

Aus dem Institut für Molekularbiologie  
(Prof. Dr. rer. nat. B. Schwappach-Pignataro)  
im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Identifizierung von neuen Komponenten oder Cargoes der COPI-Vesikelhüll- Maschinerie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Julia Franz (geb. Grundmeier)**

aus

Gütersloh

Göttingen 2020



Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

**Betreuungsausschuss**

Betreuer/in Prof. Dr. rer. nat. B. Schwappach

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. M. Thumm

**Prüfungskommission**

Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. B. Schwappach

Ko-Referent/in: .....

Drittreferent/in: .....

Datum der mündlichen Prüfung: .....

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Identifizierung von neuen Komponenten oder Cargoes der COPI-Vesikelhüll-Maschinerie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Julia Franz)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Kompartimente der eukaryontischen Zelle</i>	1
1.1.1 Zytoplasma	2
1.1.2 Endosom	2
1.1.3 Endoplasmatisches Retikulum	2
1.1.4 Golgi-Apparat	3
1.1.5 Mitochondrium	3
1.1.6 Zellkern	3
1.1.7 Vakuole	4
1.1.8 Zellwand	4
1.1.9 Zytoskelett	4
1.2 <i>Intrazellulärer Transport</i>	4
1.2.1 Hüllvesikelproteine	5
1.3 <i>COPI</i>	6
1.3.1 Struktur	6
1.3.2 Funktion	8
1.4 <i>Autophagie</i>	8
1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae als Modellsystem</i>	10
1.5.1 Mikroskopie von Hefezellen mit Hilfe einer SWAT-GFP-Bibliothek	12
1.6 <i>Auswirkungen von Mutationen des COPI-Proteins aus biologischer und medizinischer Sicht</i>	12
1.7 <i>Fragestellung dieser Arbeit</i>	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 <i>Material</i>	15
2.1.1 Standardmedien und -puffer	15
2.1.2 Kits und andere Materialien	18
2.1.3 Geräte	19
2.1.4 Enzyme	19
2.1.5 Antikörper	20
2.1.6 Hefestämme	21
2.1.7 Primer und Plasmide	21
2.2 <i>Methoden</i>	23
2.2.1 DNA-Techniken	23
2.2.2 Biochemische Techniken	28

---

2.2.3	Experimente mit <i>S. cerevisiae</i>	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	<i>Herstellung eines Knockout-Stammes und einer isogenetischen Kontrolle</i>	34
3.2	<i>Auswahl eines Knockout-Stammes und einer isogenetischen Kontrolle</i>	35
3.3	<i>Untersuchung der Hitzesensibilität</i>	38
3.4	<i>SGA der SWAT-GFP Bibliothek mit dem Knockout-Stamm und der isogenetischen Kontrolle</i>	41
3.5	<i>Mikroskopie des SGAs</i>	42
3.6	<i>Untersuchung der Treffer</i>	43
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
6.1	<i>Beiträge in Sammelwerken, Handbüchern, Lehrbüchern, Monographien und Zeitschriftenbeiträgen</i>	70
6.2	<i>Internetquellen</i>	73

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Zellkompartimente einer Hefezelle.....	1
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung eines membranassoziierten Coatomers.....	7
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der JPred-Sekundärstrukturvorhersagen der $\delta$ -COP-Untereinheit.....	14
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Herstellung eines Knockout-Stammes und einer isogenetischen Kontrolle.....	35
<b>Abbildung 5:</b> Western Blot der Knockout Stämme und der isogenetischen Kontrollen.....	36
<b>Abbildung 6:</b> Wachstumstest verschiedener Knockout Stämme und isogenetischer Kontrollen.....	37
<b>Abbildung 7:</b> Wachstums-Analyse nach Überexpression der relevanten Ret2-Variante durch Plasmid-Transformation in die isogenetische Kontrolle bzw. den Knockout.....	39
<b>Abbildung 8:</b> Western Blots nach Überexpression der relevanten Ret2-Variante durch Plasmid-Transformation in die isogenetische Kontrolle bzw. den Knockout.....	40
<b>Abbildung 9:</b> SGA-Ablaufplan für Ret2LD2 $\alpha$ und Ret2Clonat zur Kreuzung mit der SWAT GFP-Bibliothek.....	42
<b>Abbildung 10:</b> Mikroskopie-Bilder der Proteine Fun14, Ubx3 und Get3.....	44
<b>Abbildung 11:</b> Mikroskopie-Bilder der Proteine Apm3, Atg8 und Emp 24.....	45
<b>Abbildung 12:</b> Mikroskopie-Bilder der Proteine Ygr016w, Hrr25 und Mpd1.....	46
<b>Abbildung 13:</b> Western-Blot-Analyse von Ganzzell-Proteinextrakten der vorläufigen Treffer-Stämme mit den GFP-Fusionsproteinen von Fun14, Ubx3, Get3 und Apm3.....	48
<b>Abbildung 14:</b> Western Blot der vorläufigen Treffer-Stämme mit den GFP-Fusionsproteinen von Atg8 und Emp24.....	49
<b>Abbildung 15:</b> Western Blot der vorläufigen Treffer-Stämme mit den GFP-Fusionsproteinen von Ygr016w, Hrr25, Mpd1 und Jem1.....	51
<b>Abbildung 16:</b> Spotting-Assays der Stämme BY4741, $\delta$ c* und Ret2LD2 $\alpha$ .....	53
<b>Abbildung 17:</b> Finale Treffer und die Koregulation durch Transkriptionsregulatoren.....	67

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> COPI-Untereinheiten des Homo sapiens und der S.cerevisiae (Gaynor et al. 1998) .....	11
<b>Tabelle 2:</b> Standardmedien und-puffer .....	15
<b>Tabelle 3:</b> Kits und andere Materialien.....	18
<b>Tabelle 4:</b> Geräte .....	19
<b>Tabelle 5:</b> Restriktionsenzyme .....	19
<b>Tabelle 6:</b> Primärantikörper.....	20
<b>Tabelle 7:</b> Sekundärantikörper .....	20
<b>Tabelle 8:</b> Hefestämme .....	21
<b>Tabelle 9:</b> Primer zur Herstellung des Konstrukts .....	21
<b>Tabelle 10:</b> Primer zur Vermehrung der Rekombinationskassette.....	22
<b>Tabelle 11:</b> Primer zum Einbringen der Klonat-Kassette nach dem Ret2-Stop-Codon .....	22
<b>Tabelle 12:</b> Protokoll zur PCR.....	25
<b>Tabelle 13:</b> Ablauf der PCR.....	25
<b>Tabelle 14:</b> Protokoll zur DNA-Ligation .....	26
<b>Tabelle 15:</b> Protokoll zum zeitlichen Ablauf der Ligation.....	26
<b>Tabelle 16:</b> Protokoll zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel.....	29
<b>Tabelle 17:</b> Die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre jeweilige Erkennungssequenz .....	34
<b>Tabelle 18:</b> Vorläufige Trefferliste der High-Throughput-Fluoreszenz-Mikroskopie .....	47
<b>Tabelle 19:</b> Finale Trefferliste der High-Throughput- Fluoreszenz-Mikroskopie.....	55
<b>Tabelle 20:</b> Liste aller finalen Treffer, die untereinander eine genetische/physikalische Beziehung aufweisen.....	59
<b>Tabelle 21:</b> Liste der Proteine, die mit mehreren Treffern aus Tabelle 19 interagieren und in einer Beziehung zu COPI stehen .....	61
<b>Tabelle 22:</b> Liste der Proteine die mit mehreren Treffern aus Tabelle 19 interagieren und in einer Beziehung zur Autophagie stehen.....	62



## Abkürzungsverzeichnis

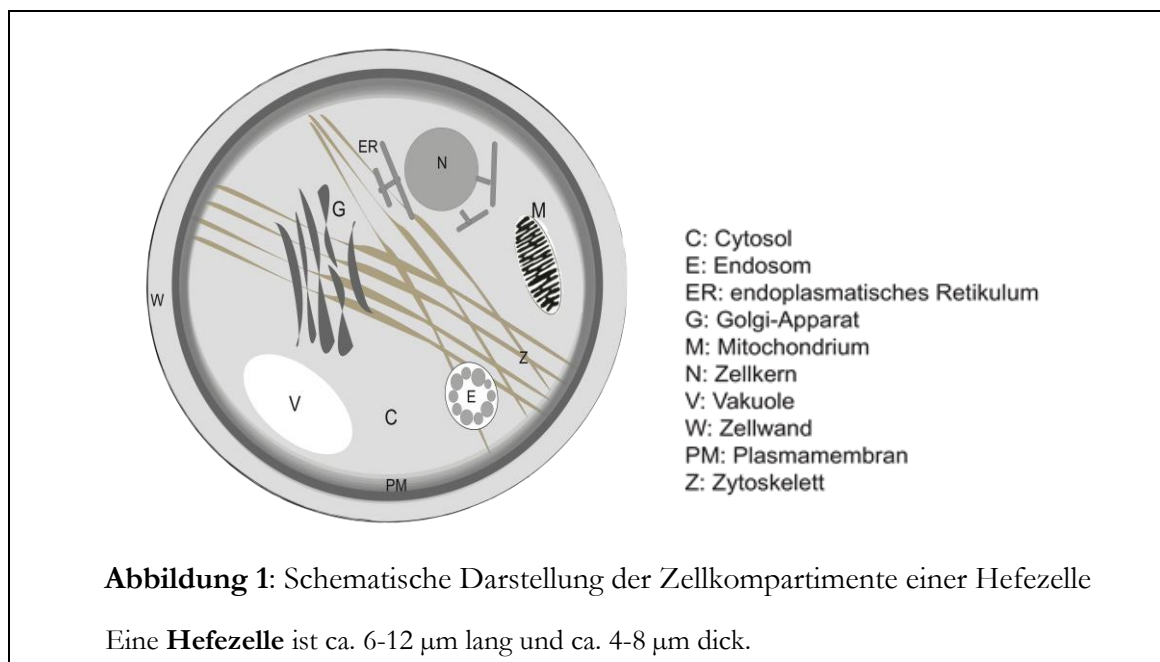
$\alpha$ -COP	Alpha-COP
ADP	Adenosine Diphosphate
ATP	Adenosine Triphosphate
Arf1	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor 1
$\beta$ -COP	Beta-COP
$\beta'$ -COP	Beta'-COP
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
CRP	C-reaktives Protein
CVT	Cytoplasm-to-Vacuole Targeting
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
$\delta$ -COP	Delta-COP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$ -COP	Epsilon-COP
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
$\gamma$ -COP	Gamma-COP
GAP	GTPase Activating Protein
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
$\mu$ -HD	Mu-Homologie-Domäne
Nur17	Neurological-17-Maus
PI3K	Phosphatidylinositol-3-phosphat-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SGA	Synthetic Genetic Array
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SWAT	Swap-Tag
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
$\zeta$ -COP	Zeta-COP

# 1 Einleitung

## 1.1 Kompartimente der eukaryontischen Zelle

Die eukaryontische Zelle umfasst eine Größe von 10–100  $\mu\text{m}$  und setzt sich aus den einzelnen Organellen, die als voneinander abgegrenzte Kompartimente fungieren, zusammen. Die einzelnen Kompartimente werden unterschiedlichen Anforderungen und Rahmenbedingungen gerecht und können so diverse Prozesse in dichter räumlicher Nähe erfüllen. Da Entstehungs- und Wirkungsort von Proteinen und Lipiden häufig nicht übereinstimmen, ist ein stetiger Austausch der Kompartimente untereinander essentiell.

Abbildung 1 zeigt den Aufbau und die Aufteilung einer eukaryontischen Zelle mit ihren Kompartimenten.



Wie anhand von Abbildung 1 zu erkennen ist, sind die einzelnen Kompartimente von einer Membran umgeben. Die auf diese Weise erzeugte selektiv durchlässige Struktur ist entscheidend für eine effiziente Trennung einer Zelle oder Organelle von ihrer Umgebung. Membranen bestehen aus verschiedenen Arten von Molekülen. Hierzu zählen u. a. Phospholipide, integrale Membranproteine, periphere Proteine, Glykoproteine und

Glycolipide (Buselmaier 2012). Die Verteilung dieser unterschiedlichen Komponenten erfolgt nicht zufällig, sondern gezielt, um bestimmte Mengen der Komponenten sicherzustellen. Dies macht einen selektiven Transport bzw. die selektive Zurückhaltung von Proteinen oder Lipiden notwendig.

Nachfolgend sollen die Einzelbestandteile der eukaryontischen Zelle näher erläutert werden.

### 1.1.1 Zytoplasma

Das Zytoplasma ist der Inhalt einer Zelle innerhalb der Plasmamembran und umgibt in eukaryontischen Zellen den Nukleus. Es dient als eine Art dreidimensionales Gitter, welches die anderen festen Strukturen verbindet und unterstützt. Hier findet ein Großteil der Proteinsynthese statt (Lechowski 2014). Das Zytosol (der lösliche Teil des Zytoplasmas außerhalb der Organellen) besteht hauptsächlich aus Wasser und vielen niedermolekularen Verbindungen (Buselmaier 2012).

### 1.1.2 Endosom

Endosomen sind dynamische Membransysteme, die am Transport innerhalb der Zelle beteiligt sind. Sie erhalten endozytäre Zellmembranmoleküle und sortieren sie zum Abbau oder zur Rückführung an die Zelloberfläche. Sie erhalten ebenfalls neu synthetisierte Proteine, die für vakuoläre Kompartimente bestimmt sind. Bei bestimmten Zelltypen können endosomale multivesikuläre Körper exozytisch mit der Zelloberfläche verschmelzen. Diese freigesetzten Vesikel werden Exosomen genannt (Buselmaier 2012).

### 1.1.3 Endoplasmatisches Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein aus Membrantubuli, Vesikeln und abgeflachten Zisternen bestehendes Netzwerk. Man unterscheidet zwischen einem glatten und dem rauen ER. Während ersteres frei von Ribosomen ist, zeichnet sich letzteres durch die Besetzung mit Ribosomen aus. Das ER hat viele allgemeine Funktionen, u. a. die Modifikation und die Faltung von Proteinen sowie deren Transport und Sekretion (Buselmaier 2012).

#### 1.1.4 Golgi-Apparat

Der sogenannte Golgi-Apparat besteht aus mehreren abgeflachten Zisternenmembranen und gleichartigen Vesikeln, die meist eng zueinander angeordnet sind. Es entsteht eine stapelartige Struktur. Der Golgi-Apparat ist nicht symmetrisch aufgebaut. Er besitzt stattdessen eine cis-Seite (Bildungsseite) und eine trans-Seite (Sekretionsseite) (Buselmaier 2012).

Der Golgi-Apparat empfängt die gesamte Ausgabe von *denovo* synthetisierten, sekretorischen Polypeptiden aus dem ER an der Bildungsseite. Er dient dazu, sie mit Hilfe von Vesikeln posttranslational zu verarbeiten und zu sortieren, sodass die modifizierten Proteine auf unterschiedliche Transportvesikel verteilt werden, mit denen sie von der Sekretionsseite zu ihren Bestimmungsorten (Plasmamembran, sekretorische Vesikel oder Lysosomen) gebracht werden. Somit besitzt der Golgi-Apparat eine dynamische Struktur, die mit anderen Organellen in Verbindung steht (Boujard et al. 2014).

#### 1.1.5 Mitochondrium

Das Mitochondrium ist eine halbautonome, sich selbst reproduzierende Organelle, die im Zytoplasma der meisten eukaryontischen Zellen vorkommt. Jedes Mitochondrium ist von einer doppelten Begrenzungsmembran umgeben. Proteine, die ins Innere des Mitochondriums gelangen wollen, passieren die innere und äußere Membran mit Hilfe von Translocons (Lechowski 2014).

In den Mitochondrien findet die oxidative Phosphorylierung statt, die zur Bildung von ATP führt. Die Größe und Kodierungskapazität der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNA) variiert in unterschiedlichen Organismen beträchtlich und kodiert für Ribosomale-Ribonukleinsäure (rRNAs), Transfer-Ribonukleinsäure (tRNAs) und wenige essentielle mitochondriale Proteine (Buselmaier 2012).

#### 1.1.6 Zellkern

Im Zellkern findet die DNA-Transkription, -Replikation und RNA-Reifung statt. Die Hülle des Zellkerns besteht aus zwei Lipidschichten. Diese innere und äußere Kernmembran grenzen den sogenannten perinukleären Raum ab, welcher mit dem Lumen

des ER verbunden ist. Der Austausch zwischen Zellkern und Cytoplasma erfolgt durch Kernporen, welche aus mehr als 30 Proteinen bestehen (Lechowski 2014).

### 1.1.7 Vakuole

Die Vakuole – verwandt dem Lysosom von tierischen Zellen – ist von einer einfachen Membran umgeben. Sie speichert kleine Moleküle oder Ionen und baut verschiedene Zellbestandteile ab. Der für den Abbau notwendige saure pH-Wert wird durch Protonenpumpen innerhalb der Membran erreicht (Lechowski 2014).

### 1.1.8 Zellwand

Bei der Zellwand handelt es sich um eine komplexe Schicht, die die Zelle umgibt. Sie spielt eine entscheidende Rolle für die Zellform, -stabilität und -entwicklung sowie für den Schutz vor Umweltgefahren (Buselmaier 2012).

### 1.1.9 Zytoskelett

Beim Zytoskelett handelt es sich um eine dynamische dreidimensionale Struktur, die das Zytoplasma von Zellen füllt. Es dient der Zytokinese und der Organisation der Organellen oder organellenähnlichen Strukturen innerhalb der Zelle (Buselmaier 2012).

## 1.2 Intrazellulärer Transport

Kompartimentierung ermöglicht das gleichzeitige Ablaufen von unterschiedlichsten Stoffwechsel- und Signal-Prozessen sowie die Energie-Transduktion. Weiterhin erfordert die Organisation in Kompartimente den Transport von Proteinen. Ein gezielter Transport von Proteinen in die bzw. aus den jeweiligen Zellkompartimenten und damit durch die jeweils begrenzende Membran hindurch, findet in den meisten Fällen nicht spontan statt. Stattdessen ermöglichen Transportsysteme, welche ebenfalls aus Proteinen bestehen, den Ein- und Austritt von Stoffen aus den Zellorganellen (Wickner und Schekman 2005).

### 1.2.1 Hüllvesikelproteine

Der Transport der meisten Proteine und Membranlipide zwischen den Organellen erfolgt in von Proteinen umhüllten Vesikeln. Der Transport via Hüllvesikel wird heute als wichtigste Art des intrazellulären Stoffaustauschs angesehen. Für die Verformung und Krümmung der Membran ist dabei die Hüllprotein Polymerisation verantwortlich.

Hüllvesikel wurden erstmals im Jahr 1975 von Palade und seinen Co-Autoren in Säugetierzellen erwähnt (Palade 1975). In den darauffolgenden Studien wurden drei Typen beschichteter Vesikelproteine – detailliert hinsichtlich ihrer strukturellen Komponenten und Funktionen charakterisiert: Clathrin-verpackte Vesikel vermitteln im späten sekretorischen Weg den Transport zwischen Golgi-Apparat, Endosomen und der Plasmamembran (Robinson 2004). COPI und COPII ermöglichen hingegen den Transport zwischen ER und Golgi-Apparat. COPII ist dabei für den anterograden (ER zu Golgi) und COPI für den retrograden Transport (Golgi zu ER) verantwortlich. Zusätzlich dient das Protein COPI auch dem internen Transport zwischen den Golgi-Zisternen (Rothman, 1994; Schekman und Orci, 1996; Schmid, 1997).

Bei den Hüllvesikelproteinen handelt es sich um eine molekulare Maschinerie mit zwei zentralen Aufgaben. Zum einen dient sie der Vesikelbildung und zum anderen der aktiven Auswahl von Proteinen und Lipidfrachten (Springer et al. 1999). Weiterhin spielt sie für die Aufrechterhaltung der Identität der Organellen eine wichtige Rolle, da sie eine Vermischung der Komponenten verhindert (Kirchhausen 2000).

Die beschriebenen Proteine Clathrin, COPI und COPII weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Zu diesen gehört bspw. die einheitliche Vesikelbildung, welche in drei Phasen verläuft:

Zu Beginn findet die Abschnürung des betreffenden Membranabschnitts statt. Diese sogenannte Vesikelknospung ist von Proteinfaktoren abhängig: Zur Ausbildung der Vesikelhülle erfolgt die Rekrutierung der Hüllproteine über GTPasen. Diese werden wiederum durch GEF-Proteine (Guanine nucleotide exchange factor) reguliert.

Darauf folgt die Einleitung des Vorgangs der Hüllenablösung, welche aus einer GTP-Hydrolyse über GTPasen resultiert. Die Regulierung der GTPasen erfolgt dabei durch GAP (GTPase activating protein). Als Folge der Hydrolyse von GTP wird die GTPase aus der Membran ausgeschlossen, was schließlich zu einer vollständigen Ablösung des Vesikels von seiner Hülle führt.

Im letzten Schritt kommt es durch Ankerfaktoren, die an die GTPasen der Rab-Familie gebunden sind, zur Anlagerung an die Membran des Zielkompartiments und zur SNARE (Soluble NSF attachment protein receptor) vermittelten Fusion (Boujard et al. 2014).

### 1.3 COPI

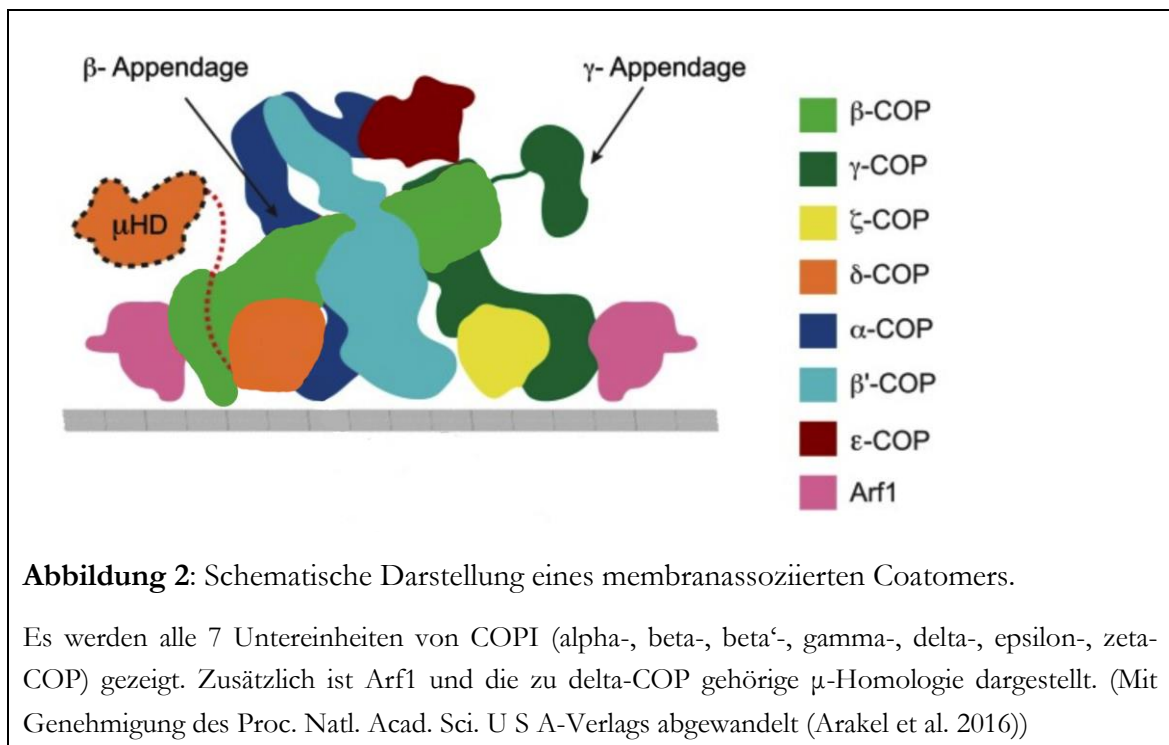
COPI, das Hüllvesikelprotein, auf dem der Fokus der vorliegenden Dissertation liegt, wurde zwar vor COPII entdeckt, ist in der Vergangenheit jedoch strukturell längst nicht so umfangreich untersucht worden wie COPII und Clathrin.

Hüllproteinkomplexe bewirken die Bildung eines COPI-Vesikels. Die Rekrutierung dieser Coatomer-Proteine erfolgt durch Arf1, welches an GTP bindet und zur Ras-Superfamilie der GTPasen gehört (Donaldson et al. 1992; Palmer et al. 1993; Gillingham und Munro 2007; Lechowski 2014). Solange Arf1 an GDP gebunden ist, verbleibt es im Cytosol. Durch die Bindung an GTP verändert es jedoch seine Konformation und seine nun freiliegende Glycin-myristoylierten N-terminale amphiphatische Helix interagiert mit der Membran, sodass es schließlich zur Anlagerung an die Membran kommt. GEFs aktivieren Arf1 und der Einfluss von GAPs führt zu einer Deaktivierung von Arf1 (Franco et al. 1996; Liu et al. 2009). GBF1 befindet sich im Golgi-Apparat und unterstützt als GEF die Bindung von GTP an Arf1. Arf1 ist in der Lage Membranen zu verformen. Daher wurde in Studien bereits vermutet, dass das Zusammenspiel von Hüllprotein-Polymerisation und Arf1-Bindung Krümmungen der Membran verursacht (Krauss et al. 2008). ArfGAP1, der Antagonist von ArfGEF1, ist ebenfalls im Golgi-Apparat lokalisiert und hemmt die Aktivierung von Arf1 (Chardin et al. 1996).

Nachfolgend wird auf die Struktur von COPI eingegangen.

#### 1.3.1 Struktur

Coatomer, der heptamere Proteinkomplex der 75-100 nm großen COPI-Vesikel (Malhotra et al. 1989) besteht aus sieben Untereinheiten: alpha-, beta-, beta<sup>′</sup>-, gamma-, delta-, epsilon- und zeta-COP (Waters et al. 1991). Diese sind in der nachfolgenden Abbildung visualisiert.



Alpha- und beta'-COP bilden zusammen eine Art Brücke aus und befinden sich mit ihren Propellerdomänen an der Außenseite von COPI. Zusammen mit beta- und gamma-COP gehören sie zu den großen Untereinheiten. An den Enden der beiden letztgenannten Bestandteile fungiert Arf als Bindungstransmitter. Innerhalb von beta- und gamma-COP befinden sich zudem die beiden kleinen Untereinheiten delta- und zeta-COP, die jeweils eine Longin-Domäne enthalten. Dabei handelt es sich um eine Domäne mit einer charakteristischen Kombination von einer Helix, fünf beta-Faltblättern und zwei weiteren alpha-Helices, die in etlichen Proteinen mit Zusammenhang zu Transportvesikeln vorkommt. Zusätzlich existiert in delta-COP eine C-terminale  $\mu$ -Homologie Domäne ( $\mu$ -HD), die über einen Linker an die Helix des delta-COP gebunden ist (Arakel et al. 2016)

Besonders ist die dynamische und flexible Struktur von COPI. Im Vergleich zu COPII und Clathrin formt COPI recht unregelmäßige Käfige und die Rekrutierung erfolgt „en bloc“ (Hara-Kuge et al. 1994). Trotz der Homologie von vier Untereinheiten von COPI zum Clathrin-Adaptor-Komplex ist COPI deutlicher gespreizt und außer epsilon-COP besitzen alle Untereinheiten des Heptamers Kontakt zur Membran. Nach aktuellem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass der C-Terminus von alpha-COP und die  $\mu$ -Homologie-Domäne in delta-COP an der Coatomer-Triaden-Bildung beteiligt sind.



COPI lässt sich in folgende Subkomplexe untergliedern: Der B-Komplex, auch als Käfig bekannt, umfasst alpha-, beta'- und epsilon-COP. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass der B-Komplex, in Analogie zu Clathrin-beschichteten Vesikeln, ein käfigformender Subkomplex ist. Diese Annahme musste jedoch überdacht werden, seitdem bekannt ist, dass alpha- und beta'-COP mit dem zweiten Subkomplex F interagieren, die Membran direkt berühren und keine regelmäßigen Käfige um das Vesikel ausbilden. Der Subkomplex F, auch als Adapter-Komplex bezeichnet, ist ein Tetramer aus beta-, gamma-, delta- und zeta-COP.

### 1.3.2 Funktion

Wie bereits zuvor erwähnt, ist COPI für den retrograden Transport vom cis- Golgi-Apparat zum ER sowie für den Intra-Golgi Transport zuständig. Unter dem Transport innerhalb des Golgi-Apparats versteht man den Weg vom trans-Golgi zum medianen Golgi und vom medianen Golgi zum cis-Golgi (Lechowski 2014).

Somit spielt COPI eine essentielle Rolle dabei, dass sich Chaperone und Enzyme an ihrem Bestimmungsort befinden. Untersuchungen mit Brefeldin A (Hemmstoff eines GEF-Proteins) zeigten, dass der Golgi-Apparat durch eine starke Hemmung der COPI-Aktivität verschwindet. Nachdem Brefeldin A abgesetzt wurde, konnten die GEF Proteine die Vesikelbildung jedoch wieder einleiten. Somit fand keine Hemmung von COPI mehr statt und es konnte beobachtet werden, wie sich der Golgi-Apparat wieder aufbaute (Boujard et al. 2014).

## 1.4 Autophagie

Die Autophagie bezeichnet einen in allen Eukaryonten hoch konservierten Prozess. Er dient der Beseitigung überflüssiger Zellbestandteile und alter Organellen. Intrazelluläres Material wird zum Abbau und zur Rückgewinnung verwertbaren Materials zum Lysosom (in *Saccharomyces cerevisiae* Vakuole) transportiert (Lynch-Day und Klionsky 2010).

Die Autophagie spielt u.a. eine Rolle bei der zellulären Reaktion auf Stress, bei der Entwicklung (Levine und Klionsky 2004), der Tumorsuppression (Gozuacik und Kimchi 2004) und der Resistenz gegen Krankheitserreger (Nakagawa et al. 2004).

Grundsätzlich lässt sich zwischen Makro-, Mikroautophagie, sowie der Chaperon-vermittelten Autophagie unterscheiden (Levine und Klionsky 2004).

Die Mikroautophagie wird durch eine Invagination der Lysosom-Membran um die abzubauenen Bestandteile initiiert. Im Folgenden kommt es zu einer röhrenartigen Verlängerung der Invagination, an dessen Ende ein Vesikel abgeschnürt wird. Dieser wird schließlich gemeinsam mit seinem Inhalt im Lysosom degradiert (Li et al. 2012).

Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie, welche bisher nur in höheren Säugetieren charakterisiert wurde, wird ein abzubauenes Protein vom Chaperon erkannt und als Proteinkomplex zum Lysosom geleitet. Durch das sogenannte Lysosomal-Membran-assoziierte Protein 2a (LAMP-2A) gelangt der Komplex in das Lysosom um in ihm anschließend abgebaut zu werden (Cuervo und Wong 2014).

Die Induktion der Makroautophagie wird bei *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) über die Aktivierung des Atg1-Komplexes ausgelöst und bedarf etlicher Atg-Proteine. Im menschlichen Organismus spricht man von einem ULK-Komplex. Die Induktionsphase kann durch die Protein-Kinase Tor gehemmt werden (Boujard et al. 2014).

In der zweiten Phase kommt es durch die Bildung einer isolierenden Membran zum Einschluss der abzubauenen zytoplasmatische Komponenten. Es entsteht ein sogenanntes Phagophor. Sowohl Proteine, als auch Lipide sind an diesem Prozess beteiligt. Durch die Rekrutierung von Atg-Proteinen an die Stelle der prä-autophagosomalen Strukturen (PAS) kommt es zur Einleitung des Vesikeleinschlusses (Boujard et al. 2014).

Der nächste Schritt beinhaltet die Ausdehnung des Vesikels zu einem Autophagosom, welches von einer Doppelmembran umgeben ist. Die Bildung von Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) durch die Phosphatidylinositol-3-phosphat-Kinase (PI3K) ist hierbei essentiell. PI3K interagiert mit Atg6 und befindet sich meist an der Membran des trans-Golgis. Der Komplex aus Atg6 und PI3K ermöglicht die Konjugation von Atg12 an Atg5. Im Weiteren folgt die Konjugation des Proteins Atg5 mit einer Phosphatidylethanolamin-Gruppe von Atg8 (Boujard et al. 2014).

Im letzten Schritt entsteht durch Fusion der äußeren Autophagosom-Membran mit dem Lysosom das Autophagolysosom. Während dieses Schrittes kommt es zum Abbau der inneren Membran des ehemaligen Autophagosoms und die im Inneren befindlichen Bestandteile werden von den Enzymen des Lysosoms hydrolysiert (Kroemer et al. 2010).

Die Makroautophagie kann sowohl in nichtselektiver als auch in selektiver Weise auftreten. Die nichtselektive Variante tritt z. B. unter Nährstoff- oder Energiemangelbedingungen auf, das Autophagosom bindet zufällig einen Teil des Zytoplasmas und die Abbauprodukte dienen als Nährstoffquellen. Bei der selektiven Autophagie umhüllt das Autophagosom schädliche Materialien wie Proteinaggregate, beschädigte Mitochondrien (=Mitophagie), invasive Bakterien oder überschüssige Peroxisomen (=Pexophagie) zur Eliminierung (Lynch-Day und Klionsky 2010). Letztere Variante hat in den vergangenen Jahren aufgrund ihrer direkten Relevanz für Erkrankungen des Menschen Aufmerksamkeit erregt

(Deretic und Levine 2009; Johansen und Lamark 2011; Mizushima und Komatsu 2011; Weidberg et al. 2011).

In bestehende Studien mit dem Modellorganismus *S. cerevisiae* konnten bisher 41 mit Autophagie in Verbindung stehende Proteine dargestellt werden, es handelt sich um Atg-Proteine. 15 von ihnen sind entscheidend bei der Bildung der autophagosomalen Membran und werden daher als die Kernmaschinerie angesehen. Einige der übrigen Atg-Proteine sind für die Regulierung der Kernmaschinerie verantwortlich und bestimmen die Ziele der autophagosomalen Sequestrierung bei der selektiven Autophagie (Tanaka et al. 2014).

In der Bäckerhefe existiert der „Cytoplasm-to-Vacuole Targeting“ (Cvt-Weg) als ein selektiver Autophagie bezogener Signalweg, der den Transport von Enzymen vermittelt, die im Vakuololumen wirken (Lynch-Day und Klionsky 2010). Auf dem Cvt-Weg sammelt sich die vakuoläre Aminopeptidase Ape1 im Zytoplasma unter Bildung einer aggregatartigen Struktur, die vom Rezeptorprotein Atg19 erkannt wird (Kim et al. 1997; Scott et al. 2001). Atg19 bindet u.a. die Aspartylaminopeptidase Ape4 und die  $\alpha$ -Mannosidase Ams1, wodurch diese in die Anordnung eingebaut werden (Shintani et al. 2002; Yuga et al. 2011). Anschließend rekrutiert Atg19 das Adapterprotein Atg11, welches eine Verbindung zwischen der Anordnung und der Vakuolarmembran schafft und die Atg-Kernproteine rekrutiert, um die Membranbildung zu initiieren (Shintani et al. 2002; Tanaka et al. 2014).

## 1.5 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellsystem

Bereits in der Vergangenheit kam *S. cerevisiae* als genetisch manipulierbares Modellsystem in wissenschaftlichen Studien zum Einsatz. Mit Hilfe von genetischen, biologischen und zellulären Methoden wurden intrazelluläre Transportmechanismen von Hüllvesikeln untersucht. Sobald ein Hefegen charakterisiert wurde, ist es unter praktischen Gesichtspunkten häufig vorteilhaft, das menschliche Äquivalent zu ermitteln und dessen Rolle zunächst in der heterologen Umgebung Hefe zu untersuchen, als die sofortige Charakterisierung in Säugerzellen anzustreben. Durch die hohe Konservierung zwischen den intrazellulären Transport-Vorgängen des menschlichen Organismus und denen der *S. cerevisiae* lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse gut übertragen (Boujard et al. 2014) – bis hin zur Untersuchung von krankheitsverursachenden Mutationen mit Hilfe der funktionellen Komplementation.

Da die Bäckerhefe einige Vorteile im Laboralltag liefert, bietet sich ihre Verwendung auch für den Rahmen dieser Arbeit an:

Durch die geringe Verdopplungszeit ergibt sich ein schnelles Wachstum, die Konstruktion von mutanten Organismen ist vergleichsweise einfach, das Genom ist gut charakterisiert und zudem leicht zu manipulieren. Auch die aufzuwendenden Kosten für die Forschung mit Bäckerhefe sind als günstig einzustufen. Weiterhin erlauben die erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen für den Umgang mit *S. cerevisiae* das Arbeiten in S1-Laboren (Sherman 2002).

Wie bereits erwähnt, besteht ein weiterer, wesentlicher Vorteil in der einfachen Übertragbarkeit der Erkenntnisse. In nachfolgender Tabelle werden daher die Äquivalente der menschlichen COPI-Untereinheiten für die *S. cerevisiae* aufgeführt:

**Tabelle 1:** COPI-Untereinheiten des Homo sapiens und der *S.cerevisiae* (Gaynor et al. 1998)

<b>Homo Sapiens (Mensch)</b>	<b><i>S. cerevisiae</i> (Bäckerhefe)</b>
$\alpha$ -COP	<i>RET1</i>
$\beta$ -COP	<i>SEC26</i>
$\beta'$ -COP	<i>SEC27</i>
$\gamma$ -COP	<i>SEC21</i>
$\delta$ -COP	<i>RET2</i>
$\epsilon$ -COP	<i>SEC28</i>
$\zeta$ -COP	<i>RET3</i>

Weiterhin bietet der Modellorganismus *S. cerevisiae* systematische Sammlungen von Stämmen oder ganzen Bibliotheken, in denen jedes Gen auf ähnliche Weise modifiziert wurde, um somit umfassende genomische Studien zu ermöglichen (Giaever et al. 2002; Huh et al. 2003; Tarassov et al. 2008; Botstein und Fink 2011)

Jüngste Forschungsergebnisse ermöglichen eine einfache, schnelle und kostengünstige Herstellung solcher Bibliotheken mit Hilfe einer Methode namens SWAp-Tags (SWAT) (Khmelniskii et al. 2011; Yofe et al. 2016). Eine sogenannte SWAT-Bibliothek besteht aus einem systematischen Array von Akzeptor-Genfusionen, die es möglich machen, die Ursprungsbibliothek in eine veränderte Bibliothek zu konvertieren. Hierfür wird das Akzeptormodul durch eine neue Genomsequenz ersetzt. Dieser Austausch erfolgt durch

die Kreuzung der Ursprungsbibliothek mit dem gewünschten Donorstamm (Yofe et al. 2016).

### 1.5.1 Mikroskopie von Hefezellen mit Hilfe einer SWAT-GFP-Bibliothek

Die Mikroskopie mit Hilfe von fluoreszenten Proteinen ist eine sensitive Methode. Markierte Moleküle werden hierbei als Lichtpunkte vor einem schwarzen Hintergrund sichtbar. Bei der klassischen Mikroskopie findet hingegen eine Farbveränderung vor einem bereits angefärbten Hintergrund statt (Lechowski 2014).

Grundsätzlich besteht sowohl die Möglichkeit der Markierung über Fluorophor-gekoppelte Antikörper, als auch über die genetische Kopplung eines fluoreszierenden Proteins (z. B. green fluorescent protein) an das jeweilige Zielprotein. Es kann somit einerseits die Lokalisation von Proteinen, als auch die von Zellorganellen bestimmt werden. Das in dieser Arbeit verwendete, als Biomarker fungierende green fluorescent protein (GFP) stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* (Lechowski 2014).

Dank der vollständigen Genombibliothek, welche aus 5500 Stämmen besteht, die das SWAT NOP1-Promotor-GFP-Modul tragen (Meurer et al. 2017), ist es möglich, große Datenmengen an Mikroskopie-Bildern zu generieren und auszuwerten.

## 1.6 Auswirkungen von Mutationen des COPI-Proteins aus biologischer und medizinischer Sicht

Beeinträchtigungen des intrazellulären Transports wurden in der Pathogenese von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit (Annaert und De Strooper 2002) und der Parkinson-Krankheit (Cooper et al. 2006) beobachtet.

Die Bedeutung des intrazellulären Transports für die ordnungsgemäße Funktion und Aufrechterhaltung neuronaler Zellen ist somit klar ersichtlich. Das genaue Zusammenspiel zwischen den Mechanismen, welche die neurodegenerativen Erkrankungen verursachen, ist jedoch häufig nicht vollständig nachvollziehbar. Insbesondere der Wissensstand bzgl. der Auswirkungen von Mutationen der COPI- Untereinheiten weist einige Lücken auf.

Die essentielle Bedeutung von COPI für eukaryontisches Leben ist unter Fachexperten unumstritten. Selbst kleinere Veränderungen innerhalb des Proteins können zu schweren Erkrankungen führen. Mutationen, welche die Funktionalität einzelner COPI-

Untereinheiten beeinträchtigen, wurden als Ursache seltener, menschlicher Erbkrankheiten ermittelt. Unter anderem konnten autoimmunbedingte Lungenerkrankungen mit einer Mutation in der alpha-COP-Untereinheit in Verbindung gebracht werden (Watkin et al. 2015). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Mutation im delta-COP-Gen zu Entwicklungsstörungen, mit denen ebenfalls eine veränderte Skelettbildung und eine eingeschränkte Gehirnentwicklung einhergingen, führte (Izumi et al. 2016).

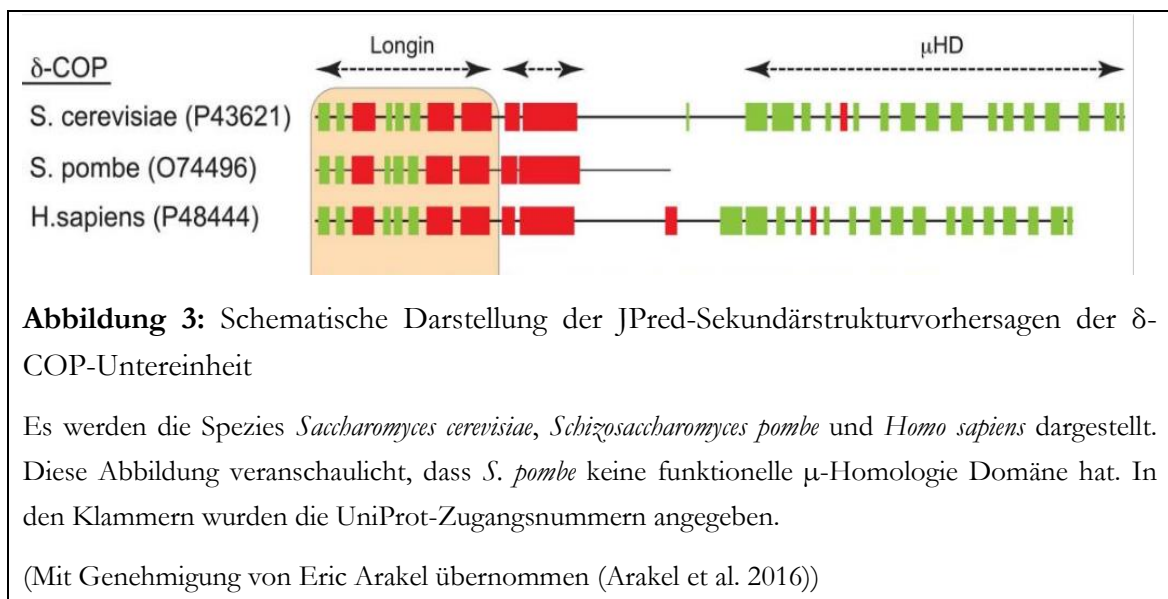
Die „neurological 17“ (nur17) Maus besitzen eine N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU)-induzierte Mutation. Die Mutantenmäuse zeigten als Phänotyp sowohl eine Veränderung der Fellfarbe als auch eine Ataxie, was auf eine Purkinje-Zelldeneration im Kleinhirn zurückgeführt werden konnte. Bereits Jeans et al. beschrieben im Jahr 2007 im Rahmen eines Mausversuchs die Ursache von Ataxie in einer Störung des vesikulären Transportwegs (Jeans et al., 2007). Durch positionelles Klonieren der nur17-Maus fand man zudem heraus, dass eine T-zu-C-Missense-Mutation im zehnten Exon des Archain 1-Gens vorlag. Da dieses für die delta-Untereinheit des COPI-Komplexes codiert, lag eine Störung des intrazellulären Transports vor. Als Beleg für die These, dass die Arcn1-Mutation für die Phänotypen in Nur17-Mäusen verantwortlich war, dienten weitere Versuchsergebnisse. Zum Beispiel konnte die transgene Expression von Wildtyp-Archain 1 (delta-COP) die Nur17-Phänotypen retten, sodass keine Neurodegeneration mehr auftrat (Xu et al. 2010).

## 1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Wie unter dem vorangegangenen Gliederungspunkt beschrieben, beeinflussen Mutationen in Genen, die für verschiedene COPI-Untereinheiten kodieren, den intrazellulären Transport und können damit zu neurodegenerativen Erkrankungen führen. Somit würde eine weitere biochemische und zellbiologische Charakterisierung der Vesikelhülle COPI auch das Verständnis bzgl. solcher Krankheitsbilder voranbringen.

Jüngste Studien zeigten, dass *S. cerevisiae* trotz der Deletion der  $\mu$ -Homologie Domäne des delta-COP lebensfähig ist. Auch die Tatsache, dass eine bestimmte Hefespezies namens *Schizosaccharomyces pombe* nur ein RET2-homologes Gen besitzt, welches für eine verkürzte Variante der  $\delta$ -COP-Untereinheit kodiert, der die C-terminale  $\mu$ -Homologie Domäne völlig fehlt, unterstreicht diese Aussage (Arakel et al. 2016). Angesichts der publizierten Theorie, dass die Beteiligung der  $\mu$ -Homologie Domäne von delta-COP an der Triadenverbindung

innerhalb der Vesikelhülle beiträgt (Dodonova et al. 2015), ist deren Fehlen jedoch sehr erstaunlich. Die nachfolgende *Abbildung 3*, die von Dr. Eric Arakel zur Verfügung gestellt wurde, zeigt schematisch die Sekundärstrukturvorhersagen für delta-COP. Dargestellt sind die entsprechenden Proteine von *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Homo sapiens*. Mit Hilfe der Darstellung wird das Fehlen der  $\mu$ -Homologie Domäne in *S. pombe* veranschaulicht.



Um die grundsätzliche Rolle und die aktuellen Forschungserkenntnisse der  $\mu$ -Homologie der delta-COP-Untereinheit in eukaryontischen Systemen genauer zu verstehen, sollte ein high-content GFP-basiertes Lokalisations-Screening durchgeführt werden. Dabei wurde die Lokalisation einer an Cargoes und Maschinerie-Komponenten des vesikulären Transports angereicherten Untermenge des Hefeproteoms mit Hilfe automatisierter Mikroskopie und manueller Bildanalyse in einem Stamm mit delta-COP mit und ohne  $\mu$ -Homologie-Domäne verglichen. Zur weiteren Charakterisierung von identifizierten GFP-Fusionsproteinen, deren Lokalisation von der  $\mu$ -Homologie-Domäne abhängt, wurden Western Blots angefertigt, da mit dieser Methode die betroffenen GFP-Fusionsproteine anhand ihres Molekulargewichts verifiziert werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Standardmedien und -puffer

**Tabelle 2:** Standardmedien und-puffer

Bezeichnung	Konzentration	Inhalt
Acrylamid	30 % (w/v)	Acrylamide 4K 292,2 g/l, bisacrylamide 4K 7,8 g/l
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	Agar in LB-Medium, autoklavieren
Blocking-Lösung für Western Blot	1x	TBS in H <sub>2</sub> O
	5 % (w/v)	Milchpulver
	0,02 % (v/v)	IGEPAL
ClonNat-Stocklösung	100 mg/ml	Clon-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O, steril filtriert, Lagerung bei -20°C
DNA-Ladepuffer 6fach	30 % (v/v)	Glycerol
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau
Glukose 40 %	200 g (w/v)	Glukose
	500 ml	H <sub>2</sub> O
Hefeagar	40 g/l	Bactoagar für Hefe in H <sub>2</sub> O oder YPAD, autoklavieren
Hefemedium YPAD	10 g/l	Hefeextrakt
	20 g/l	Peptonwasserstoff
	40 mg/l	Adeninsulfat
	20 g/l	Glukose
		mit H <sub>2</sub> O zu 1L auffüllen, autoklavieren



Bezeichnung	Konzentration	Inhalt
Hefemedium selektiv	6,7 g/l	Hefestickstoffbasis
	0,57 g/l	Aminosäurengemisch (je nach Bedarf)
	20 g/l	Glukose
	20 mg/l	L-Arginin, L-Methionin, L-Histidin, L-Uracil
	30 mg/l	L-Lysin, L-Tyrosin
	40 mg/l	Adeninhemisulfat
	50 mg/l	L-Phenylalanin, L-Tryptophan
	100 mg/l	L-Aspartat, L-Glutamat, L-Leucin
		In H <sub>2</sub> O, steril filtriert
Hefepplatten	50 % (v/v)	Hefeagar, autoklaviert
	50 % (v/v)	Hefemedium, steril filtriert
LB-Medium für Bakterien	15 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
		mit H <sub>2</sub> O zu 1L auffüllen, autoklavieren
Lithium Acetat 10fach (1M)	102 g/l	Lithium Acetat mit H <sub>2</sub> O zu 1L auffüllen, steril filtriert
Lithium Acetat-Mix	1 x	10 x TE pH 7,5
	1 x	10 x Lithium Acetat pH 7,5
	8 x	H <sub>2</sub> O
PBS (phosphate buffered saline) 1 x	140 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		mit H <sub>2</sub> O zu 1L auffüllen
PEG-Stocklösung (50 %)	500 g/l	PEG (Polyethylglycol) 4000 in H <sub>2</sub> O, steril filtriert
Ponceau-S-Stocklösung 10 x	20 g/l	Ponceau-S
	300 g/l	Trichloressigsäure
	300 g/l	Schwefelsalicylsäure
		in H <sub>2</sub> O, steril filtriert

Bezeichnung	Konzentration	Inhalt
SDS-Ladepuffer Proteingel 5 x	250 mM	Tris-HCL pH 6,8
	5 % (w/v)	SDS 10 %
	0.5 % (w/v)	Bromphenolblau
	50 % (v/v)	Glycerol
	250 mM	DTT (Dithiotreitol)
SDS-Laufpuffer Proteingel 5 x	250 mM	Glycin pH 8,3
	125 mM	Tris
	0,1 % (v/v)	10 % SDS
		mit H <sub>2</sub> O zu 1L auffüllen
SOC-Medium für Bakterien	20 g/l	Tryptone
	5 g/l	Hefeextrakt
	0,5 g/l	NaCl
	2,5 mM	KCl
		H <sub>2</sub> O nach dem Autoklavieren
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	20 mM	Glukose
SDS 10 %	100 g/l	Natriumdodecylsulfat
T4-Ligase-Puffer	50 mM	Tris-HCL pH 7,6
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	ATP
	1 mM	DTT
	50 mg/ml	PEG-8000
		H <sub>2</sub> O, Aliquots bei -20 °C lagern
TAE-Puffer (DNA-Gel-Laufpuffer) 20 x	800 mM	Tris-HCl pH 7,5
	200 mM	Natrium-Acetat
	20 mM	EDTA pH 8,0
TBS 10 x	240 mM	Tris pH 7,4 (HCl)
	1,36 M	NaCl
	30 mM	KCl
		mit H <sub>2</sub> O zu 1L auffüllen

Bezeichnung	Konzentration	Inhalt
TBS-Tween 20	0,02 % (v/v)	Tween-20
	1 x	TBS
TE 10 x	100 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
		pH 7,5 mit HCl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)		C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>
Transferpuffer 10 x	390 mM	Glycin
	480 mM	Tris pH 8,3
	3,7 g/l	SDS
		+ 20 % (v/v) Methanol in 1 x Puffer
Trichloressigsäure (TCA)	50 % (w/v)	Trichloressigsäurepulver

### 2.1.2 Kits und andere Materialien

**Tabelle 3:** Kits und andere Materialien

Kit	Hersteller und Katalognummer
Hybond <sup>TM</sup> -ECL <sup>TM</sup> Nitrocellulosemembran	Amersham Bioscience (Katalognummer RPN3032d)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Katalognummer 26616)
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Katalognummer 26619)
YeaStar <sup>TM</sup> Genomic DNA Kit	Zymo Research (Katalognummer D2002)

### 2.1.3 Geräte

**Tabelle 4:** Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Agarosegelelektrophorese Apperatur	PowerPac Basic	BioRad
Elektroporator	Gene Pulser	BioRad
Imaging Machine (Mikroskop)	IM02	Acquifer
Liquid Handling-Robotor	Bravo	Agilent Technology
Membrandetektion	Odyssey	Licor
Nano-Drop	NanoDrop2000c	ThermoScientific
Pinning-Robotor	Rotor HDA	Singer
Spektralphotometer	BioMate5	ThermoScientific
SDS-Gelelektrophorese-Apperatur	Multiple Gel Caster, Mighty Small 250	Hoefer
Tisch-Zentrifuge	Centrifuge 5418 R	Eppendorf
Western Blot-Apperatur	Mighty Small Transfer System T22	Amersham Biosciences

### 2.1.4 Enzyme

**Tabelle 5:** Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller:
BamHI (Bacillus amyloliquefaciens)	Fermentas
EcoRI (Escherichia coli)	Fermentas
XhoI (Xanthomonas holcicola)	Fermentas

Verwendete Polymerase: Expand™ High Fidelity PCR polymerase.

## 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 6:** Primärantikörper

Name	Erzeugt in	Katalognummer	Verdünnung	Herkunft
$\alpha$ -Coat1	Kaninchen		1:1000	H. D. Schmitt
$\alpha$ -GFP	Kaninchen	TP401	1:1000	Torrey Pines biolabs (von Acris bestellt)
$\alpha$ -HIS	Maus	34660	1:1000	Qiagen
$\alpha$ -PGK1	Maus	459250	1:1000	Thermo Fisher Scientific
$\alpha$ -RET2	Kaninchen		1:1000	H. D. Schmitt

**Tabelle 7:** Sekundärantikörper

Name	Katalognummer	Verhältnis	Herkunft
IRD 680LT Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	926-68072	1:5000	LI-COR Biosciences
IRD 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)	926-32213	1:5000	LI-COR Biosciences

## 2.1.6 Hefestämme

Tabelle 8: Hefestämme

Name	Genotyp	Herkunft
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0, met15Δ0;</i> <i>ura3Δ0</i>	Euroscarf
Ret2Clonat	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0,</i> <i>lys2+/lys+, met15Δ0, ura3Δ0,</i> <i>can1::STE2pr-spHIS5,</i> <i>lyp1::STE3pr-LEU2 Ret</i> 2α::Clonat	mit Hilfe von Dr. Arakel in dieser Dissertation hergestellt
Ret2LD2α	<i>MATa his3Δ1, leu2Δ0,</i> <i>lys2+/lys+, met15Δ0, ura3Δ0,</i> <i>can1::STE2pr-spHIS5,</i> <i>lyp1::STE3pr-LEU2 Ret2 Longin</i> Domain 2α::Clonat	mit Hilfe von Dr. Arakel in dieser Dissertation hergestellt

## 2.1.7 Primer und Plasmide

Tabelle 9: Primer zur Herstellung des Konstrukts

Primer	Sequenz
Ret2_BamF	CGCGGATCCATGGTGGT <sup>*</sup> TTTGGCTGC
Ret2-Longin-H6-RP-	EcoR1CCGGAATTCCGGtcagtgatggtgatggtgatgCCCGTGT <sup>*</sup> T TCCTTTCATGTTCTTT
EcoR1- PAG25TEFp_FP	CCGGAATTCCGGGGGTTAATTAAGGCGCGCCAGAT CTGT <sup>*</sup> TTA
Xho1-PAG25term_RP	CCGCTCGAGCGGCGAGCTCGTT <sup>*</sup> TCGACACTGGAT GGCGGCG

**Tabelle 10:** Primer zur Vermehrung der Rekombinationskassette

Primer	Sequenz
Ret2Flank-Pr1_FP	TAGATCATATTAGAATACCTATAGCTCCATCAAAAGAA ATACACAATGGTGGTTT*TTGGCTGCTTCTATCACTACG
Ret2Flank-Pr2_FP	TGTTGACACCTCAAGAACAAGGGCAAT*TAGCCTCAGC GTCGAATATAGATCATATTAGAATACCTATAGCTCCAT
Ret2Flank-Pr1_RP	AGTTTGTGTATATAACTTAAGTAT*TTTATATGTGAATG TAACGTAGCGGCGAGCTCGTT*TCGACACTGGATGGC
Ret2Flank-Pr2_RP	TATATAGAAGGACGAAAGAAAAGATACCTCGATT*TTTA TTTATTTAGTTTGTGTATATAACTTAAGTAT*TTATA

**Tabelle 11:** Primer zum Einbringen der Klonat-Kassette nach dem Ret2-Stop-Codon

Primer	Sequenz
Ret2-3'-Clonat-FP1	AAATCGAGGTATCT*TTTCTTTTCGTCCTTCTATATATATA GT*TTAAAAT*TCGGGGGGT*TAAT*TAAGGCGCGCCAGA
Ret2-3'-Clonat-FP2	TCACATATAAAAATACTTAAGTTATATACACAAACTAAAT AAATAAAAATCGAGGTATCT*TTTCTTTTCGTCCTTCT
Ret2-3'-Clonat-RP1	TGACGGGTAACCCTAAAAGGAAAAATAATAAGAATA AGAGTAAGCGAGCTCGTT*TCGACACTGGATGGCGGC G
Ret2-3'-Clonat-RP2	GCAAAT*CTAAACCAAGAAGCTGGAACATCT*TTAATAA AAAGGATTGACGGGTAACCCTAAAAGGAAAAATAATA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA-Techniken

#### 2.2.1.1 Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Beim Restriktionsverdau handelt es sich um eine Methodik zum Schneiden von DNA an bestimmten DNA-Sequenzen durch die Verwendung von Restriktionsenzymen. Dazu werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, welche das Zerschneiden des DNA-Doppelstranges katalysieren. Diese „Schnitte“ erfolgen an bekannten Stellen (Palindromen). Im Anschluss daran können die geschnittenen Sequenzen in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und aufgereinigt werden.

Restriktionsenzym-Verdauungen werden durchgeführt, indem 2-3 µg DNA mit einer geeigneten Menge an Restriktionsenzymen (1–5 Einheiten) in ihrem jeweiligen Puffer und bei der empfohlenen Idealtemperatur für die spezifisch verwendeten Enzyme inkubiert werden (Herstellerangaben sind zu beachten).

Das Volumen der Reaktion hängt von der Konzentration und Größe der zu verdauenden DNA ab. Entsprechend des Verwendungszweckes wird das Reaktionsgemisch entweder 60 Minuten (Klonierung) oder 90 Minuten (Testverdauung) inkubiert. Um eine Vektor-Selbstligation zu verhindern, wurde das Reaktionsgemisch nach 60 Minuten mit einer Einheit alkalischer Phosphatase (CIAP) aus dem Kälberdarm vermengt. Alkalische Phosphatase katalysiert die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen aus der DNA. DNA-Fragmente, denen die 5'-Phosphoryl-Termini fehlen, können sich nicht selbstligieren. Diese Eigenschaft wurde sich zunutze gemacht, um den Vektorhintergrund während des Klonens zu verringern. Die DNA wurde nur für einen kurzen Zeitraum (~ 10 Minuten) bei 37 °C mit CIAP inkubiert. Der Prozess des Restriktionsverdau bzw. der Phosphatasebehandlung wurde durch Überführen des Reaktionsgemisches auf 4 °C oder –20 °C gestoppt. Ergänzend wurde DNA-Beladungspuffer zu dem Reaktionsgemisch gegeben, um die Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese aufzutrennen.

#### 2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) anhand von unterschiedlichen Laufverhalten aufzutrennen, was dazu dient, ihre Größe und Masse durch einen Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe zu bestimmen.

Die Agarose-Gelelektrophorese wird angewendet, um das Fortschreiten eines Restriktionsenzymverdau zu stoppen. Weiterhin dient sie dazu, die Ausbeute und Reinheit der DNA-Reinigung oder einer PCR-Reaktion zu bestimmen. Ebenso zählt die Trennung der DNA-Fragmente auf der Basis ihrer Größe, um sie später vom Gel zu reinigen, zu den Verwendungsmöglichkeiten der Agarose-Gelelektrophorese.



Die DNA-Proben werden mit einem Beladungspuffer gemischt, der einen Farbstoff enthält, um die Vorderseite zu markieren. Anschließend werden diese in die Probenvertiefungen geladen. Die Gele werden 45 Minuten lang bei konstanter Spannung (100 bis 200 Volt) einer Elektrophorese unterzogen. Größenmarker werden zusammen mit den DNA-Proben einer Co-Elektrophorese ausgesetzt, um die Größe der aufgelösten Fragmente zu bestimmen. Die Gele werden mit Ethidiumbromid, das in der Gelmatrix enthalten war, gegossen, um die Sichtbarmachung der DNA-Fragmente unter UV-Licht (302 bis 366 Newtonmeter) zu ermöglichen. Alternativ werden die Gele mit Safeview (einem Farbstoff, der Ethidiumbromid – ein toxisches mutagenes Reagens – ersetzt) mit einer Fluoreszenzemission von rund 490 Newtonmetern gegossen. Der Prozentsatz der Gele liegt zwischen 0,8 Prozent und 2 Prozent, abhängig von der Größe der aufgelösten Fragmente: Je größer das DNA-Fragment ist, desto geringer ist der Prozentsatz des anzufertigenden Agarosegels.

### 2.2.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerasen-Ketten-Reaktion (nachfolgend PCR) ist es möglich, einen DNA-Abschnitt *in vitro* in großen Mengen zu vervielfältigen. Für die PCR werden die zu vervielfältigende Matrizen-DNA, die spezifischen Primer – welche an die Ausgangs-DNA binden –, Desoxynukleotide sowie eine thermostabile Polymerase zusammengegeben. Insgesamt werden im Rahmen der PCR 20 bis 40 Zyklen durchlaufen. Jeder Zyklus besteht dabei aus drei Schritten: Zunächst erfolgt die Denaturierung, die der Auftrennung der doppelsträngigen DNA dient und bei ca. 95 °C stattfindet. Als zweites folgt die Phase der Anlagerung. Während dieser wird die Temperatur wieder gesenkt und es lagern sich die beiden Primer an ihre komplementären Sequenzen in der Matrizen-DNA an. Als letzter Schritt findet die Elongation statt. Bei dieser kommt es zu einem erneuten Temperaturanstieg auf ca. 75 °C. Hierbei nutzt die thermostabile DNA-Polymerase die angelagerten Primer als Startpunkt und baut die vorhandenen Desoxynukleotide komplementär zur Matrizen-DNA ein.

Der erste und zweite Zyklus unterscheidet sich leicht von den darauffolgenden Zyklen. Bei den entstehenden Produkten am Anfang einer PCR handelt es sich um zu lange Amplifikate. Dies lässt sich auf eine Synthese des neuen Strangs über die Bindestelle des komplementären Primers hinaus zurückführen. Aus diesem Grund erhält man die gewünschte Länge erst ab dem dritten Zyklus (Molekularbiologische Methoden 2.0).

Der PCR-Reaktionsansatz erfolgt gemäß den Angaben von Tabelle 12.

**Tabelle 12:** Protokoll zur PCR

Plasmid-DNA/genomische DNA	0.5-5 ng/25-200 ng
5x Phusion HF Puffer/10x Roche Buffer	6 µl/3 µl
dNTP-Mix	2,4 µl
Primer F	1,2 µl
Primer R	1,2 µl
Phusion HF Polymerase/Roche Polymerase	0.6 µl/0.3 µL
Steriles H <sub>2</sub> O	auf 30 µL auffüllen
Plasmid DNA/genomische DNA	0.5-5 ng/25-200 ng

Die PCR erfolgt in den innerhalb der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Teilschritten:

**Tabelle 13:** Ablauf der PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94°C (96°C bei Verwendung von genomischer DNA)	5 min
2	94°C	1 min
3	50-65°C (Primer-Schmelztemperatur überprüfen)	1 min
4	72°C	1 min
5	72°C	5 min
6	4°C	∞

Die Schritte 2 bis 4 werden dabei 24 bis 34 Mal wiederholt

#### 2.2.1.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Nach der Elektrophorese wird der Bereich des Gels, der die isolierten DNA-Fragmente enthält, herausgeschnitten, gewogen und es wird das gemäß den Anweisungen des Kits (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) vorgeschriebene Volumen an DNA-Bindungspuffer hinzugegeben. Die Gelmatrix wird anschließend bei 55 °C geschmolzen und auf eine Reinigungssäule (die eine Siliciumdioxid Matrix enthält) aufgetragen. Nach der vorgeschriebenen Anzahl von Wäschen, um alle verbleibenden Verunreinigungen zu entfernen, wird die gereinigte DNA mit Puffern geringer Salzelution eluiert.

### 2.2.1.5 DNA-Ligation

Die DNA-Ligation dient der Verknüpfung zweier DNA-Fragmente zu einer Einheit. Ein 30-Mikroliter-Ansatz beinhaltet 6 Mikroliter linearisierten Vektor, 4 Mikroliter linearisiertes Insert, 0,5 Mikroliter T4-DNA-Ligase (Fermentase), 3 Mikroliter 10fach T4-Puffer und 16,5 Mikroliter steriles Wasser zum Auffüllen. Zur Bestimmung des Hintergrunds (z. B. unvollständig geschnittener Vektor) sollte eine Kontrolle angesetzt werden. Diese wird auf die gleiche Weise wie die Ligation hergestellt. Allerdings wird hierbei die Insertmenge durch steriles Wasser ersetzt. Die angesetzte Lösung wird für 16 Stunden konstant bei einer Temperatur von 18 °C gehalten, anschließend für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt und schließlich bei 4 °C aufbewahrt.

**Tabelle 14:** Protokoll zur DNA-Ligation

	<b>Ligation</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>Vektor</b>	6 µl	6 µl
<b>Insert</b>	4 µl	-
<b>10fach T4 Puffer</b>	3 µl	3 µl
<b>Steriles Wasser</b>	16,5 µl	20,5 µl
<b>T4-Ligase</b>	0,5 µl	0,5 µl
<b>Volumen gesamt</b>	30 µl	30 µl

Die Ligation erfolgt in den innerhalb der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Schritten:

**Tabelle 15:** Protokoll zum zeitlichen Ablauf der Ligation

18°C	16 Stunden
65°C	10 Minuten
4°C	∞

### 2.2.1.6 Elektroporation

Elektroporation dient dem Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Zunächst wird der DNA der Eintritt ermöglicht, indem die Membran des E. coli-Bakteriums vorübergehend permeabel wird. Durch eine selektive Agarplatte (z. B. mit Antibiotikum) werden nur Bakterienzellen positiv selektioniert, die ein Plasmid aufgenommen haben. Im Anschluss an das ausreichende Wachstum der Kolonie kann mit Hilfe einer sogenannten Minipräparation Plasmid-DNA gewonnen werden.

Die allgemeinen Grundeinstellungen des Elektroporators liegen bei 400 Ohm und 25 Mikrofara. Nach dem Einschalten muss die Voltzahl auf 2,5 erhöht werden; dies entspricht dem Maximum.

Zunächst wird 1 Milliliter SOC in den Pasteur, anschließend die DNA in jeweils 50 Mikroliter-Aliquots pipettiert. Die zu pipettierende Menge DNA liegt bei einer Ligation bei ca. 1,5 Mikroliter einer 50 Mikroliter-Reaktion. Bei geplanter Retransformation wird 1 Mikroliter einer 1:1000- bis 1:100000-Verdünnung verwendet. Im nächsten Schritt erfolgt die blasenfreie Befüllung der Elektroporationsküvette mit allen zuvor genannten Bestandteilen. Anschließend wird die Küvette in den Elektroporator gestellt und dieser wird gestartet. Die Zeitkonstante sollte zwischen 6 und 10 liegen. Sollte sie niedriger sein, ist auch die Transformationseffizienz geringer. Die Resuspendierung mit 1 Milliliter SOC in Kulturröhrchen sollte direkt im Anschluss vorgenommen werden. Danach erfolgt für 30 bis 60 Minuten eine Inkubation der Zellen bei 37 °C. Im letzten Schritt werden zwischen 100 und 500 Mikroliter der Lösung auf eine selektive Platte gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wird als sogenannte Minipräparation bezeichnet. Nachdem die Zellkolonien auf dem Selektivmedium ausreichend gewachsen sind, werden sie in ein Flüssigmedium geimpft und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert.

Mit Hilfe der Plasmid-DNA wird die Minipräparation mit dem „Nucleo Spin® Plasmid Mini-Kit“ von Machery-Nagel nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

#### 2.2.1.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Mit Hilfe des „NanoDrop“-Geräts der Firma ThermoScientific wurde die Extinktion der DNA-Proben angezeigt. Durch die Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die DNA-Konzentration (c) der Proben ermittelt werden:

$$E_{\lambda} = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I_1} \right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

(E: Extinktion; I1: Intensität des transmittierten Lichtes; I0: Intensität des einfallenden Lichtes; c: Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz,  $\epsilon_{\lambda}$ : dekadischer Extinktionskoeffizient, d: Schichtdicke der Küvette)

### 2.2.1.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, HRB 381757) nach der Technik von Sanger (Sanger und Coulson 1975).

## 2.2.2 Biochemische Techniken

### 2.2.2.1 Zelldichte bei Hefezellen

Mit Hilfe des Spektralphotometers wird die Zelldichte der Hefezellkulturen gemessen. Die optische Dichte (OD) gibt die Dichte von Zellen in einem flüssigen Medium an, die bei 600 Newtonmetern gemessen wurde (OD600). Dabei wird die von der Schichtdicke unabhängige Extinktion angegeben.

### 2.2.2.2 Alkalische Natriumhydroxid-Lyse von Zellen

Um die Proteine für weitere Experimente aus den *S. cerevisiae* extrahieren zu können, muss die Zelle lysiert werden. Eine alkalische Lösung dient hierbei dem Aufbrechen der Zellmembran. Diese Natriumhydroxid-Lyse erfolgt für alle Proben, die auf ein SDS-Gel aufgetragen werden sollen.

Zunächst werden die aufzutragenden Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase bei 13 000 Upm zentrifugiert und dann in 200 Mikrolitern 100 mM NaOH resuspendiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden sie erneut pelletiert und entsprechend der Zelldichte in variablen Volumina von 1 × SDS-Ladepuffer resuspendiert. Danach wird die Suspension fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und dann pelletiert. Der sich daraus ergebende Überstand wird als Proteinlysate verwendet.

### 2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach Größe und Ladung in einem elektrischen Feld. Die zuvor alkalisch lysierten und durch SDS-Ladepuffer-Resuspension negativ geladenen und mit DTT (Dithiothreitol) versetzten Proteine wandern durch das Anlegen einer Spannung zum positiven Pol – der Anode. Generell wandern kleinere Proteine schneller und leichter durch das Gel als größere.

Die verschiedenen Proteine besitzen eine individuelle Netto-Eigenladung. Deshalb ist das anionische Tensid SDS notwendig, um die Proteine zu beschichten und ihnen eine negative Ladung zu geben. Das Reduktionsmittel DTT (Dithiothreitol) dient hingegen der Auflösung von Disulfidbrücken. Das anschließende Probensieden ermöglicht eine Denaturierung und

eine überwiegend lineare Konformation des Proteins, sodass das Laufverhalten der jeweiligen Proteine nur noch von ihrem molekularen Gewicht abhängt.

Das System der SDS-PAGE besteht hauptsächlich aus drei Komponenten: dem Trenn- und Sammelgel sowie dem Elektrodenpuffer. Für diese Arbeit wurden Sammelgele mit einer 5 %-igen Konzentration und Trenngele überwiegend mit einer 12 %-igen Konzentration verwendet.

**Tabelle 16:** Protokoll zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel

	Sammelgel 5 % in ml Mengenangaben für 2 Gele	Trenngel 12 % in ml Mengenangaben für 2 Gele
H <sub>2</sub> O	5,5	3,3
Acrylamide mix (30 %)	1,3	4,0
1.5 M Tris (pH 8,8)	-	2,5
1.0 M Tris (pH 6,8)	1,0	-
SDS (10 %)	0,08	0,1
Ammonium persulfate (10 %)	0,08	0,1
TEMED	0,008	0,004

Die für die Gelherstellung zu verwendenden Glasplatten werden vor jedem Gebrauch gewaschen und mit Ethanol gereinigt. Im Anschluss werden als erstes 3,5 Milliliter des Trenngels zwischen die Glasplatten gegossen und an der Oberkante mit 100 % Isopropanol abgedeckt, um eine gerade Kante zu erhalten. Nach ca. 45 Minuten ist eine vollständige Polymerisation des Trenngels zu erwarten. Das Isopropanol muss abgegossen und vollständig entfernt werden, sodass die Kammer mit ca. 1 Milliliter Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm für die Taschen eingesetzt werden kann. Nachdem auch das Sammelgel vollständig polymerisiert ist, kann der Kamm für die Taschen vorsichtig entfernt werden und es kann – mit Hilfe der Gele – der Zusammenbau der Kammer erfolgen. Je nach Taschengröße werden bis zu 15 Mikroliter der Probe in die Tasche eingebracht. Als Längenstandard kommt der Page Ruler Prestained von ThermoScientific zur Anwendung. Während sich die Proteine im Sammelgel befinden, liegt der Strom bei 15 Milliampere pro Gel. Nachdem die Moleküle das Trenngel erreichen, wird der Strom auf 30 Milliampere pro Gel erhöht. Bei Ankunft der Marker am unteren Gelrand wird der Stromfluss schließlich gestoppt.

#### 2.2.2.4 Western Blot und Antikörper-Detektion

Die Antikörper-Detektion ist eine Methode zum Nachweis spezifischer Proteine, die auf der Erkennung eines Epitops durch einen Antikörper basiert. Somit wird die Analyse der im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine durch eine spezielle Visualisierung ermöglicht. Nach Absolvierung der SDS-PAGE wird das Gel in Transferpuffer gelegt. Mit Hilfe einer Art „Transfer-Sandwich“ – bestehend aus Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel und einer weiteren Schicht Filterpapier – erfolgt die Übertragung von Gel auf die Nitrocellulose-Membran. Die Herstellung des Transfer-Sandwichs erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Übertragung dauerte innerhalb der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche 80 Minuten bei Einstellungen von 60 Volt und 0,5 Ampere.

Nach der Übertragung sind die aufgetrennten Proteine für den Antikörpernachweis zugänglich: Die Membranen werden für 5 Minuten mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Dies dient dem Nachweis einer korrekten Übertragung der Proteine auf die Membran, da sich Ponceau-S unspezifisch an jedes Protein bindet. Im nächsten Schritt wird die Membran in Milchpuffer eingelegt, damit alle nicht von Proteinen besetzten Flächen blockiert werden. Anschließend wird die blockierte Membran mit dem primären Antikörper, welcher in Milch gelöst wird, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser Antikörper bindet sich spezifisch an das nachzuweisende Protein. Am folgenden Tag wird die Membran dreimal fünf Minuten lang mit 1xPBS-T gewaschen. Im letzten Schritt wird die Membran mit dem sekundären Antikörper eine Stunde lang bei Raumtemperatur in Milch inkubiert, dann erneut dreimal in 1xPBS-T gewaschen und schließlich im Licor Odyssey gescannt.

### 2.2.3 Experimente mit *S. cerevisiae*

#### 2.2.3.1 Transformation von Hefezellen

Damit manipulierte DNA in Hefezellen eingebracht werden kann, muss eine Transformation durchgeführt werden. Zunächst erfolgt eine Inkubation des Stamms in 4 Millilitern Flüssigmedium für 24 Stunden bei 30 °C.

Die flüssige Kultur wird bei 2 000 Upm für 5 Minuten abzentrifugiert und anschließend in 1 Milliliter sterilem Wasser gewaschen. Das entnommene Pellet wurde im Rahmen der Versuche in 200 Mikrolitern Lithium-Acetat-Mix resuspendiert und mit 0,5 bis 1,0 Mikrogramm DNA und 18 Mikrolitern Carrier-DNA vermennt und gevortext. Anschließend wurden 1,2 Milliliter PEG-Lösung hinzugegeben. Es erfolgte zunächst eine Inkubation für 45 Minuten bei Raumtemperatur und für weitere 15 Minuten bei 42 °C. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Zell-Pellet mit 100 Millilitern sterilem Wasser resuspendiert und auf selektiven Platten ausgestrichen. Abschließend folgt die Inkubation dieser Platten bei 30 °C für ca. 48 Stunden.

### 2.2.3.2 Wachstumstest

Die zu untersuchenden Zellkulturen werden über Nacht in 3 Millilitern YPAD inkubiert. Am nächsten Tag werden 900 Mikroliter steriles Wasser (H<sub>2</sub>O), zusammen mit 100 Mikrolitern der Zellkultur, in eine Küvette gegeben und die OD (optische Dichte) wird bestimmt. Mit Hilfe der folgenden Formel wird die Zellkultur entsprechend ihrer gemessenen OD mit H<sub>2</sub>O verdünnt:

$$OD_{600}(\text{unverdünnt}) \times \text{Volumen} = OD_{600}(\text{verdünnt}) \times 1000\text{ml}$$

Anschließend werden die bereits verdünnten Zellkulturen dreimal jeweils im Verhältnis 1:8 weiter verdünnt. So entsteht eine Verdünnungsreihe mit insgesamt vier Verdünnungsstufen.

### 2.2.3.3 Kreuzung der GFP-getaggten Bibliothek mit den zu untersuchenden *ret2* Mutanten

Für die Hefe *S. cerevisiae* wurde eine Methode, die „SGA-Analyse“ (Synthetic Genetic Array) entwickelt, welche die Möglichkeit bietet, eine systematische Konstruktion von Doppelmutanten zu erstellen und eine globale Analyse von genetischen Wechselwirkungen ermöglicht. In einem SGA-Screening wird eine sogenannte Query-Mutation mit einem geordneten Array von ungefähr 5000 lebensfähigen Gen-Deletionsmutanten gekreuzt, sodass die Nachkommen, welche die Mutationen aufweisen, hinsichtlich ihrer Veränderungen bewertet werden können. Dieser Ansatz kann auch mit Hefearrays, die Modifikationen wie eine GFP-Fusion enthalten, durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Verwendung einer Hefebibliothek, deren einzelnen Proteine eine GFP-Markierung trugen, sodass eine Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisationsbestimmung des jeweiligen Proteins im jeweils zu untersuchenden genetischen Hintergrund möglich war. Dieser Array-basierte Ansatz automatisiert die genetische Analyse von Hefen im Allgemeinen und kann leicht für eine Reihe unterschiedlicher genetischer Screenings angepasst werden.

Für die SGA-Analyse ist zunächst ein Aufbau erforderlich, bei dem die Bibliotheks-Stämme und die Knockout- oder modifizierten Stämme generiert werden. Anschließend umfasst das Verfahren mehrere Replikationsschritte, die manuell oder robotergesteuert durchgeführt werden können. Für das SGA dieser Arbeit wurde der Rotor HDA der Firma Singer Instruments verwendet; der Ablauf orientierte sich an den Herstellerempfehlungen.



## SGA-Ablauf:

Der im Folgenden beschriebene Ablauf wurde sowohl für die isogenetische Kontrolle als auch für den Knockout Stamm durchgeführt. Beide wurden als modifizierter Stamm beschrieben (s. Tabelle 8).

### 1. Herstellung der Quellenplatten des modifizierten Stamms und der GFP-Bibliothek

Der modifizierte Stamm wurde über Nacht in 5 ml YEED hochgezogen.

Die flüssige Kultur wurde auf eine YEED-Platte gegossen und mit einem Replikator auf eine frische YEED-Platte übertragen. In dem darauffolgenden Schritt diente diese Platte als Quelle zur Paarung mit der bekannten GFP-Bibliothek. Das zu verwendende Format betrug 384 Kolonien pro Platte. Das Fixieren des modifizierten Stamms in einem 384-Format auf einer Agarplatte wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Die Kolonien wuchsen für zwei Tage lang bei 30 °C.

Die GFP-Bibliothek wurde auf frisches YEED-G418-Medium im 384 Kolonien-Format kopiert, sodass die Formate der zu kreuzenden Stämme übereinstimmten. Eine Inkubation von einem Tag bei 30 °C wurde durchgeführt.

### 2. Kreuzung des modifizierten Stamms auf der 384 Kolonien-Platte mit der GFP-Platte im 384 Kolonien-Format (diploide Selektion):

Als erstes wurde die gewachsene Platte mit den 384 Kolonien des modifizierten Stamms auf eine frische YEED-Platte übertragen. Im nächsten Schritt wurde die GFP-Bibliotheks-Platte auf die zuvor aufgetragenen Kolonien des modifizierten Stamms übertragen und einen Tag bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3. MATa / Adiploide Selektion und Sporulation:

Die resultierenden MATa/ Azygoten wurden zur Selektion auf YEED-G418-/ clonNAT-Platten übertragen. Die diploiden Selektionsplatten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die diploiden Zellen auf angereichertes Sporulationsmedium übertragen. Die Platten wurden fünf Tage bei 22 °C inkubiert.

### 4. MATa meiotische Nachkommenauswahl (haploide Selektion):

Die Sporen wurden auf SD-His-Arg-Lys+canavanine+S-AEC-Medium übertragen. Die haploiden Selektionsplatten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

### 5. Wiederholung des Schritts vier

## 6. Herstellung der finalen modifizierten Selektion der GFP-Bibliothek

Es erfolgte eine Übertragung der Sporen aus den Schritten vier und fünf auf SD(MSG)-His-Arg-Lys-ura+canavanine+S-AEC+CloNAT für alle Markierungen beider Quellstämme (modifizierte Stämme (Tabelle 8) und GFP-Bibliothek). Die Selektionsplatten wurden zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung eines Knockout-Stammes und einer isogenetischen Kontrolle

Um die Fragestellung dieser Dissertation zu beantworten, musste ein Knockout-Stamm hergestellt werden, in welchem die  $\mu$ -Homologie-Domäne von delta-COP deletiert ist. Der Knockout-Stamm Ret2LD2 $\alpha$  wurde nach dem Genabschnitt benannt, welcher der Deletion vorangestellt ist, der Longin-Domäne und der darauffolgenden alpha-Helix 2 $\alpha$ . Um einen Stamm mit der  $\mu$ -Homologie-Domäne zu erhalten, der mit dem Ret2LD2 $\alpha$ -Stamm vergleichbar ist, wurde eine isogenetische Kontrolle, der Stamm Ret2Clonat, erstellt (Tabelle 8). Beide Stämme enthalten ein Gen, welches Resistenz gegen Clonat vermittelt und als Selektionsmarker dient.

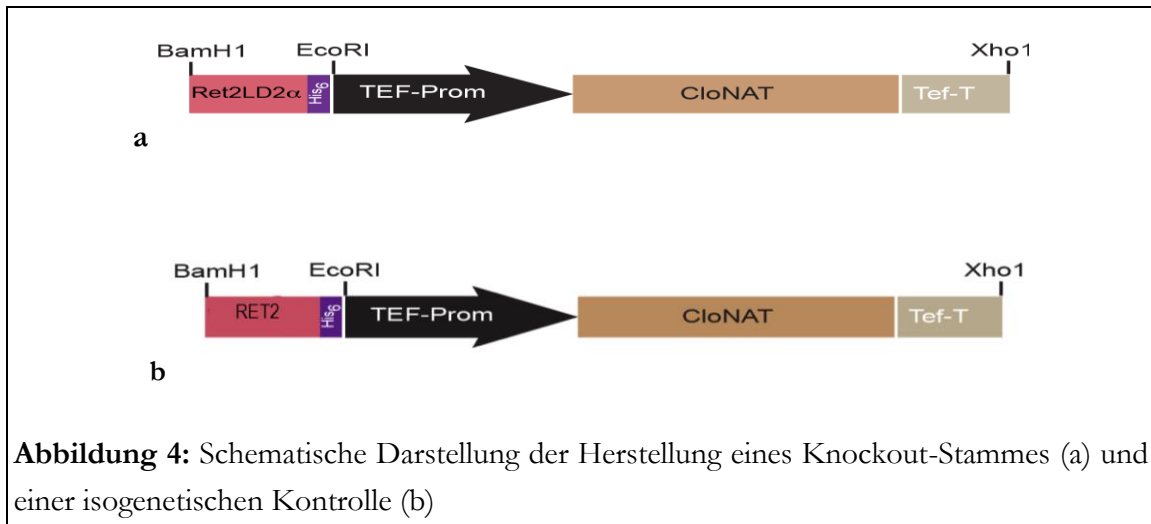
Die Strategie zur Herstellung dieser Stämme beruht auf homologer Rekombination. Hierfür musste zunächst ein Vektor hergestellt werden, der die gewünschten genetischen Informationen enthält. Bei diesem Vorgang wurden Restriktionsenzyme, welche die DNA an bestimmten Positionen erkennen und schneiden können, eingesetzt. Bevor die benötigten Schnittsequenzen mittels Plasmids in den Zielorganismus transferiert werden konnten, mussten sie durch Ligasen miteinander verknüpft werden.

**Tabelle 17:** Die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre jeweilige Erkennungssequenz

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz
BamHI (Bacillus amyloliquefaciens)	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'
EcoRI (Escherichia coli)	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'
XhoI (Xanthomonas holcicola)	5'-CTCGAG-3' 3'-GAGCTC-5'

(Official REBASE Homepage | The Restriction Enzyme Database | NEB)

Die zur Rekombination zu verwendende Kasette wurde unter Verwendung von BamHI-EcoRI und EcoRI-XhoI in P416 kloniert.

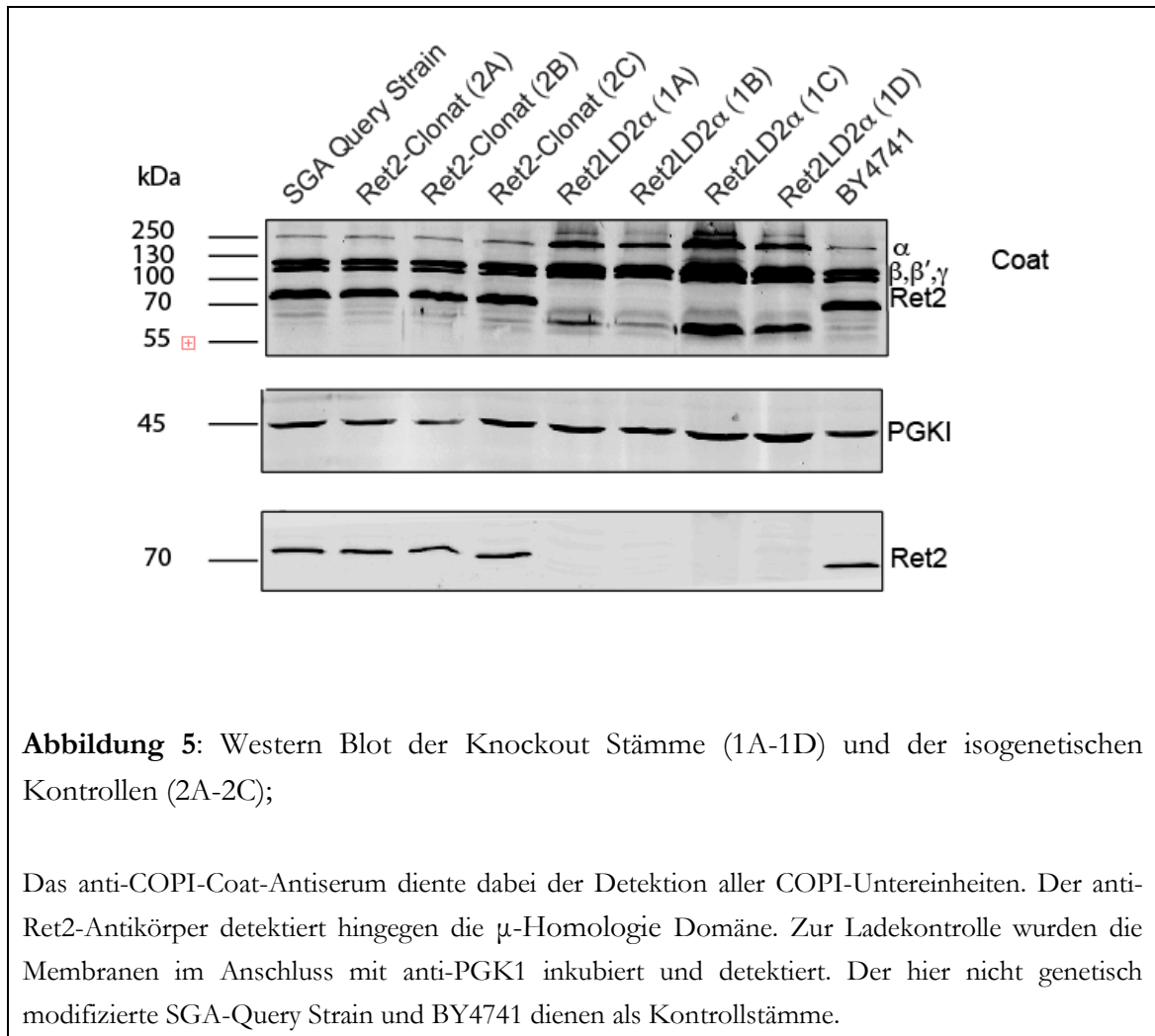


**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Herstellung eines Knockout-Stammes (a) und einer isogenetischen Kontrolle (b)

Nachdem ein geeigneter Plasmid-Vektor (p416 Ret2LD2a-His6-Tefp-Clonat) mit den erforderlichen genetischen Informationen hergestellt worden war, musste dieser zum Zwecke der homologen Rekombination in den Zielorganismus *S. cerevisiae* transferiert werden. Das innerhalb der Untersuchungen erzeugte und verwendete Plasmid wies eine Antibiotikaresistenz gegen Clonat auf. Durch das Wachstum auf Clonat-haltigem Selektivagar kam es zur Selektion der Hefezellen, in denen der Austausch stattgefunden hatte.

### 3.2 Auswahl eines Knockout-Stammes und einer isogenetischen Kontrolle

Die Auswahl eines geeigneten Knockout Stammes und einer isogenetischen Kontrolle wurde anhand von mehreren Faktoren – den Western Blots, der Wachstums-Analyse, der DNA-Analyse der genomischen DNA sowie der DNA-Sequenzierung – getroffen. Es wurden insgesamt vier Knockout-Stämme (1A-1D) und drei isogenetische Kontrollen (2A-2C) ausgewertet. Mit Hilfe von PCR aus genomischer DNA, gefolgt von einer DNA Sequenzierung, konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Stämmen 1A-1D um Stämme handelte, bei denen die  $\mu$ -Homologie Domäne (Ret2) nicht vorhanden war. Dies wurde zusätzlich durch einen Western-Blot untermauert, in dem das delta-COP-Protein (Ret2) mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 5).



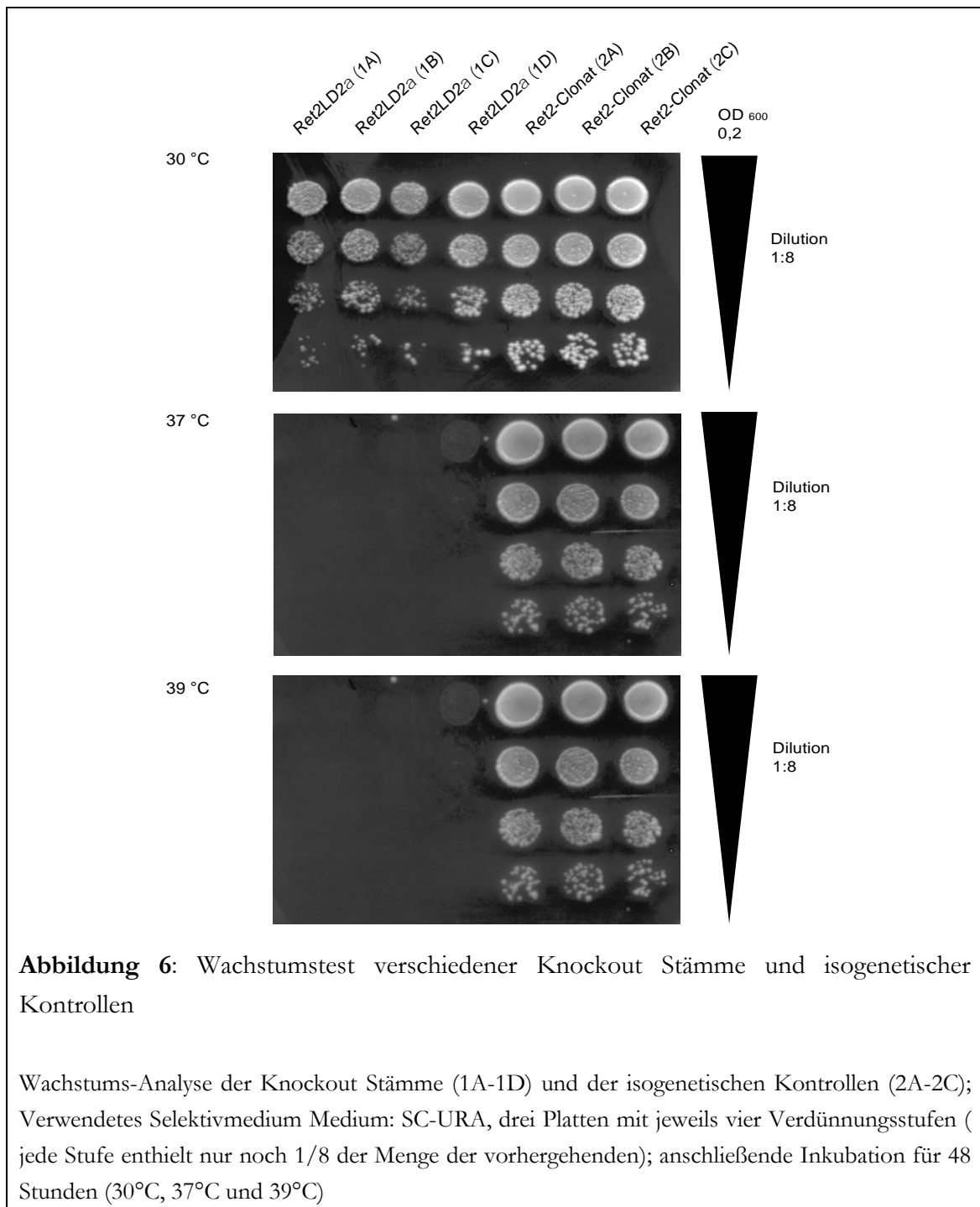
**Abbildung 5:** Western Blot der Knockout Stämme (1A-1D) und der isogenetischen Kontrollen (2A-2C);

Das anti-COPI-Coat-Antiserum diente dabei der Detektion aller COPI-Untereinheiten. Der anti-Ret2-Antikörper detektiert hingegen die  $\mu$ -Homologie Domäne. Zur Ladekontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit anti-PGK1 inkubiert und detektiert. Der hier nicht genetisch modifizierte SGA-Query Strain und BY4741 dienen als Kontrollstämme.

Bei der Untersuchung des Western Blots (siehe Abbildung 5) war – im Vergleich zu den isogenetischen Kontrollen – eine Zunahme von  $\alpha$ -COP in den Knockout-Stämmen zu erkennen. Es lag der Verdacht einer Kompensationsreaktion nahe, mit der die Zellen möglicherweise versuchen, die Funktionalität des COPI-Komplexes zu steigern. Der Stamm 1B zeigte die größte Konformität zu den Vergleichsstämmen. Die isogenetischen Kontrollen wirkten im Western Blot kongruent.

Die Analyse der genomischen DNA lieferte bei den Knockout-Stämmen 1B und 1C die besten Ergebnisse. Für die isogenetischen Kontrollen zeigte hingegen die genomische DNA von 2A den optimalsten Wert.

Um Aussagen zum Wachstum der einzelnen Stämme machen zu können, wurde je ein Wachstumstest für die Knockout Stämme (1A-1D) und die isogenetischen Kontrollen (2A-2C) bei 30, 37 und 39 °C durchgeführt. Temperaturen über 30°C setzen Hefezellen unter Hitzestress und ermöglichen einen Test auf den robusten Ablauf aller zellulären Prozesse. Hitze-Empfindlichkeit ist häufig ein Anzeichen für eine molekulare Fehlfunktion in einem genetisch manipulierten Stoffwechselweg oder zellbiologischen Prozess. Eine Visualisierung der bei diesem Test erzielten Ergebnisse zeigt Abbildung 6.



Es wurden drei Platten mit jeweils vier Verdünnungsstufen angefertigt. Jede dieser Stufen enthielt nur noch ein Achtel der Konzentration der vorherigen Stufe. Anschließend wurden die Platten für 48 Stunden in Inkubatoren mit den bereits erwähnten, unterschiedlichen Temperaturen (30°C, 37°C und 39°C), gelegt.

Bei der Auswertung der Resultate zeigte sich, dass die Knockout-Stämme hitzeempfindlich, die isogenetischen Kontrollen hingegen hitzestabil, waren. Bei 30 °C waren alle Stämme lebensfähig. Durch zunehmende Verdünnung zeigte sich jedoch eine erhöhte

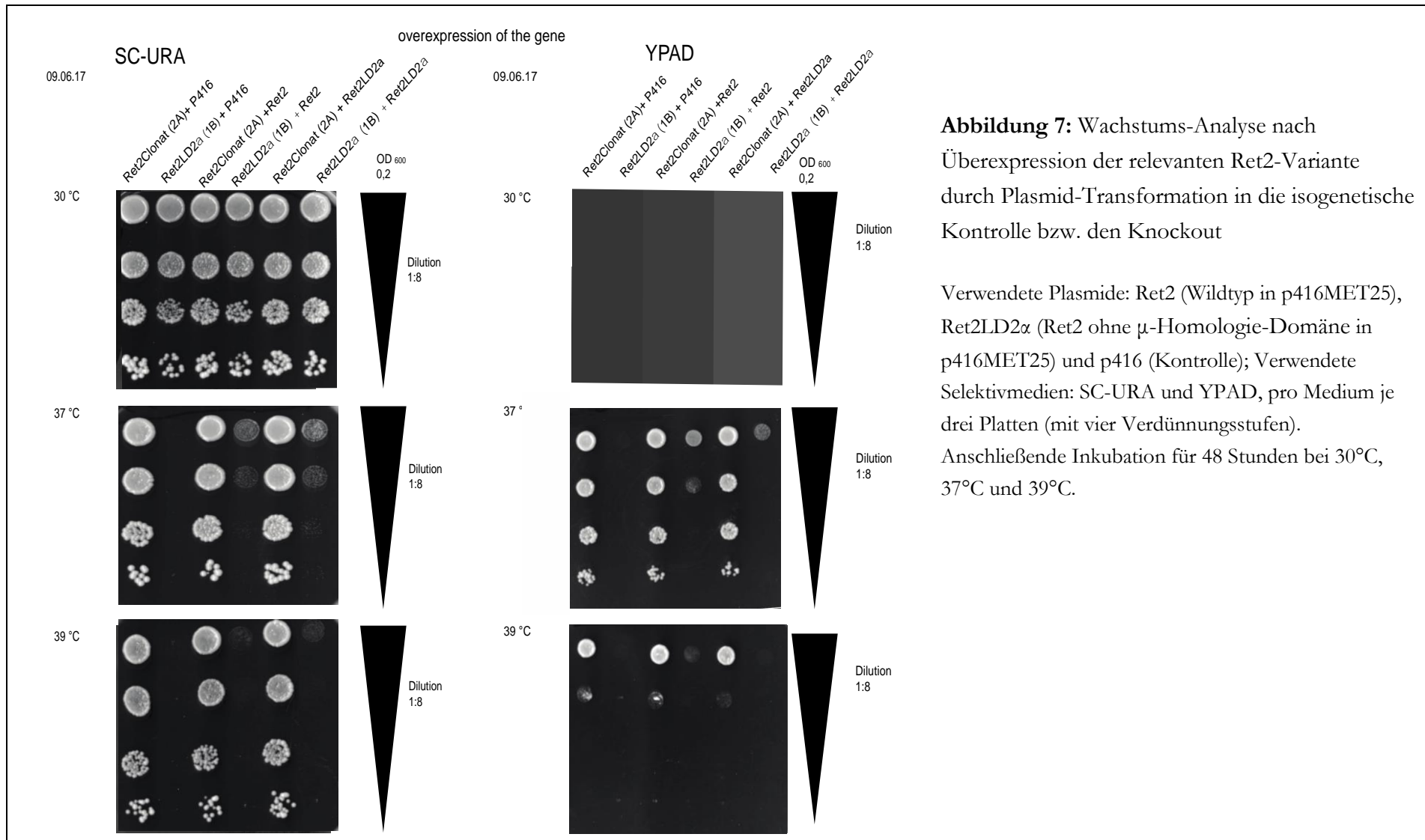
Wachstumsrate der isogenetischen Kontrollen im Vergleich zu den Knockout Stämmen. Innerhalb der Knockout-Stämme schien das Wachstum von 1B und 1D leicht überlegen zu sein. Unter den isogenetischen Kontrollen waren in der Wachstums-Analyse keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

Unter Beachtung aller bisherigen Versuche zur grundlegenden Charakterisierung der Stämme lag die Wahl von 1B als Knockout-Stamm und 2A als isogenetische Kontrolle nahe.

### 3.3 Untersuchung der Hitzesensibilität

Die Ergebnisse der Wachstums-Analyse warfen neue Fragen auf, da bisher publizierte Studien eine Hitzeresistenz bis 39 °C, auch nach einer Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne, belegen (siehe Diskussion) und somit im Widerspruch zu den innerhalb dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnissen stehen. Allerdings wurde dieses Ergebnis in einem anderen genetischen Hintergrund als dem hier verwendeten des SGA-Query-Stammes erzielt (REF Arakel 2016).

Um eine genauere Auswertung der Wachstumshemmung unter Hitzeeinwirkung zu ermöglichen, wurden weitere Wachstums-Analysen durchgeführt, welche in Abbildung 7 zu sehen sind. Zunächst wurde mit Hilfe einer Überexpression von Ret2LD2 $\alpha$  versucht, das Wachstum des Knockout-Stammes zu retten. Hierzu wurden die isogenetische Kontrolle und der Knockout-Stamm jeweils mit den Plasmiden Ret2 und Ret2LD2 $\alpha$  sowie – zur Vergleichskontrolle – mit p416MET25. Bei p416MET25 handelt es sich um das leere Empfängerplasmid, in das Ret2 und Ret2LD2 $\alpha$  transformiert wurden. Weiterhin wurden die Versuche sowohl unter Verwendung eines SC-URA-Mediums (Selektion auf das Plasmid) als auch eines YPAD-Vollmediums (keine Selektion) durchgeführt.



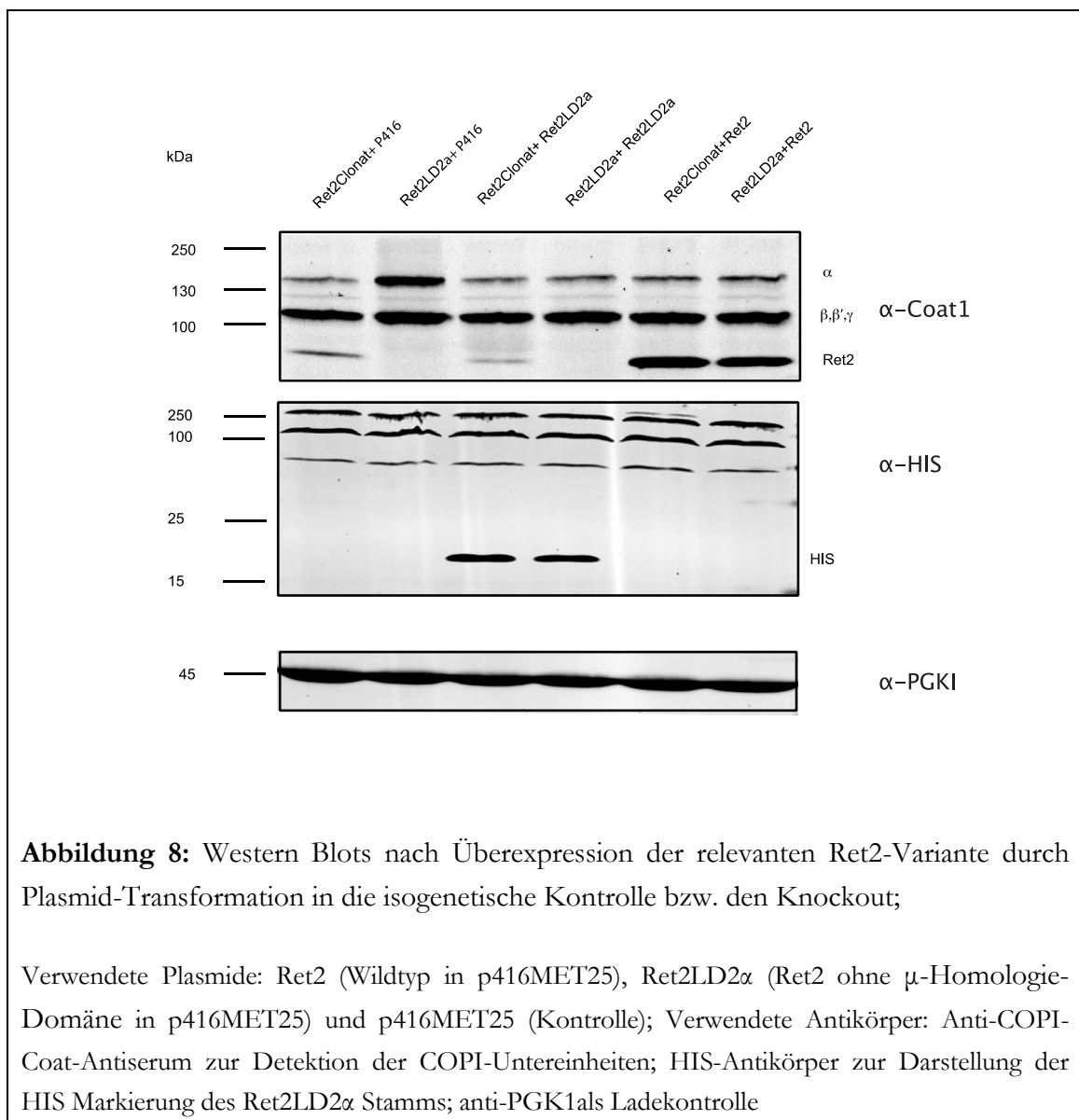
**Abbildung 7:** Wachstums-Analyse nach Überexpression der relevanten Ret2-Variante durch Plasmid-Transformation in die isogenetische Kontrolle bzw. den Knockout

Verwendete Plasmide: Ret2 (Wildtyp in p416MET25), Ret2LD2α (Ret2 ohne μ-Homologie-Domäne in p416MET25) und p416 (Kontrolle); Verwendete Selektivmedien: SC-URA und YPAD, pro Medium je drei Platten (mit vier Verdünnungsstufen). Anschließende Inkubation für 48 Stunden bei 30°C, 37°C und 39°C.



Die Assays wurden dabei parallel auf SC-URA- und YPAD-Platten mit unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Es wurden demnach auch hier pro Medium drei Platten mit jeweils vier Verdünnungsstufen angefertigt. Das bereits beschriebene Vorgehen hinsichtlich der Verdünnung wurde beibehalten (siehe Gliederungspunkt 3.2). Anschließend wurden die Platten ebenfalls für 48 Stunden in Inkubatoren mit Temperaturen in Höhe von 30, 37 und 39 °C gelegt.

Zur Verifizierung der Wachstums-Versuche wurde die Proteinexpression in den transformierten Stämmen im Anschluss mit Hilfe von Western-Blots analysiert. Das Resultat ist Abbildung 8 zu entnehmen.



In der vorangegangenen Abbildung 8 diente das anti-COPI-Coat-Antiserum der Detektion der COPI-Untereinheiten. Der anti-HIS-tag-Antikörper zeigt hingegen die HIS-tag-

Markierung des überexprimierten Ret2LD2 $\alpha$ -Proteins auf. Zur Ladekontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit anti-PGK1 inkubiert und auf diese Weise detektiert.

Bei der Auswertung des Western Blots (siehe Abbildung 8) sollte die Analogie von Knockout-Stamm und isogenetischer Kontrolle nach der Transformation mit Ret2 erwähnt werden, da die beiden Stämme im Spotting Assay ein unterschiedliches Wachstumsverhalten aufwiesen. Deutlich erkennbar wird die Überexpression von Ret2LD2 $\alpha$  durch Nachweis des HIStags sowohl im Knockout-Stamm als auch in der isogenetischen Kontrolle.

### 3.4 SGA der SWAT-GFP Bibliothek mit dem Knockout-Stamm und der isogenetischen Kontrolle

Für das geplante SGA (Herstellung einer neuen Hefe-Bibliothek mit Hilfe **S**ynthetischer **G**enetischer **A**rraytechnik) wurde eine Teilkollektion der SWAT-GFP-Bibliothek gewählt. Insgesamt besteht die Bibliothek aus vier Platten mit jeweils 1536 unterschiedlichen Proteinen. Minimiert man die Anzahl der Proteine pro Platte auf 384 Stück, so erhält man 16 Platten für die gesamte Bibliothek. Um einen angemessenen Zeitrahmen für diese Arbeit einhalten zu können, wurde der Fokus innerhalb des geplanten SGAs auf fünf ausgewählte Platten mit je 384 Kolonien gelegt. Es handelte sich hierbei um die Platten eins bis vier, sowie Platte 16. Der gesamte SGA-Ansatz erfolgte parallel für Ret2LD2 $\alpha$  und Ret2-Clonat. In Abbildung 9 wird der detaillierte Ablaufplan für den SGA-Ansatz visualisiert:

Step	Plates	Recipe	Growth	Temperature
Query strain liquid starter	Liquid media (Innoculation)	YPAD + 1x CloNAT 5ml	1 day	30°C
	Liquid media (Dilution)	YPAD + 1x CloNAT 50ml	1 day	30°C
Query strain array	Agar plates	YPAD + 1x CloNat	2 days	30°C
Library array (SWAT)	Agar plates	SC -Ura	1 day	30°C
Mating	YPAD plates	YPAD	1 day	RT
Diploid selection	Plates that contain specific selection to both the query strain markers and the library markers.	SD(MSG) -URA + 1x CloNAT	2 days	30°C
2. Diploid selection		SD(MSG) -URA + 1x CloNAT	2 days	30°C
Sporulation	Nitrogen starvation plates	(1% K acetate + met +lys + his +leu, 25% of standard SC ie 2.5ml/l of 100x stock)	5-6 days	22°C/RT in a wet box
Haploid selection	SD-His-Arg-Lys+canavanine+S-AEC for <u>MAT<sub>a</sub></u>	SD-His-Arg-Lys+canavanine+Thialysine (S-AEC)	2 days	RT
Repeat print from sporulation to haploid	SD-His-Arg-Lys+canavanine+S-AEC for MAT <sub>a</sub>	SD-His-Arg-Lys+canavanine+thialysine	2 days	RT
Final mutant selection	SD(MSG)-His -Arg-Lys-ura+canavanine+S-AEC + CloNAT for all markers from both the query strain and the library	SD(MSG)-His -Arg-Lys-ura+canavanine+S-AEC + 1x CloNAT	2days	RT

**Abbildung 9:** SGA-Ablaufplan für Ret2LD2 $\alpha$  und Ret2Clonat zur Kreuzung mit der SWAT GFP-Bibliothek

Bei den einzelnen Zwischenschritten erschien die Wachstumsgeschwindigkeit der Kontrolle geringfügig höher.

Nach der vollständigen Durchführung des SGA-Protokolls wurden einzelne Stämme stichprobenartig mit Hilfe von Western Blots verifiziert, um den Erfolg der automatisierten Kreuzung zu überprüfen.

### 3.5 Mikroskopie des SGAs

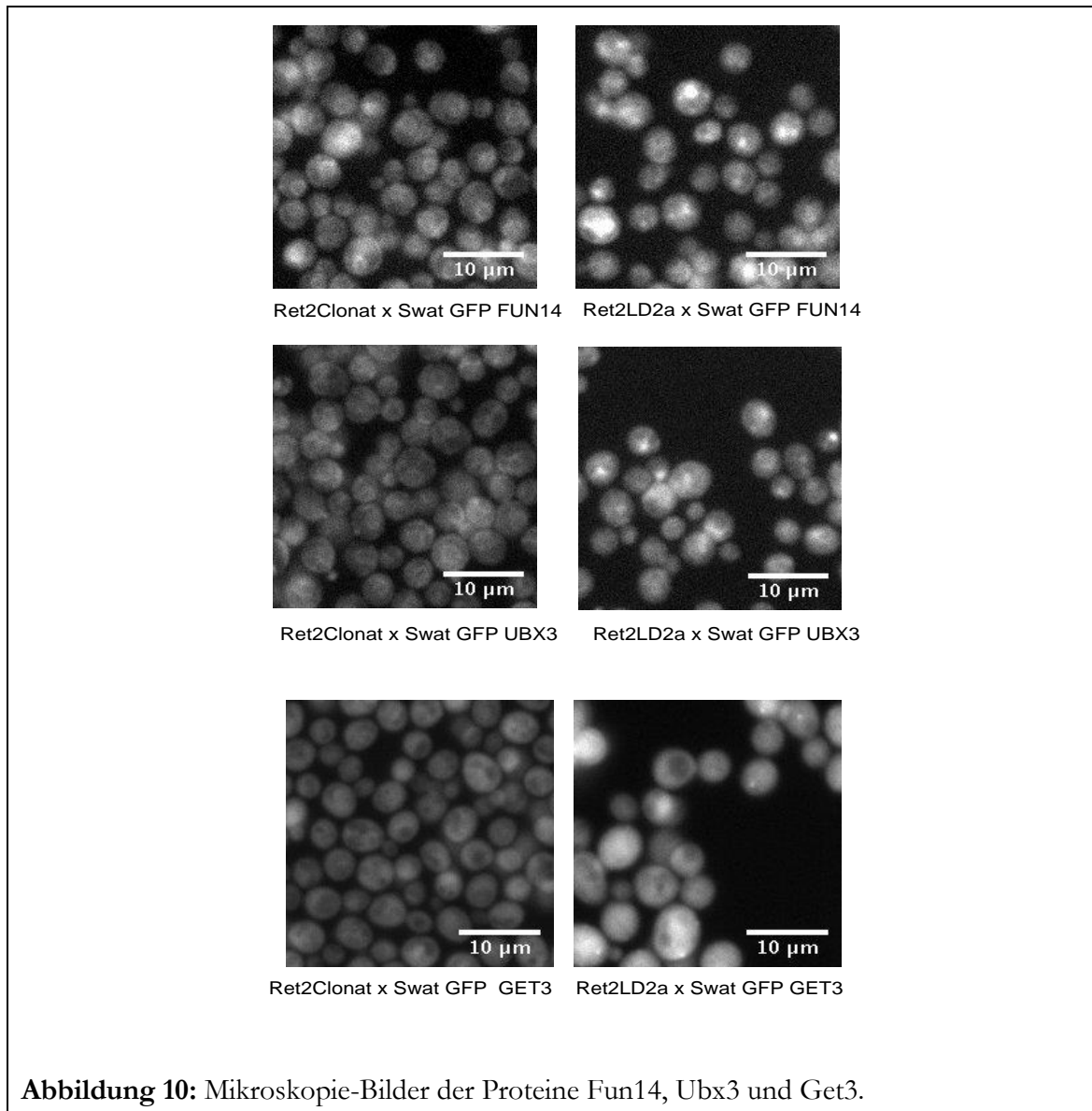
Die fünf Platten der neu hergestellten Bibliothek wurden mit Hilfe von „High Throughput“- Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Hierzu wurden die 384er-Platten mit den frisch gewachsenen Hefezellen über Nacht in SC-URA-HIS+NAT inokuliert und am nächsten Tag in einem „Low-Fluo“-Medium mit niedriger Eigenfluoreszenz verdünnt. Jeweils 30 Minuten nach der Verdünnung erfolgte die Mikroskopie. Anschließend verweilten die Kulturen zudem für weitere vier Stunden bei 30 °C im Inkubator und wurden im Anschluss erneut mikroskopiert. Somit erhielt man Bilder der exponentiellen und der stationären Wachstums-Phase.

Zur Auswertung der Mikroskopie-Bilder wurde nach einer möglicherweise veränderten Lokalisation eines Proteins in dem Mutanten-Stamm ohne  $\mu$ -Homologie-Domäne gesucht und das Ergebnis mit der Lokalisation in der isogenetischen Kontrolle verglichen.

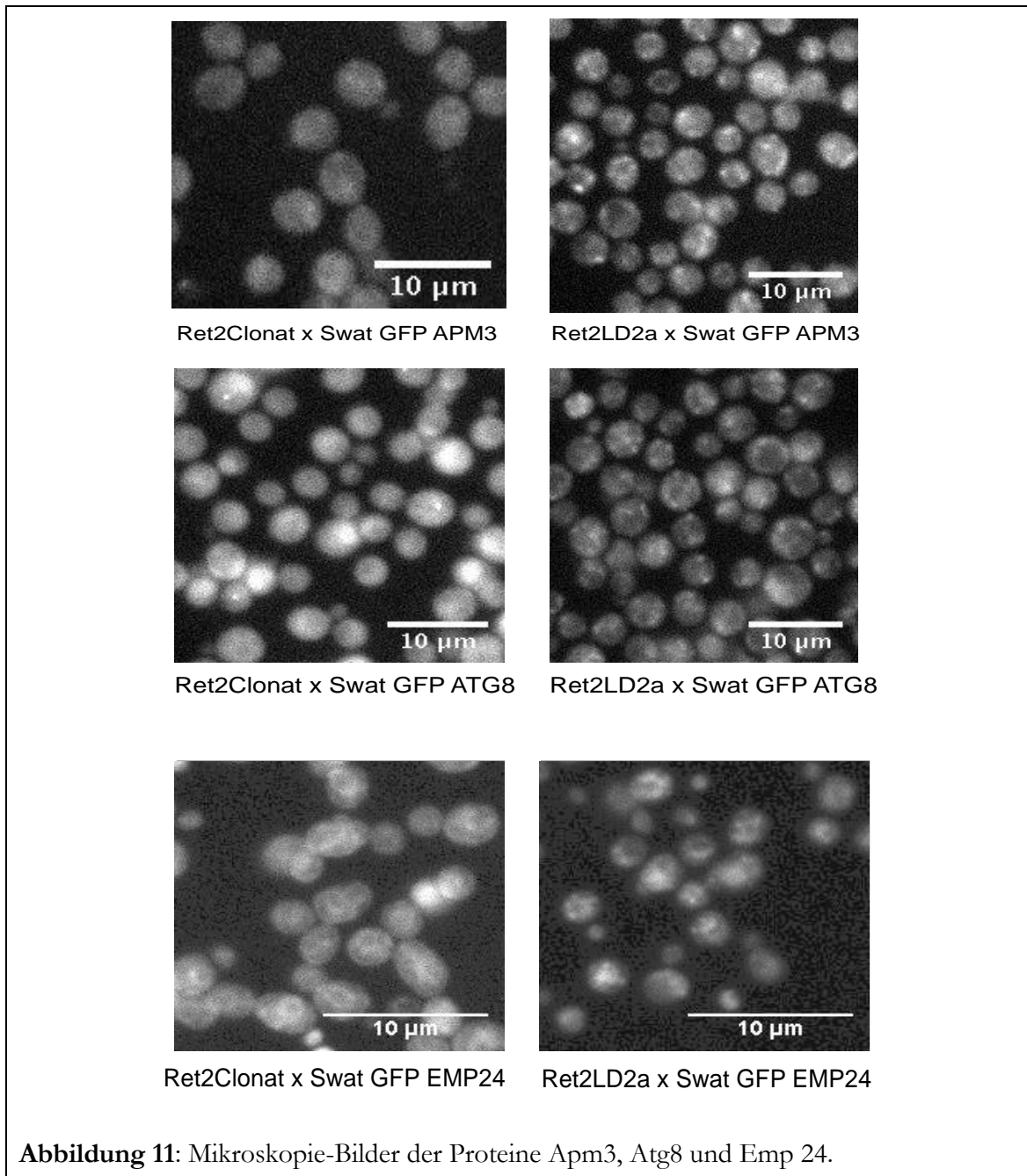
Als vorläufige Treffer wurden jene Proteine definiert, die nach der Kreuzung mit Ret2LD2 $\alpha$  einen anderen Lokalisations-Phänotyp aufwiesen als nach der Kreuzung mit Ret2-Clonat. Nach dem ersten Mikroskopie-Durchlauf ergab sich so eine Treffermenge von 54 Proteinen.

### 3.6 Untersuchung der Treffer

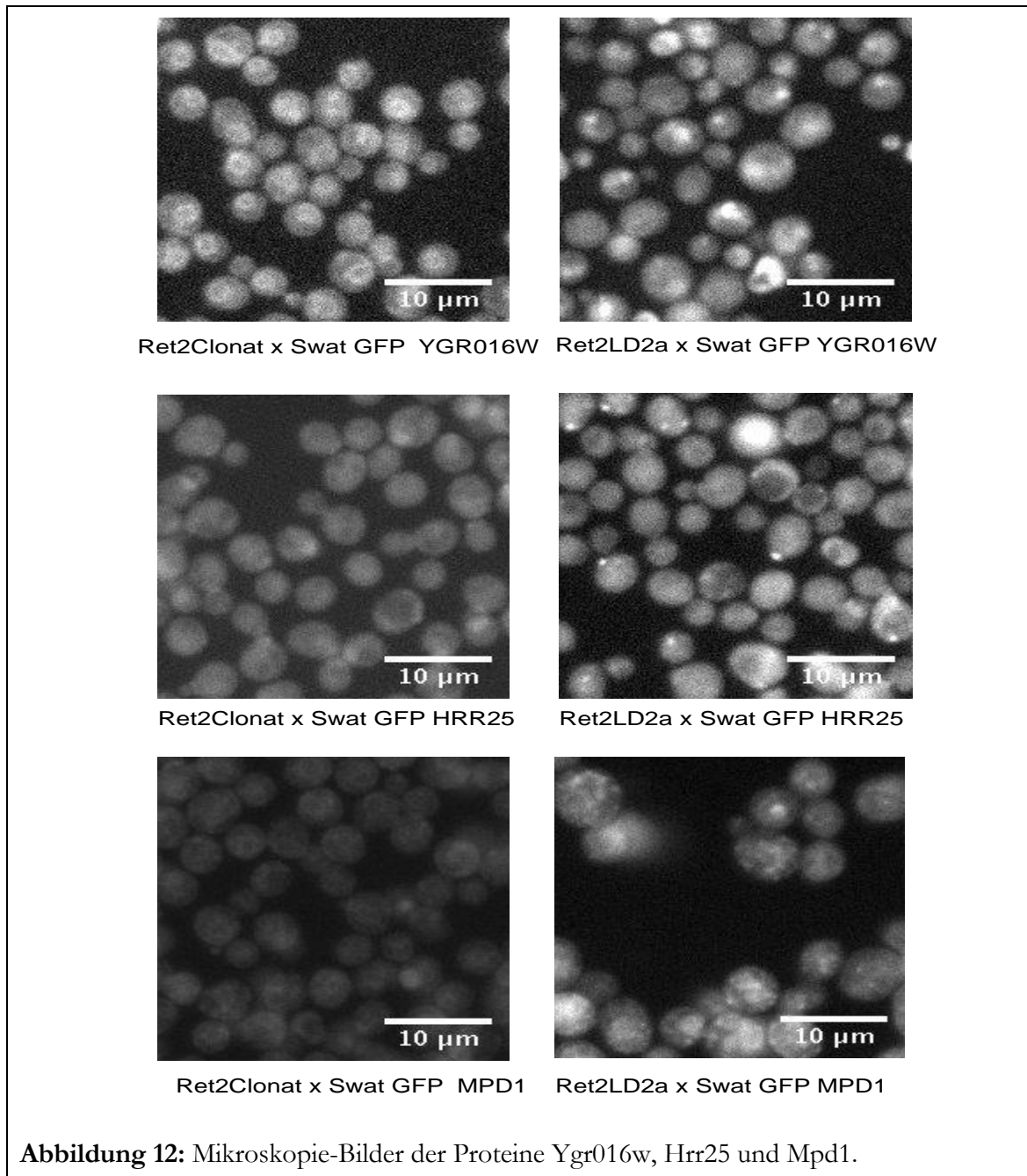
Da sichergestellt werden musste, dass es sich bei den Ergebnissen um reproduzierbare phänotypische Veränderungen handelt und dass nicht kurzfristig entstandene Mutationen oder Methodik-Fehler die Ursache sind, wurde zur weiteren Auswertung erneut ein automatisierter Fluoreszenz-Mikroskopie-Durchlauf ausgeführt. In diese Untersuchung wurden die zuvor ermittelten 54 Treffer zur Verifikation erneut untersucht. Nach der Auswertung der Bilder verringerte sich die Anzahl der vorläufigen Treffer auf zehn Proteine.



Die in Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12 gezeigten Ausschnitte aus dem Gesamtbild sind jeweils unter derselben Belichtungseinstellung aufgenommen und ausgewertet worden. Die abgebildete Maßstabsangabe ermöglicht einen Größenvergleich. Auf diese Weise wird erkennbar, dass sich bei einem Vergleich zwischen isogenetischer Kontrolle (linke Spalte der Abbildungen) und Stamm mit Ret2 ohne  $\mu$ -Homologie-Domäne (rechte Spalte der Abbildungen) nicht nur die Lokalisation z. T. verändert, sondern dass sich die Proteine in manchen Fällen ebenso hinsichtlich ihrer Größe und Helligkeit unterscheiden. So erscheinen die Zellen des Ret2LD2 $\alpha$ , gekreuzt mit GFP-Get3, heller und größer als bei Ret2-Clonat, welches mit GFP-Get3 gekreuzt wurde.



Auch in Abbildung 11 lassen sich Lokalisationsunterschiede erkennen. Beim Protein ATG8 erscheint die isogenetische Kontrolle deutlich heller als der Knockout-Stamm.



In Abbildung 12 zeigt sich ein deutlicher Helligkeitsunterschied zwischen dem mit GFP-Hrr25 gekreuzten Ret2LD2 $\alpha$ -Stamm und dem, wesentlich dunkleren, mit GFP-Hrr25 gekreuzten Ret2-Stamm. Bei einer Betrachtung des Proteins GFP-Mpd1 erscheinen die Zellen des Knockout-Stammes hingegen größer als die der isogenetischen Kontrolle.

Die Kenntnis über das Molekulargewicht des jeweiligen Fusionsproteins ist, in Anbetracht der weiteren Auswertung mittels Western Blots, äußerst relevant. Sollten die molaren Größen von isogenetischer Kontrolle und Knockoutstamm im anti-GFP-Antikörper Blot nicht übereinstimmen, so muss von einer ungewollten zusätzlichen Mutation oder einer Kontamination während des SGA-Prozesses ausgegangen werden.

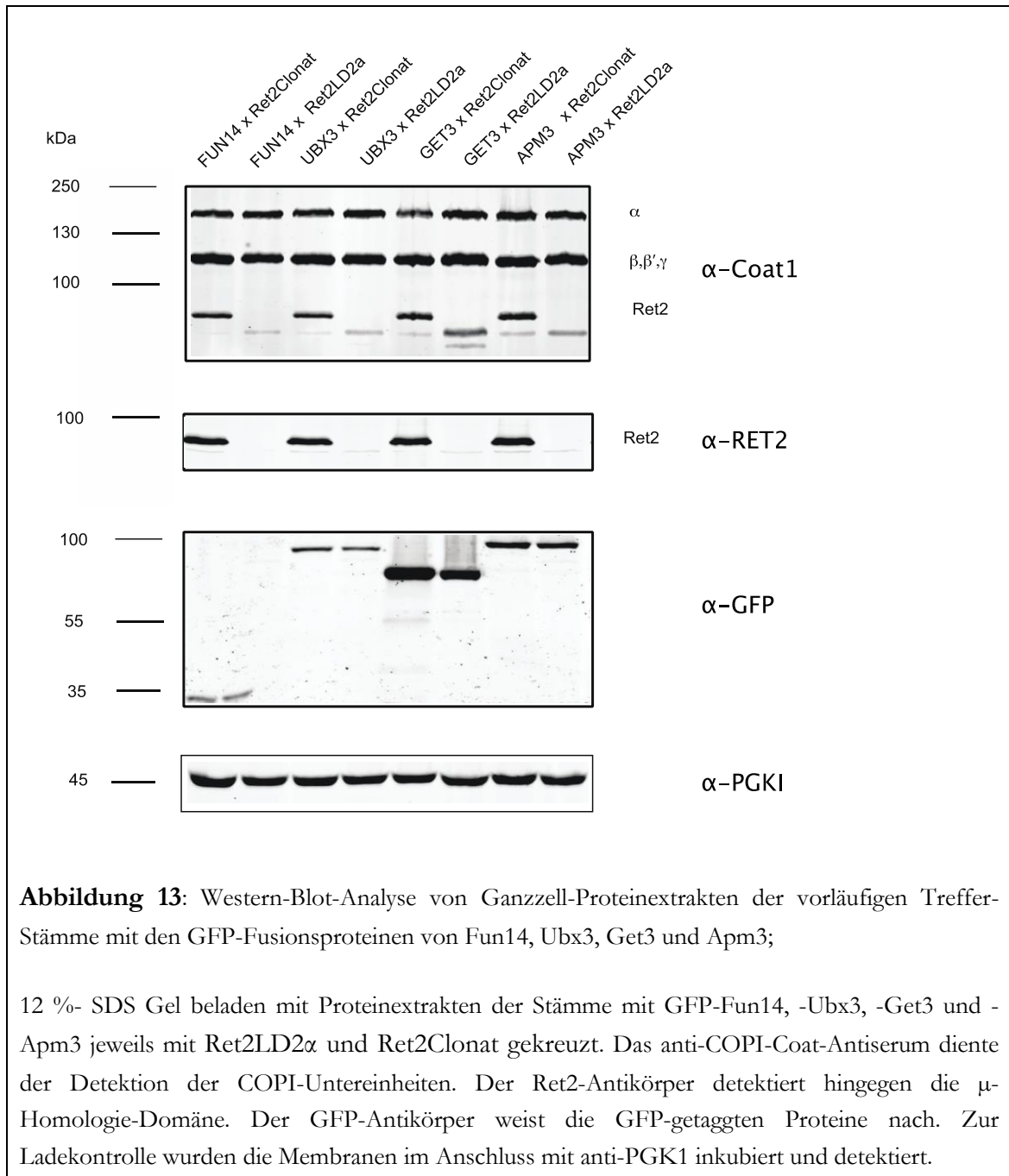
Aus diesem Grund sind in Tabelle 18 alle vorläufigen Treffer und die jeweiligen Lokalisationen der isogenetischen Kontrolle und des Knockout-Stammes sowie ihre aus der Primärsequenz berechneten Molekulargewichte angegeben.

**Tabelle 18:** Vorläufige Trefferliste der High-Throughput-Fluoreszenz-Mikroskopie

Name	Lokalisation log. Phase Ret2Clonat	Lokalisation log. Phase Ret2LD2 $\alpha$	Größe ohne GFP (kDa)
FUN14	ER	Punktförmige Anordnung	22
UBX3	ER	Punktförmige Anordnung	53
GET3	zytosolisch	Punktförmige Anordnung	39
YGR016W	ER	Punktförmige Anordnung	22
JEM1	ER	ER und punktförmige Anordnung	75
APM3	Zytosolisch mit vereinzelter punktförmiger Verteilung	Ausgeprägte punktförmige Anordnung	55
ATG8	Zytosolisch mit vereinzelter punktförmiger Verteilung	Punktförmige Anordnung	14
EMP24	ER	Punktförmige Anordnung	23
HRR25	zytosolisch	Vereinzelte punktförmige Anordnung	57
MPD1	ER	Ausgeprägte punktförmige Verteilung	92

Bei der weiteren Untersuchung der vorläufigen Treffer-Proteine mit Hilfe von Western-Blots kam ein anti-COPI-Coat-Antiserum zur Detektion der COPI-Untereinheiten zur Anwendung. Ein anti-Ret2-Antikörper sollte die Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne belegen und ein anti-GFP-Antikörper wurde zur Identifikation des jeweiligen GFP-Fusionsproteins aus der Bibliothek verwendet. Die Ergebnisse der Proteinanalyse in den untersuchten Stämmen können der nachfolgenden Abbildung entnommen werden:

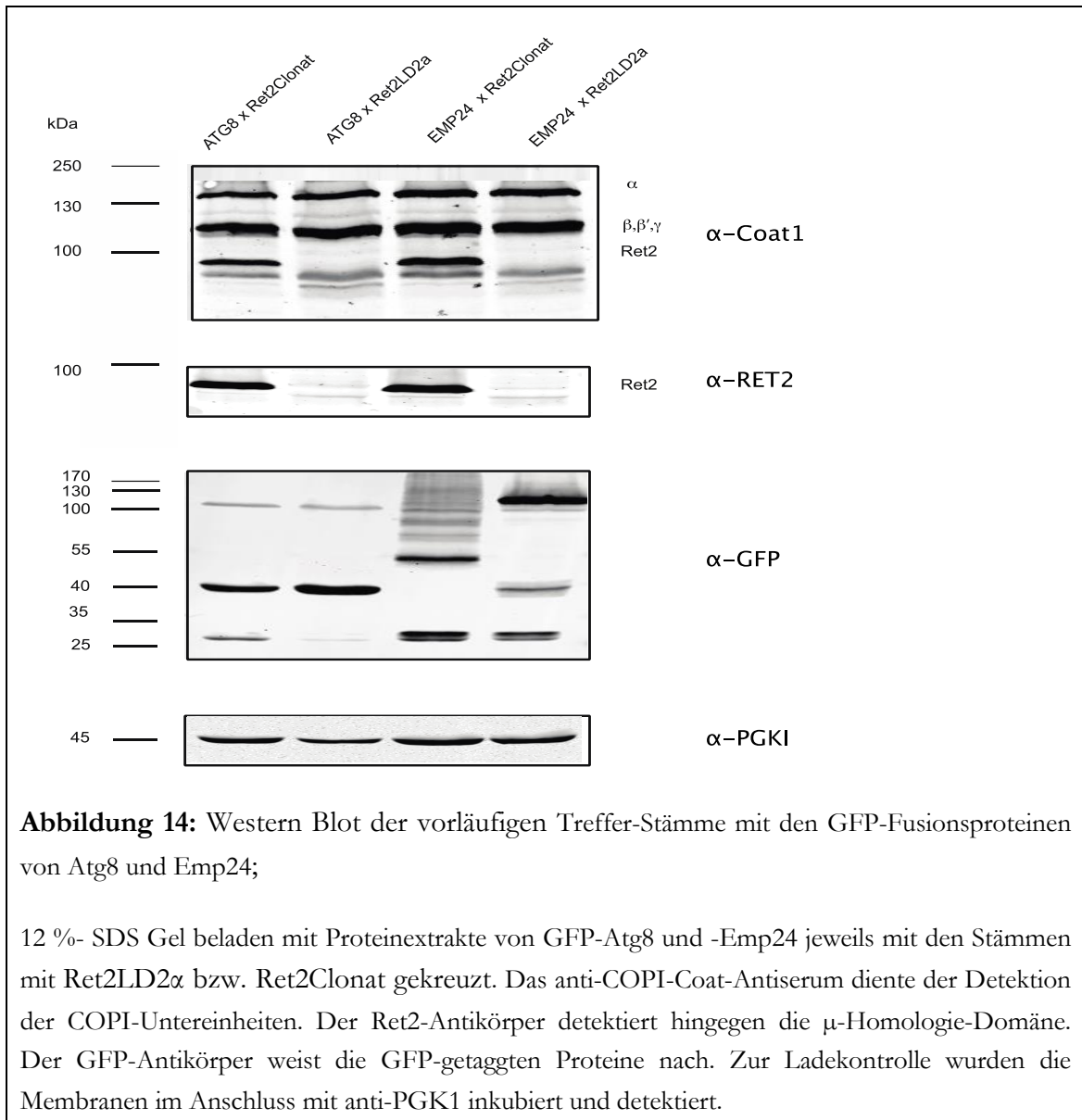




Die Auswertung der angefertigten Western-Blots von Fun14, Ubx3, Get3 und Apm3 zeigt zum einen, dass bei den angegebenen Knockout-Stämmen weiterhin eine Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne vorliegt (siehe anti-Ret2-Antikörper). Zum anderen konnte mit Hilfe des anti-GFP-Antikörpers gezeigt werden, dass es sich bei den jeweiligen Knockout-Stämmen und ihrer isogenetischen Kontrolle um Stämme handelt, deren GFP-Proteine das gleiche Laufverhalten und damit die gleiche Größe besitzen (siehe anti-GFP-Antikörper). Der Antikörper anti-PGK1 zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels.

Dasselbe Vorgehen (wie bei Fun14, Ubx3, Get3 und Apm3) fand ebenfalls für die Proteine Atg8 und Emp24 Anwendung. Das bedeutet, hier wurden auf ein zwölf-prozentiges SDS-

Gel Proteinextrakte der isogenetischen Kontrolle und des Stamms ohne  $\mu$ -Homologie-Domäne und jeweils mit der GFP-Fusion von Atg8 und Emp24 aufgetragen. Zur Ladekontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit anti-PGK1 inkubiert und detektiert, sodass sich folgende Blots ergaben:

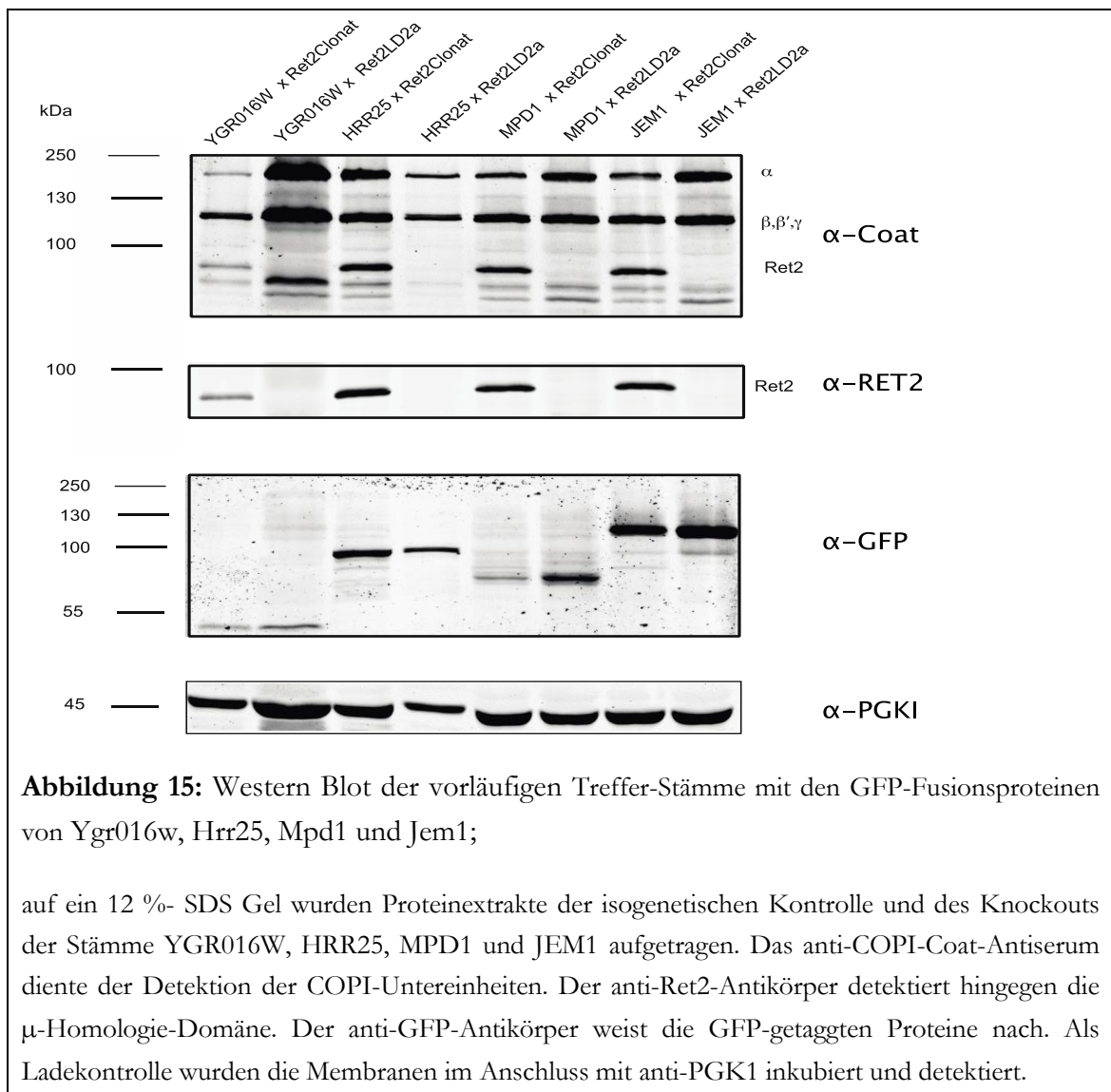


Bei Betrachtung der Abbildung 14 lässt sich ebenfalls die deletierte  $\mu$ -Homologie-Domäne der Knockout-Stämme mit Hilfe des anti-Ret2-Antikörper nachweisen. Die Darstellung der Emp24-Kreuzungen mit dem anti-GFP-Antikörper zeigen jedoch eine Degradation von GFP-Emp24 beim Vergleich von Knockout-Stamm und isogenetischer Kontrolle. Betrachtet man die GFP-Atg8-Kreuzungen nach der Verwendung des anti-GFP-Antikörper, so erscheint die unterste Bande im Western Blot ( $\approx 28$  Kilodalton) beim Knockout-Stamm deutlich verblasst im Vergleich zur isogenetischen Kontrolle. Ohne  $\mu$ -

Homologie-Domäne zeigt sich Emp24 – im Vergleich zu seiner isogenetischen Kontrolle – nach Nachweis mit dem anti-GFP-Antikörper deutlich verändert. Betrachtet man die unterste Bande ( $\approx 28$  Kilodalton), so erscheint sie im Knockout-Stamm etwas schwächer. Auf der Höhe der zweiten Bande des Knockout-Stammes ( $\approx 40$  Kilodalton) weist die isogenetische Kontrolle gar keine Bande auf. Ihre zweite Bande liegt etwas höher ( $\approx 50$  Kilodalton). Sie erscheint, ausgehend von mehreren verschwommenen Banden oberhalb, degradiert zu sein. Der Knockout-Stamm zeigt eine dritte Bande ( $\approx 130$  Kilodalton). Diese stellt zugleich die am stärksten ausgeprägte Bande des GFP-Emp24-Proteins im Stamm ohne  $\mu$ -Homologie-Domäne dar.

Auch in folgender Darstellung (Abbildung 15) zeigt sich mit Hilfe des anti-Ret2-Antikörpers die erfolgreiche Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne in Stämmen mit GFP-Ygr016w, -Hrr25, -Mpd1 und -Jem1.

Um die nachfolgenden Bilder zu generieren, wurden ebenfalls auf ein 12 %-iges SDS-Gel Proteinextrakte der isogenetischen Kontrolle und des Stamms ohne  $\mu$ -Homologie-Domäne mit GFP-Ygr016w, -Hrr25, -Mpd1 und -Jem1 aufgetragen. Zur Ladekontrolle wurden die Membranen im Anschluss erneut mit anti-Pgk1 inkubiert und detektiert.



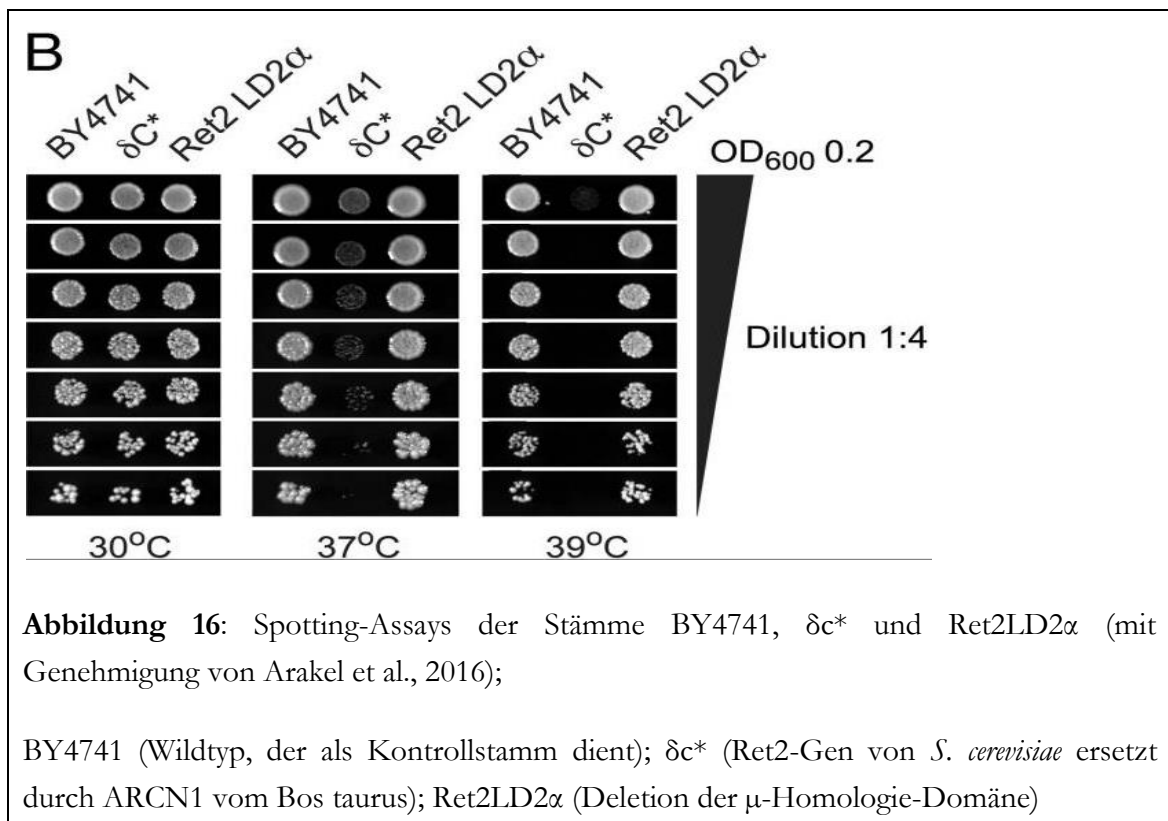
In der Abbildung 15 zeigt sich, neben der erfolgreichen Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne, mit Hilfe des anti-GFP-Antikörpers bei allen vier untersuchten Stämmen, dass es sich bei den jeweiligen Knockout-Stämmen und ihrer isogenetischen Kontrolle um Stämme handelt, deren GFP-Proteine jeweils die gleiche Größe in den beiden Ret2-manipulierten Stämmen besitzen.

## 4 Diskussion

Betrachtet man die vier erstellten Knockout-Stämme im Vergleich zu den isogenetischen Kontrollen, die unter Gliederungspunkt 3.2 vorgestellt und in einem Western-Blot dargestellt wurden, fällt eine Zunahme von  $\alpha$ -COP auf. Es liegt der Verdacht einer Kompensationsreaktion nahe, die COPI als Reaktion auf die Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne durchführt.

Bei der Anfertigung der ersten Wachstums-Analyse (siehe Abbildung 6) traten, wie im Ergebnissteil bereits erwähnt, Widersprüche zu bestehenden Veröffentlichungen auf. Auch der Versuch, die Temperaturempfindlichkeit durch Überexpression zu kompensieren, misslang. Dies ist vor allem deswegen verwunderlich, da u.a. eine Transformation der Stämme Ret2-Clonat und Ret2LD2 $\alpha$  mit Ret2 durchgeführt wurde. Somit standen dem konstruierten Stamm alle COPI-Untereinheiten zur Verfügung. Dies belegen auch die Ergebnisse des in Abbildung 8 gezeigten Western-Blots.

In der nachfolgenden Abbildung ist eine komprimierte Wachstums-Analyse zu sehen, welche noch einmal verdeutlicht, dass die Deletion der Ret2- $\mu$ -Homologie-Domäne vor einem anderen genetischen Hintergrund bis zu 39 °C keine Temperaturempfindlichkeit verursacht (diese Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Eric Arakel zur Verfügung gestellt).



Bei BY4741 handelt es sich um einen Wildtyp, welcher als Kontrollstamm dient. Im ebenfalls dargestellten Stamm  $\delta c^*$  ersetzt ARCNI vom *Bos taurus* (Hausrind) das *RET2*-Gen in *S. cerevisiae*.

Bei *RET2* handelt es sich hingegen um ein essenzielles Gen. Aus diesem Grund war bei der Manipulation des Ret2-Hefegens mit einem hohen Selektionsdruck zu rechnen. Zwar gelang es, die Expression der entsprechenden Proteine mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen und auch die DNA-Sequenzierung der genomischen DNA bewies die korrekte Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne; allerdings zeigen die Unterschiede zwischen der Wachstums-Analyse des Stammes, der im Jahr 2016 von Eric Arakel erstellt wurde, sowie der Wachstums-Analyse des Stammes, der im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurde, ebenfalls, dass eine Veränderung des Phänotyps der Stämme besteht.

Wie bereits erwähnt, wurde für die Publikationen von Dr. Eric Arakel ein anderer Ausgangsstamm (BY4743) verwendet als für die innerhalb der Dissertation durchgeführten Experimente (BY4741). Weiterhin erfolgte die Konstruktion der Stämme nicht auf dieselbe Art und Weise. Insofern weisen beide Stämme genomische Unterschiede auf.

Im Stamm, der für die Studien von Dr. Eric Arakel konstruiert wurde, ersetzt eine Kanamycin-Resistenz-Kassette mit temperatursensitiver *RET2*-Variante (p416 *ret2-1*) und *URA3*-Marker-Gen das ursprüngliche *RET2*-Gen des ausgehenden Wildtypstammes

BY4743. Mit Hilfe dieses Stammes wurde das veränderte delta-COP(*RET2*)-Gen in das Genom der Hefe integriert. Im Anschluss wurde eine Gegen-Selektion des Plasmids mit der Hefeverision des delta-COP-Gens *ret2-1* durch die Verwendung von 5-Fluorouracil herbeigeführt. Die Anwesenheit von *URA3* führt zu einer Transformation des 5-Fluorouracils in ein toxisches Produkt. Folglich konnten ausschließlich Zellen überleben, die das *URA3*-markierte Plasmid verloren haben. Die Herstellung des in dieser Dissertation betrachteten Stammes erfolgte wie unter Gliederungspunkt 3.1 beschrieben. Durch die Unterschiede zwischen dem Ursprungstamm und dem aus einer Herstellung resultierenden Stamm sind die beiden *Ret2LD2 $\alpha$* -Varianten trotz gleicher Benennung nicht vollständig vergleichbar.

Es liegt der Verdacht nahe, dass eine Mutation außerhalb des im Fokus stehenden *RET2*-Gens entstanden ist, da sowohl die Sequenzierung der DNA als auch die Western Blots belegen, dass im Bereich der gezielt vorgenommenen DNA-Modifikation mittels Plasmid-Vektor keine zusätzlichen ungewollten Mutationen vorliegen. Begünstigt wurde die genetische Veränderung vermutlich durch den erhöhten Selektionsdruck, dem die modifizierten Stämme ausgeliefert waren.

Die „High Throughput“-Fluoreszenz-Mikroskopie unter Gliederungspunkt 3.5 lieferte im ersten Durchlauf 54 Treffer. Die erneute Mikroskopie eben dieser Stämme ergab zehn verifizierte Treffer. Der Verlust von ungefähr 85 Prozent der Treffer im Verlauf der Verifikation innerhalb eines Hochdurchsatz-Screenings ist als normal zu bewerten. Eine mögliche Ursache sind z. B. Fehler während der Mikroskopieplatten-Vorbereitung. Da die „High Throughput“-Fluoreszenz-Mikroskopie mit mehreren, sowohl manuellen als auch maschinellen Teilschritten, eine Reihe potentieller Fehlerquellen birgt, liegt die Vermutung nahe, dass es innerhalb der Vorbereitungen zu Verunreinigungen einzelner „Wells“ kam. Daher sollten so gewonnene experimentelle Ergebnisse grundsätzlich mehrfach mit den entsprechenden Experimenten getestet werden, bevor man ihre Ergebnisse weiterverfolgt.

Bei der Anfertigung der Western-Blots der zehn vorläufigen, aus dem Screening erhaltenen Treffer fielen insbesondere die isogenetischen Kontrollen und die Stämme ohne  $\mu$ -Homologie-Domäne der Proteine Atg8 und Emp24 auf (siehe Abbildung 14). Die Inkubation und Detektion mit anti-GFP zeigte Unterschiede im Laufverhalten des jeweiligen GFP-Fusionsproteins. Bei Atg8 handelte es sich um einen eher geringfügigen Unterschied, welcher vernachlässigbar ist. Die Abweichungen bei Emp24 sind hingegen deutlich wahrnehmbar und lassen darauf schließen, dass GFP-Emp24 im Stamm ohne  $\mu$ -Homologie-Domäne möglicherweise stark degradiert wird. Tabelle 19 können die finalen Treffer und die dazugehörigen Funktionen bzw. Aufgaben der einzelnen Proteine entnommen werden.

**Tabelle 19:** Finale Trefferliste der High-Throughput- Fluoreszenz-Mikroskopie

Name	Charakteristika und Aufgaben (Saccharomyces Genome Database   SGD)	Beziehung zur Autophagie	Beziehung zu COPI	Subzelluläre Lokalisation
FUN14	Mitochondrial-integrales Protein der äußeren Membran; mitochondriale Organisation; Aufgabe: Phospholipid-Homöostase	Autophagie der Mitochondrien; interagiert genetisch mit: RPD3		Äußere Mitochondrienmembran
UBX3	Clathrin-beschichtete Vesikelkomponente; Aufgabe: Endozytose (→ effiziente Clathrin-vermittelte Endozytose)	Interagiert genetisch mit ATG17, MON1 und RPD3; interagiert physikalisch mit CDC48	Interagiert genetisch mit SEC28 und physikalisch mit RSP5	Endoplasmatisches Retikulum
GET3	Teil des Get-Komplexes; Aufgaben: Beteiligung am ATP-abhängigen Golgi → ER-Transport; Insertion von Tail-Anker-Proteinen in die ER-Membran	Interagiert genetisch mit ARL1, ATG32, BET3, BET5, ESA1, RPD3, SEC18, TRS23, TRS85, VMA1, VMA21, VPH2, YPT1, YPT6	Interagiert genetisch mit MTC1, RET2, RET3, SEC26 und SEC27	Cytosol; endoplasmatisches Retikulum
YGR016W			Protein mit vier vorhergesagten Transmembran-Segmenten und einem putativen KXXXX-COOH, COPI-abhängiges Retrieval-Signal; interagiert genetisch mit COP1, RET2, RET3 und SEC26	Endoplasmatisches Retikulum
ATG8	Aufgabe: Regulator von Atg1p → bindet den Atg1p-Atg13p-Komplex und löst dessen vakuolären Abbau aus	Bestandteil von Autophagosomen und Cvt-Vesikeln; interagiert genetisch mit APE1, ATG1, ATG13, ATG15, ATG4, ATG7, KSP1, SIR2, VMA1, VMA21, VPS21 und YPT6; interagiert physikalisch mit <b>APM3</b> und <b>EMP24</b> ,	Interagiert genetisch mit COP1 und MTC1; interagiert physikalisch mit RSP5, SEC21 und SEC26	Vakuole vom Pilztyp, Zytoplasma



Name	Charakteristika und Aufgaben (Saccharomyces Genome Database   SGD)	Beziehung zur Autophagie	Beziehung zu COPI	Subzelluläre Lokalisation
		APE1, ATG1, ATG12, ATG21, ATG3, ATG32, ATG34, ATG39, ATG4, ATG40, phys. Interaktion: ATG5, ATG7, ATG9, CCZ1, CDC48, CUE5, KSP1, SEC17, SEC4, VPS21 und YPT1		
EMP24		Interagiert genetisch mit BET3, BET5, ROT1, TRS20, TRS23, TRS85, YPT1 und YPT6; interagiert physikalisch mit ATG23, ATG27, <b>ATG8</b> , ATG9 und VPS30	Interagiert genetisch mit RET2, SEC21 und SEC27; interagiert physikalisch mit MST27	Membran des endoplasmatischen Retikulums; Golgi-Membran
JEM1	Chaperon-Bindung; Aufgaben: Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum; Beteiligung an der Karyogamie	Interagiert genetisch mit MON1; interagiert genetisch mit <b>MPD1</b>		Membran des endoplasmatischen Retikulums
APM3	Bestandteil des AP3-Komplexes; Aufgabe: Protein-Targeting, d.h. Transport des Proteins von Golgi zur Vakuole	Interagiert genetisch mit ARL1, TRS20, TRS23, VMA21, VPS21, YPT52 und YPT6; interagiert physikalisch mit <b>ATG8</b>	Interagiert genetisch mit RSP5 und SEC27	Golgi-Apparat
HRR25	Aufgaben: ATP-Bindung; Proteinkinase-Aktivität; DNA-Reparatur; Regulation der Clathrin-abhängigen Endozytose; Regulierung des ER→ Golgi-Vesikel-vermittelten Transports (vermittelnder Transport?)	Autophagie des Peroxisoms; interagiert genetisch mit, ATG13, BET5, CDC48, LTV1, PPM1, RPD3, SEC17, SEC2, TRS20, TRS23, VMA21 und XRN1; interagiert physikalisch mit APE1, ATG32, ATG34, DNM1, LTV1, SEC2 und YPT1	Interagiert genetisch mit COP1; interagiert und physikalisch mit SGM1	Plasma-Membran,; Golgi-Apparat; Nukleus
MPD1	Mitglied der Proteindisulfidisomerase-Familie; Aktivität der Protein-Disulfid-Reduktase (Glutathion); Aufgaben: Zellredox-Homöostase; Proteinfaltung	Interagiert genetisch mit <b>JEM1</b>		Lumen des endoplasmatischen Retikulums, Vakuole vom Pilztyp

Bei Fun14 handelt es sich um ein mitochondriales, integrales Protein der äußeren Membran. Es kann sowohl Änderungen in der Mitochondrienmorphologie als auch innerhalb der Proteinkomplexanordnung und Phospholipid-Homöostase bewirken.

Fundc1 (Fun14-Analoga im *H. sapiens*) trägt zur Hypoxie-induzierten Mitophagie bei. Es kann die Autophagiemaschinerie rekrutieren und den Mitophagieprozess starten (Liu et al., 2012).

Ubx3 stellt einen Cofaktor von Cdc48 für die Ubiquitylierung der Histon-Untereinheit H2B dar (Bonizec et al., 2014). Bei diesem Vorgang wird das Protein Ubiquitin reversibel an H2B gebunden. Infolgedessen führen weitere Reaktionen schließlich dazu, dass das Enzym Argininosuccinat-Synthase (ASS) nicht mehr hergestellt wird. ASS ist für die Katalisierung von Aspartat und Citrullin zu Argininosuccinat zuständig. Diese Reaktion findet bei der Biosynthese der Aminosäure Arginin statt (Sun und Allis, 2002). Somit ist Ubx3 maßgeblich an der Regulation des Arginin-Stoffwechsels beteiligt.

Get3 spielt eine wesentliche Rolle im Get-Komplex. Dieser spielt – wie COPI – eine wesentliche Rolle für die Integrität des sekretorischen Wegs, da er bestimmte C-terminal verankerte Membranproteine, z. B. SNAREs, die bei der Vesikelfusion eine Rolle spielen, ins ER einschleust. Get3 transportiert die sogenannten Tail-Anchored (TA)-Membranproteine zur ER-Membran, wobei Get1 und Get2 einen Rezeptorkomplex bilden, der den Get3-TA-Proteinkomplex erkennt und die Freisetzung der TA-Proteine ermöglicht. TA-Proteine spielen während des gesamten sekretorischen Wegs eine entscheidende Rolle (Schuldiner et al. 2008).

Beim Protein YGR016W handelt es sich um ein putatives Protein unbekannter Funktion (YGR016W | SGD).

Jem1 (YJL073) kodiert für ein DnaJ-ähnliches Protein, welches in der ER-Membran lokalisiert ist. DnaJ-Proteine sind molekulare Chaperonproteine. Die Funktion von Jem1 besteht in der Faltung von Proteinen. Weiterhin ist es für die Kernmembranfusion während des Matings erforderlich. Auch genetische Wechselwirkungen mit Kar2 konnten bewiesen werden (Nishikawa und Endo, 1997; JEM1 | SGD). Bei Kar2 handelt es sich um eine ATPase, die ebenfalls am Proteinimport in das ER beteiligt ist und als Chaperon wirkt, um die Proteinfaltung im ER zu vermitteln (Romisch, 1999, S. 61; Okamura et al., 2000, S. 2; KAR2 | SGD, S. 2; Tokunaga M, et al., 1992 | SGD).

Apm3 ist am Protein-Targeting zur Vakuole beteiligt. Es ist demnach für die Zielsteuerung der Proteine nach der Synthese bedeutend, deren Zielkompartiment die Vakuole ist. Insbesondere zum Protein-Transport vom Golgi-Apparat zur Vakuole trägt Apm3 bei, da es Bestandteil des Adaptorproteins Komplex-3 ist (APM3 | SGD, S. 3).

HRR25 gehört zur Familie der Caseinkinase 1 (CK1). Diese stellen eine Gruppe von den Serin-/Threonin-Proteinkinasen dar, deren Regulation und Rolle im Membranverkehr weitgehend unbekannt sind (Knippschild et al., 2005). Innerhalb des COPII-Transports

spielt die Phosphorylierung von COPII durch Hrr25 eine entscheidende Rolle für den gerichteten Transport vom ER zum Golgi-Apparat (Lord et al., 2011). Hrr25 wird durch Ypt1 direkt zu COPII-Vesikeln rekrutiert, um den Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat zu aktivieren. Aktuelle Studien zeigten auch, dass die Kinase Hrr25 durch Phosphorylierung von Rezeptorproteinen zwei unterschiedliche, selektive Autophagie bezogene Pfade in *S. cerevisiae* reguliert: Zum einen Atg19, welches die Assemblierung von vakuolären Enzymen im CVT-Weg erkennt; zum anderen Atg36, welches überflüssige Peroxisomen identifiziert. Die Hrr25-vermittelte Phosphorylierung verstärkt die Wechselwirkungen dieser Rezeptoren mit dem gemeinsamen Adapter Atg11, welcher die autophagosomalen Kernproteine rekrutiert, die die Bildung der autophagosomalen Membran vermitteln (Tanaka et al. 2014).

MPD1 ist ein Mitglied der Proteindisulfid-isomerase-Familie. Es interagiert mit der Chaperon-Aktivität der Cne-Proteindisulfid-Isomerase und hemmt diese. Weiterhin ist es an der Zellredox-Homöostase und der Proteinfaltung beteiligt.

Die Unterschiede zwischen den Phänotypen der jeweiligen Knockout-Stämme und den isogenetischen Kontrollen lassen vermuten, dass durch eine Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne (verkürztes Ret2) eine Änderung der Lokalisation innerhalb der Zelle bewirkt wird. Die finalen Trefferproteine treten ihrerseits mit anderen Proteinen in Interaktion. Da die Funktionsweise eines Proteins im direkten Zusammenhang mit seiner Lokalisation stehen kann, besteht die Möglichkeit, dass das Fehlen der  $\mu$ -Homologie-Domäne zu einer Art Kettenreaktion führt. Es wird deutlich, dass die  $\mu$ -Homologie-Domäne auf nachfolgende Prozesse in der Zelle Einfluss besitzt.

Zur weiteren Analyse der erzielten Treffer wurde im Folgenden näher auf die Interaktionen eingegangen. Die Informationen hierzu wurden mit Hilfe der Genome Database SGD ermittelt. Generell lässt sich zwischen genetischer und physikalischer Interaktion differenzieren: Die genetische Interaktion wurde bspw. durch Knockout-Screens nachgewiesen. So kam es bei einem Knockout eines einzelnen Proteins zu keiner Veränderung; ein Knockout beider Interakteure führte jedoch zu einer Wachstumsänderung. Die physikalische Beziehung ist eine physische Bindung, die z. B. durch ein Bindungsexperiment („Pull-Down“) ermittelt wurde.

Aus Tabelle 19 geht bereits hervor, dass die finalen Treffer teilweise eine genetische oder physikalische Beziehung zueinander aufweisen. Diese werden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst dargestellt.

**Tabelle 20:** Liste aller finalen Treffer, die untereinander eine genetische/physikalische Beziehung aufweisen

<b>Finaler Treffer 1</b>	<b>Finaler Treffer 2</b>	<b>Genetisch/Physikalische Beziehung</b>
APM3	ATG8	Phys. Interaktion (Affinitätserfassungs-Massenspektrometrie)
MPD1	JEM1	Gen. Interaktion (phänotypische Suppression)
EMP24	ATG8	Phys. Interaktion (Affinitätserfassungs-Massenspektrometrie)

Interessant ist hierbei, dass sich in Tabelle 20 einige interagierenden Proteine aus Tabelle 19 wiederholen. Somit stehen die finalen Treffer teilweise mit den gleichen Proteinen in einer genetischen oder physikalischen Beziehung. Die folgenden zwei Tabellen sollen dazu dienen diese Zusammenhänge der Interakteure übersichtlicher darzustellen. Es wurden jene Proteine in die Auflistung aufgenommen, welche mit zwei oder mehr finalen Treffern interagieren. Weiterhin liefern die Tabellen Informationen zur Art der Beziehung (genetisch oder physikalisch) und zur jeweiligen Funktion. Tabelle 21 bezieht sich dabei auf die Beziehungen zu COPI und Tabelle 22 auf die zur Autophagie.

**Tabelle 21:** Liste der Proteine, die mit mehreren Treffern aus Tabelle 19 interagieren und in einer Beziehung zu COPI stehen

<b>Interakteur</b>	<b>Phys. Beziehung zu Treffer</b>	<b>Gen. Beziehung zu Treffer</b>	<b>Beschreibung des Interakteurs</b>
<i>RET2</i>		<i>GET3, YGR016W, EMP24</i>	Delta-Untereinheit des Coatomers (COPI)
<i>RET3</i>		<i>GET3, YGR016W</i>	Zeta-Untereinheit des Coatomers (COPI)
<i>SEC21</i>	<i>ATG8</i>	<i>EMP24</i>	Gamma-Untereinheit des Coatomers (COPI)
<i>SEC26</i>	<i>ATG8</i>	<i>GET3, YGR016W</i>	Beta-Untereinheit des Coatomers (COPI)
<i>SEC27</i>		<i>GET3, EMP24, APM3</i>	Beta'-Untereinheit des Coatomers (COPI)
<i>RSP5</i>	<i>ATG8, UBX3</i>	<i>APM3</i>	Reguliert u.a. Hitzeschock-Reaktion, Transkription, Endozytose und Ribosom-Stabilität; erforderlich für effizienten Golgi-ER-Transport in COPI-Mutanten
<i>MTC1</i>		<i>GET3, ATG8</i>	Interagiert mit Ribosomen; grün-fluoreszierendes Protein (GFP) - Fusionsprotein ist im Zytoplasma und in COPI-beschichteten Vesikeln lokalisiert
<i>COP1</i>		<i>YGR016W, HRR25, ATG8</i>	Alpha-Untereinheit des Coatomers (COPI)

**Tabelle 22:** Liste der Proteine die mit mehreren Treffern aus Tabelle 19 interagieren und in einer Beziehung zur Autophagie stehen

Interakteur	Phys. Beziehung zu Treffer	Gen. Beziehung zu Treffer	Beschreibung des Interakteurs
<i>BET3</i>		<i>GET3, EMP24</i>	Hydrophiles sowie homodimeres Protein, welches in Verbindung mit SNARE-Proteinen beim Targeting und der Fusion von ER mit Golgi-Transportvesikeln mitwirkt; reguliert den ER-Golgi-Verkehr, den Intra-Golgi-Verkehr, den Endosom-Golgi-Verkehr und die Autophagie
<i>BET5</i>		<i>GET3, EMP24, HRR25</i>	Reguliert den ER-Golgi-Verkehr, den Intra-Golgi-Verkehr, den Endosom-Golgi-Verkehr und die Autophagie
<i>ATG9</i>	<i>ATG8, EMP24</i>		Transmembranprotein, das an der Bildung von Cvt (Cytoplasm-to-Vacuole Targeting) und autophagischen Vesikeln beteiligt ist
<i>ATG13</i>		<i>ATG8, HRR25</i>	Regulatorische Untereinheit des Atg1p-Signalisierungskomplexes; stimuliert die Atg1p-Kinase-Aktivität; ist erforderlich für die Vesikelbildung während der Autophagie und für den Cvt-Signalweg (Cytoplasm-to-Vacuole Targeting)
<i>ATG32</i>	<i>ATG8, HRR25</i>	<i>GET3</i>	Mitochondriales Außenmembranprotein zur Einleitung der Mitophagie
<i>ATG34</i>	<i>ATG8, HRR25</i>		Rezeptorprotein, das an der selektiven Autophagie während der Starvation beteiligt ist

<b>Interakteur</b>	<b>Phys. Beziehung zu Treffer</b>	<b>Gen. Beziehung zu Treffer</b>	<b>Beschreibung des Interakteurs</b>
YPT1	<i>HRR25</i>	<i>GET3, ATG8, EMP24,</i>	Zugehörigkeit zur Rab-Familie GTPase; beteiligt am ER-Golgi Transport während des Sekretionsweges
YPT6		<i>GET3, ATG8, EMP24, APM3</i>	Zugehörigkeit zur Rab-Familie GTPase; beteiligt am Endosom-Golgi-Transport, am retrograden internen Golgi-Transport und am retrograden Golgi-ER-Transport; die Golgi-lokalisierte Form ist GTP-gebunden, während die cytosolische Form GDP-gebunden ist; Beteiligung an der „stressbedingten- Autophagie“
VMA1		<i>GET3, ATG8</i>	Beteiligt an der Verlängerung der chronologischen Lebensdauer durch Methioninrestriktion in autophagienabhängiger Weise
VMA21		<i>GET3, ATG8, APM3, HRR25</i>	Divergiertes Ortholog des humanen XMEA (X-chromosomale Myopathie mit exzessiver Autophagie)
TRS20		<i>HRR25, EMP24, APM3</i>	Reguliert den ER-Golgi-Transport, den Intra-Golgi-Transport, den Endosom-Golgi-Transport und die Autophagie
TRS23		<i>GET3, EMP24, APM3, HRR25</i>	Reguliert den ER-Golgi-Transport, den Intra-Golgi-Transport, den Endosom-Golgi-Verkehr und die Autophagie
TRS85		<i>GET3, EMP24</i>	Reguliert den Endosom-Golgi-Verkehr und ist für die Membranexpansion während der Autophagie sowie für den CVT-Weg erforderlich



Interakteur	Phys. Beziehung zu Treffer	Gen. Beziehung zu Treffer	Beschreibung des Interakteurs
<i>RPD3</i>		<i>FUN14, UBX3, GET3, HRR25</i>	Reguliert Transkription, Stummschaltung, Autophagie und andere Prozesse durch eine Beeinflussung des Chromatin-Remodellings
<i>MON1</i>		<i>JEM1, UBX3</i>	Untereinheit eines heterodimeren Guaninnukleotidaustauschfaktors (GEF); die GEF-Aktivität wird durch Membranassoziationen und anionische Phospholipide stimuliert; spielt eine Rolle bei der Lokalisierung von Ypt7p auf der Vakuolarmembran; ist erforderlich für Autophagie, für den CVT-Weg sowie für die Mitophagie
<i>CDC48</i>	<i>UBX3, ATG8</i>	<i>HRR25</i>	AAA ATPase; Beteiligung an der Makroautophagie
<i>ARL1</i>		<i>APM3, GET3</i>	Beteiligt an der „stress“ induzierten Autophagie (z. B. hohe Temp.); lösliche GTPase mit Beteiligung an der Regulation des Membrantransports
<i>VPS21</i>	<i>ATG8,</i>	<i>ATG8, APM3</i>	Endosomale Rab-Familie GTPase; erforderlich für den endozytischen Transport und die Sortierung von vakuolären Hydrolasen; beteiligt an Autophagie- und Ionenstresstoleranz
<i>SEC17</i>	<i>ATG8</i>	<i>HRR25</i>	Alpha-SNAP-Cochaperon; peripheres Membranprotein, das für den vesikulären Transport zwischen ER und Golgi, den "Priming"-Schritt bei der homotypischen Vakuolenfusion und der Autophagie erforderlich ist

Anhand der vorangegangenen Tabellen wird deutlich, dass eine Vielzahl an komplexen Verknüpfungen und Parallelen zwischen einigen Treffern existieren.

Die Tabelle 21 zeigt, dass fünf Untereinheiten des Coatomers mehr als einmal eine Rolle als Interaktoren der Trefferproteine spielen. Es handelt sich dabei um Untereinheiten des delta-, zeta-, gamma-, beta- und beta'-COP.

Aus Tabelle 22 geht hervor, dass die Interaktoren, die eine Beziehung der finalen Treffer zur Autophagie herstellen, teilweise aus den gleichen Proteinfamilien stammen. Es kommen bspw. mehrere Vertreter der Bet-Gruppe, der Bromodomänen und extra-terminalen Domänen vor. Dies ist durch das Vorhandensein von zwei Tandem-Bromodomänen und einer extra-terminalen Domäne gekennzeichnet (Taniguchi 2016). Auch die Gruppen der Autophagie-verwandten-Proteine (Atg) sowie die der GTP-bindenden-Proteine sind mehrfach vertreten. Zwei weitere Interaktoren sind Mitglieder der vakuolären ATPase-Assemblierung (Vma). Außerdem konnten drei Vertreter des sogenannten „Transport-Protein-Partikel-Komplexes“ (Trs) ermittelt werden.

Vor allem der Bezug zur Autophagie ist deutlich erkennbar. Es lässt sich daher annehmen, dass eine Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne auch Auswirkungen auf die autophagischen Prozesse innerhalb der eukaryontischen Zelle besitzt.

Eine mögliche Hypothese wäre z. B., dass ER-Proteine oder zirkulierende Proteine, welche bedingt durch die Deletion im Knockout-Stamm nicht mehr korrekt gefaltet werden, abgeschnürt werden und der Prozess der Autophagie induziert wird.

Betrachtet man bspw. Atg8, so ist es in der Auswertung der Mikroskopiebilder im Knockout-Stamm punktförmiger verteilt als in der isogenetischen Kontrolle. Eine mögliche Interpretation dieser Veränderung wäre, dass die neue Lokalisation Strukturen im Zytosol zeigen, welche nun Autophagie betreiben.

Möchte man diese These weiterverfolgen, so ließe sich die Vermutung aufstellen, dass Proteine, welche eher luminal bzw. im Bereich der Membran lokalisiert sind (wie z. B. Jem1 und Mpd1) durch die Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne stabilisiert werden und somit weniger der Autophagie zugeführt werden. In Folge dessen käme es zu einer Akkumulation der betroffenen Proteine. Dies würde die stärker ausgeprägte Bande der Knockout-Stämme mit Jem1 und Mpd1 in dem Western Blot mit anti-GFP-Antikörper erklären (siehe Abbildung 15).

Eine weitere Annahme wäre, dass Proteine, welche auf zytoplasmatischer Seite lokalisiert (z. B. Ubx3 und Get3) und Ubiquitin-regulations-abhängig sind, autophagisch abgebaut werden.

Nachfolgend werden die Interaktionen der finalen Treffer untereinander noch einmal anschaulich visualisiert. Weiterhin werden die korrespondierenden Koregulatoren mit in die Abbildung aufgenommen. Teilweise kommt es bei diesen zu Übereinstimmungen; es gilt dabei allerdings zu beachten, dass es sich um recht generelle Transkriptionsregulatoren handelt.

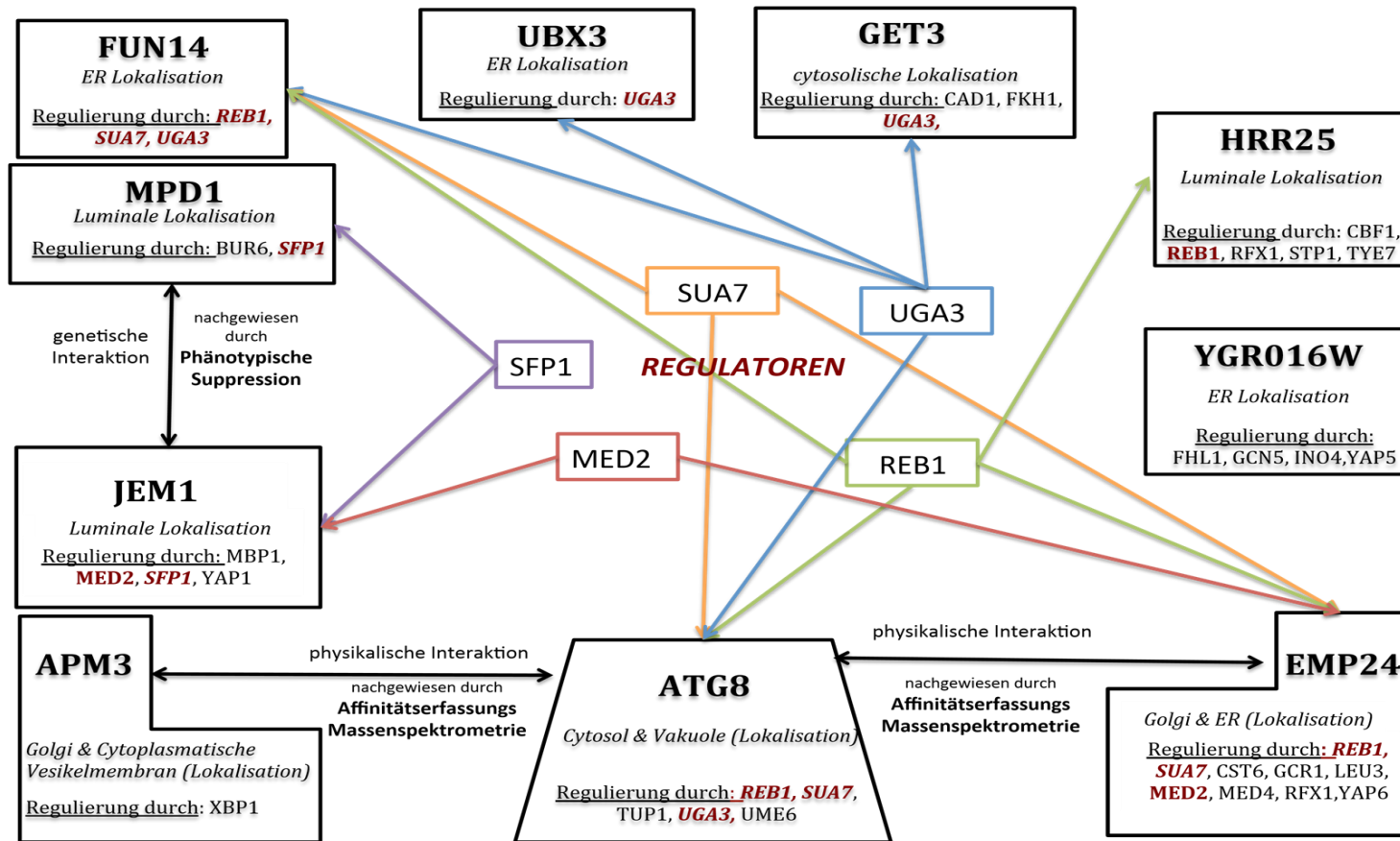


Abbildung 17: Finale Treffer und die Koregulation durch Transkriptionsregulatoren;

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Rolle des essentiellen COPI-Hüllvesikelproteins näher betrachtet werden. Seine Funktion besteht primär im retrograden Transport innerhalb der eukaryontischen Zelle vom Golgi-Apparat zum ER. Das Hüllvesikelprotein besteht aus sieben Untereinheiten: alpha-, beta-, beta'-, gamma-, delta-, epsilon- und zeta-COP.

Bestehende Studien zeigten die Entbehrlichkeit der  $\mu$ -Homologie-Domäne, welche Bestandteil von delta-COP ist. Die erzielten Ergebnisse im Modellorganismus *S. cerevisiae* stützen diese Annahme ebenfalls und liefern erste Einblicke in die Folgen der Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne.

Als Grundlage für die Forschungsarbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden durch Transformation zunächst zwei vergleichbare Hefestämme erzeugt. Die entwickelten Stämme Ret2Clonat und Ret2LD2 $\alpha$  glichen sich in Bezug auf die Resistenz gegen Clonat und den HIS-Tag. Einzig die Länge von *RET2* variierte bei den beiden Stämmen. Bei *RET2* handelt es sich um das delta-COP-Analoga im Hefezellorganismus. Bei Ret2LD2 $\alpha$  – dem Knockout-Stamm – liegt aufgrund der Deletion der  $\mu$ -Homologie-Domäne ein verkürztes *RET2*-Gen vor. Ret2Clonat – d.h. die isogenetische Kontrolle – besitzt hingegen die vollständige *RET2*-Sequenz.

Bei der Konstruktion der Stämme wurden mehrere Transformationen parallel realisiert (vier Knockout-Stämme 1A-1D und drei isogenetische Kontrollen 2A-2C). Die jeweils korrekte Nukleotid-Abfolge des delta-COPs wurde mit Hilfe einer DNA-Sequenzierung belegt. Die Auswahl der Ausgangsstämme für das geplante SGA aus den konstruierten Stämmen erfolgte anhand von Western Blots, Wachstums-Analysen und der DNA-Sequenzierung der genomischen DNA.

Die Auswertung der angefertigten Wachstums-Analysen warf Fragen bezüglich der Hitzeresistenz der Knockout-Stämme auf. In bereits bestehenden Studien konnte ein Überleben von Ret2LD2 $\alpha$  auch bei Temperaturen bis 39 °C Celsius gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es allerdings nicht, ein Wachstum der Knockout-Stämme 1A-1D bei Temperaturen über 30 °C zu realisieren. Selbst die Überexpression des *RET2*-Gens und eine Veränderung des Wachstumsmediums führten zu keiner Verbesserung der Hitzeresistenz. Folglich muss von einer, während der Stamm-Konstruktion entstandenen, irreversiblen Modifikation im Genom dieses Stammes ausgegangen werden.

Für das geplante SGA wurde eine Teilkollektion von fünf Platten der Bibliothek, die insgesamt 16 Platten mit 384 Proteinen umfasst, gewählt. So umfassten die folgenden Versuche Platte eins bis vier, sowie Platte 16. Das gesamte SGA erfolgte für Ret2LD2 $\alpha$  und die Kontrolle Ret2Clonat parallel.

Die fünf fertigen Platten wurden mit Hilfe von „High Throughput“-Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Nach dem ersten Mikroskopie-Durchlauf ergab sich eine Treffermenge von 54 Proteinen. Nach einem erneuten „High Throughput“-Fluoreszenz-Mikroskopie-Durchlauf verringerte sich die Anzahl der vorläufigen Treffer auf zehn Proteine. Es handelt sich um phänotypische Veränderungen der log-Phase zwischen den folgenden mit Ret2LD2 $\alpha$  und Ret2Clonat gekreuzten Proteinen: Fun14, Ubx3, Get3, Ygr016w, Jem1, Apm3, Atg8, Eem24, Hrr25 und Mpd1.

Die erzielten Trefferproteine wurden hinsichtlich ihrer Funktion und Verknüpfungen zueinander untersucht. Auffällig war die bei nahezu allen Treffern auftretende indirekte oder sogar direkte Beteiligung an autophagischen Prozessen. Um die indirekte Beziehung näher zu erläutern, wurden die Interakteure der Trefferproteine, welche in Verbindung zur Autophagie standen, tabellarisch zusammengefasst. Bei der Betrachtung der Gesamtheit dieser Interakteure traten einige mehr als nur einmal auf – sie standen demzufolge mit mehreren Trefferproteinen in einer Beziehung. Aufgrund dessen wurden jene Autophagie-Interakteure, die mindestens zweimal genannt wurden, in einer weiteren Tabelle aufgelistet. Dabei handelte es sich um Atg9, Atg13, Atg32, Atg4, Ypt1, Ypt6, Bet3, Bet5, Vma1, Vma21, Trs20, Trs23, Trs85, Rpd3, Mon1, Cdc48, Arl1, Vps21 sowie Sec17. Die Gruppen der Autophagie-verwandten-Proteine (Atg), die der GTP-bindenden-Proteine sowie die Proteinfamilie der Bromodomänen und extra-terminalen Domänen (Bet) sind somit mehrfach unter den Autophagie-Interakteuren anzutreffen. Zwei weitere Interakteure sind Mitglieder der vakuolären ATPase-Assemblierung (Vma). Zudem konnten drei Vertreter des „Transport-Protein-Partikel-Komplexes“ (Trs) ermittelt werden.

Die finalen Treffer wurden weiterhin bezüglich ihrer Verbindung zu COPI genauer untersucht. Hierbei wurden erneut alle mehrfach auftretenden Interakteure tabellarisch dargestellt; dieses Mal jene, die in Verbindung zu COPI stehen: Ret2, Ret3, Sec1, Sec26, Sec27, Rsp5, Mtc1 und Cop1. Es wurde gezeigt, dass fünf Untereinheiten des Coatomers mehr als einmal eine Rolle als Interakteure der Trefferproteine spielen. Es handelt sich hier um die Untereinheiten delta-, zeta-, gamma-, beta- und beta'-COP (Ret2, Ret3, Sec21, Sec26, Sec27).

## 6 Literaturverzeichnis

### 6.1 Beiträge in Sammelwerken, Handbüchern, Lehrbüchern, Monographien und Zeitschriftenbeiträgen

- Annaert W, De Strooper B (2002): A Cell Biological Perspective on Alzheimer's Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 25–51
- Arakel EC, Richter KP, Clancy A, Schwappach B (2016):  $\delta$ -COP contains a helix C-terminal to its longin domain key to COPI dynamics and function. *Proc Natl Acad Sci* 113, 6916–6921
- Bonizec M, Hérisant L, Pokrzywa W, Geng F, Wenzel S, Howard GC, Rodriguez P, Krause S, Tansey WP, Hoppe T, Dargemont C (2014): The ubiquitin-selective chaperone Cdc48/p97 associates with Ubx3 to modulate monoubiquitylation of histone H2B. *Nucleic Acids Res* 42, 10975–10986
- Botstein D, Fink GR (2011): Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics* 189, 695–704
- Boujard D, Anselme B, Cullin C, Raguénès-Nicol C: Zell- und Molekularbiologie im Überblick. Springer Spektrum 2014
- Buselmaier W: Zelluläre Strukturelemente; in: Biologie für Mediziner; hrsg. v. Buselmaier W; Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2012, 9–48
- Chardin P, Paris S, Antonny 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
- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, et al. (2006):  $\alpha$ -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science* 313, 324–328
- Deretic V, Levine B (2009): Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 5, 527–549
- Dodonova SO, Diestelkoetter-Bachert P, von Appen A, Hagen WJH, Beck R, Beck M, Wieland F, Briggs J a. G (2015): VESICULAR TRANSPORT. A structure of the COPI coat and the role of coat proteins in membrane vesicle assembly. *Science* 349, 195–198
- Donaldson JG, Cassel D, Kahn RA, Klausner RD (1992): ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatmer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6408–6412
- 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, 1573–1578
- Gaynor EC, Graham TR, Emr SD (1998): COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way? *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1404, 33–51

- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B, et al. (2002): Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387–391
- Gillingham AK, Munro S (2007): The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 579–611
- Gozuacik D, Kimchi A (2004): Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891–2906
- 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
- Huh W-K, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O’Shea EK (2003): Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691
- Izumi K, Brett M, Nishi E, Drunat S, Tan E-S, Fujiki K, Lebon S, Cham B, Masuda K, Arakawa M, et al. (2016): ARCN1 Mutations Cause a Recognizable Craniofacial Syndrome Due to COPI-Mediated Transport Defects. *Am J Hum Genet* 99, 451–459
- Johansen T, Lamark T (2011): Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279–296
- Khmelniskii A, Meurer M, Duishoev N, Delhomme N, Knop M (2011): Seamless Gene Tagging by Endonuclease-Driven Homologous Recombination. *PLoS ONE* 6
- Kim J, Scott SV, Oda MN, Klionsky DJ (1997): Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* 137, 609–618
- Kirchhausen T (2000): Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 187–198
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M (2005): The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17, 675–689
- Krauss M, Jia J-Y, 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
- Lechowski S: Zell- und Molekularbiologie im Überblick. Springer Spektrum, Berlin [u.a.] 2014
- Levine B, Klionsky DJ (2004): Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Dev Cell* 6, 463–477
- Liu Y, Kahn RA, Prestegard JH (2009): Structure and Membrane Interaction of Myristoylated ARF1. *Struct Lond Engl* 17, 79–87
- Lord C, Bhandari D, Menon S, Ghassemian M, Nycz D, Hay J, Ghosh P, Ferro-Novick S (2011): Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* 473, 181–186
- Lynch-Day MA, Klionsky DJ (2010): The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett* 584, 1359–1366
- Malhotra V, Serafini T, Orci L, Shepherd JC, Rothman JE (1989): Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* 58, 329–336



- Meurer M, Duan Y, Sass E, Kats I, Herbst K, Buchmuller BC, Dederer V, Huber F, Kirrmaier D, Stefl M, et al. (2017): A genome-wide resource for high-throughput genomic tagging of yeast ORFs. *bioRxiv* 226811
- Mizushima N, Komatsu M (2011): Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728–741
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, et al. (2004): Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306, 1037–1040
- Nishikawa S, Endo T (1997): The Yeast JEM1p Is a DnaJ-like Protein of the Endoplasmic Reticulum Membrane Required for Nuclear Fusion. *J Biol Chem* 272, 12889–12892
- Okamura K, Kimata Y, Higashio H, Tsuru A, Kohno K (2000): Dissociation of Kar2p/BiP from an ER Sensory Molecule, Ire1p, Triggers the Unfolded Protein Response in Yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 445–450
- Palade G (1975): Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347–358
- Palmer DJ, Helms JB, Beckers CJ, Orci L, Rothman JE (1993): Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J Biol Chem* 268, 12083–12089
- Robinson MS (2004): Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* 14, 167–174
- Romisch K (1999): Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci* 112, 4185–4191
- Schuldiner M, Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, Schmitt HD, Schwappach B, Weissman JS (2008): The GET Complex Mediates Insertion of Tail-Anchored Proteins into the ER Membrane. *Cell* 134, 634–645
- Scott SV, Guan J, Hutchins MU, Kim J, Klionsky DJ (2001): Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol Cell* 7, 1131–1141
- Sherman F: Getting started with yeast; in: *Methods in Enzymology*, Band 350; hrsg. v. Guthrie C, Fink GR; Academic Press 2002, 3–41
- Shintani T, Huang W-P, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2002): Mechanism of Cargo Selection in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *Dev Cell* 3, 825–837
- Springer S, Spang A, Schekman R (1999): A Primer on Vesicle Budding. *Cell* 97, 145–148
- Sun Z-W, Allis CD (2002): Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104–108
- Tanaka C, Tan L-J, Mochida K, Kirisako H, Koizumi M, Asai E, Sakoh-Nakatogawa M, Ohsumi Y, Nakatogawa H (2014): Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *J Cell Biol* 207, 91–105
- Taniguchi Y (2016): The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins. *Int J Mol Sci* 17
- Tarassov K, Messier V, Landry CR, Radinovic S, Serna Molina MM, Shames I, Malitskaya Y, Vogel J, Bussey H, Michnick SW (2008): An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science* 320, 1465–1470
- Waters MG, Serafini T, Rothman JE (1991): „Coatomer“: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 349, 248

- Watkin LB, Jessen B, Wiszniewski W, Vece T, Jan M, Sha Y, Thamsen M, Santos-Cortez RLP, Lee K, Gambin T, et al. (2015): COPA mutations impair ER-Golgi transport causing hereditary autoimmune-mediated lung disease and arthritis. *Nat Genet* 47, 654–660
- Weidberg H, Shvets E, Elazar Z (2011): Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* 80, 125–156
- Wickner W, Schekman R (2005): Protein Translocation Across Biological Membranes. *Science* 310, 1452–1456
- 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 Color and Purkinje Cell Degeneration. *PLOS Genet* 6, e1000956
- Yofe I, Weill U, Meurer M, Chuartzman S, Zalckvar E, Goldman O, Ben-Dor S, Schütze C, Wiedemann N, Knop M, et al. (2016): One library to make them all: Streamlining yeast library creation by a SWAp-Tag (SWAT) strategy. *Nat Methods* 13, 371–378
- Yuga M, Gomi K, Klionsky DJ, Shintani T (2011): Aspartyl aminopeptidase is imported from the cytoplasm to the vacuole by selective autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 286, 13704–13713

## 6.2 Internetquellen

- APM3 | SGD. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000000492>; Zugriff am 06.03.2019
- JEM1 | SGD. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000003609#reference>; Zugriff am 06.03.2019
- KAR2 | SGD. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000003571>; Zugriff am 06.03.2019
- Molekularbiologische Methoden 2.0 - 9783838587424. <https://www-1utb-2studi-2e-2book-1de-18dwondw9b9ff.han.sub.uni-goettingen.de/Viewer2.0/pdfviewer/index/viewer?isbn=9783838587424&access=24e10ba3147cbe43eb7b16ee5d09acff&code=cf857da2a8b6723b496fd4176c3b09e7&q=&lang=de&key=&page=&label=A&prodId=2460&hash=a29e95900351e0a076fe3b2e8e68f3b0&token=a29e95900351e0a076fe3b2e8e68f3b0&timestamp=cf857da2a8b6723b496fd4176c3b09e7>; Zugriff am 03.06.2019
- Official REBASE Homepage | The Restriction Enzyme Database | NEB. <http://rebase.neb.com/rebase/>; Zugriff am 14.02.2019
- Saccharomyces Genome Database | SGD. <https://www.yeastgenome.org/>; Zugriff am 06.03.2019
- Tokunaga M, et al. (1992) | SGD. <https://www.yeastgenome.org/reference/S000055090>; Zugriff am 06.03.2019
- YGR016W | SGD. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000003248>; Zugriff am 06.03.2019

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich gerne Prof. Dr. Blanche Schwappach und Dr. Eric Arakel von ganzem Herzen danken. Gemeinsam sind Sie ein echtes „Betreuungs-Dream-Team“, sie ergänzten sich perfekt und arbeiteten stets in dieselbe Richtung. Daraus resultierte eine Rundum-Sorglos Betreuung für mich.

Blanche unterstütze mich stets, von der Themenfindung über die Planung und Durchführung der Experimente bis hin zur Niederschrift und Korrektur dieser Dissertation. Sie ist eine großartige Doktormutter, die stets ein offenes Ohr hatte und sich jedem meiner Probleme angenommen hat. Durch ihre sympathische und einfühlsame Art hat Sie es geschafft ein durchweg motiviertes und engagiertes Team aufzubauen. Als Teil ihrer Arbeitsgruppe kann man sich somit nur wohl fühlen.

Einen Betreuer wie Eric würde ich jedem Promovierenden wünschen. Er hat immer ein freundliches Wort auf den Lippen, erklärt mit engelsgleicher Geduld jeden Versuchsaufbau bis ins kleinste Detail, ist jederzeit für Fragen offen und beantwortet diese äußerst ausführlich und leicht verständlich.

Weiterhin möchte ich gerne Arkos, Anne, Ariane und der gesamten Arbeitsgruppe danken. Sie begleiteten mich im täglichen Prozess der Experimente, halfen und unterstützen mich wo sie nur konnten. Ihre Zuarbeit, Betreuung und Unterstützung trugen in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit bei.