das Gemisch wurde gevortext und 1,2 ml PEG-Lösung hinzugegeben. Nun wurden die Probengefäße für 45 Minuten bei Raumtemperatur und im Anschluss für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nachdem erneut abzentrifugiert (10000 Upm) wurde, wurde der Überstand entfernt. Das Zell-Pellet wurde in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf selektiven Platten ausgestrichen. Die Platten werden bei 30 °C und je nach Stamm für 2-3 Tage für das Wachstum inkubiert.

#### 5.2.3.2 Kar2-Sekretionsassay

Mit dem Sekretionsassay ist es möglich, sekretierte Proteine zu detektieren, die von der Zelle in den Extrazellularraum abgegeben werden.

Dies wurde benutzt, da die Transportmaschinerie, welche COPI und den KDEL-Rezeptor involvieren, nachweislich im nicht intakten Zustand Proteine sekretieren. Um den Zustand des KDEL-Rezeptor abhängigen Retrievals und damit der COPI-abhängigen Transportmaschinerie zu untersuchen, wurde der Sekretionsassay eingesetzt, da bekannt ist, dass Störungen in diesem

System zu einer Sekretion von KDEL-tragenden Proteinen in den Extrazellulärraum führen.

Das Ausmaß der Sekretion kann auf die eingesetzte Zellmenge und die Menge an zellulärem Gesamtprotein normalisiert werden. Damit ist das Ausmaß des Schadens im KDEL-Retrieval oder der COPI-Maschinerie im Stamm gut nachweisbar.

Als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden  $\Delta$ ERD1 und BY4741 benutzt. Dabei stellt BY4741 einen normalen Wildtyp-Stamm dar und  $\Delta$ ERD1 einen stark gestressten Zellstamm, in welchem der KDEL-Rezeptor vollständig fehlt (Auer 2008).

Um die Proben vergleichen zu können, wurden sie auf die maximale Sekretion des  $\Delta$ ERD1-Stamms normalisiert. Die Proben wurden auf die maximale Sekretion des  $\Delta$ ERD1-Stamms normalisiert, um sie vergleichbar zu machen.

Da gleiche Zellmengen in den Proben des Sekretionsassays wichtig sind, wurden die Proben, nachdem sie über Nacht in 4 ml Selektivmedium bei 30 °C gewachsen waren, am Morgen verdünnt. Dafür wurde Vollmedium YPAD benutzt. Im ersten Schritt wurde die Kultur auf eine  $OD_{600}$  von 0.5 verdünnt. Dazu wurde die Menge an Zellen berechnet und auf 5 ml YPAD aufgefüllt. Zur Zellzahlverdopplung wurde die Probe für 2 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 4 ml der Zellkultur pelletiert und in 10 ml sterilem Wasser gewaschen. Der Rückstand wurde anschließend mit einer Menge an YPAD resuspendiert, sodass als Resultat eine  $OD_{600}$  1,0 vorlag.

Nach erneutem Wachstum für 1,5 Stunden bei 30 °C wurde die gleiche Zellzahl bei allen Proben erreicht.

Anschließend wurden 1,5 ml der Kulturen abzentrifugiert. Proteine aus 1,35 ml des Überstands wurden in einem neuen Röhrchen mit TCA (siehe Kapitel 5.1.1) präzipitiert und mit Aceton gewaschen. Vorbereitend für das Auftragen auf das SDS-PAGE-Gel wurde die Probe mit SDS-Ladepuffer vermischt. Dabei konnte es aufgrund des niedrigen pH-Wertes zu einer Gelbfärbung der Lösung kommen. Es wurden 10  $\mu$ l HCl-Tris-Puffer, pH 8,8 hinzugefügt. Der Rückstand wurde in NaOH gelöst und ebenfalls mit DNA-Ladepuffer vermischt. Die Proben wurden auf ein 12 %-iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen

und die Sekretionsmenge von bestimmten KDEL-tragenden Proteinen (Pdi1, Kar2) mit Hilfe eines Western Blots analysiert.

## 6 Literaturverzeichnis

### Zeitschriften

Aoe T, Cukierman E, Lee A, Cassel D, Peters P, Hsu V (1997): The KDEL receptor, ERD2, regulates intercellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *EMBO J* 16, 7305-7316

Arakel E: COPI-based quality control of native ATP sensitive potassium channels. PhD Diss. Manchester 2011

Aridor M, Bannykh S, Rowe T, Balch, W (1995): Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol* 131, 875-893

Assoum M, Salih MA, Drouot N, H'Mida-Ben Brahim D, Lagier-Tourenne C, AIDrees A, Elmalik SA, Ahmed TS, Seidahmed MZ, Kabiraj MM, Koenig M (2010): Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia. *Brain* 133, 2439-2447

Auer T: Regulation of the GET Pathway for the insertion of tail-anchored membrane proteins. Bachelorarbeit, Heidelberg 2008

Barnett J (2003): Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology* 6, 557-567

Béthune J, Kol M, Hoffmann J, Reckmann I, Brügger B, Wieland F (2006 a): Coatamer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Mol Cell Biol* 26, 8011-8021

Béthune J, Wieland F, Moelleken J (2006 b): COPI-mediated transport. *J Membr Biol* 211, 65-79

Bigay J, Gounon P, Robineau S, Antony B (2003): Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* 426, 563-566

Cabrera M, Muniz M, Hidalgo J, Vega L, Martín M, Velasco A (2003): The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol Biol Cell* 14, 4114-4125

Chardin P, Paris S, Antony B, Robineau S, Béraud-Dufour S, Jackson CL, Chabre M (1996): A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384, 481-484

Corsi A, Schekman R (1996): Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271, 30299-30302

- Cosson P, Letourneur F (1994): Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263, 1629-1631
- Cosson P, Lefkir Y, Démollière C, Letourneur F (1998): New COP1-binding motifs involved in ER retrieval. *EMBO J* 17, 6863-6970
- Cukierman E, Huber I, Rotman M, Cassel D (1995): The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* 270, 1999-2002
- D'Esposito M, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, Esposito T, Flagiello L, Mazzarella R, Schlessinger D, D'Urso M (1996): A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nat Genet* 13, 227-229
- Donaldson J, Cassel D, Kahn R, Klausner R (1992): ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6408
- Duden R, Griffiths G, Frank R, Argos P, Kreis T. (1991): Beta-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell* 64, 649-665
- Edeling M, Smith C, Owen D (2006): Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 32-44
- Ellgaard L, Helenius A (2003): Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999): Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888
- Eugster A, Frigerio G, Dale M, Duden R (2000): COPI domains required for coatamer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J* 19, 3905-3917
- Eugster A, Frigerio G, Dale M, Duden R (2004): The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct dilysine motifs. *Mol Biol Cell* 15, 1011
- Faini M, Prinz S, Beck R, Schorb M, Riches JD, Bacia K, Brügger B, Wieland FT, Briggs JA (2012): The structures of COPI-coated vesicles reveal alternate coatamer conformations and interactions. *Science* 336, 1451-1454
- Fath S, Mancias J, Bio X, Goldberg J (2007): Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* 129, 1325-1336
- Fiedler K, Veit M, Stamnes M, Rothman J (1996): Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* 273, 1396
- Filippini F, Rossi V, Galli T, Budillon A, D'Urso M, D'Esposito M (2001): Longins: a new evolutionary conserved VAMP family sharing a novel SNARE domain. *Trends Biochem Sci* 26, 407-409

- Fotin A, Cheng Y, Sliz P, Grigorieff N, Harrison SC, Kirchhausen T, Walz T (2004): Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 432, 573-579
- Franco M, Chardin P, Chabre M, Paris S (1996): Myristoylation-facilitated Binding of the G Protein ARF1 to Membrane Phospholipids Is Required for Its Activation by a Soluble Nucleotide Exchange Factor. *J Biol Chem* 271, 1573
- Galli T, Zahraoui A, Vaidyanathan VV, Raposo G, Tian JM, Karin M, Niemann H, Louvard D (1998): A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane proteine in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9, 1437-1448
- Gething MJ, Sambrook J (1992): Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45
- Gillingham A, Munro S (2007): The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 579
- Goldberg J (2000): Decoding of sorting signals by coatomer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell* 100, 671-679
- Hamada H, Suzuki M, Yuasa S, Mimura N, Shinozuka N, Takada Y, Suzuki M, Nishino T, Nakaya H, Koseki H, Aoe T (2004): Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Biol Cell* 18, 8007-8017
- Hammond C, Helenius A (1995): Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7, 523-529
- Hara-Kuge S, Kuge O, Orci L, Amherdt M, Ravazzola M, Wieland FT, Rothman JE (1994): En bloc incorporation of coatomer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J Cell Biol* 124, 883-892
- Harter C, Wieland F (1998): A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11649
- Heldwein EE, Macia E, Wang J, Yin HL, Kirchhausen T, Harrison SC (2004): Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14108
- Henderson M, Richie C, Airavaare M, Wang Y, Harvey B (2013): Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. *J Biol Chem* 288, 4209-4225
- Herrmann J, Malkus P, Schekman R (1999): Out of the ER--outfitters, escorts and guides. *Trends Cell Biol* 9, 5-7
- Heusser K, Yuan H, Neagoe I, Tarasov A, Ashcroft F, Schwappach B (2006): Scavenging of 14-3-3 proteins reveals their involvement in the cell-surface transport of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Cell Sci* 119, 4353-4363

- Hiller M, Finger A, Schweiger M, Wolf D (1996): ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728
- Hong W (2005): SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* 1744, 493-517
- Hsia K, Hoelz A (2010): Crystal structure of alpha-COP in complex with epsilon-COP provides insight into the architecture of the COPI vesicular coat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11271
- Hurtley S, Helenius A (1989): Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Dev Biol* 5, 277-307
- Jackson M, Nilsson T, Peterson P (1990): Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 9, 3153-3162
- Jeans AF, Oliver PL, Johnson R, Capogna M, Vikman J, Molnár Z, Babbs A, Partridge CJ, Salehi A, Bengtsson M, Eliasson L, Rorsman P, Davies KE (2007): A dominant mutation in Snap25 causes impaired vesicle trafficking, sensorimotor gating, and ataxia in the blind-drunk mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (7), 2431-2436
- Kahn R, Kern F, Clark J, Gelmann E, Rulka C (1991): Human ADP-ribosylation factors. A functionally conserved family of GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 266, 2606-2614
- Kirchhausen T (2000): Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 187-198
- Krauss M, Jia JY, Roux A, Beck R, Wieland FT, De Camilli P, Haucke V (2008): Arf1-GTP-induced tubule formation suggests a function of Arf family proteins in curvature acquisition at sites of vesicle budding. *J Biol Chem* 283, 27717-27723
- Kühn M, Schekman R (1997): COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr Opin Cell Biol* 9, 477-483
- Laemmli U (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lanoix J, Ouwendijk J, Stark A, Szafer E, Cassel D, Dejgaard K, Weiss M, Nilsson T (2001): Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J Cell Biol* 155, 1199-1212
- Lee C, Goldberg J (2010): Structure of coatamer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell* 142, 1-10
- Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Démollière C, Duden R, Emr SD, Riezman H, Cosson P (1994): Coatamer is essential for retrieval of dilysin-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79, 1199-1207

- Levine T, Daniels R, Wong LH, Gatta A, Gerondopoulos A, Barr FA (2013): Discovery of new Longin and Roadblock domains that form platforms for small GTPases in Ragulator and TRAPP-II. *Methods Enzymol* 4, 62-69
- Lewis M, Pelham H (1990): A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348, 162-163
- Lewis M, Pelham H (1992 a): Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68, 353-364
- Lewis M, Pelham H (1992 b). Sequence of a second human KDEL receptor. *J Mol Biol* 226, 913-6
- Lewis M, Sweet D, Pelham H (1990): The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* 61, 1359-1363
- Liu Y, Kahn R, Prestegard J (2009): Structure and membrane interaction of myristoylated ARF1. *Structure* 17, 79-87
- Lotti L, Torrisi M, Erra M, Bonatti S (1996): Morphological analysis of the transfer of VSV ts-045 G glycoprotein from the endoplasmic reticulum to the intermediate compartment in vero cells. *Exp Cell Res* 227, 323-331
- Lowe M, Kreis T (1995): In vitro assembly and disassembly of coatomer. *J Biol Chem* 270, 31364
- Lowe M, Kreis T (1996): In vivo assembly of coatomer, the COP-I coat precursor. *J Biol Chem* 271, 30725
- Ma D, Jan L (2002): ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr Opin Neurobiol* 12, 287-292
- Malhotra V, Serafini T, Orci L, Shepherd J, Rothman J (1989): Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* 58, 329-336
- McNew JA, Sogaard M, Lampen NM, Machida S, Ye RR, Lacomis L, Tempst P, Rothman JE, Söllner TH (1997): Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport. *J Biol Chem* 272, 17776-17783
- Michelsen K, Yuan H, Schwappach B (2005): Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep* 6, 717-722
- Michelsen K, Mrowiec T, Duderstadt KE, Frey S, Minor DL, Mayer MP, Schwappach B (2006): A multimeric membrane protein reveals 14-3-3 isoform specificity in forward transport in yeast. *Traffic* 7, 903-916
- Michelsen K, Schmid V, Metz J, Heusser K, Liebel U, Schwede T, Spang A, Schwappach B (2007): Novel cargo-binding site in beta and delta subunits of coatomer. *J Cell Biol* 179, 209-217

- Mumberg D, Müller R, Funk M (1994): Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* 22, 5767-5768
- Munro S, Pelham H (1987): A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907
- Murshid A, Presley J (2004): ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell Mol Life Sci* 61, 133-145
- Nickel W, Sohn K, Bünning C, Wieland F (1997): p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11393-11398
- Nilsson T, Warren G (1994): Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 6, 517-521
- Palade G (1975): Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358
- Palmer D, Helms J, Beckers C, Orci L, Rothman J (1993): Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem* 268, 12083
- Pavel J, Harter C, Wieland F (1998): Reversible dissociation of coatamer: Functional characterization of a beta/delta-coat protein subcomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2140
- Pfeffer S, Rothman J (1987): Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem* 56, 829-852
- Popoff V, Adolf F, Brügger B, Wieland F (2011): COPI budding within the golgi stack. *Perspect Bio Med* 3
- Pucadyil T, Schmid S (2009): Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science* 325, 1217
- Rapoport T, Matlack K, Plath K, Misselwitz B, Staeck O (1999): Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* 380, 1143-1150
- Raykhel I, Alanen H, Salo K, Jurvansuu J, Nguyen VD, Latva-Ranta M, Ruddock L (2007): A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* 179, 1193-1204
- Reinhard C, Harter C, Bremser M, Brügger B, Sohn K, Helms JB, Wieland F (1999): Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1224-1228
- Reinhard C, Schweikert M, Wieland F, Nickel W (2003): Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8253

- Rossi V, Banfield DK, Vacca M, Dietrich LE, Ungermann C, D'Esposito M, Galli T, Filippini F (2004): Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators. *Trends Biochem Sci* 29, 682-688
- Rothman J (1994): Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55
- Sacher M, Stone S, Ferro-Novick S (1997): The synaptobrevin-related domains of Bos1p and Sec22p bind to the syntaxin-like region of Sed5p. *J Biol Chem* 272 (27), 17134-17138
- Sanger F, Coulson A (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94, 441-448
- Scales S, Pepperkok R, Kreis T (1997): Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* 90, 1137-1148
- Schäfer IB, Hesketh GG, Bright NA, Gray SR, Pryor PR, Evans PR, Luzio JP, Owen DJ (2012): The binding of Varp to VAMP7 traps VAMP7 in a closed, fusogenically inactive conformation. *Nat Struct Biol* 19, 1300-1309
- Scheel A, Pelham H (1997): Identification of amino acids in the binding pocket of the human KDEL receptor. *J Biol Chem* 273, 2467-2472
- Schekman R, Orci L (1996): Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271, 1526
- Schledzewski K, Brinkmann H, Mendel R (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 coatamer COPI. *J Mol Evol* 48, 770-778
- Schlossman D, Schmid S, Braell WR (1984): An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol* 99, 723
- Schmid S (1997): Clathrin-coated vesicle formation and protein-sorting: an integrated process. *Biochemistry* 66, 511
- Schuldiner M, Collins SR, Thompson NJ, Denic V, Bhamidipati A, Punna T, Ihmels J, Andrews B, Boone C, Greenblatt JF, Weissman JS, Krogan NJ (2005): Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507-519
- Semenza J, Hardwick K, Dean N, Pelham H (1990): ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61, 1349-1357
- Serafini T, Stenbeck G, Brecht A, Lottspeich F, Orci L, Rothman JE, Wieland FT (1991): A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature* 349, 215-220
- Sherman F (2002): Getting Started with Yeast. *Methods Enzymology* 350, 3-41

- Shih W, Gallusser A, Kirchhausen T (1995): A clathrin-binding site in the hinge of the beta-2 chain of mammalian AP-2 complexes. *J Biol Chem* 270, 31083
- Sikorski R, Hieter P (1989): A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *S. cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27
- Singh P, Tang B, Wong S, Hong W (1993): Transmembrane topology of the mammalian KDEL receptor. *Mol Cell Biol* 13, 6435-6441
- Sohn K, Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Bremser M, Lottspeich F, Fiedler K, Helms JB, Wieland FT (1996): A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatamer binding. *J Cell Biol* 135, 1239
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1993): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324
- Stagg SM, Gürkan C, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, Carragher B, Balch WE (2006): Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* 439, 234-238
- Stagg SM, LaPointe P, Razvi A, Gürkan C, Potter CS, Carragher B, Balch WE (2008): Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* 134, 474-484
- Stamnes MA, Craighead MW, Hoe MH, Lampen N, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE (1995): An integral membrane component of coatamer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8011-8015
- Stenmark H (2009): Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-525
- Takagi M, Ishii T, Barnes AM, Weis M, Amano N, Tanaka M, Fukuzawa R, Nishimura G, Eyre DR, Marini JC, Hasegawa T (2012): A novel mutation in LEPRE1 that eliminates only the KDEL ER- retrieval sequence causes non-lethal osteogenesis imperfecta. *PLOS Biol* 7
- Tanigawa G, Orci L, Amherdt M, Ravazzola M, Helms J, Rothman J (1993): Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* 123, 1365-1371
- Townsley F, Wilson D, Pelham H (1993): Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J* 12, 2821-2829
- Trahey M, Hay J (2010): Transport vesicle uncoating: it's later than you think. *F1000 Biol Rep* 2, 47
- Vivona S, Corey W, Strop P, Rossi V, Filippini F, Brunger A (2010): The longin SNARE VAMP7/TI-VAMP adopts a closed conformation. *J Bio Chem* 285, 17965-17973

- Wang P, Li B, Zhou L, Fei E, Wang G (2011): The KDEL receptor induces autophagy to promote the clearance of neurodegenerative disease-related proteins. *Neuroscience* 190, 43-55
- Waters M, Serafini T, Rothman J (1991): 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 349, 248-251
- Watson P, Frigerio G, Collins B, Duden R, Owen D (2004): Gamma-COP appendage domain - structure and function. *Traffic* 5, 79-88
- Werner E, Brodsky J, McCracken A (1996): Proteasom-dependent endoplasmatic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13797-13801
- Wilson D, Lewis M, Pelham H (1993): pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J Biol Chem* 268, 7465-7466
- Wu W, Erickson J, Lin R, Cerione R (2000): The gamma-subunit of the coatomer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature* 405, 800-804
- Xu X, Kedlaya R, Higuchi H, Ikeda S, Justice MJ, Setaluri V, Ikeda A (2010): Mutation in archain 1, a subunit of COPI coatomer complex, causes diluted coat clor and Purkinje cell degeneration. *PLoS Genetics* 6
- Yoshihisa T, Barlowe C, Schekman R (1993): Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* 259, 1466
- Yu W, Lin J, Jin C, Xia B (2009): Solution structure of human zeta-COP: direct evidences for structural slmilarity between COPI and clathrin-adaptor coats. *J Mol Biol* 386, 903-912
- Yuan H, Michelsen K, Schwappach B (2003): 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* 13, 638-646
- Zerangue N, Schwappach B, Jan Y, Jan L (1999): A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537-548
- Zhao L, Helms JB, Brügger B, Harter C, Martoglio B, Graf R, Brunner J, Wieland FT (1997): Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4418-4423
- Zhao X, Lasell T, Melancon P (2002): Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distince functions in protein traffic. *Mol Biol Cell* 13, 119
- Zolov S, Lupashin V (2005): Cog3g depletion blocks vesicle mediated Golgi retrograde rafficking in HeLa Cell. *J Cell Biol* 168, 747

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Blanche Schwappach für alle ihre Mühe danken, die zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen hat. Angefangen hat der Prozess mit einem ermutigenden Praktikum, daraufhin folgte die Zuteilung einer spannenden, relevanten und lösbaren Fragestellung. Prof. Schwappach stand mir während meiner Zeit im Labor jederzeit zur Verfügung und hat bei großen wie bei kleinen Problemen ausgeholfen. Im Prozess des Schreibens war sie meine wichtigste Ansprechperson, und ich danke ihr für die vielen Gespräche, die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Während meiner praktischen Tätigkeiten im Labor sind zwei Personen besonders hervorzuheben, denen ich meinen tiefsten Dank aussprechen möchte: mein Betreuer Dr. Eric Arakel, der mir vom ersten Tag an mit endloser Geduld und viel Rat und Tat zur Seite stand und Anne Clancy, die jede noch so kleine Frage schnellstmöglich beantwortete. Diese beiden Personen haben mich im täglichen Prozess der Experimente begleitet, und ich danke ihnen sowohl für die wundervolle Betreuung als auch ihre Zuarbeit.

Ein herzlicher Dank gilt auch meiner restlichen Arbeitsgruppe – Olga, Fabio, Markus, Kerstin, Lena und Ketan – die mich im Arbeitsalltag und in den Pausen unterstützt haben.

---