

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Ernstpeter Stüven

aus Bielefeld

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Identifizierung von Mikrodomän-Proteinen und funktionelle
Charakterisierung von Cholesterin im Golgi-Apparat

Gutachter: Prof. Dr. Felix T. Wieland

Gutachter: Prof. Dr. Irmgard Sinning

... und staunend begann ich zu experimentieren.

Max Ernst

I	Einleitung	1
1	Kompartimentierung	1
2	Sekretorischer Weg	1
3	Intra-Golgi Transport	3
3.1	v-ATPase im sekretorischen Weg, Aufbau und Funktion	6
4	Mikrodomänen, Rafts und Caveolae	7
5	Mikrodomänen im sekretorischen Weg	9
6	Mikrodomänen im Golgi-Apparat	10
7	Cholesterin	12
II	Aufgabenstellung	13
III	Ergebnisse	14
1	Identifizierung von GIC-Komponenten	14
1.1	Identifizierung der Untereinheit A und B der v-ATPase als Bestandteil des GIC	14
1.2	Mikrosequenzierung von Bande 1 und 2	14
1.3	Abreicherung der Untereinheit B der v-ATPase in COPI-Vesikeln	16
1.4	Inhibition der Sekretion von Proteinen durch Bafilomycin A1	17
1.5	Identifizierung von BASP1/CAP-23/NAP-22 als Bestandteil des GIC	18
2	Die Rolle von Cholesterin im Intra-Golgi-Proteintransport	22
2.1	Inhibition des Intra-Golgi-Proteintransport durch M β CD	22
2.2	Keine Inhibition der Glykosylierungsreaktion durch M β CD	23
2.3	Spezifität der Inhibition des Intra-Golgi-Transports durch M β CD	24
2.4	M β CD wirkt auf die Golgimembran und nicht auf einen zytosolischen Transportfaktor	25
2.5	Inhibition des Fusionsschritts des Intra-Golgi-Transportassays durch M β CD	26
2.6	Extraktion von Cholesterin durch M β CD	27
2.7	Aufhebung der Inhibition durch M β CD mittels Vorbeladung mit Cholesterin	28
2.8	Inhibition des Intra-Golgi-Transports durch Cholesterin-M β CD-Komplexe	29
2.9	Einfluss der Cholesterinextraktion auf die Cholesterinpopulation der <i>liquid ordered</i> und der <i>liquid disordered phase</i>	30
2.10	Verhalten des Lipidhaushalts bei erhöhter Cholesterinkonzentration	31
2.11	Verhalten von Raftproteinen im Golgi-Apparat bei Veränderungen des Cholesteringehalts	33
2.12	Einfluss der Cholesterinaddition auf die Struktur des Golgi-Apparats	34
IV	Diskussion	36
1	Die v-ATPase als Bestandteil des GIC	36
2	NAP-22 ist Bestandteil des GIC	39
3	Die Rolle von Cholesterin im Intra-Golgi-Proteintransport	40
V	Zusammenfassung	47

VI	Material und Methoden	49
1	Material	49
1.1	Chemikalien	49
1.2	Antikörper	49
1.2.1	Primärantikörper	49
1.2.2	Sekundärantikörper	50
1.3	Peptide	50
1.4	Synthetische Oligonukleotide	50
1.5	Plasmide	50
1.6	Zelllinien	51
2	Methoden	51
2.1	Zellbiologische Methoden	51
2.1.1	Zählen von Zellen	51
2.1.2	Kultivierung von Zellen	51
2.1.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	51
2.1.4	Passagieren von Zellen	51
2.1.5	Anzucht von Zellen in Spinner-Kultur	52
2.1.6	Stabile Transfektion	52
2.1.7	FACS-Analysen transformierter Zellen	53
2.2	Molekularbiologische Methoden	53
2.2.1	Transformation von <i>E.coli</i>	53
2.2.2	Ligation	54
2.2.3	Glyzerindauerkulturen von <i>E.coli</i>	54
2.2.4	Präparation von Plasmid DNA	54
2.2.4.1	Aufreinigung analytischer DNA-Mengen	54
2.2.4.2	Aufreinigung präparativer DNA-Mengen	54
2.2.5	Restriktionsverdau von DNA	54
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
2.2.7	Sequenzierung	55
2.2.8	Agarosegel-Elektrophorese von Nukleinsäuren	55
2.2.9	DNA-Größenstandards	56
2.2.10	Isolierung von Nukleinsäuren-Fragmenten	56
2.2.11	Bestimmung der DNA-Konzentration	56
2.2.12	Überexpression von ratiometrischem pH-GFP-GST-Fusionsprotein in <i>E.coli</i>	56
2.3	Proteinbiochemische Methoden	57
2.3.1	Proteinbestimmung mit Bicinchinonsäure	57
2.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)	57
2.3.3	2D-Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975)	58
2.3.4	Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE	59
2.3.5	Coomassie-Färbung von Proteingelen	59
2.3.6	Silberfärbung von Proteingelen	60
2.3.7	Chloroform/Methanol-Präzipitation	60
2.3.8	Western Blot	60
2.3.9	Proteinsequenzierung	60

2.4	Immunochemische Methoden	61
2.4.1	Immunnachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	61
2.4.2	Immunfluoreszenz	61
2.4.3	Infektion von Vero-Zellen mit VSV ts045	62
2.5	Weitere Methoden	62
2.5.1	Isolierung von Golgimembranen aus CHO-Zellen	62
2.5.2	Isolierung Triton X-100 unlöslicher Komplexe aus Golgimembranen	63
2.5.3	Präparation von Rinderhirnzytosol (Wattenberg und Rothman, 1986)	63
2.5.4	Präparation von Rattenhirnzytosol	64
2.5.5	Generierung von COPI-Transportvesikeln (Serafini et al., 1991)	64
2.5.6	Intra-Golgi-Proteintransportassay (Balch et al., 1983)	65
2.5.7	2-Stufen Intra-Golgi-Transportassay (Porat et al., 2000)	66
2.5.8	Glykosylierungsassay (Taylor et al., 1994)	66
2.5.9	Inkubation von Hirnzytosol mit M β CD	67
2.5.10	Cholesterinextraktion mit M β CD	67
2.5.11	Synthese von M β CD-Cholesterin-Komplexen	67
2.5.12	Saure Lipidextraktion (Bligh und Dyer, 1959)	68
2.5.13	PC- und SM-Bestimmungen mittels ESI-MS/MS (Brügger et al., 1997)	68
2.5.14	Cholesterinbestimmung mittels ESI-MS/MS (Sandhoff et al., 1999)	69
2.5.15	Etablierung der NAGTI-pH-GFP-CHO-Zelllinien	69
VII	Literaturverzeichnis	71
VIII	Abkürzungsverzeichnis	86
IX	Danksagung	88

I Einleitung

1 Kompartimentierung

Im Gegensatz zu prokaryotischen Organismen verfügen eukaryotische Zellen über ein ausgeprägtes Endomembransystem. Diese Membrankompartimente dienen unter anderem zur Abgrenzung von Reaktionsräumen und zur Erhaltung von Konzentrationsgradienten. Die räumliche Trennung ermöglicht es, verschiedene Prozesse, welche sich aufgrund von unterschiedlichen Ansprüchen an z.B. pH-Wert, Redoxpotential oder Eduktkonzentration nicht miteinander vereinbaren lassen, gleichzeitig nebeneinander ablaufen zu lassen. Damit die Organellen ihre spezifische Funktion erfüllen können, bedarf es einer genauen Regulation ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung. Dies wird durch Transport- und Sortierungsprozesse zwischen den Organellen erreicht. Neu synthetisierte Proteine werden vom Ort ihrer Synthese zu den Zielkompartimenten transportiert. Hinzu kommen Kontrollmechanismen, wie z.B. Sortierung und der Transport von inkorrekt transportierten Proteinen.

Die Komplexität und das Ausmaß der Kompartimentierung der Zelle führt zu einer großen Zahl von Sortierungs- und Transportereignissen. Eine zentrale Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der einzelnen Proteinzusammensetzungen der unterschiedlichen Kompartimente nehmen dabei die Organellen des sekretorischen Wegs ein.

2 Sekretorischer Weg

Transmembranproteine, die ihre Funktion an der Plasmamembran ausüben, wie z.B. Rezeptoren und Ionenkanäle, oder lösliche Proteine, die sezerniert werden, wie z.B. Antikörper, müssen den sekretorischen Weg durchlaufen (Abb. 1). Im ersten Schritt wird die naszierende Peptidkette in das Endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert. Dieser Prozess wird durch die Hydrophobizität der Signalsequenz ausgelöst und führt zur SRP- (*signal recognition particle*)-vermittelten Rekrutierung des aktiven Ribosoms an die ER-Membran (Blobel und Dobberstein, 1975). Am ER wird die Translation wieder aufgenommen, so dass die Peptidkette durch den Translokationskanal in das Lumen des ERs synthetisiert wird (Rapoport et al., 1999).

Im ER erfolgen erste N-Glykosylierungsreaktionen (Kornfeld und Kornfeld, 1985), die Bildung von Disulfidbindungen (Gething und Sambrook, 1992) und mittels Chaperonen

wird der korrekte Faltungszustand gewährleistet. Danach werden die Proteine in zwei Schritten zum Golgi-Apparat transportiert. Im ersten Schritt werden die Proteine mittels COPII-Vesikeln zum *Intermediate Compartment* (IC) und im zweiten Schritt von dort mit COPI-Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. Das IC wird auch als *Vesicular Tubular Cluster* (VTC) oder als 15°C-Kompartiment bezeichnet. Es wird durch das Markerprotein ERGIC 53 (Hauri et al., 2000) und die kleine GTPase Rab2 (Chavrier et al., 1990) charakterisiert.

Der Golgi-Apparat besteht aus mehreren dicht übereinander geschichteten Membransäcken. Bis zu mehreren hundert Kopien einer solchen Zisternenpackung können pro Zelle existieren. Dabei werden cis-, medial- und trans-Golgi unterschieden. Eine biochemische Unterscheidung dieser Einteilung beruht auf der Analyse der Glykosylierungsmuster von sezernierten Proteinen. Glykoproteine werden von residenten Glykosylierungsenzymen sequentiell modifiziert (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Daneben erfolgen noch andere Modifikationen wie z.B. die Sulfatierung im späten Golgi-Komplex (Esko, 1991).

Die Proteine treten am cis-Golgi in den Golgi-Apparat ein und durchlaufen anschließend die Zisternen des medialen- und des trans-Golgis bevor sie im sogenannten Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ankommen (Rothman und Wieland, 1996). Eine zentrale Aufgabe erfüllen hierbei COPI-Vesikel, die den Transport vom IC zum Golgi-Apparat, innerhalb des Golgi-Apparats und retrograd zum ER vermitteln (zusammengefasst in (Nickel und Wieland, 1998)). Auf den Intra-Golgi-Transport wird in Kapitel I.3 genauer eingegangen.

Vom TGN gelangen die Proteine auf verschiedene Weise an die Plasmamembran oder zu anderen Zielkompartimenten, wie z.B. Lysosomen und Endosomen. Dies geschieht hauptsächlich über sekretorische oder Clathrin-umhüllte Vesikel. Falls es sich um polarisierte Zellen handelt, werden Proteine zudem basolateral oder apikal sortiert und transportiert. Bei diesem Sortierungsprozess sollen sogenannte Rafts oder Mikrodomänen eine entscheidende Rolle übernehmen (Simons und van Meer, 1988; Simons und Ikonen, 1997; Schroeder et al., 2001). Auf Mikrodomänen und deren Beteiligung im sekretorischen Weg wird in den Kapiteln I.4 und I.5 genauer eingegangen.

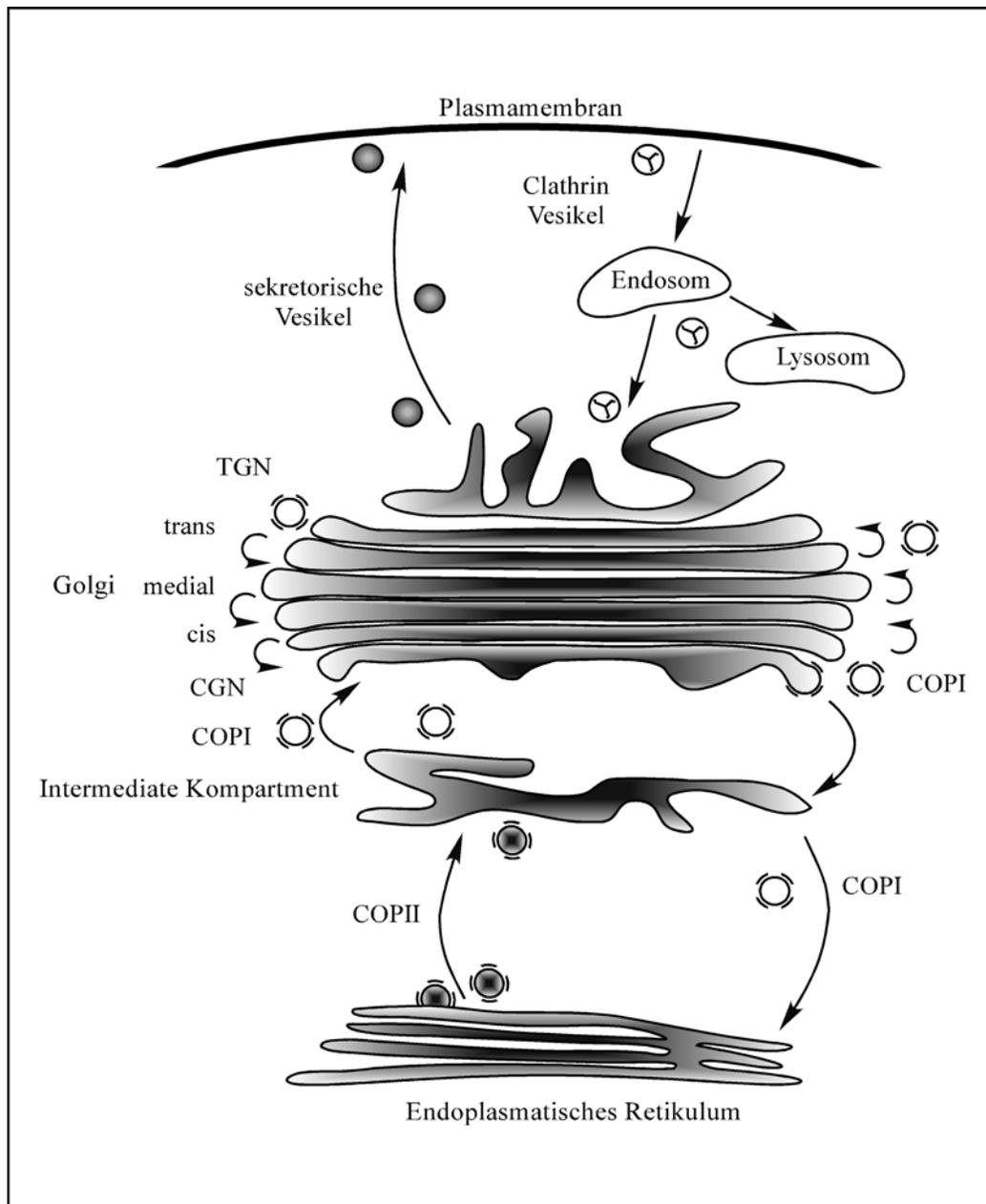


Abb. 1: Der sekretorische Weg

3 Intra-Golgi-Transport

Für den Intra-Golgi-Transport von Proteinen werden zwei Modelle diskutiert: vesikulärer Transport und zisternale Reifung. Diese unterschiedlichen Modelle lassen sich in Einklang miteinander bringen, wenn beide Transportformen mit variierenden Anteilen zugelassen werden und dabei der vesikuläre Transport speziell für die schnelle Art des Transports angenommen wird (Pelham und Rothman, 2000).

COPI-Vesikel sind für den vesikulären Intra-Golgi-Transport verantwortlich. Es handelt sich dabei um 70-80nm große Vesikel, die von einer Proteinhülle bestehend aus dem heptameren Hüllprotein Coatomer (*coat protomer*) umschlossen werden. Der Transportvorgang kann in verschiedene Einzelschritte eingeteilt werden: Knospung der Vesikel, Dissoziation der Proteinhülle, *Docking* und Fusion.

An der Rekrutierung des Coatomer an die Golgimembran ist neben einem Rezeptor die kleine GTPase ARF (*ADP ribosylation factor*) beteiligt. Nur ein geringer Anteil des zellulären ARFs ist unter *steady state* Bedingungen mit Golgimembranen assoziiert (Helms et al., 1993). Der Anteil wird erhöht, wenn ein GEF-(*guanosine nucleotide exchange factor*)-vermittelter Nukleotidaustausch ARF-GDP in membranassoziiertes ARF-GTP umwandelt. Dies führt zu einer Konformationsänderung und ermöglicht eine Insertion der N-terminalen Myristatgruppe in die Membran. Daneben wird eine Beteiligung von p24-Proteinen bei der Rekrutierung von ARF-GDP beschrieben (Gommel et al., 2001; Majoul et al., 2001).

Anschließend kann Coatomer möglicherweise binär sowohl an den zytoplasmatischen Anteil eines p24-Familienmitglieds als auch an ARF binden und so an die Membran rekrutiert werden (Zhao et al., 1997; Zhao et al., 1999). Die Interaktion mit p24-Familienmitgliedern führt zu einer Konformationsänderung und möglicherweise einer Polymerisation des Coatomers, und kann so eine Krümmung der Membran und ein Abknospen erzwingen (Reinhard et al., 1999).

Während des Abknospungsprozesses wurde durch Verwendung von GTP γ S anstelle von GTP (Nickel et al., 1998) sowie durch Verwendung einer Hydrolyse-defizienten ARF-Mutante (Malsam et al., 1999; Pepperkok et al., 2000) gezeigt, dass die GTP-Hydrolyse für die Aufnahme von Frachtmolekülen in COPI-Vesikel notwendig ist und möglicherweise mehrere Zyklen Austausch und Hydrolyse von GTP ablaufen müssen, bevor ein Vesikel entsteht. Die Hydrolyse von GTP zu GDP wird dabei von GAPs (*GTPase activating protein*) reguliert.

Nach dem Abknospen der Vesikel bleiben diese weiterhin mit den Golgi-Zisternen verbunden. Das Protein p115 bindet sowohl Giantin auf den COPI-Vesikeln, als auch GM130 am Golgi-Komplex und stellt so sicher, dass die Vesikel nicht vom Golgi-Apparat wegdiffundieren können (Orci et al., 1998; Lesa et al., 2000; Linstedt et al., 2000; Seemann et al., 2000).

Damit das Vesikel mit der Zielmembran fusionieren kann, muss erst die Proteinhülle abdissoziieren. Voraussetzung hierfür ist die Hydrolyse des GTP am ARF, so dass die Proteinhülle in Umkehrung des Rekrutierungsvorgangs vom Vesikel abfallen kann (Tanigawa et al., 1993). Bei der Hydrolyse des GTP ist neben dem GAP auch Coatomer beteiligt, da in einer Inkubation aus ARF, ARF-GAP und Coatomer die GTPase Aktivität um den Faktor 1000 gesteigert wird (Goldberg, 1999; Goldberg, 2000; Szafer et al., 2000; Szafer et al., 2001).

Für die Spezifität des Andockens der Vesikel an die Zielmembran und die anschließende Fusion sind die SNARE (*SNAP receptor*)-Proteine von zentraler Bedeutung (zusammengefasst in (Gerst, 1999)). Es handelt sich um Membranproteine, die sich zum einen auf den Vesikeln (v-SNAREs) und zum anderen auf der Zielmembran (t-SNAREs) befinden. Die SNARE-Proteine liegen auf den Vesikeln und auf der Zielmembran gepaart in sogenannten cis-Komplexen (ein SNARE-Komplex in einer Membran) vor. Diese Interaktionen werden unter Beteiligung von SNAPs (*SNARE attachment protein*) durch das Protein NSF (*NEM sensitiv factor*) ATP-abhängig getrennt, so dass sich ein trans-Komplex (ein SNARE-Komplex von SNAREs in unterschiedlichen Membranen) aus v- und t-SNARE bilden kann. In einem *in vitro* Ansatz mit v- und t-SNARE tragenden Liposomen konnte gezeigt werden, dass die SNARE Interaktion ausreichend ist, um die Fusion zu vermitteln (Weber et al., 1998; Nickel et al., 1999; Parlati et al., 1999). Neben der Vermittlung der Fusion wird durch die Paarung der SNAREs auch die Spezifität einer Fusion gesichert (McNew et al., 2000). Nur bestimmte Paarungen zwischen v- und t-SNAREs sind möglich, so dass nicht jedes Vesikel mit jeder Zielmembran fusionieren kann. Mit ARF, der p24-Proteinfamilie, Coatomer und den SNAREs sind die für die Bildung von COPI-Vesikeln (Bremser et al., 1999) und deren anschließender Fusion mit Zielmembranen minimal notwendigen Proteine bekannt. Aber sie allein ermöglichen noch keinen Intra-Golgi-Transport. Es sind weiterhin die erwähnten ARF-GEFs und GAPs, p115, GM130, Giantin, SNAP und NSF notwendig. Daneben existieren weitere Proteine und Faktoren die den Transport regulieren oder beschleunigen, wie z.B. SBP 56 (Porat et al., 2000), GATE 16 (Legesse-Miller et al., 1998), Calcium (Porat und Elazar, 2000) oder heterotrimere G-Proteine (Helms, 1995; Helms et al., 1998).

Teilweise erfüllen diese Faktoren nicht nur eine Rolle im Intra-Golgi-Transport, sondern üben Funktionen an verschiedenen Punkten des sekretorischen Wegs aus. Auf eine solche Komponente wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

3.1 v-ATPase im sekretorischen Weg, Aufbau und Funktion

Entlang des sekretorischen Wegs existiert ein pH-Gradient (Wu et al., 2001). Der pH-Wert im ER liegt mit pH 7.1-7.4 im neutralen Bereich (Kim et al., 1998; Kneen et al., 1998; Wu et al., 2001). Entlang des Golgi-Apparats nimmt die Azidifizierung zu und damit der pH-Wert bis auf pH 6.5-6.2 ab (Kim et al., 1986; Farinas und Verkman, 1999; Schapiro und Grinstein, 2000; Wu et al., 2001). Im TGN werden pH-Werte bis zu pH 5.9 gemessen (Demaurex et al., 1998; Miesenböck et al., 1998). In sekretorischen Granula sinkt der pH-Wert weiter auf bis zu pH 5.5 (Wu et al., 2001). Verantwortlich für die Azidifizierung von Organellen ist primär die vakuoläre ATPase (Finbow und Harrison, 1997). Die v-ATPase besteht aus zwei Untereinheiten, V0 und V1, analog zu den Untereinheiten F0 und F1 der F-ATPase in den Mitochondrien (Moriyama und Nelson, 1989). Die V0-Untereinheit umfasst den Transmembrananteil und ist für die Translokation der Protonen verantwortlich, während die lösliche V1-Untereinheit die notwendige Energie für den aktiven Transport durch die Hydrolyse von ATP liefert (Nelson, 1992).

Über die Regulation der v-ATPase ist bisher wenig bekannt. Es wurden Hinweise auf einen Einfluss von inhibitorischen, heterotrimeren G-Proteinen auf die Aktivität der v-ATPase in Endosomen gefunden (Codina et al., 1999). Experimente mit Phorbolestern deuten auf eine Regulation über Proteinkinase C hin (Nordstrom et al., 1994; Heming und Bidani, 1995). Eine Regulation über die Kontrolle von Disulfidbindungen in der Untereinheit A der V1 Domäne wird ebenfalls diskutiert (Feng und Forgac, 1992b; Feng und Forgac, 1992a).

Die Frage, wie und in welchem Ausmaß die v-ATPase an der Regulation des pH-Werts in den unterschiedlichen Organellen beteiligt ist, ist Thema einer kontroversen Debatte. Neben der Existenz und Aktivität der v-ATPase sind z.B. die Na,K-ATPase sowie Leitfähigkeiten für bestimmte Ionen wie Chlorid ausschlaggebend für den pH-Wert eines bestimmten Organells. Für den Golgi-Apparat existieren Untersuchungen zu diesen Faktoren und ihren Einfluss auf den pH-Wert (Schapiro und Grinstein, 2000) sowie Modellrechnungen, die diese Messungen beschreiben (Grabe et al., 2000; Grabe und Oster, 2001). Die Abnahme des pH-Werts vom ER zum Golgi-Komplex wird danach über eine größere Präsenz der aktiven v-ATPase im Golgi-Apparat erklärt (Wu et al., 2001). Unter *steady state* Bedingungen arbeitet die v-ATPase dabei ständig gegen einen Protonenverlust an (Farinas und Verkman, 1999). Gegenionen wie Chlorid scheinen entgegen ersten Annahmen den pH-Wert nicht zu beeinflussen (Wu et al., 2001).

Eine Anzahl unterschiedlicher Arbeiten befassen sich mit dem Einfluss des pH-Werts auf die Sekretion und die Sortierung von Proteinen (Muroi et al., 1993; Palokangas et al., 1994; Ying et al., 2000; Wu et al., 2001). All diese Untersuchungen zum Einfluss der v-ATPase bedienen sich des spezifischen Inhibitors Bafilomycin A1 (Bowman et al., 1988), oder des strukturell verwandten Folimycins, und die Ergebnisse stimmen dahingehend überein, dass eine Inhibition des Transports stattfindet. Der Mechanismus ist bisher ungeklärt. Einzelne Beobachtungen können gut erklärt werden, wie z.B. der retrograde Transport von ER-Proteinen, die über eine KDEL-Sequenz verfügen. Die Affinität der KDEL-Sequenz zum KDEL-Rezeptor ist bei niedrigem pH-Wert größer als bei höherem pH-Wert, so dass auf diese Weise aus dem ER entkommene Proteine vom KDEL-Rezeptor gebunden und zum ER zurückgebracht werden (Wilson et al., 1993).

Daneben schlagen Peters et al. eine andere Möglichkeit der Beteiligung nur der V0-Domäne an Transportprozessen vor (Peters et al., 2001; Müller et al., 2002). Ihre Ergebnisse könnten auf eine direkte Beteiligung der V0-Domäne bei der Fusion hindeuten.

4 Mikrodomänen, Rafts und Caveolae

Für die Beschreibung von Zellmembranen wurde zunächst das *Fluid Mosaic Model* herangezogen. Bei diesem Modell befinden sich die Lipide in der *liquid disordered phase*. Die Lipide verfügen über eine hohe Lateraldiffusionsgeschwindigkeit und eine sehr viel geringere transversale Diffusion. Transmembranproteine und in der Membran verankerte Proteine, z.B. über Lipidanker wie GPI, können sich dabei wie die Lipide lateral in den zwei Dimensionen der Membran frei bewegen.

Basierend auf den ersten Arbeiten von Brown und Rose (1992) zeigte sich, dass nicht die gesamte Membran in der *liquid disordered phase* vorliegt, sondern auch Bereiche in der *liquid ordered phase* existieren. Die *liquid ordered phase* zeichnet sich durch eine gestreckte Konformation der Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren und eine eingeschränkte laterale Diffusion gegenüber der *liquid disordered phase* aus. Zu ihrer Bildung kommt es durch Lipidsegregation. Durch Interkalation von Cholesterin zwischen die gesättigten Kohlenwasserstoffketten von Sphingolipiden erreichen diese eine dichtere Packung. Neben den hydrophoben Wechselwirkungen in der Lipiddoppelschicht wurden stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cholesterin und den Sphingolipiden vorgeschlagen (Simons und Ikonen, 2000) (siehe Abb. 2). Als weiterer Faktor für die Segregation gilt die Kohlenwasserstoffkettenlänge der Fettsäuren sowie deren Anteil an

Doppelbindungen. Längere, gesättigte Fettsäuren finden sich präferentiell in der *liquid ordered phase*. Auch diese Eigenschaften der Lipide begünstigen eine dichtere Packung.

Neben den Lipiden zeichnen sich diese Domänen durch charakteristische Proteine aus, die bedingt durch andere Packungseigenschaften präferentiell mit diesen Domänen assoziieren. Proteine, die über einen GPI-Anker verfügen, wie z.B. PLAP (Benting et al., 1999a), oder die doppelt acyliert sind, wie z.B. G α (Moffet et al., 2000), finden sich bevorzugt in Assoziation mit Sphingolipiden und Cholesterin. Für diese Art von Domäne hat sich die Bezeichnung Raft oder Mikrodomäne durchgesetzt (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 2000).

Es werden zwei Arten von Mikrodomänen aufgrund ihrer Morphologie und ihrer Proteinzusammensetzung unterschieden. Bei den sogenannten Caveolae handelt es sich um schon lange in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtete, flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran (Palade, 1953). Daneben existieren morphologisch nicht von der übrigen Plasmamembran unterscheidbare Mikrodomänen, in denen insbesondere GPI-verankerte Proteine gefunden werden (Schnitzer et al., 1996; Stuermer et al., 2001).

Mittels Extraktion von Membranen mit nicht-ionischen Detergenzien bei 0°C und anschließender Flotation der Komplexe in einer Dichtegradientenzentrifugation wurden Mikrodomänen erstmals isoliert (Brown und Rose, 1992). Dieses Verfahren zum Nachweis der Rafts barg die Gefahr, dass es sich um Artefakte des Isolierungsprozederes handeln könnte. Experimente mit künstlichen Membransystemen (Radhakrishnan et al., 2000), neue Untersuchungen (London und Brown, 2000) und Methoden wie *Atomic Force Microscopy* (Rinia und de Kruijff, 2001; Rinia et al., 2001), *Single Molecule Microscopy* (Schutz et al., 2000) konnten weitere Hinweise für die Existenz von Mikrodomänen und damit für die Richtigkeit dieses Isolierungsverfahrens liefern.

Während zunächst Rafts nur in Säugerzellen identifiziert wurden, konnten Lisanti (Kubler et al., 1996) und Simons (Bagnat et al., 2000) auch aus Hefe Rafts isolieren. Mikrodomänen wurden zuerst für die Plasmamembran beschrieben, aber ausgedehntere Untersuchungen zeigten ihre Existenz bzw. Hinweise auf ihre Existenz im TGN (Keller und Simons, 1998), in Phagosomen (Desjardins et al., 1994; Dermine et al., 2001), in Endosomen und Lysosomen (Kobayashi et al., 1998; Mayor et al., 1998; Gagescu et al., 2000; Gruenberg, 2001), im ER (Bagnat et al., 2000), in *Lipid Droplets* (Fujimoto et al., 2001; Ostermeyer et al., 2001; Pol et al., 2001) und im Golgi-Komplex (Gkantiragas et al., 2001).

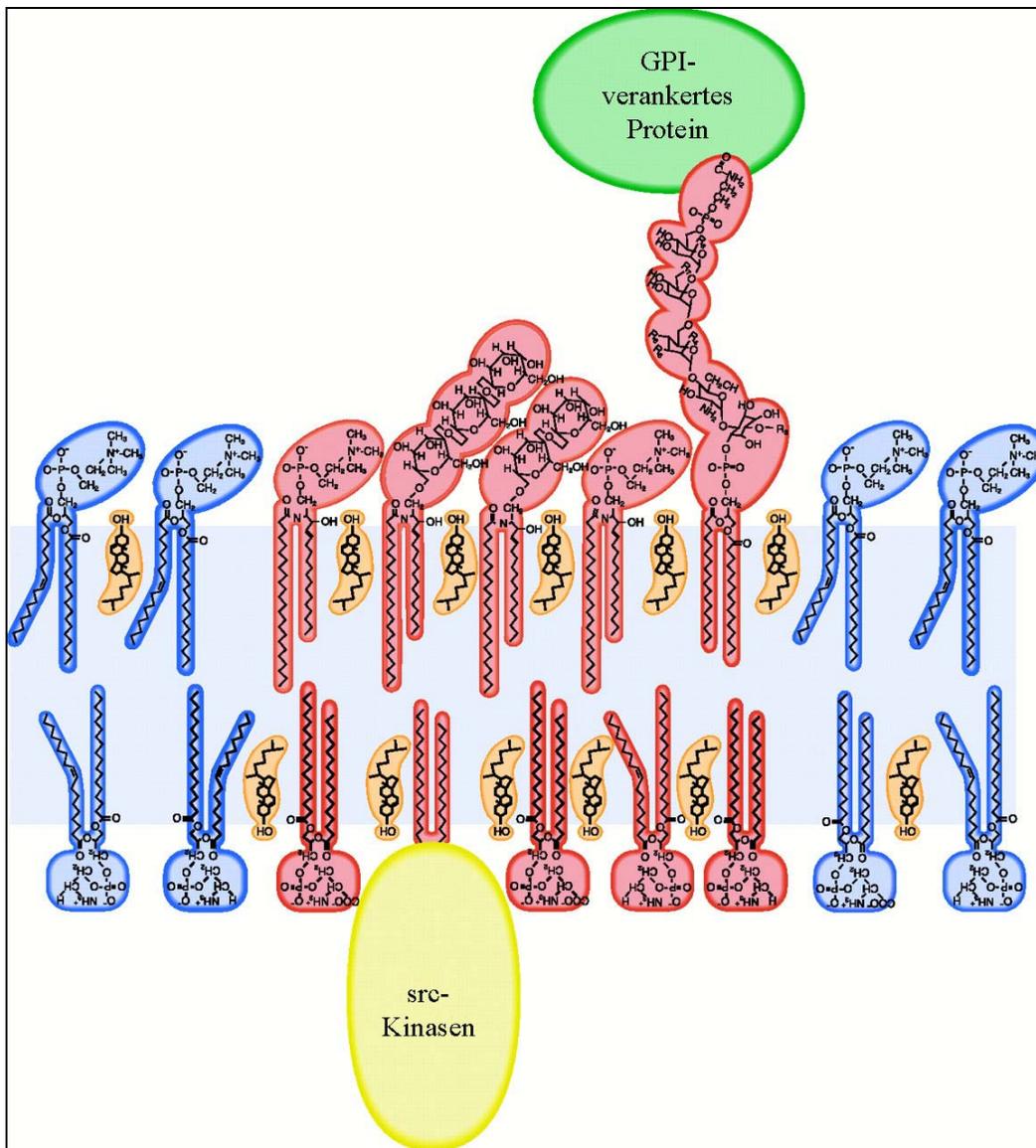


Abb. 2: Modell Spingolipid- und Cholesterin-reicher Mikrodomänen nach Simons und Ikonen, 2000

5 Mikrodomänen im sekretorischen Weg

Mikrodomänen werden mit verschiedenen Funktionen in Zusammenhang gebracht. Bedeutende Erkenntnisse kommen aus den Untersuchungen zum Membrantransport (zusammengefasst in (Ikonen, 2001)). Insbesondere Sortierung und Transport von GPI-verankerten Proteinen in polarisierten Zellen wurden untersucht (Muniz und Riezman, 2000). Dabei zeigte sich, dass die meisten GPI-verankerten Proteine Raft-assoziiert sind und apikal transportiert werden (Ikonen und Simons, 1998). Der GPI-Anker wurde als ursächlich für beide Beobachtungen angenommen. Nicht alle GPI-verankerten Proteine werden jedoch apikal transportiert (Benting et al., 1999b; Lipardi et al., 2000). Eine

mögliche Erklärung hierfür ist, dass nicht nur Mikrodomänen die Sortierung steuern, sondern auch Glykane (Lipardi et al., 1999). Auch in der regulierten Sekretion existieren Prozesse, für die eine Raftabhängigkeit diskutiert wird, wie z.B. die Cholesterinabhängigkeit der Bildung von regulierten sekretorischen Vesikeln vom TGN in AT20-Zellen (Wang et al., 2000; Tooze et al., 2001). Die cholesterinabhängige Aktinkometenbildung an Golgi-Apparat entstammenden Vesikeln lässt auf eine noch nicht genauer definierte Verbindung von Rafts, Transport und Zytoskelettelementen schließen (Rozelle et al., 2000). Auch SNARE-Proteine konnten in Mikrodomänen gefunden werden (Lafont et al., 1999; Chamberlain et al., 2001; Lang et al., 2001). Dies deutet auf eine direkte Beteiligung von Mikrodomänen am vesikulären Transports hin, da hierüber die Bereiche der Fusion räumlich definiert werden könnten.

Neben Funktionen im sekretorischen Weg wurde die Beteiligung von Rafts für andere Transportrouten in der Zelle beschrieben, wie z.B. von Endosomen zu Golgi (Grimmer et al., 2000), die Reifung von Phagosomen (Desjardins et al., 1994; Dermine et al., 2001), von der Plasmamembran über den Golgi-Apparat zurück zur Plasmamembran (Nichols et al., 2001) und von der Plasmamembran zu Endosomen (Mayor et al., 1998).

Da Mikrodomänen bedingt durch ihre physikalischen Eigenschaften einen Einfluss auf die Steifheit, die Topologie und die Viskosität der Membran haben, könnte dies einen Effekt auf das Knospen und die Fission von Vesikeln haben. Erste Betrachtungen in dieser Richtung existieren bereits (Huttner und Zimmerberg, 2001).

6 Mikrodomänen im Golgi-Apparat – Der GIC (Golgi-derived Insoluble Complex)

Neben den oben erwähnten Mikrodomänen im sekretorischen Weg konnten Gkantiragas et al., (2001) erstmals die Existenz von Rafts im frühen Golgi-Apparat beschreiben. Diese als GIC bezeichneten Mikrodomänen wurden nach dem Standardverfahren durch Detergenzextraktion von isolierten CHO-Golgi-membranen und anschließender Flotation im Saccharosegradienten erhalten. Wie in Abb. 3 gezeigt, besteht der GIC aus zehn Hauptproteinen, die in nahezu stöchiometrischen Mengen vorkommen. Die Identifizierung der Proteine mit den scheinbaren Molekulargewichten von 72 und 56 kDa gelang bisher nicht. Bei sechs der übrigen acht Proteine handelte es sich um bereits bekannte Proteine und zwar um $G\alpha$ und $G\beta$ der heterotrimeren G-Proteine, die Untereinheit E und die *accessory subunit* der v-ATPase, Flotillin-1 und Caveolin-1. Vier der sechs Proteine weisen einen Bezug zum Transport im sekretorischen Weg auf. Neben den heterotrimeren G-Proteinen,

die bei der Regulation des Intra-Golgi-Transports involviert sind (Helms et al., 1995; Helms et al., 1998), ist dies, wie in Kapitel I.3.1 beschrieben, die v-ATPase.

Bei den zwei anderen Proteinen handelte es sich um bis dato unbekannte Proteine. Das kleinste Protein hat ein Molekulargewicht von 17 kDa. Es konnte näher charakterisiert werden und wird als GAPR-1 bezeichnet (Eberle et al., 2002). Das andere Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 45 kDa wird zur Zeit eingehend untersucht (Li, persönliche Mitteilung).

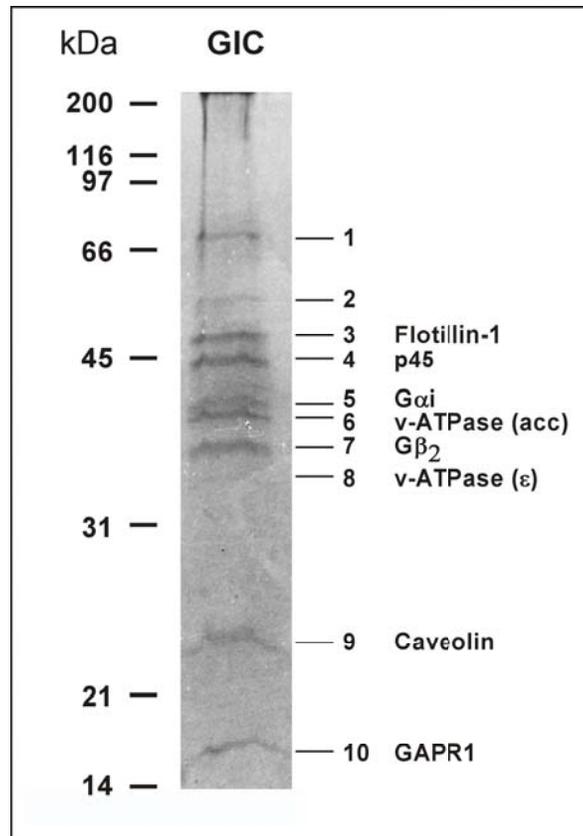


Abb. 3: Das Proteinmuster des GIC (Coomassiefärbung eines SDS-Gels)

Außer durch einfache Proteinmuster zeichnet sich der GIC durch einen spezifischen Lipidgehalt aus. Der GIC enthält 25% der gesamten Phospholipide des Golgi-Apparats, wobei darin 67% der Sphingolipide und 43% des Cholesterins des Golgi-Apparats enthalten sind. Somit sind die für Mikrodomänen typischen Sphingolipide und Cholesterin im GIC angereichert. Auf die GIC-Komponente Cholesterin wird kurz im folgenden Abschnitt eingegangen.

7 Cholesterin

Zellen können Cholesterin entweder selbst synthetisieren oder von außen aufnehmen (zusammengefasst in (Schroeder et al., 2001)). Die Synthese beginnt im Zytosol, wird aber im ER abgeschlossen (Reinhart et al., 1987). Vom ER wird das Cholesterin zu anderen Bereichen der Zelle transportiert, wobei der Hauptteil (65-90%) des zellulären Cholesterins in der Plasmamembran sitzt (Orci et al., 1981; Lange et al., 1989). Vom geringen Cholesteringehalt des ERs zum hohen an der Plasmamembran erstreckt sich ein Konzentrationsgradient über die Organellen des sekretorischen Wegs (van Meer, 1993). Solch ein Konzentrationsgradient findet sich auch im Golgi-Apparat selbst wieder, mit einer etwas höheren Cholesterinkonzentration in den trans- als in den cis-Zisternen (Pagano et al., 1989; Coxey et al., 1993; Cluett und Machamer, 1996; Cluett et al., 1997).

Neben vesikelunabhängigen Mechanismen für den Transport an die Plasmamembran, wie z.B. mittels zytosolischer Proteine wie Caveolin-1 (Smart et al., 1996; Uittenbogaard et al., 1998; Ikonen und Parton, 2000) und *Sterol carrier protein-2* (Puglielli et al., 1995), wird zumindest ein Teil des Cholesterins direkt über den Golgi-Apparat transportiert.

Es ist nicht klar, wie das Cholesterin innerhalb des Golgi-Apparats transportiert wird, da es aus den für den Intra-Golgi-Transport verantwortlichen COPI-Vesikeln, wie auch bestimmte Sphingolipide, segregiert wird (Brügger et al., 2000).

Cholesterin und das im Golgi-Apparat neusynthetisierte Sphingomyelin wird in Zusammenhang mit der Entstehung von Rafts gebracht (Holthuis et al., 2001). Obwohl Ergebnisse, wie z.B. die Lokalisation im frühen Golgi-Apparat und nicht im TGN gegen eine Rolle als Vorläufer der Mikrodomänen an der Plasmamembran sprechen, ist diese Frage jedoch nicht abschließend geklärt. Welche Funktion das Cholesterin im GIC erfüllt, ist ebenfalls noch offen. Es könnte für die Integrität der Mikrodomänen notwendig sein, oder eine Rolle bei der Regulation der Aktivität der Proteine im GIC spielen. Denkbar wäre auch ein entscheidender Einfluss auf die Membranfluidität der Golgimembran.

II Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte basierend auf der Identifizierung von sphingolipid-reichen Mikrodomänen am Golgi-Apparat (Gkantiragas et al., 2001) eine genauere Charakterisierung weiterer Protein-Komponenten des GIC erfolgen. Insbesondere die Proteinkomponenten im Molekulargewichtsbereich zwischen 53 kDa und 75 kDa standen im Mittelpunkt des Interesses. Nach der Identifizierung und Validierung als Bestandteil des Golgi-Apparats war ihre Funktion Ziel der Untersuchung.

Neben der funktionellen Charakterisierung der Proteinkomponenten des GICs sollten die Lipidkomponenten und dabei insbesondere Cholesterin bezüglich seines Einflusses auf die Struktur des GIC und eine Funktion im Intra-Golgi-Proteintransport näher untersucht werden.

III Ergebnisse

1 Identifizierung von GIC-Komponenten

1.1 Identifizierung der Untereinheiten A und B der v-ATPase als Bestandteile des GIC

Gkantiragas et al. (2001) konnte die Existenz von sphingolipid-reichen Mikrodomänen am Golgi-Apparat nachweisen. Neben einer Anreicherung von Sphingolipiden und Cholesterin wurde ein einfaches Proteinmuster bestehend aus zehn Proteinen bei einer Isolierung der Rafts aus CHO-wt Golgimembranen gefunden. Dieser Komplex wurde als GIC für *Golgi-derived insoluble complex* definiert. Die zehn Proteinbanden im Coomassie-gefärbtem SDS-Gel wurden mit abnehmendem scheinbaren Molekulargewicht durchnummeriert (siehe Abb. 3). Für acht Proteine (Banden 3 bis 10) gelang eine Identifizierung entweder als bekanntes Protein (Flotillin-1, Caveolin-1, $G\alpha$ und $G\beta$ der heterotrimeren G-Proteine, die Untereinheit E und die *accessory subunit* der v-ATPase) oder als bis dato unbekanntes Protein (Bande 3 und 10). Bande zehn wurde kürzlich charakterisiert und als GAPR-1 bezeichnet (Eberle et al., 2002). Bande 3 mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 45 kDa wird zur Zeit eingehend untersucht (Li, persönliche Mitteilung).

Die Proteinbanden 1 und 2 mit scheinbaren Molekulargewichten von 72 und 56 kDa sollten im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und gegebenenfalls charakterisiert werden.

1.2 Mikrosequenzierung von Bande 1 und 2

Zur Identifizierung der Banden 1 und 2 wurde zuerst GIC isoliert und nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Banden ausgeschnitten und von Prof. Dr. F. Lottspeich enzymatisch verdaut (V8-Protease) und mikrosequenziert (Eckerskorn und Lottspeich, 1989). Die Ergebnisse werden in Abb. 4 wiedergegeben.

Bande 1:	HFTEFVPLRTK	v-ATPase Untereinheit A
	LIKDDFLQQN	v-ATPase Untereinheit A
Bande 2:	DLTGYITEGQIY	v-ATPase Untereinheit B

Humane Aminosäuresequenz der Untereinheit A der v-ATPase

```

1  mdfsklpkil dedkestfgv vhgvsqpvvt acdmagaamy elrvvghsel vgeiirlegd
61  matiqvyeet cgvsvqdpvl rtgkplsvdv gpgimgaifd giqrplsdiss sqtqsiyipr
121 gvnvsalsrd ikwdfpckn lrvgshittg diygivsens likhkimlpp rnrgrtvtyia

```

```

181 ppgnydtsdv vlelefegvk ekftmvqvwv arqvrpvtek lpanhplltg qrvldalfpc
241 vqggttaipg afgcgtvis qslskysnsd viiyvgcger gnmsevldr fpeltmevdg
301 kvesimkrta lvantsnmpv aareasiytg itlseyfrdm gyhvsmmads tsrwaealre
361 isgrlaempa dsgypaylga rlasfyerag rvkclgnper egsvsivgav sppggdfsdp
421 vtsatlgivq vfwgldkkla qrkhfpsvwn lisyskymra ldeyydkhft efvplrtkak
481 eilqeedla eivqlvgkas laetdkitle vaklikddfl qqngytpydr fcpfyktvgm
541 lsnmiafydm arravettaq sdnkitwsii rehmgdilyk lssmkfkdpf kdgeakiksd
601 yaqlledmqn afrsled

```

Humane Aminosäuresequenz der Untereinheit B der v-ATPase

```

1 malramrgiv ngaapelpvp tggpavgare qalavsrnyl sqprltyktv sgvngplvil
61 dhvkfpryae ivhltlpdgt krsgqvlevs gskavqvfe gtsgidakkt sceftgdilr
121 tpsedmlgr vfngsgkpid rgpvvlaedf ldimgqipn qcriypeemi qtgisaidgm
181 nsiargqkip ifsaaglphn eiaaqicrqa glvkkskdvv dyseenfaiv faamgvnmet
241 arffksdfee ngsmdnvclf lnlandptie riitprlalt taeflayqce khvlviltm
301 ssyaealrev saareevpgr rgfpgymtd latiyeragr vegrnsgitq ipiltmpndd
361 ithpipdltg yitegqiyvd rqlhnrqiyp pinvlpslsr lmksaigegm trkdhadvsn
421 qlyacyaigk dvqamkavvg eealtsddl yleflqkfer nfiaggyen rtvfetldig
481 wqllrifpke mlkripqstl sefyprdsak h

```

Abb. 4: Ergebnis der Mikrosequenzierung von Bande 1 und 2 und Homologievergleiche. GIC wurde wie in Abschnitt (VI.2.5.2) beschrieben isoliert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Coomassie Blue gefärbten Banden mit scheinbaren Molekulargewichten von 72 und 56 kDa wurden ausgeschnitten und mit V8-Protease verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden mikrosequenziert und konnten als Fragmente der vakuolären ATPase identifiziert werden (grau hinterlegt).

In Bande 1 konnten zwei Peptide und in Bande 2 ein Peptid identifiziert werden. Die Peptide zeigten 100%ige Identität mit den humanen Sequenzen der Untereinheit A der vakuolären ATPase für Bande 1 (van Hille et al., 1993) und der Untereinheit B für Bande 2 (Nelson et al., 1992). Für Bande 1 gilt diese Identität auch für die Sequenz für die Untereinheit A der v-ATPase aus Maus und Rind. Zusätzlich stimmen die scheinbaren Molekulargewichte der Banden 1 und 2 mit den Molekulargewichten der Untereinheiten der v-ATPase überein. Diese Ergebnisse bezüglich der Identität der Banden 1 und 2 wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen die Untereinheiten A und B der v-ATPase im Western Blot eines 2D-Gels verifiziert (Abb. 5).

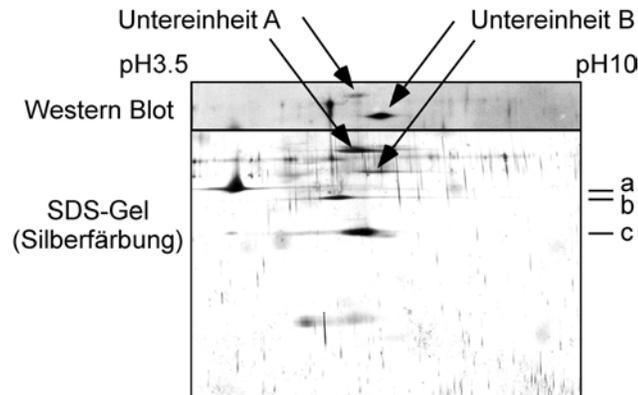


Abb. 5: 2D-Gel und Western Blot der v-ATPase. GIC wurde isoliert und mittels 2D-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Nach dem Blotten wurde das Gel silbergefärbt und die Blotmembran mit Antikörpern gegen die Untereinheit A und B der v-ATPase analysiert. In der Silberfärbung sind weitere GIC-Proteine erkennbar: a: Nap-22 (siehe Abschnitt III.1.5), b: p45 und c: v-ATPase (acc).

1.3 Abreicherung der Untereinheit B der v-ATPase in COPI-Vesikeln

Für andere Komponenten des GIC konnte gezeigt werden, dass sie aus COPI-Transportvesikeln segregiert werden. Hierzu zählen die heterotrimeren G-Proteine (Helms et al., 1998), Flotillin-1, Caveolin-1 (Gkantiragas et al., 2001), GAPR-1 (Eberle et al., 2002) und Cholesterin (Brügger et al., 2000). Wenn diese Segregation in der Tatsache begründet ist, dass die Proteine Teil von Mikrodomänen sind, so liegt die Vermutung nahe, dass auch Untereinheiten der v-ATPase in COPI-Vesikeln unterrepräsentiert sein sollten.

Um diese Vorhersage zu überprüfen, wurden gleiche Mengen (auf Lipid bezogen) an Golgimembranen und an COPI-Vesikeln im Western Blot miteinander verglichen. Die Generierung von COPI-Vesikeln aus Golgimembranen erfolgte nach einem Standardverfahren (Malhotra et al., 1989) mittels Zytosol, einem ATP-regenerierenden System und GTP γ S (Beckers und Rothman, 1992).

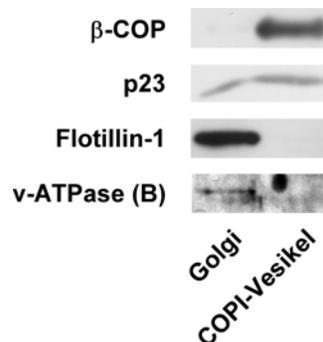


Abb. 6: Segregation der Untereinheit B der v-ATPase aus COPI-Vesikeln. Jeweils 10.8 μ g Gesamtphospholipide von isolierten Golgimembranen und COPI-Vesikeln wurden mittels Antikörpern gegen die Untereinheit B der v-ATPase in SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zur Kontrolle wurde der Blot mit Antikörpern gegen β -COP, p23 und Flotillin-1 entwickelt (durchgeführt von Dr. I. Gkantiragas).

Erwartungsgemäß findet sich β -COP, eine Untereinheit des Coatomers, in der Vesikelfraktion angereichert. Daneben wird p23 sowohl in Golgimembranen als auch in COPI-Vesikeln detektiert (Sohn et al., 1996), wohingegen Flotillin-1 nicht in den COPI-Vesikeln angereichert ist. Für die Untereinheit B als Repräsentant der V1-Domäne der v-ATPase wird eine eindeutige Abreicherung in COPI-Vesikeln gefunden (Abb. 6).

1.4 Inhibition der Sekretion von Proteinen durch Bafilomycin A1

In mehreren Arbeiten konnte eine Bedeutung des pH-Werts der Organellen des sekretorischen Wegs und der v-ATPase für den Transport von Proteinen gezeigt werden. Welche Transportschritte genau von der Hemmung der v-ATPase betroffen sind, ist nicht geklärt (Muroi et al., 1993; Yilla et al., 1993; Palokangas et al., 1994).

Die Arbeiten implizieren eine Rolle der v-ATPase im frühen sekretorischen Weg. Ungeklärt ist jedoch, ob der Transport sekretorischer Proteine bis zum Erreichen des TGN von der Aktivität der v-ATPase abhängig ist, oder auch darüber hinaus.

Dies lässt sich experimentell durch Infektion von Vero-Zellen mit dem tsO45 VS Virus untersuchen (Kreis, 1986). Das VSV G-Protein akkumuliert bei Inkubation der Zellen bei 39.5°C im ER und wird nach Abkühlen auf 31°C an die Plasmamembran transportiert. Dieser Fall ist in Abb. 7A und B dargestellt. Ist während des Transports hingegen mit 250nM Bafilomycin A1 ein selektiver Inhibitor der v-ATPase (Bowman et al., 1988) anwesend, so ist eine perinukleäre Struktur erkennbar (D) und keine Anfärbung der Plasmamembran sichtbar (C). Dies zeigt, dass der Proteintransport an die Plasmamembran vermutlich im Golgi-Apparat durch Inhibition der v-ATPase blockiert wird. Wird das Experiment unter Bedingungen wiederholt, bei denen die Zellen von 39.5°C auf 20°C abgekühlt werden (E) und erst danach in Anwesenheit von Bafilomycin A1 bei 31°C inkubiert (G), so ist kein Effekt des Inhibitors erkennbar. Bei 20°C akkumuliert unter diesen Bedingungen das VSV G im TGN. Werden die Zellen anschließend bei 31°C inkubiert, dann ist der Transport des VSV Gs vom TGN zur Plasmamembran nicht mehr Bafilomycin A1 sensitiv.

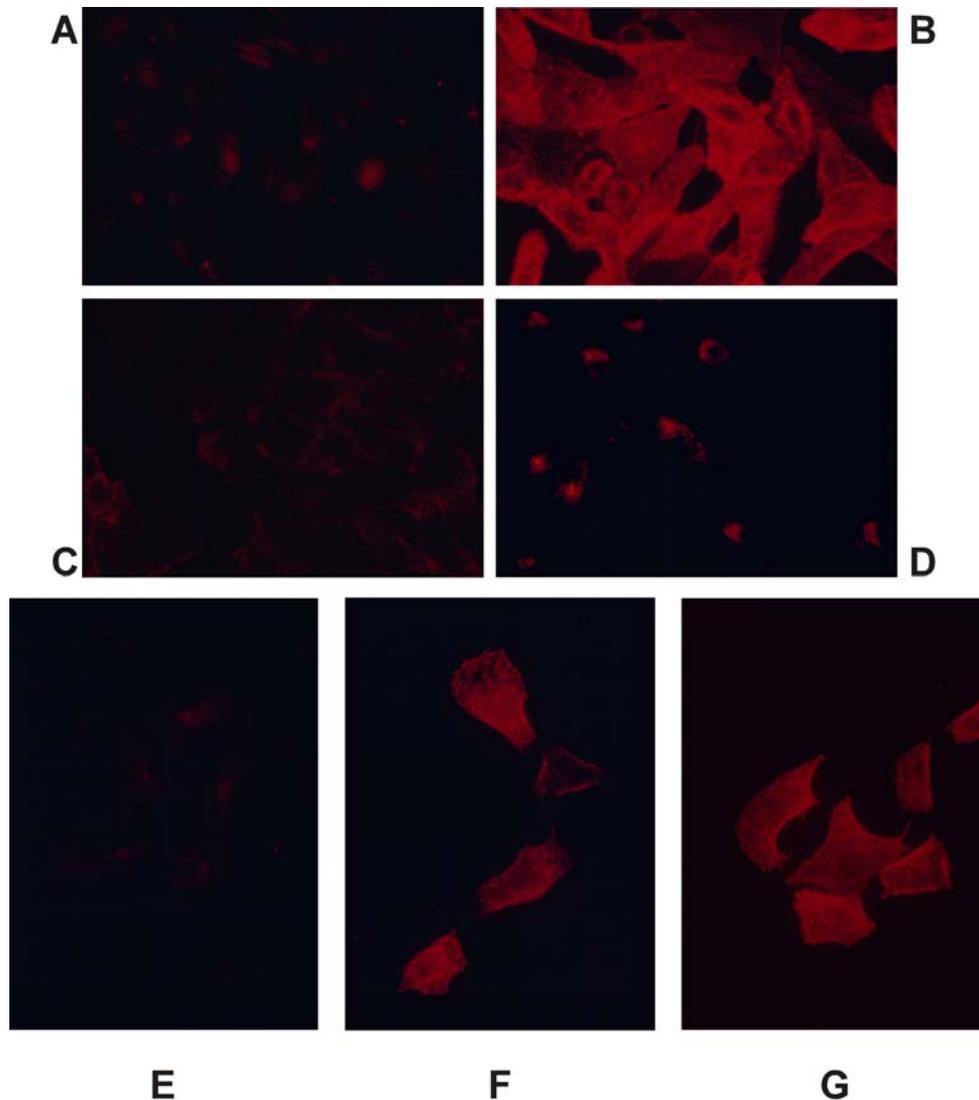


Abb. 7: Bafilomycin A1 inhibiert Proteinsekretion nicht zwischen TGN und Plasmamembran. Vero-Zellen wurden mit dem tsO45-VSV infiziert, und das tsO45-G-Protein wird durch Inkubation bei 39.5°C im ER angestaut (A-G). Entweder in Anwesenheit von 250 nM Bafilomycin A1 (D und C) oder in Abwesenheit (B) wurde die Temperatur auf 31°C verringert. Nur für Bild D wurden die Zellen permeabilisiert, ansonsten zeigen alle anderen Bilder Plasmamembranfärbungen. Im Fall von E bis G wurden die Zellen erst für eine Stunde bei 20°C inkubiert (E) und erst dann in Ab- (F) oder Anwesenheit (G) von 300 nM Bafilomycin bei 31°C temperiert.

1.5 Identifizierung von BASP1/CAP-23/NAP-22 als Bestandteil des GIC

Die von Prof. Dr. Lottspeich durchgeführten Mikrosequenzierungen ergaben zusätzlich ein Peptid, dass sowohl in Bande 1 als auch in Bande 2 zu finden war. Sequenzanalysen ergaben eine 93%ige Homologie bzw. 87%ige Identität mit einem Protein, dass in der Literatur als NAP-22 (aus Ratte) (Maekawa et al., 1993), als BASP1 (aus Rind und Mensch) (Mosevitsky et al., 1994) oder als CAP-23 (aus Huhn) (Widmer und Caroni, 1990) bekannt ist (nachfolgend nur NAP-22 genannt). Nach der Identifizierung der Untereinheiten A und B

NAP-22 wurde bisher hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. In verschiedenen Zellen konnte aber auch ein Teil am Golgi-Apparat identifiziert werden (Iino und Maekawa, 1999). Um zu ermitteln, ob NAP-22 in CHO-Zellen bevorzugt im Golgi-Apparat vorliegt und damit Bestandteil des GICs ist, wurden Immunfluoreszenzen durchgeführt. Hierfür wurden Peptidantikörper gegen den C-Terminus („Caesar“) generiert und in der Immunfluoreszenz eingesetzt. Wie Abb. 9 zeigt, markieren die NAP-22-Antikörper (Caesar) einen Bereich, der mit der Anfärbung eines TGN38-Antikörpers übereinstimmt. Der TGN38-Antikörper wurde hier als Marker für den Golgi-Komplex verwendet. Die Kollokalisierung war auch nach zweistündiger Behandlung mit Cycloheximid noch vorhanden (Daten nicht gezeigt), so dass die Anfärbung des Golgi-Apparats nicht ausschließlich auf neusynthetisiertes Protein zurückzuführen ist, sondern einer *steady state* Lokalisation entspricht. Die Spezifität der Anfärbung wurde zum einen durch das Ausbleiben der Golgifärbung im Präimmunserum (Daten nicht gezeigt) und zum anderen durch die spezifische Inhibition des Golgisignals der NAP-22-Antikörper bei Vorinkubation mit dem zur Herstellung der Antikörper verwendeten Peptid gezeigt.

Für die Differenzierung zwischen frühem und spätem Golgi-Apparat, wurden CHO-Zellen mit Brefeldin A behandelt. Unter diesen Bedingungen bleibt das Signal für TGN38 größtenteils bestehen (Daten nicht gezeigt), aber NAP-22 zeigt jetzt keine Kollokalisierung mit dem durch TGN38 angefärbten TGN, sondern ähnelt dem durch einen PDI-Antikörper angefärbtem ER. Dies entspricht dem für Proteine des frühen Golgi-Apparats beschriebenen Verhalten. Damit verhält sich NAP-22 in CHO-Zellen wie die anderen GIC-Proteine Flotillin-1 und GAPR-1 (Gkantiragas et al., 2001; Eberle et al., 2002).

Der Unterschied zwischen NAP-22 und den übrigen GIC-Proteinen besteht folglich in der Tatsache, dass NAP-22 zwar in der Silberfärbung eine scheinbar stöchiometrische Komponente ist nicht aber in der Coomassiefärbung.

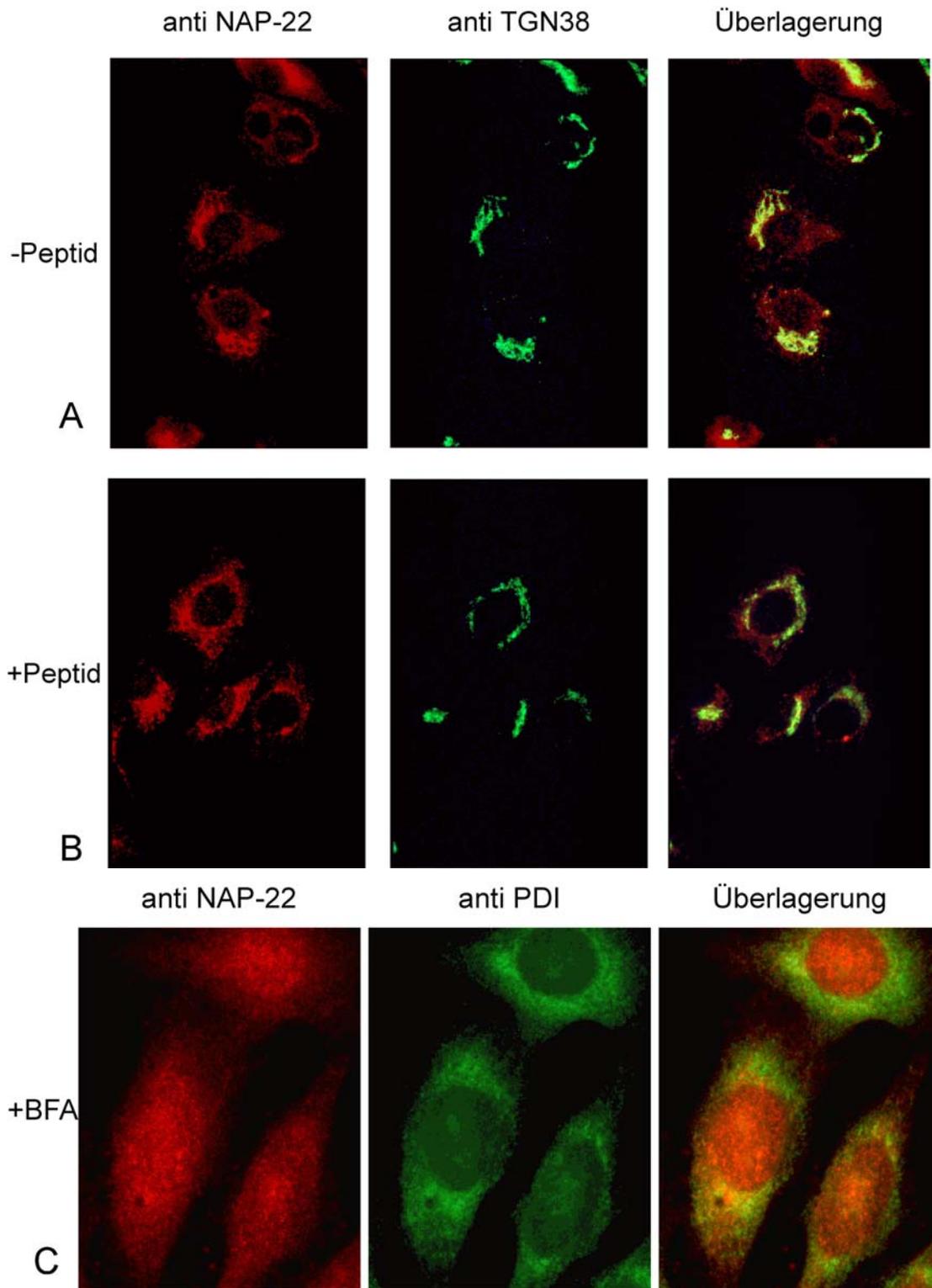


Abb. 9: Immunlokalisierung von NAP-22 im frühen Golgi-Apparat. Fixierte und permeabilisierte NRK-Zellen wurden mit folgenden Antisera in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. A: anti-Caesar ohne Caesar-Peptid, B: anti-Caesar plus Caesar-Peptid. Zur Kolokalisierung wurde anti-TGN38 (A und B) oder anti-PDI (C) verwendet. Die Immunfluoreszenzen in C wurden nach 15-minütiger Inkubation mit 5 μ M Brefeldin A durchgeführt. Die Bilder A und B wurden zunächst auf Diafilm fotografiert und dann digitalisiert, während die Bilder C mit einer Digitalkamera fotografiert wurden.

2 Die Rolle von Cholesterin im Intra-Golgi-Proteintransport

2.1 Inhibition des Intra-Golgi-Proteintransports durch M β CD

Die Protein- und Lipidzusammensetzung von detergentunlöslichen Komplexen aus Golgimembranen (Gkantiragas et al., 2001) könnte auf eine mögliche Funktion dieser Mikrodomänen hinweisen. Für die Proteine v-ATPase und heterotrimere G-Proteine wird eine Regulation des Intra-Golgi-Transports diskutiert (Palokangas et al., 1994; Helms et al., 1998; Palokangas et al., 1998). Auch für das Lipid Cholesterin wird eine Beteiligung bei unterschiedlichen intrazellulären Transportprozessen diskutiert (Rodal et al., 1999; Grimmer et al., 2000). Als Quintessenz könnte dies auf eine mögliche Funktion des Cholesterins bei der Regulation des Intra-Golgi-Proteintransports deuten.

Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurde ein zellfreier Intra-Golgi-Transportassay (Balch et al., 1983) als geeignetes Testsystem verwendet. Bei dem Intra-Golgi-Proteintransportassay werden isolierte Golgimembranen aus CHO-wt und aus einer CHO-Mutante, der das aktive Glykosylierungsenzym N-Acetylglukosamin-Transferase I fehlt, zusammen mit Zytosol, einem ATP-regenerierendem System und Tritium markiertem UDP-GlcNAc inkubiert. Die Mutanten-Zellen waren vor der Isolierung der Golgimembranen mit dem *vesicular stomatitis virus* (VSV) infiziert worden. In den Mutanten-Zellen kann das VSV G (Glykoprotein des VSV) Protein wegen der fehlenden Transferase nicht weiter modifiziert werden. Kommt es dahingegen im Transportassay zu Transportereignissen zwischen den zwei unterschiedlichen Golgimembranpräparationen, so kann das VSV G in wt-Golgimembranen weiter modifiziert werden, so dass der Einbau von radioaktivem GlcNAc als Maß für Transport gemessen werden kann. Bei diesem Transport handelt es sich um vesikulären COPI-vermittelten Transport (Orci et al., 1989).

Zur Untersuchung der Rolle von Cholesterin beim Intra-Golgi-Transport wird Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein häufig angewandtes Cholesterin extrahierendes Reagenz (Prydz und Simons, 2001). M β CD ist ein Makrozyklus, bestehend aus sieben partiell methylierten Glukose-Molekülen. Es konnte gezeigt werden, dass M β CD Cholesterin mit hoher Affinität aus biologischen Membranen extrahieren kann (Ohtani et al., 1989). α CD, bestehend aus nur sechs Glukosemolekülen, extrahiert hingegen Cholesterin mit einer mindestens 20fach geringeren Affinität als β CD. M β CD wird wegen seiner hohen Affinität zu Cholesterin bevorzugt zur Untersuchung von dessen Einfluss auf zelluläre Prozesse, wie z.B. Signaltransduktion und Transport verwendet.

Wird M β CD in den Intra-Golgi-Transportassay titriert, so ergibt sich eine Inhibition des Transports zu 90% bei 2 mM M β CD (Abb. 10). Dagegen zeigt α CD erst bei Konzentrationen über 1 mM einen inhibitorischen Effekt.

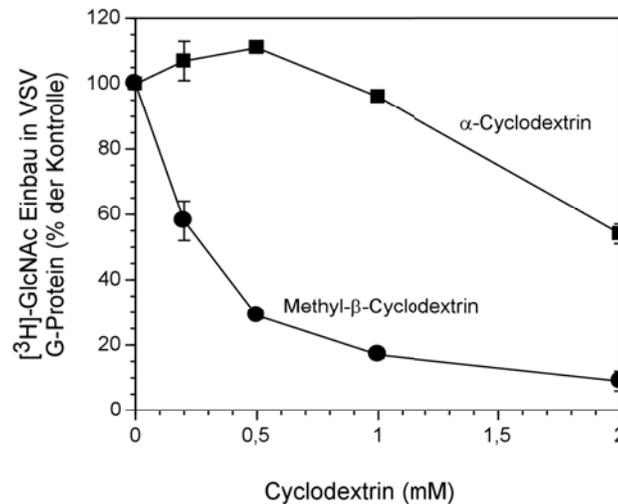


Abb. 10: Einfluss von M β CD und α CD auf den Intra-Golgi-Transport. Zunehmende Mengen α - (Quadrate) und M β CD (Kreise) wurden in einen Standard Intra-Golgi-Transportassay gegeben. Der Einbau von radioaktivem $^3\text{[H]GlcNAc}$ in das VSV G-Protein wurde, wie in Methoden beschrieben, gemessen.

2.2 Keine Inhibition der Glykosylierungsreaktion durch M β CD

Der Intra-Golgi-Transportassay lässt sich in zwei Schritte aufteilen. In der ersten Phase erfolgt der eigentliche Transport und in der zweiten Phase erfolgt die geschwindigkeitsbestimmende Glykosylierungsreaktion. Eine Hemmung des Signals im Transportassay kann deswegen sowohl auf einer Beeinflussung einer Transportreaktion, als auch auf einem Einfluss auf die Glykosylierung beruhen. Um hierin zu unterscheiden, wird M β CD in einem Glykosylierungsassay untersucht.

In dem Glykosylierungsassay (Taylor et al., 1994) werden aus CHO-wt-Zellen isolierte Golgimembranen verwendet. Die Zellen waren zuvor mit dem VSV infiziert worden und die Isolierung der Golgimembranen erfolgte zu einem Zeitpunkt, bei dem sich der Großteil des VSV Gs im Golgi-Apparat befand. Werden diese Membranen mit radioaktivem GlcNAc unter Bedingungen, die Intra-Golgi-Transport ausschließen, inkubiert, so kann mit diesem Testsystem der Einfluss auf die Glykosylierungsreaktion untersucht werden. Zur Inhibition der Intra-Golgi-Transportprozesse wird NEM verwendet (Block et al., 1988).

In Abb. 11 ist das Ergebnis zur Beeinflussung der Glykosylierung durch α CD und M β CD dargestellt. Weder α CD noch M β CD haben einen negativen Einfluss auf die

Glykosylierungsreaktion, so dass der Effekt von M β CD im Transportassay auf die Beeinflussung der Transportreaktion eingegrenzt werden kann.

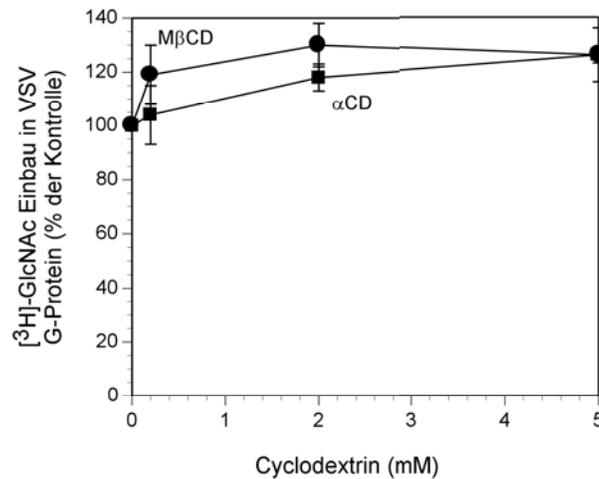


Abb. 11: Einfluss von α CD und M β CD auf die Glykosylierungsreaktion. Zunehmende Mengen α - (Quadrate) und M β CD (Kreise) wurden in einen Standard Glykosylierungsassay gegeben. CHO-wt Golgimembranen wurden aus mit VSV infizierten Zellen gewonnen und in Anwesenheit von 1 mM NEM zur Inhibition von Transportprozessen inkubiert. Der Einbau von radioaktivem 3 [H]GlcNAc in das VSV G-Protein wurde gemessen, wie unter Methoden beschrieben.

2.3 Spezifität der Inhibition des Intra-Golgi-Transports durch M β CD

Um zu prüfen, ob es sich bei der Inhibition durch M β CD um eine unspezifische Inhibition, wie z.B. durch ein Detergenz handelt, wird eine kinetische Messung der Hemmung durchgeführt. Ein solches Experiment ist in Abb. 12 dargestellt.

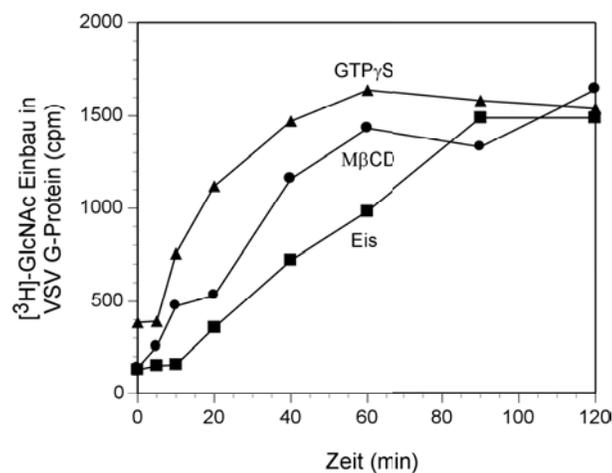


Abb. 12: M β CD ist ein spezifischer Inhibitor des Intra-Golgi-Transports. Vergleich der Kinetik der Inhibition durch Eis (Quadrate), GTP γ S (Dreiecke) und M β CD (Kreise). Zu den markierten Zeitpunkten wurden GTP γ S (50 μ M Endkonzentration) bzw. M β CD (2 mM Endkonzentration) in den Intra-Golgi-Transportassay gegeben. Die Inkubationszeit aller Proben betrug zwei Stunden. Der Fortschritt des Transports (ohne Inhibitor) wurde durch Transfer der Proben auf Eis bestimmt. Der Einbau von radioaktivem 3 [H]GlcNAc in das VSV G-Protein wurde gemessen, wie unter Methoden beschrieben. Dieses Experiment wurde von Dr. A. Porat durchgeführt.

Die Gesamtinkubationszeit aller Proben betrug hierbei immer zwei Stunden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proben entweder auf Eis gestellt und weiter inkubiert, oder es wurde der Inhibitor zugegeben und weiter bei normaler Assaytemperatur inkubiert. Die Kurve für die auf Eis gesetzten Proben stellt damit das minimal mögliche Signal dar. Ein unspezifisch wirkender Inhibitor, wie z.B. ein Detergenz, liefert eine identische Kurve, weil er sofort und komplett ab dem zugegebenen Zeitpunkt inhibiert. Eine nicht inhibierende Substanz liefert das maximale Signal unabhängig davon, wann die Substanz zugegeben wurde. Im Vergleich dazu liegt die Messkurve für GTP γ S über der Messkurve für die Inkubation auf Eis und nähert sich gegen Ende der Inkubation dem maximalen Signal an. Dies bedeutet, dass erstens diese Substanz inhibiert, und zweitens, dass jeweils zu einem gegebenen Zeitpunkt ein gewisser Anteil der Transportreaktion schon soweit abgelaufen ist, dass der inhibierte Schritt bereits passiert wurde. Dieser Anteil der Transportreaktion liefert deswegen ein Transportsignal, das über der Eiskurve liegt. Ein solches Verhalten wird in der Literatur mit dem Entstehen eines sogenannten *Resistant Transport Intermediate* beschrieben (Melancon et al., 1987).

Die Messkurve für M β CD liegt, wie auch für GTP γ S beschrieben, oberhalb der Kurve für die Inkubation auf Eis, so dass auch bei M β CD von einem spezifischen Transportinhibitor ausgegangen werden kann.

2.4 M β CD wirkt auf die Golgimembran und nicht auf einen zytosolischen Transportfaktor

Die inhibitorische Wirkung von M β CD durch die Extraktion von Cholesterin erlaubt zwei Vorhersagen. Zum einen sollte kein zytosolischer Faktor in seiner Funktion durch Extraktion gestört werden, und zum anderen sollten Golgimembranen nach Vorinkubation mit M β CD in einem sich anschließenden Intra-Golgi-Transportassay ähnlich wie in einem Standard Transportassay bei Zugabe von M β CD inhibiert sein. Diese Hypothesen wurden in zwei unterschiedlichen Experimenten überprüft.

Zunächst wurde Zytosol mit M β CD inkubiert und anschließend alle niedermolekularen Substanzen, zu denen auch M β CD gehört, mittels Gelfiltration entfernt. Wie in Abb. 13A dargestellt, zeigt solch ein Zytosol ein vergleichbares Transportsignal wie ein analog ohne M β CD behandeltes Zytosol. Im Gegensatz dazu inhibiert gelfiltriertes Zytosol, welches anschließend mit M β CD versetzt wird, den Intra-Golgi-Transport.

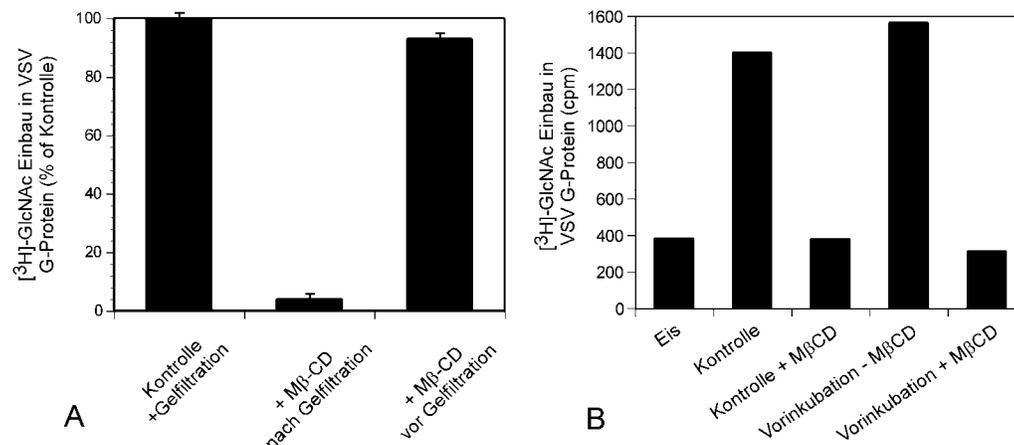


Abb. 13: MβCD wirkt auf eine Membrankomponente. **A** Rinderhirnzytosol wurde mit (rechts) und ohne (links und mitte) 1 mM MβCD eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend gefiltriert. Die so behandelten Zytosole wurden in Standard Transportassays eingesetzt (mitte + 1 mM MβCD). **B** Intra-Golgi-Transportassays werden in Vorinkubationen mit und ohne 3 mM MβCD 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (die 2 rechten Balken) und anschließend pelletiert. Die Golgimembranen wurden dann mit frischem Puffer, ATP regenerierendem System und Rattenhirnzytosol versetzt. Zur Kontrolle sind in den drei linken Balken die Ergebnisse aus Standard Transportassays bei Inkubation bei 0°C (Eis), bei 37°C (Kontrolle) und bei 37°C und Anwesenheit von 2 mM MβCD (Kontrolle + MβCD) gezeigt. In den Vorinkubationen wurde eine höhere MβCD-Konzentration aufgrund der kürzeren Inkubationszeit verwendet. Dieses Experiment wurde von Dr. A. Porat durchgeführt. Der Einbau von radioaktivem $^3\text{[H]GlcNAc}$ in das VSV G-Protein wurde wie unter Methoden beschrieben gemessen.

Zur Überprüfung der zweiten Hypothese wurde ein Zwei-Stufen-Transportassay durchgeführt. Nach einer ersten zehnmütigen Inkubation mit MβCD wurden die Membranen abzentrifugiert, und dann in der zweiten Inkubation wieder mit frischem Zytosol, Puffer etc. versetzt. Nach einer ersten Inkubation mit MβCD liefern die Membranen in der zweiten Inkubation kein Transportsignal mehr (Abb. 13B). Damit muss MβCD auf eine Membrankomponente wirken.

2.5 Inhibition des Fusionschritts des Intra-Golgi-Transportassays durch MβCD

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass MβCD ein spezifischer Inhibitor des Intra-Golgi-Transports ist. Der Intra-Golgi-Transport lässt sich aber in mehrere Einzelreaktionen zerlegen: das Abknospen der Vesikel, Tethering, Docking und Fusion. Zur Untersuchung welche Teilreaktion von MβCD betroffen ist, wurde bestimmt, ob MβCD auch dann hemmt, wenn Brefeldin A (BFA) anwesend ist. Unter der Wirkung von BFA wird die Transportreaktion auf eine Fusionsreaktion reduziert. Das Pilzgift BFA führt dazu, dass ARF in einem Komplex mit seinem ARF-GEF blockiert und deshalb der vesikuläre

COPI-Transport unterbunden wird (Helms und Rothman, 1992; Mansour et al., 1999; Peyroche et al., 1999). *In vivo* führt dies zu einer Fusion des Golgi-Apparats mit dem ER (Lippincott et al., 1989). *In vitro* führt dies zu einer Fusion der Zisternen des Golgi-Apparats untereinander (Elazar et al., 1994). Diese Fusion ist der Fusionsreaktion des vesikulären COPI-Transports bezüglich der beteiligten Proteinmaschinerie äquivalent.

In Anwesenheit von BFA zeigt M β CD immer noch eine effiziente Hemmung (Abb15). Dies deutet daraufhin, dass M β CD die Fusionsreaktion hemmt. Eine zusätzliche Beeinträchtigung anderer Teilreaktionen kann nicht ausgeschlossen werden.

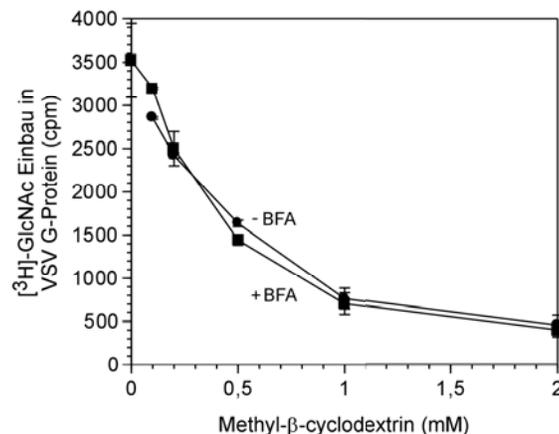


Abb. 14: M β CD hemmt den Intra-Golgi-Transport in Anwesenheit von Brefeldin A. Zunehmende Konzentrationen M β CD wurden in den Intra-Golgi-Transportassay in Anwesenheit (Kreise) oder Abwesenheit (Quadrate) von BFA (150 μM) titriert. Der Einbau von radioaktivem ^3H GlcNAc in das VSV G-Protein wurde wie unter Methoden beschrieben gemessen.

2.6 Extraktion von Cholesterin durch M β CD

M β CD wird häufig zur Extraktion von Cholesterin aus Membranen verwendet. Üblich sind Konzentrationen von 5 bis 20 mM. Im Transportassay werden bereits Effekte bei geringeren Konzentrationen deutlich. Deswegen wurde die Effizienz der Cholesterinextraktion aus isolierten Golgimembranen durch M β CD im Konzentrationsbereich zwischen 0.5 und 10 mM gemessen. Im Vergleich hierzu wurde zusätzlich die Cholesterinextraktion von α -CD bestimmt.

Der Cholesteringehalt wurde mittels ESI-MS/MS nach vorheriger Sulfatierung der freien Hydroxylgruppe bestimmt (Sandhoff et al., 1999). Die Ergebnisse sind in Abb. 15 zusammengefasst.

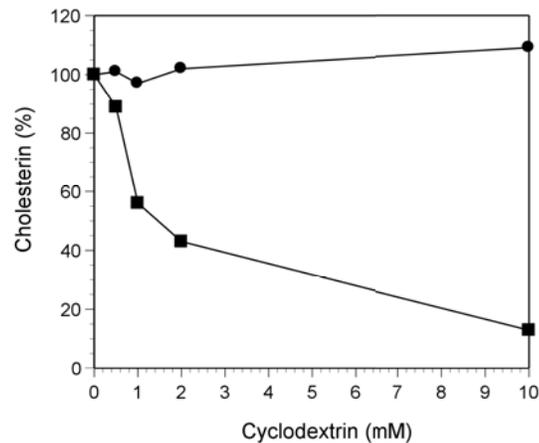


Abb. 15: Cholesterinbestimmungen nach Extraktion mit α - und M β CD. Golgimembranen wurden mit steigenden Konzentrationen α CD (Kreise) bzw. M β CD (Quadrate) für zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Nach 100.000 g Zentrifugation wurden die Membranen in 1,4-Dioxan aufgenommen, mit isotopenmarkiertem Cholesterinstandard versetzt, lyophilisiert und in wasserfreiem 1,4-Dioxan resuspendiert. Der Überstand wurde lyophilisiert und mittels SO₃-Pyridin sulfatiert. Der Cholesteringehalt wurde im ESI-MS/MS bestimmt.

Es wird deutlich, dass M β CD im Gegensatz zu α CD bereits bei einer Konzentration von 1 bis 2 mM Cholesterin extrahiert. Dies ist im Einklang mit den Daten zur Inhibition des Intra-Golgi-Transportassays durch M β CD und nicht durch α CD.

Das extrahierte Cholesterin konnte im Überstand nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass die bei geringen M β CD-Konzentrationen extrahierbare Cholesterinmenge abhängig von der Präparation der Golgimembranen ist. Die Extraktion bei 1 mM M β CD variierte zwischen verschiedenen Golgipräparationen und kann bis zu 65% betragen.

2.7 Aufhebung der Inhibition durch M β CD mittels Vorbeladung mit Cholesterin

Wenn M β CD Cholesterin extrahiert und der Intra-Golgi-Transport durch Cholesterinextraktion inhibiert wird, so wird eine Aufhebung der Inhibition nach Vorbeladung des M β CD mit Cholesterin erwartet. Um einen Zusammenhang zwischen dem Cholesteringehalt der Golgimembranen und der Aktivität des Intra-Golgi-Transports detaillierter zu untersuchen, wurde ermittelt, unter welchen Bedingungen der Cholesteringehalt der Golgimembranen in Anwesenheit von M β CD nicht verändert wird. Dazu wurden unterschiedliche Komplexe aus Cholesterin und M β CD hergestellt und mit Golgimembranen inkubiert. Anschließend wurde der Cholesteringehalt der Golgimembranen mittels ESI-MS/MS gemessen (Daten nicht gezeigt).

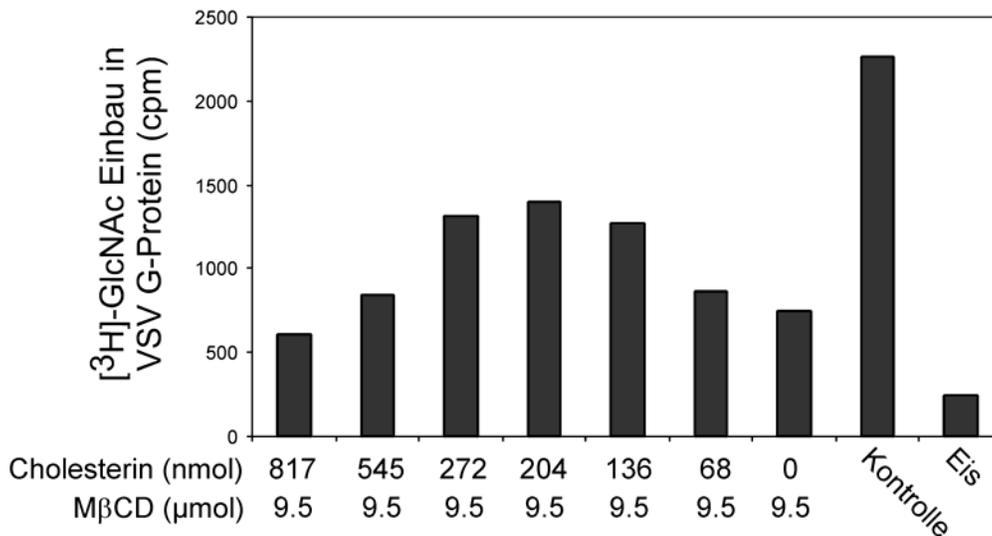


Abb. 16: Einfluss der MβCD-Cholesterin-Komplexe auf den Intra-Golgi-Transport. MβCD-Cholesterin-Komplexe wurden im 2-Stufen Transportassays eingesetzt. Die Membranen wurden zunächst 10 min bei Raumtemperatur mit MβCD-Cholesterin-Komplexen inkubiert und anschließend wie bei Abb. 13B beschrieben reisoliert und erneut in einem Transportassay eingesetzt. Die Mengenangaben für Cholesterin und MβCD geben die eingesetzten Mengen bei der Synthese der verwendeten Komplexe an. Dieses Experiment wurde von Dr. A. Porat durchgeführt.

Um sekundäre Effekte, die bei langen Inkubationen mit MβCD zu einer irreversiblen Hemmung des Transportassays führen könnten, auszuschließen, wurden die MβCD-Cholesterin-Komplexe nur in der ersten Stufe eines Zwei-Stufen Transportassays eingesetzt. Vorher wurde in einer Titrationsreihe an CHO-wt-Golgimembranen überprüft, dass bei der kürzeren Inkubationszeit ebenfalls Cholesterin extrahiert wird und durch entsprechende MβCD-Cholesterin-Komplexe Cholesterin der Membran zugeführt werden kann (Daten nicht gezeigt, siehe auch Kapitel III.2.10). Das Ergebnis in Abb. 16 zeigt, dass nur bei einem bestimmten Verhältnis von MβCD zu Cholesterin in den vorgeformten Komplexen eine Aufhebung der Transporthemmung beobachtet werden kann. Sobald der Cholesteringehalt erhöht oder gesenkt wird, bleibt die Hemmung bestehen. Eine vollständige Umkehr des inhibitorischen Effekts wird auch innerhalb der engen Grenzen, in denen der Cholesteringehalt nahezu dem Ausgangswert entspricht, nicht beobachtet.

2.8 Inhibition des Intra-Golgi-Transports durch Cholesterin-MβCD-Komplexe

Bei der Aufhebung der Inhibition des Intra-Golgi-Transportassays durch Verwendung von Cholesterin-MβCD-Komplexen wurde festgestellt, dass die Erhöhung des Cholesteringehalts der Golgimembranen ebenfalls zu einer Inhibition des Intra-Golgi-Transports führt (Abb. 16).

Genau wie für M β CD stellte sich die Frage, ob es sich bei M β CD-Cholesterin-Komplexen um einen spezifischen Effekt auf den Intra-Golgi-Transport handelte. Auch in diesem Fall wird die Frage mittels einer kinetischen Messung wie in Abschnitt III.2.3 beantwortet. Die in Abb. 17 dargelegte Messung zeigt auch für vorbeladenes M β CD höhere Werte als für die auf Eis weiterinkubierte Proben. Folglich handelt es sich bei vorbeladenem M β CD um einen spezifischen Transport Inhibitor, weil auch hier ein sogenanntes *Resistant Transport Intermediate* entsteht.

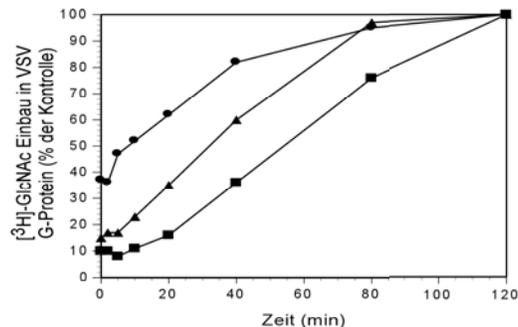


Abb. 17: M β CD-Cholesterin-Komplexe sind spezifische Inhibitoren des Intra-Golgi-Transports. Kinetik der Inhibition von M β CD (Kreise) im Vergleich zur Inhibition durch M β CD-Cholesterin (Dreiecke) und Eis (Quadrate). Zu den markierten Zeitpunkten wurden M β CD (2 mM Endkonzentration) bzw. M β CD-Cholesterin-Komplex (2 mM M β CD Endkonzentration) in den Intra-Golgi-Transportassay gegeben. Die Inkubationszeit aller Proben betrug zwei Stunden. Der Fortschritt des Transports (ohne Inhibitor) wurde durch Transfer der Proben auf Eis bestimmt. Der Einbau von radioaktivem ^3H GlcNAc in das VSV G-Protein wurde gemessen, wie unter Methoden beschrieben. Dieses Experiment wurde von Dr. A. Porat durchgeführt.

2.9 Einfluss der Cholesterinextraktion auf die Cholesterinpopulationen der *liquid ordered* und der *liquid disordered phase*

In Abschnitt III.2.6 wurde gezeigt, dass M β CD Cholesterin aus Golgimembranen extrahiert. Dies wirft die Frage auf, ob Cholesterin mit unterschiedlicher Präferenz aus der *liquid ordered* und der *liquid disordered phase* extrahiert wird. Zu diesem Zweck wurden die Golgimembranen nach der M β CD-vermittelten Extraktion mit Triton X-100 behandelt. Nach Trennung in detergenzlöslichen und -unlöslichen Anteil wird der Cholesteringehalt in beiden Phasen bestimmt. Das Ergebnis zeigt keine präferentielle Extraktion aus einer bestimmten Membranphase (Abb. 18). Dabei ist zu beachten, dass zur besseren Vergleichbarkeit mit den Transportassays die Extraktion für zwei Stunden durchgeführt wurde. Die Messung nach zwei Stunden bedingt einen möglichen Verlust kinetischer Information bezüglich einer möglichen schnellen Extraktion aus einer bestimmten Phase. Das Ergebnis könnte deshalb einen thermodynamischen Gleichgewichtszustand beschreiben.

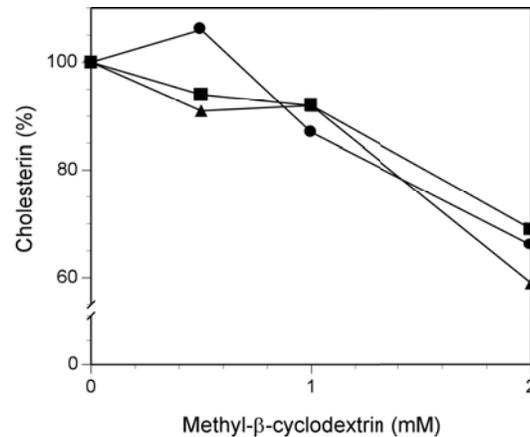


Abb. 18: Extraktion von Cholesterin aus der *liquid ordered* und der *liquid disordered phase*. Golgimembranen wurden mit zunehmenden Konzentrationen MβCD für zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen abzentrifugiert und in PEN- oder PEN-Puffer mit 1% TX-100 resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in dem Membranniederschlag der PEN-Puffer-Inkubation die Gesamtcholesterinmenge (Quadrate), im Niederschlag der PEN-Puffer + TX-100-Inkubation der Cholesteringehalt der *liquid ordered* (Dreiecke) und im entsprechenden Detergenzüberstand der Cholesteringehalt der *liquid disordered phase* (Kreise) bestimmt. Die Cholesterinbestimmung erfolgte wie bei Abb. 15 und in den Methoden beschrieben.

2.10 Verhalten des Lipidhaushalts bei erhöhter Cholesterinkonzentrationen

Nachdem im vorherigen Abschnitt der Frage nach der Extraktion von Cholesterin aus den unterschiedlichen Membranphasen nachgegangen wurde, wird nun das Verhalten von zusätzlich exogen zugegebenem Cholesterin bezüglich seiner Beteiligung an der *liquid ordered* oder der *liquid disordered phase* bestimmt. Cholesterin wurde in Form von Cholesterin-MβCD-Komplexen zu Golgimembranen gegeben (siehe Abb. 24). Anschließend wurde der Cholesteringehalt entweder in der Gesamtfraktion oder in detergenzlöslicher und unlöslicher Fraktionen der Membran massenspektrometrisch bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 19A wiedergegeben. Überraschenderweise konnte durch Zugabe des Cholesterins die Gesamtcholesterinmenge ca. verfünffacht werden. Davon ist der größere Teil detergenzunlöslich und befindet sich in der Mikrodomänenfraktion.

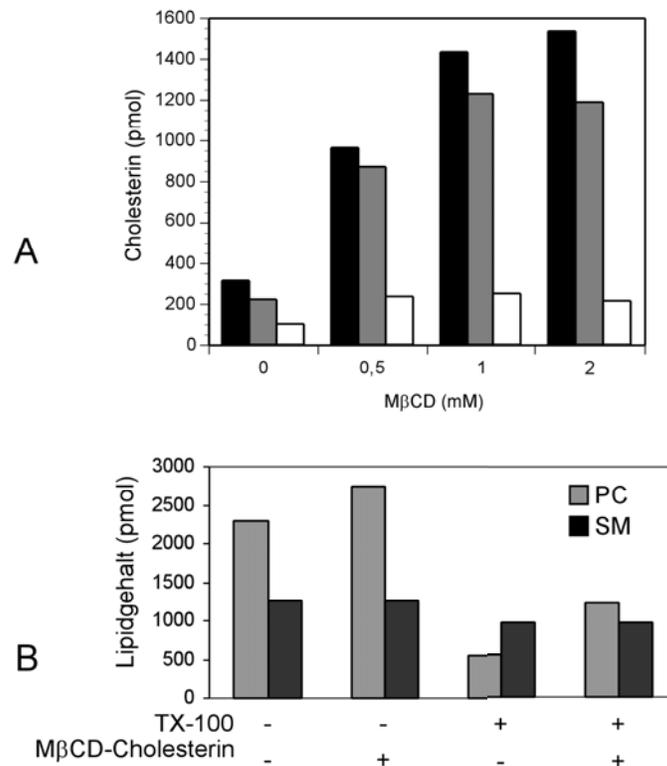


Abb. 19: Lipidverhalten nach Cholesterinaddition. **A** Cholesterinverteilung nach Zugabe von Cholesterin zu Golgimembranen. Golgimembranen wurden mit zunehmenden Konzentrationen MβCD-Cholesterin-Komplexen für zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Der Gesamtcholesteringehalt (schwarze Balken), der Cholesteringehalt in der detergentunlöslichen Fraktion (graue Balken) und in der detergentlöslichen Fraktion (weiße Balken) wurde, wie bei Abb. 16 beschrieben, gemessen. **B** Sphingomyelin- und PC-Verteilung nach Cholesterinzugabe zu Golgimembranen. Aliquots der Fraktionen wie in Abb. 19A (ohne detergentunlösliche Fraktion) wurden nicht zur Cholesterinbestimmung verwendet, sondern nach einer sauren Lipidextraktion nach Bligh und Dyer wurden SM und PC im ESI-MS/MS bestimmt. Die PC- und SM-Bestimmungen wurden freundlicherweise von Dr. B. Brügger durchgeführt.

Wegen dem proportional hohen Cholesterinanstieg in der *liquid ordered phase* wurde bestimmt, wie andere Lipide sich unter diesen Bedingungen verhalten. Deswegen wurde bei hohem Cholesteringehalt die Verteilung von Sphingomyelin und PC massenspektrometrisch bestimmt. Im Unterschied zu Abb. 19A können wegen des hohen Triton X-100-Gehalts in Abb. 19B keine Werte für die *liquid disordered phase* angegeben werden, da das Triton X-100 diese Art der Messung stört.

Die Cholesterinaddition führt zu einem Anstieg des PC-Gehalts in der detergentunlöslichen Phase, während der Sphingomyelingeht unbeeinflusst und unverändert zum großen Teil in der detergentunlöslichen Phase bleibt. Wie erwartet findet sich in der detergentunlöslichen Fraktion bevorzugt PC mit gesättigten Fettsäuren an (Daten nicht gezeigt).

2.11 Verhalten von Raftproteinen im Golgi-Apparat bei Veränderungen des Cholesteringehalts

Verschiedene Erklärungsansätze sind denkbar, wie kleine Veränderungen des Cholesteringehalts der Golgimembranen einen Einfluss auf den Intra-Golgi-Transport haben könnten. Ein Einfluss der veränderten Membranrigidität oder -krümmung ist eine Möglichkeit. Es konnte aber kein Effekt von M β CD auf das Abknospen von COPI-Vesikeln gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Eine Alternative ist die Beeinflussung der Funktion von Proteinen, die am Intra-Golgi-Transport beteiligt sind.

Aus diesem Grund wurde das Verhältnis von detergentunlöslichen und -löslichen GIC-Proteinen nach Cholesterinextraktion und -addition untersucht (Abb. 20). Nach den Berichten über SNAREs in Rafts (Lafont et al., 1999) wurden zusätzlich die für den Intra-Golgi-Transport verantwortlichen v- (GOS28) und t-SNAREs (Syntaxin 5) in die Untersuchung aufgenommen.

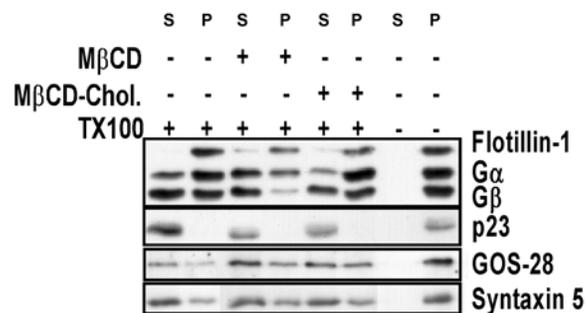


Abb. 20: Detergenzlösliche und -unlösliche Fraktion ausgewählter Golgi-Proteine nach Extraktion und Addition von Cholesterin. Golgimembranen wurden zwei Stunden bei 30°C ohne oder mit 2 mM M β CD bzw. 2 mM M β CD-Cholesterin-Komplexen inkubiert. Die Membranen wurden zentrifugiert, anschließend in PEN bzw. PEN + 1% TX-100 resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden Niederschlag (P) und Überstand (S) Chloroform/Methanol gefällt und die Proteine mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Wie in Abb. 20 dargestellt, zeigen die einzelnen GIC-Proteine und SNAREs eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Extraktion und Addition von Cholesterin. Flotillin-1 und die Untereinheit B der v-ATPase zeigen genau wie das zur Kontrolle untersuchte p23 keine Beeinflussung durch Variationen des Cholesteringehalts. p23 steht hier repräsentativ für alle raftunabhängigen Proteine. Ebenso zeigen die beiden SNAREs keine deutliche Sensitivität auf veränderte Cholesterinkonzentrationen unter den betrachteten Bedingungen. Von diesen Proteinen unterscheidet sich das Verhalten von G α und insbesondere G β . Diese beiden Proteine zeigen eindeutig ein Cholesterin sensitives Solubilisierungsverhalten. Wird Cholesterin extrahiert, so wird ein größerer Anteil von Triton X-100 solubilisiert als unter Kontrollbedingungen. Insbesondere umgekehrt führt

Addition von Cholesterin zu einem höheren Anteil detergentunlöslichen Proteins als unter Kontrollbedingungen.

2.12 Einfluss der Cholesterinaddition auf die Struktur des Golgi-Apparats

Durch Zugabe von Cholesterin zu Golgimembranen wird der Intra-Golgi-Proteintransport gehemmt (Abschnitt III.2.8). Damit einhergehend wird der Anteil von Mikrodomänen in den Membranen vergrößert (Abschnitt III.2.10) und der Anteil von $G\alpha$ und $G\beta$ in der Mikrodomänenfraktion nimmt ebenfalls zu (Abschnitt III.2.11). Heterotrimeren G-Proteinen am Golgi-Apparat wird u.a. eine Rolle beim Intra-Golgi-Transport (Helms, 1995; Helms et al., 1998) und bei der Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur (Jamora et al., 1997; Yamaguchi et al., 1997; Jamora et al., 1999) zugeschrieben. Deswegen wurde untersucht, ob Cholesterindepletion oder -addition eine Veränderung der Golgi-Struktur zur Folge hat. Zu diesem Zweck wurde mittels M β CD Cholesterin zu Zellen gegeben oder extrahiert und die Golgi-Struktur anhand etablierter Golgiproteine in der Immunfluoreszenz überprüft (Abb. 21).

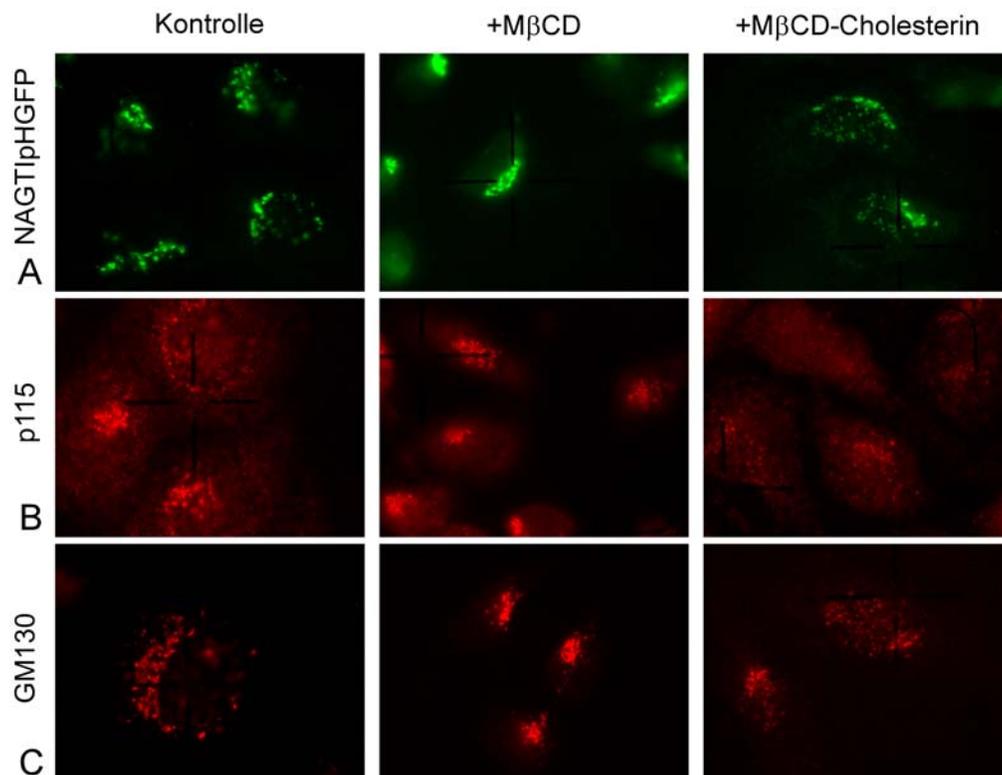


Abb. 21: *In vivo* Effekt von M β CD-Cholesterin-Komplexen. NAGTI-pH-GFP-CHO-Zellen (A) bzw. CHO-Zellen (B und C) wurden 30 min mit 10 mM M β CD, 10 mM M β CD-Cholesterin-Komplexen oder nur mit HEPES-Medium behandelt (Kontrolle). Mittels Antikörpern gegen p115 (B) und GM130 (C) und indirekter Immunfluoreszenz bzw. direkter Fluoreszenz für NAGTI-pH-GFP (A) wurde die Golgi-Struktur analysiert.

Deutlich sind die Unterschiede in der Golgi-Struktur nach Addition von Cholesterin zu erkennen. Sowohl GM130, als auch p115 (Seemann et al., 2000) und ein GlcNAc-Transferase I-GFP-Konstrukt (Shima et al., 1997) zeigen eine vesikulierte Golgi-Struktur.

IV Diskussion

1 Die v-ATPase als Bestandteil des GIC

Es konnten die zwei noch unidentifizierten Proteine des GIC identifiziert werden. Es handelt sich um die Untereinheiten A und B der vakuolären H^+ -ATPase. Damit sind insgesamt vier Untereinheiten der V1-Domäne der v-ATPase im GIC enthalten. Die v-ATPase stellt folglich die Hauptkomponente des GICs dar. Interessanterweise finden sich nur Untereinheiten der V1-Domäne im GIC wieder. Wie die Proteine ohne die V0-Domäne an der Membran gehalten werden, ob durch Protein-Protein-Wechselwirkungen oder durch Lipidanker, ist unbekannt. Welche Eigenschaften zur Lokalisation dieser Proteine in Rafts führt, ist ebenfalls ungeklärt. Die Untereinheit B und mittlerweile auch die Untereinheit A sind auch von anderen Gruppen in Mikrodomänen gefunden worden (Mineo und Anderson, 1996; Dermine et al., 2001).

Für die Regulation der v-ATPase existieren basierend auf unterschiedlichen experimentellen Beobachtungen verschiedene Modelle (zusammengefasst in (Nishi und Forgac, 2002)). Die Aktivität kann durch reversible Bildung einer Disulfidbindung in der Untereinheit A reguliert werden. Es kann zur Variation in der Kopplungseffizienz zwischen ATP-Hydrolyse und Protonentranslokation kommen, oder zu einer Änderung der Leitfähigkeit der Membran. Das kann entweder die Protonenleitfähigkeit oder die Leitfähigkeit für andere Ionen wie z.B. Chlorid betreffen. Während im Golgi-Apparat die Leitfähigkeit von Chlorid entgegen ersten Annahmen keinen Einfluss auf den pH-Wert zu haben scheint (Wu et al., 2001), spielt wahrscheinlich die Aktivität eines Zn^{2+} -sensitiven Protonenkanals eine Rolle bei der Kontrolle des luminalen pH-Werts (Schapiro und Grinstein, 2000). Auch eine Dissoziation von V1- und V0-Domäne wird als Mechanismus zur Regulation der Aktivität der v-ATPase diskutiert (Kane, 1995). Eine Segregation von V1- und V0-Domäne durch bevorzugte Raftassoziation der V1-Domäne könnte ein neuer Mechanismus zur Kontrolle von Dissoziation und Assoziation der Domänen und damit zur Regulation der v-ATPase sein. Für eine Regulation der Aktivität müsste die Raftassoziation ein dynamischer Prozess sein, der die regulierte Verbindung der beiden Domänen erlaubt. Wie jedoch dieser Prozess vermittelt werden könnte, ob durch Interaktionen mit anderen GIC-Proteinen oder durch Wechselwirkungen mit der spezifischen Lipidumgebung der *liquid ordered phase*, ist unbekannt. Auch die Frage, in welcher Membranphase sich die V0-Domäne befindet, bedarf

einer näheren Untersuchung, insbesondere weil die V1-Domäne sich zum großen Teil in der *liquid ordered phase* befindet.

Kürzlich wurde die Beteiligung der V0-Domäne an der Fusion von Membranen beschrieben (Peters et al., 2001; Müller et al., 2002). Das Proteolipid der V0-Domäne soll dabei in Vesikeln vorhanden sein und durch Paarung mit einer einzelnen V0-Domäne in der Zielmembran einen Kanal bilden, der nach der SNARE-Paarung den letzten Schritt in der Fusion katalysiert. Dieser Mechanismus kann nur unter der Prämisse der Trennung der beiden Domänen der v-ATPase funktionieren. Diese Trennung könnte durch Rafts verursacht sein, denn die Untereinheit B als Repräsentant der V1-Domäne wird aus COPI-Vesikeln segregiert. Dagegen spricht, dass das Proteolipid indirekt mit Rafts in Verbindung gebracht wird. Es gelang der Nachweis, dass das Proteolipid der V0-Domäne Cholesterin bindet (Thiele et al., 1999). Da Cholesterin in Rafts angereichert ist, könnte sich auch das Proteolipid dort befinden. Ein direkter Beweis hierfür fehlt jedoch. Darüber hinaus ist die These einer Beteiligung der V0-Domäne an der Fusion nicht konsistent mit existierenden Daten. *In vitro* wurde gezeigt, dass SNAREs bereits ausreichen, um Fusion zu vermitteln (Weber et al., 1998; Nickel et al., 1999; Parlati et al., 1999). So stellt sich die Frage, welche Funktion die V0-Domäne bei der Fusion erfüllen sollte. Zusätzlich erfolgt keine Fragmentierung der Vakuole, wie sie z.B. bei Mutation von SNAREs (VAM3) beobachtet wird, wenn die Gene des Proteolipids entfernt werden (Umemoto et al., 1990; Wada et al., 1992).

Die Beteiligung der V0-Domäne an der Fusion ist eine Möglichkeit der Beteiligung der v-ATPase an intrazellulären Transportprozessen, die unabhängig von ihrer H⁺-Pumpaktivität ist. Die Bedeutung der aktiven v-ATPase bei der Proteinsortierung und -sekretion im intrazellulären Transport ist eine alternative Möglichkeit. Es existieren widersprüchliche Untersuchungen bezüglich des Mechanismus und der genauen Lokalisation der Transportbeeinflussung. In einigen Untersuchungen hat Bafilomycin A1 keinen Effekt auf die EndoH Resistenz von sekretorischen Proteinen (Yilla et al., 1993; Palokangas et al., 1994). Für den Transport vom TGN zur Plasmamembran wurde ebenfalls kein Effekt von Bafilomycin A1 gefunden. Dies konnte zeitgleich mit dem Erscheinen der Untersuchungen von Palokangas et al. (1998) gezeigt werden (Abb. 7). In einer anderen Arbeit wurde der strukturell dem Bafilomycin verwandte v-ATPase Inhibitor Folimycin eingesetzt (Muroi et al., 1993) und das Erreichen der EndoH Resistenz von sekretorischen Proteinen verhindert. Damit übereinstimmend ist die Inhibition des Transports von VSV G im Golgi-Apparat vor dem Erreichen des TGN (Abb. 7). Welcher Mechanismus hinter dieser

Transportbeeinflussung steht, ist nicht bekannt. Grundsätzlich sind zwei Möglichkeiten denkbar. Entweder ist das generierte elektrochemische Potential oder der pH-Gradient notwendig für bestimmte Transportreaktionen. Es sind Beispiele in der Zelle bekannt, wo entweder das elektrochemische Potential, z.B. bei der Aufnahme von Glutamat in synaptische Vesikel, oder der pH-Wert, z.B. bei der Aufnahme von Noradrenalin in synaptische Vesikel, ausschlaggebend für einen Prozess ist (Stevens und Forgac, 1997).

Interessant ist, dass nur diejenigen Transportwege Bafilomycin A1 sensitiv sind, die in Richtung der Kompartimente mit niedrigerem pH-Wert ablaufen (ER zum TGN und Endosomen zu Lysosomen (van Deurs et al., 1996)). Es könnte sich um einen generellen Mechanismus zur Festlegung der Richtung ausgewählter Transportwege handeln. Dies würde bedeuten, dass keiner der bekannten Transportreaktionen an sich pH-abhängig ist, und würde so eine Erklärung dafür liefern, warum Bafilomycin A1 keinen Effekt im Intra-Golgi-Transportassay zeigt (Daten nicht gezeigt). Im Unterschied dazu konnte für bestimmte Einzelreaktionen an anderen Kompartimenten eine solche pH-Abhängigkeit demonstriert werden. Hierzu zählt das Abknospen von Vesikeln von Endosomen (Gu und Gruenberg, 2000) und die Bildung des trans-SNARE-Komplexes bei der Fusion von Vakuolen in Hefe (Ungermann et al., 1999). Ob es sich allerdings hierbei um generelle Mechanismen, oder nur um Sonderfälle handelt, bleibt offen. Interessanterweise wird gerade für die erwähnten Bafilomycin A1 sensitiven Transportrouten auch eine Beteiligung von Rafts diskutiert (Kobayashi et al., 1998). Ob es sich hierbei um Zufall handelt, oder ob eventuell Rafts ursächlich für die pH-Abhängigkeit eines Transportweges sind, ist bisher nicht untersucht worden.

Welcher Mechanismus hinter der Beeinflussung des Proteintransports im frühen sekretorischen Weg durch Hemmung der v-ATPase steht, ist unbekannt. In diesem Zusammenhang ist es aber interessant, über eine Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen und dem KDEL-Rezeptor zu spekulieren. Der KDEL-Rezeptor bindet sein Substrat mit einer höheren Affinität bei dem niedrigeren pH-Wert im Golgi-Apparat als bei dem höheren pH-Wert im ER. So kann der KDEL-Rezeptor aus dem ER entwichene KDEL-Proteine zum ER zurückbringen (Wilson et al., 1993). Der KDEL-Rezeptor ist das bis dato einzige bekannte Protein im Golgi-Apparat mit sieben Transmembrandomänen und erinnert an die klassischen heptahelikalen G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Durch Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine im GIC könnte der KDEL-Rezeptor die v-ATPase regulieren und so die Affinität für seinen Liganden kontrollieren. Für die

Regulation der v-ATPase durch heterotrimere G-Proteine existieren Beispiele in der Literatur (Codina et al., 1999).

2 NAP-22 ist Bestandteil des GIC

NAP-22 konnte als weiterer Bestandteil des GIC identifiziert werden. Im Coomassie gefärbtem SDS-Gel erscheint NAP-22 nicht. Andererseits ist NAP-22 in der Silberfärbung eine der prominentesten Banden. Eine Erklärungsmöglichkeit besteht in einem abnormen Anfärbeverhalten mit Coomassie. Die ungewöhnlichen Eigenschaften von NAP-22, wie das Laufverhalten in der SDS-PAGE, der niedrigen pI und die ungewöhnliche Aminosäurezusammensetzung (kein R, C, H, I, M, F und W), könnten Grund für ein abnormales Färbeverhalten sein. Bei NAP-22 wird es sich nicht um ein essentielles Mitglied des GIC handeln, da es nur in ausgewählten Geweben exprimiert wird (Hirn, Thymus, Milz, Niere und Testis) (Mosevitsky et al., 1997). Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass die exprimierten Mengen unter den gewählten Bedingungen unterhalb der Detektionsgrenze lagen. NAP-22 wird insbesondere in den Neuronen im Hirngewebe gefunden und lokalisiert dort in den Wachstumsspitzen. Die Rolle des NAP-22 bei der Regulation des Wachstums an den Nervenenden wurde mittels transgener Mäuse demonstriert (Frey et al., 2000). In diesen Mäusen fehlt die natürliche Abnahme der Expression von NAP-22 nach der Geburt und führt z.B. in Motoneuronen zu einer vermehrten Verzweigung an der neuromuskulären Verbindung. In Neuronen wird NAP-22 zusammen mit GAP-43, mit dem es auch Charakteristika wie das ungewöhnliche Laufverhalten in SDS-PAGE, die Säurelöslichkeit und die Lokalisation in Rafts (Maekawa et al., 1997) teilt, gefunden. Analoge Experimente mit transgenen GAP-43 Mäusen zeigen ebenfalls eine Regulation des Nervenwachstums. Im Fall der Motoneuronen unterscheiden sich die Anzahl und Länge der Verzweigungen an den neuromuskulären Verbindungen. Dies deutet auf eine in gewissem Maße redundante Funktion hin. Darüber hinaus existiert eine 27%ige Identität und eine 43%ige Homologie zwischen GAP43 und NAP-22. Für GAP43 wird eine Aktivierung von $G\alpha$ der heterotrimeren G-Proteine diskutiert (Strittmater et al., 1990; Strittmater et al., 1991). Im GIC werden ebenfalls heterotrimere G-Proteine gefunden. Wie diese G-Proteine aktiviert werden, ist bisher nicht geklärt. Diese Funktion könnte daher in CHO-Zellen von NAP-22 übernommen werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass NAP-22 auf synaptischen Vesikeln in Neuronen gefunden wurde, so dass eine Beteiligung bei der Regulation des Transports synaptischer Vesikel möglich wäre. Der Mechanismus einer

solchen Beteiligung ist jedoch nicht bekannt. Für heterotrimere G-Proteine am Golgi-Apparat wurde eine Rolle bei der Regulation des vesikulären Intra-Golgi-Transports gezeigt. So könnte die NAP-22-vermittelte Aktivierung von heterotrimeren G-Protein am Golgi-Apparat ein möglicher Mechanismus für eine Involvierung am vesikulären Proteintransport im sekretorischen Weg darstellen.

Die Lokalisation von NAP-22 an Membranen und in Rafts wurde genauer untersucht (Maekawa et al., 1999). Bisher konnte NAP-22 nur an Membranen gebunden und nicht frei im Zytosol nachgewiesen werden. Für die Bindung an Membranen wird zum einen die N-terminale Myristoylierung verantwortlich gemacht (Maekawa et al., 1994). Zum anderen verfügt NAP-22 trotz seines vorwiegend sauren Charakters über einen Bereich mit positiv geladenen Aminosäuren, über den ähnlich wie bei den MARCKS-Proteinen eine Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran erfolgen könnte. Daneben scheint Cholesterin eine wichtige Funktion für die Membranbindung von NAP-22 zu übernehmen, denn NAP-22 kann nur an Liposomen binden, die Cholesterin enthalten (Maekawa et al., 1999). Die Bindung ist der vorhandenen Menge Cholesterin direkt proportional. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss von NAP-22 auf die Raftstabilität untersucht (Epanand et al., 2001). Interessanterweise zeigt NAP-22 bei Zugabe zu Liposomen mit einer Lipidmischung, die nur eine geringe Tendenz haben, Rafts zu bilden, eine Stabilisierung der *liquid ordered phase*. Dies könnte eine weitere mögliche Funktion für NAP-22 im GIC sein.

3 Die Rolle von Cholesterin im Intra-Golgi-Proteintransport

Cholesterin-Gleichgewicht in Golgimembranen

Der Cholesteringehalt von Membranen variiert zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten. Über die Organellen des sekretorischen Wegs erstreckt sich ein Gradient mit der höchsten Cholesterinkonzentration in der Plasmamembran. Ein hoher Cholesteringehalt führt zu einer höheren Packungsdichte der Lipide und so zu einer dickeren Membran und einer veränderten Fluidität. Solche Veränderungen haben Konsequenzen. So wird z.B. diskutiert, ob die unterschiedliche Länge der Transmembrandomänen von Proteinen ein Sortierungsmechanismus darstellt. Wie die inhomogene Cholesterinverteilung in der Zelle aufrechtgehalten und reguliert wird, ist unbekannt. Für den intrazellulären Cholesterinfluss werden sowohl ein Transport mittels Proteinen (Caveolin-1 und *sterol carrier protein-2*) als auch vesikulärer Transport

diskutiert. Auch im Golgi-Apparat existiert eine inhomogene Verteilung mit einem Gradienten von der cis- zur trans-Seite. Vesikulärer Transport scheint für die Kontrolle des Cholesteringehalts eine untergeordnete Rolle zu spielen, weil Cholesterin aus den COPI-Vesikel segregiert wird (Brügger et al., 2000). Wofür das Cholesterin im Golgi-Apparat benötigt wird, ist bisher nicht geklärt. Es ist jedoch angereichert in Mikrodomänen, den GICs.

Cholesterin ist notwendig für den Intra-Golgi-Transport

Es wurde sowohl die Hemmung des Intra-Golgi-Proteintransports als auch die Extraktion von Cholesterin durch M β CD gezeigt. Dass die Cholesterindepletion die Ursache für die Inhibition ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch mehrere unabhängige Experimente gezeigt.

- α CD hat eine geringere Affinität zu Cholesterin und hemmt den Intra-Golgi-Transport erst bei zehnfach höheren Konzentrationen als M β CD. Die beobachtete Hemmung durch α CD korreliert nicht mit dem gemessenen Extraktionsverhalten. In einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mM α CD wird kein Cholesterin extrahiert, aber bereits bei 2 mM wird eine 50%ige Inhibition des Transports beobachtet. Hier könnten cholesterinunabhängige Effekte für eine Hemmung des Transportassays verantwortlich sein.
- Neben α CD wurde auch Filipin im Intra-Golgi-Transportassay eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Bei Filipin handelt es sich um ein Cholesterin-bindendes Reagenz. Auch die Zugabe von Filipin führt zu einer Inhibition des Intra-Golgi-Transports und untermauert so den Zusammenhang von Cholesterindepletion und Inhibition des Assays.
- Die Experimente mit Cholesterin-M β CD-Komplexen in Abb. 16 zeigen, dass es Cholesterin-M β CD-Komplexe gibt, die den Cholesteringehalt von Golgimembranen nicht verändern. Diese Bedingungen führen zu einer, wenigstens partiellen, Aufhebung der M β CD-vermittelten Inhibition des Intra-Golgi-Transports. Warum es nur zu einer partiellen Aufhebung kommt, kann vielerlei Gründe haben. Der Gesamtcholesteringehalt der Golgimembranen bleibt zwar durch die Cholesterin-M β CD-Komplexe unbeeinflusst, aber Abb. 18 und 19 zeigen, dass Cholesterin zwar sowohl aus der *liquid ordered* und der *liquid disordered phase* extrahiert wird, präferentiell jedoch in die *liquid ordered phase* eingebaut wird. Diese Verschiebung könnte der Grund für eine partielle Aufhebung der Inhibition sein.

Inhibition der Fusion

Die Extraktion von Cholesterin durch M β CD inhibiert den Intra-Golgi-Proteintransport. Durch Verwendung von Brefeldin A konnte gezeigt werden, dass M β CD die Fusionsreaktion inhibiert. Dieser Hemmung könnten verschiedene Mechanismen zu Grunde liegen:

- Cholesterin könnte die Fusionsmaschinerie durch Beeinflussung der Membranfluidität regulieren. Eine Extraktion von Cholesterin erhöht die Membranfluidität, womit die Deformation der Membran, wie sie bei der Fusion erfolgt, eher erleichtert als erschwert werden sollte. Darüber hinaus funktioniert die SNARE vermittelte Fusion von Liposomen auch in der Abwesenheit von Cholesterin (Weber et al., 1998). Solch ein genereller Mechanismus sollte neben der Fusion auch das Abknospen von COPI-Vesikeln beeinflussen. In einem zellfreien System konnte jedoch demonstriert werden, dass M β CD keinen Einfluss auf die Generierung von COPI-Vesikeln hat. Dies steht im Gegensatz zu Clathrin-umhüllten Vesikeln, bei denen solch eine Beeinflussung beschrieben wurde (Rodal et al., 1999).
- Cholesterin kann für die enzymatische Aktivität von Proteinen, die am Intra-Golgi-Transport beteiligt sind, notwendig sein. An der Plasmamembran führt eine Extraktion von Cholesterin zu einer Inhibition der regulierten Sekretion. Für diese Inhibition wird die homogenere Verteilung von SNAREs aufgrund der Cholesterindepletion verantwortlich gemacht (Lafont et al., 1999; Chamberlain et al., 2001; Lang et al., 2001). Ursache dieser inhomogenen Verteilung der SNAREs sind unterschiedliche Membranphasen, auf die im nächsten Punkt eingegangen werden. Für andere am Intra-Golgi-Transport beteiligten Proteine existieren keine Hinweise auf eine Beeinflussung ihrer Aktivität durch Cholesterin.
- In Anwesenheit von Lipiden mit einer relativ hohen Schmelztemperatur kann Cholesterin die *liquid ordered phase* stabilisieren. Mehrere Untersuchungen konnten die Koexistenz von *liquid ordered* und *disordered phase* demonstrieren. Die Existenz dieser Membranphase im Golgi-Apparat und die Identifizierung der darin angereicherten Proteine gelang kürzlich (Gkantiragas et al., 2001). Die Relevanz dieser Mikrodomänen bzw. der *liquid ordered phase* für den Intra-Golgi-Transport wird im folgenden diskutiert.

Cholesterinextraktion aus verschiedenen Membranphasen

Die Extraktion von Cholesterin durch M β CD wird in vielen Arbeiten angewandt. Dagegen blieb bisher die Frage unbeantwortet, aus welcher Phase das Cholesterin extrahiert wird. Dieser Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen, und das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt. In dem betrachteten Zeitraum von zwei Stunden wird sowohl aus *liquid ordered* als auch aus der *liquid disordered phase* prozentual gesehen gleiche Mengen Cholesterin extrahiert. Da der Anteil des Cholesterins in der *liquid ordered phase* größer ist (ca. 60% des Gesamtcholesterins) wird absolut gesehen auch mehr aus der *liquid ordered phase* extrahiert. In dieser Arbeit wurde das Extraktionsverhalten bei kleinen M β CD-Konzentrationen (1-2 mM) bestimmt, da in diesem Bereich die Inhibition im Intra-Golgi-Transportassay eintrat.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass sich das Verhältnis der Extraktion aus *liquid ordered* und *liquid disordered phase* ändert, sobald mit höheren M β CD-Konzentrationen mehr Cholesterin extrahiert wird. Für die Extraktion wurden wie im Intra-Golgi-Transportassay ein Zeitraum von zwei Stunden gewählt. Eine präferentielle Extraktion aus einer Phase kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Es existiert sogar ein Hinweis auf unterschiedliche Extraktion, denn die Extraktion von Cholesterin aus der Plasmamembran mittels M β CD folgt zwei unterschiedlichen Kinetiken (Haynes et al., 2000). Bei einer Temperatur von 30°C sollte sich jedoch schnell (innerhalb von Minuten) ein neues Gleichgewicht eingestellt haben. Ein Einfluss einer schnellen präferentiellen Extraktion aus einer Phase auf die Inhibition des Intra-Golgi-Transportassays ist deswegen zwar möglich, aber nicht sehr wahrscheinlich.

Cholesterinaddition in verschiedene Membranphasen

Im Unterschied zur Extraktion von Cholesterin wurde bei dessen Addition zu Golgimembranen eine Präferenz für eine selektive Vergrößerung der *liquid ordered phase* festgestellt. Diese Präferenz gilt sowohl für die prozentuale als auch für die absolute Zunahme. Die Zunahme von PC in der *liquid ordered phase* verdeutlicht die Vergrößerung dieser Phase. Interessanterweise findet sich keine Zunahme von SM in der *liquid ordered phase*. Offenbar ist das Verhältnis von SM in *liquid ordered* und *disordered phase* über einen großen Cholesterinkonzentrationsbereich konstant. Dass es sich um eine echte Vergrößerung der *liquid ordered phase* bei Zunahme der Cholesterinmenge handelt, wird nicht nur durch die Zunahme von PC in der Raftphase, sondern auch durch das Verhalten

der Raftproteine dokumentiert, da auch das Solubilisierungsverhalten von GIC-Proteinen durch die Cholesterinzunahme verändert wird. Besonders die heterotrimeren G-Proteine sind davon betroffen. Dies verdeutlicht, dass es unter den Raftproteinen GIC-Proteine gibt, die besonders sensibel auf den Cholesteringehalt reagieren und deswegen der Cholesteringehalt genau reguliert werden muss. Der Effekt auf die signaltransduzierenden heterotrimeren G-Proteine ist besonders interessant, weil durch kleine Variationen der Verfügbarkeit einer Komponente innerhalb einer Signaltransduktionskaskade das Endergebnis sehr unterschiedlich ausfallen kann. Dies könnte erklären, wie es zu der deutlichen Inhibition des Intra-Golgi-Transportassays kommen kann.

Unterschiedliche Effekte von M β CD und Cholesterin-M β CD-Komplexen

Der Einsatz von M β CD-Cholesterin-Komplexen wird verwendet, um zu zeigen, dass der M β CD-vermittelte Effekt auf der Extraktion von Cholesterin beruht. Überraschenderweise führte eine Verwendung von M β CD-Cholesterin-Komplexen, die nach dem Standardverfahren angefertigt waren, ebenfalls zu einer Inhibition des Intra-Golgi-Transportassays. Eine Erhöhung der Cholesterinmenge in den Komplexen (siehe Abb. 24) führte ebenfalls zu einer Inhibition (Daten nicht gezeigt). Erst eine genaue Analyse des Cholesteringehalts von Golgimembranen nach Inkubation mit M β CD-Cholesterin-Komplexen führt zu Bedingungen, bei denen der Cholesteringehalt unverändert bleibt und der Intra-Golgi-Transportassay nicht inhibiert wurde. Dadurch ergibt sich zum einen, dass die M β CD vermittelte Inhibition auf der Extraktion von Cholesterin beruht, und zum anderen, dass eine Zugabe von Cholesterin ebenfalls zu einer Inhibition führt. Obwohl der Einsatz von M β CD-Cholesterin-Komplexen zur Aufhebung von M β CD-Effekten verbreitet ist, existieren Ausnahmen, wie z.B. Grimmer et al. (2000) zeigen. Im Fall des Transports zwischen Endosomen und dem Golgi-Apparat führen Komplexe aus M β CD und Cholesterin nicht zur Aufhebung des M β CD-verursachten Transportdefekts, sondern zu einer anderen, unabhängigen Beeinträchtigung des Transports. Dass eine Aufhebung der Inhibition des Intra-Golgi-Transportassays nur bei nahezu unverändertem Cholesteringehalt erfolgt, muss als Hinweis auf eine effiziente Regulation des Cholesteringehalts im Golgi-Apparat gelten.

Mögliche Proteintargets der Variation des Cholesteringehalts

Der generelle Effekt der Cholesterinextraktion auf das Solubilisierungsverhalten von Raftproteinen zeigt, dass Cholesterin essentiell für die Unlöslichkeit dieser Proteine in kaltem Detergenz ist. In dem in Abb. 20 gezeigten Experiment ist kein Effekt der Cholesterinextraktion auf das Löslichkeitsverhalten von Flotillin-1 zu beobachten. Dies liegt an der gewählten, geringen M β CD-Konzentration, denn höhere Konzentrationen (20 mM) führen auch zu einer Solubilisierung von anderen GIC-Proteinen wie auch Flotillin-1 (Gkantiragas, 2000). Die Unterschiede im Solubilisierungsverhalten bei dieser geringen M β CD-Konzentration zeigen, dass insbesondere die heterotrimeren G-Proteine sensitiv auf variierende Cholesterinkonzentrationen reagieren. Ob dieses unterschiedliche Solubilisierungsverhalten der Grund für die M β CD und M β CD-Cholesterin vermittelte Inhibition des Intra-Golgi-Transportassays ist, kann allerdings noch nicht beantwortet werden. Die Tatsache, dass die heterotrimeren G-Proteine im Golgi-Apparat für eine Regulation der Fusion des Intra-Golgi-Transports verantwortlich gemacht werden, und M β CD ebenfalls die Fusion hemmt, könnte auf eine Verbindung hinweisen.

Die Arbeiten, die eine Beteiligung von SNAREs in Rafts zeigten (Lafont et al., 1999; Chamberlain et al., 2001; Lang et al., 2001), führten zur Untersuchung, ob die Golgi-SNAREs (Syntaxin 5 und GOS28) von M β CD oder M β CD-Cholesterin-Komplexen in ihrem Solubilisierungsverhalten und damit in ihrer Mikrodomänenassoziation beeinflusst werden. An der Plasmamembran führt eine Cholesterinextraktion mit 5-15 mM zu einer homogenen Verteilung der SNAREs und einer Verringerung der Sekretion von Dopamin aus sekretorischen Granula. Unter den hier gewählten Bedingungen konnte kein Einfluss beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen SNAREs und der cholesterinabhängigen Inhibition des Intra-Golgi-Transports kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Cholesterinextraktion und -addition könnten in einem ersten Schritt zu einer Veränderung der Größe der Mikrodomänen führen. Das würde nicht notwendigerweise den Anteil der SNARE-Proteine an der Beteiligung an Rafts verändern, könnte aber zu einer verminderten oder erhöhten Interaktion mit weiteren SNAREs oder anderen Raftproteinen führen. So könnten die SNARE-Proteine für die beobachtete Inhibition des Intra-Golgi-Proteintransports verantwortlich sein, aber es fehlt die Messung der entsprechenden Mikrodomänengröße als notwendiger Parameter zur Dokumentation eines Zusammenhangs.

Daneben könnten weitere, noch nicht untersuchte Proteine für die Transportinhibition verantwortlich sein. Dies könnte z.B. die V0-Domäne der v-ATPase sein, die direkt mit Cholesterin interagiert und eine Rolle bei der Fusion spielen soll.

Struktur des Golgi-Apparats in Abhängigkeit von seinem Cholesteringehalt

Durch Zugabe von M β CD-Cholesterin-Komplexen wird der Intra-Golgi-Transportassay gehemmt. Der erhöhte Cholesterinspiegel führte zu einer Zunahme der *liquid ordered phase* und zu einem erhöhten Anteil von detergenzunlöslichem G α und insbesondere G β . Heterotrimere G-Proteine regulieren den Intra-Golgi-Transport (Helms, 1995; Helms et al., 1998). Damit könnte der Effekt der M β CD-Cholesterin-Komplexe erklärt werden. Heterotrimere G-Proteine und insbesondere die $\beta\gamma$ -Untereinheit werden auch für die Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur verantwortlich gemacht (Jamora et al., 1997; Yamaguchi et al., 1997; Jamora et al., 1999). *In vivo* wurde deshalb der Effekt von M β CD-Cholesterin-Komplexen auf die Golgi-Struktur untersucht (Abb. 21). Die Zufuhr von Cholesterin führt zu einer Vesikulierung des Golgi-Apparats. Diese Beobachtung wird auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hela-Zellen nach Cholesterinzufuhr unterstützt (Grimmer et al., 2000). Die $\beta\gamma$ -vermittelte Vesikulierung stellt somit einen möglichen Erklärungsansatz für die Inhibition des Intra-Golgi-Transports durch M β CD-Cholesterin-Komplexe dar, der in Zukunft näher untersucht werden sollte.

V Zusammenfassung

Detergenzextraktion von Membranen bei 0°C mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation wird zur Isolierung von sphingolipid- und cholesterinreichen Mikrodomänen angewandt. Mittels dieses Verfahrens wurden aus Golgimembranen Mikrodomänen isoliert, die zehn Proteine entsprechend der Coomassiefärbung in der SDS-PAGE enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zwei bisher nicht charakterisierten Proteine mit Molekulargewichten von 72 und 56 kDa identifiziert. Es handelt sich um die Untereinheiten A und B der vakuolären ATPase. Daneben konnte mit NAP-22 eine elfte Komponente des GICs identifiziert werden. NAP-22 erscheint zwar nicht in der Coomassiefärbung aber in der Silberfärbung als prominentes Protein. Bei Hemmung der v-ATPase mit Bafilomycin A1 wird der Transport von Proteinen inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Hemmung einen Effekt auf den Proteintransport vor dem Erreichen des TGN hat.

Der Proteintransport zwischen intrazellulären Kompartimenten wird durch eine Proteinmaschinerie gesteuert. Während die beteiligten Proteine eingehend untersucht wurden, ist wenig über den Einfluss von Lipiden bekannt. Durch Verwendung eines zellfreien Intra-Golgi-Transportassays konnte gezeigt werden, dass Cholesterin hier eine entscheidende Rolle spielt. Kleine Veränderungen des Cholesteringehalts (+/-10%) führen zu einer Inhibition des Intra-Golgi-Transports (70% Inhibition). Dies gilt sowohl für die Addition als auch die Depletion. In beiden Fällen handelt sich dabei um eine spezifische Transportinhibition. Die Cholesterinextraktion führt zu einer Inhibition der Fusionsreaktion, wie durch Verwendung von BFA im Intra-Golgi-Transportassay demonstriert werden konnte. Cholesterin findet sich sowohl in der *liquid disordered* als auch in der *liquid ordered phase*. Die Extraktion von Cholesterin erfolgt aus beiden Phasen in gleichem Maße. Im Unterschied dazu wird bei der Zugabe das Cholesterin bevorzugt in die *liquid ordered phase* eingebaut. Der Erhöhung des Cholesteringehalts in der *liquid ordered phase* führt ebenfalls zu einer Zunahme von PC und SM in dieser Membranphase. Allerdings ist die Zunahme von SM nur geringfügig und auch der PC-Gehalt in der *liquid ordered phase* nimmt nicht proportional zum Cholesterinzuwachs zu.

Die geringfügigen Veränderungen des Cholesteringehalts führen zur Änderungen des Solubilisierungsverhaltens ausgewählter Golgi-Proteine, nämlich der heterotrimeren G-

Proteine. Wird Cholesterin mittels M β CD-Cholesterin-Komplexen zu intakten CHO-Zellen gegeben, so wurde eine Vesikulierung der Golgi-Struktur beobachtet.

Veröffentlichungen:

Gkantiragas, I., B. Brügger, E. Stüven, D. Kaloyanova, X.Y. Li, K. Löhr, F. Lottspeich, F.T. Wieland, and J.B. Helms. 2001. Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol Biol Cell*. 12:1819-33.

Stüven, E., A. Porat, B. Brügger, F.T. Wieland, Z. Elazar und J.B. Helms. Partitioning of Cholesterol between two Different Membrane Phases is Involved in the Regulation of Intra-Golgi Protein Transport. zur Veröffentlichung eingereicht

VI Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Sigma, Fluka oder Merck bezogen und besaßen den Reinheitsgrad “pro analysis”.

1.2 Antikörper

1.2.1 Primärantikörper

Für diese Arbeit wurden freundlicherweise folgende Antikörper zur Verfügung gestellt.

Protein	zur Verfügung gestellt von	Spezies
v-ATPase Untereinheit A	N. Nelson	Meerschweinchen
v-ATPase Untereinheit B	N. Nelson	Meerschweinchen
GFP	I. Mahjoul	Kaninchen
GFP	C. Ungermann	Kaninchen
NAP-22	M. Mosevitsky	Kaninchen
NAP-22	S. Maekawa	Maus
VSV G	R. Pepperkok	Maus
VSV G	Z. Elazar	Maus
p23	D. Gommel	Kaninchen
Flotillin-1	B. Helms	Kaninchen
Syntaxin 5	T. Söllner	Kaninchen
p17	B. Helms	Kaninchen

Die Antikörper gegen GM130, p115 und GOS28 wurden von Stressgen, diejenigen gegen α und β von Santa Cruz Biotechnology (USA) und der Antikörper gegen TGN38 von Alexis Corporation (CA, USA) bezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptidantikörper gegen NAP-22 hergestellt. Hierfür wurden die Peptide “Papa” und “Caesar” (siehe VI.1.3) mittels Glutaraldehyd an KLH gekoppelt und in Kaninchen bzw. Meerschweinchen injiziert. Zur Kopplung werden 2.5 mg

Peptid in 250 µl PBS gelöst und mit 500 µl KLH (10 mg/ml) versetzt. Das Glutaraldehyd wird fünf Mal im Abstand von 5 min als 3 µl Aliquots einer 5%igen Lösung in PBS hinzugegeben. Anschließend wird für 30 min auf Eis inkubiert und dann über Nacht mit 20 µl 1 M Glycin pH 8.5 in PBS bei 4°C blockiert. Die Immunisierung der Tiere wurde von der Firma Pineda-Antibodies (Berlin) durchgeführt.

1.2.2 Sekundärantikörper

Die Meerrettichperoxidase konjugierten Ziege-anti-Kaninchen IgG und Ziege-anti-Meerschweinchen IgG wurden von BioRad (München) bezogen. Die in der Immunfluoreszenz eingesetzten FITC und TRITC markierten Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen und Ziege-anti-Meerschweinchen wurden von Jackson Laboratories Inc. erhalten. Für die Immunfluoreszenzen des VSV G-Proteins wurde der Cy3-konjugierte anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexis Corporation, CA, USA) ebenfalls von R. Pepperkok, EMBL (Heidelberg), zur Verfügung gestellt.

1.3 Peptide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Peptide zur Generierung von Antikörpern verwendet:

„Papa“ H₂N-EEQPEPAPAPEQ-COOH
 „Caesar“ H₂N-CVASSEQSVAVKE-COOH

1.4 Synthetische Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma NAPS Göttingen GmbH synthetisiert:

NAGTI-for cccaagcttatgctgaagcagtctgcaggg
 NAGTI-rev gccggatccgccgctcggcggggggtcacaggcacacgcgg
 GFP-for ggcgatccggcggaccggtatgagtaaaggagaagaacttcactgga
 GFP-rev ccggagctctattgtatagttcatccatgccatg

1.5 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit kamen folgende Plasmide bei der Transfektion eukaryotischer Zellen und prokaryotischer Überexpression zur Anwendung:

pcDNA 3.1 Invitrogen, Groningen, Niederlande
 pGEX -2T Amersham Pharmacia Biotech, England

1.6 Zelllinien

Es wurden CHO-, NRK- und Vero-Zellen in denen hier beschriebenen Experimenten verwendet.

2 Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zählen von Zellen

Die Zellsuspension wird in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und im Phasenkontrastmikroskop wird ein Großquadrat ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich durch Multiplikation mit 10000.

2.1.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgt bei einem CO₂-Gehalt von 5%, 90% Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37°C in α -MEM, dem 7.5% (v/v) fötales Kälberserum und je 500 Einheiten Penicillin und Streptomycin pro 50 ml zugesetzt werden. NRK- und Vero-Zellen werden in DMEM unter ansonsten zu CHO-Zellen identischen Bedingungen kultiviert.

2.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben. Anschließend werden die Zellen bei 200 g für 5 min abzentrifugiert und wieder in frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert.

Zum Einfrieren werden die Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^7 /ml in 10% DMSO enthaltendem Kulturmedium ohne FCS aufgenommen, in Einfrierröhrchen gegeben und über Nacht in einer geschlossenen Styroporbox bei -80°C eingefroren. Zur längeren Lagerung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufewahrt.

2.1.4 Passagieren von Zellen

Das Medium einer konfluent mit Zellen bewachsenen Petrischale wird abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wird für ca. 20 sek mit 2 ml 0.05% (w/v) Trypsin in PBS behandelt und anschließend solange gewartet, bis die Zellen beginnen sich abzulösen. Dann werden die Zellen in vorgewärmtem Medium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung wieder ausgesät.

2.1.5 Anzucht von Zellen in Spinner-Kultur

Die Kultivierung von CHO-Zellen in Suspensionskultur erfolgt in 1.5 l Spinnerflaschen der Firma Techne (Wertheim). Hierfür werden vier konfluent bewachsene 10 cm Petrischalen wie unter VI.2.1.4 beschrieben trypsinisiert und anschließend in 500 ml Medium aufgenommen. Die Zellen werden jeweils bei Erreichen einer Zelldichte von $5-6 \times 10^5$ /ml um den Faktor 3-4 verdünnt. Zur Ernte werden die Zellen bei 500 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert.

2.1.6 Stabile Transfektion von Zellen

Die stabile Transfektion von CHO-Zellen erfolgt mit dem SuperFect Transfektions Reagenz von Qiagen (Hilden). Im ersten Schritt werden die Zellen zur Ermittlung der effizientesten Transfektionsbedingung transient transfiziert.

CHO-Zellen werden trypsinisiert, in frischem Medium aufgenommen, in einer 24-Loch Platte, in die Deckgläschen gelegt wurden, ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert, so dass die Zellen am nächsten Tag 50-70% konfluent sind. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und dann für 2.5 h mit dem in Medium aufgenommenen Komplex aus DNA und Superfectreagenz im Brutschrank inkubiert. Die Transfektionskomponenten werden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen nach 24h mittels Immunfluoreszenz auf die höchste Transfektionsrate analysiert.

Zum Austesten der optimalen Transfektionsbedingungen werden die Verhältnisse 1:2, 1:5 und 1:10 (in w/v) von DNA zu Superfect für die DNA-Mengen 0.5 µg, 1 µg und 2 µg verwendet. Zur Herstellung des DNA-Superfect-Komplexes wird die DNA in 60 µl PBS vorgelegt und das Superfect hinzugegeben. Nach 10 min wird dann zum Abstoppen der Komplexbildung 350 µl Medium dazugegeben.

Die stabile Transfektion wird auf Grund der Immunfluoreszenz Ergebnisse mit DNA-Superfect-Verhältnissen von 1:2.5 und 1:5 bei 20 µg DNA durchgeführt. Es werden drei 60% konfluente 10 cm Petrischalen mit CHO-Zellen mit diesen Bedingungen transfiziert. Nach zwei Tagen wird das Medium gegen Selektionsmedium (α -MEM mit 0.5 mg/ml G418) ausgewechselt. Eine vierte Schale CHO-wt-Zellen wird zur Kontrolle ebenfalls mit Selektionsmedium behandelt. Drei Wochen später sind auf der Kontrollplatte keine lebenden Zellen zu erkennen. Da die Transfektionsrate sehr hoch war und die Transfektion das Wachstum nicht wesentlich verlangsamte, mussten die transfizierten Zellen stark verdünnt, frisch ausgesät werden. Nachdem einzelne Zellhaufen sichtbar wurden, wurde die Schale trypsinisiert und die Zellhaufen einzeln mit einer Pipette in jeweils ein Loch einer

96-Loch Platte transferiert. Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen nacheinander in 24-Loch, 6-Loch, 3 cm und 10 cm Platten bzw. Schalen transferiert. Beim Wechsel auf 6-Loch Platten werden Zellen zur Analyse in der Immunfluoreszenz abgenommen und von da ab werden nur noch transfizierte Zellen weitergeführt. Der Selektionsdruck wird bis zum Einfrieren der ersten Zellen aufrecht gehalten.

2.1.7 FACS-Analysen transformierter CHO-Zellen

Die mit dem NAGTI-pH-GFP-Konstrukt (siehe Abb. 25) transfizierten CHO-Zellen werden trypsinisiert, wieder in vorgewärmtem Medium aufgenommen, gezählt und für 5 min bei 200g abzentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen FACS-Medium (α -MEM mit 5% (v/v) Dissoziationspuffer, 0.5% (v/v) FCS) aufgenommen, so dass eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt wird. Die Suspension wird durch ein Zellsieb filtriert und im FACS gemessen. Die FACS-Messungen wurden am ZMBH in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schwappach von Frau Dr. Kehlenbach durchgeführt.

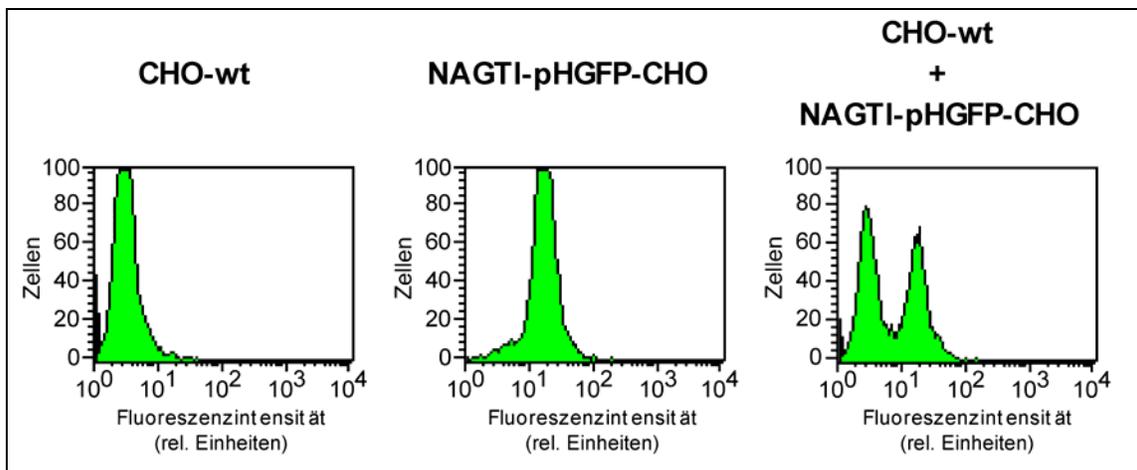


Abb. 22: FACS-Analyse der NAGTI-pHGFP-CHO-Zellen. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurden CHO-wt-Zellen mit NAGTI-pH-GFP-CHO-Zellen bzw. mit einer 1:1 Mischung aus beiden Zellpopulationen im FACS verglichen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot kompetente BL21-Bakterien (Stratagene, Heidelberg) wird auf Eis aufgetaut, das Plasmid oder ein Aliquot eines Ligationsansatzes wird hinzugegeben, es wird gemischt und für 30 min weiter auf Eis inkubiert. Dann werden die Bakterien für 90 sek auf 42°C erwärmt und dann wieder auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wird für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden danach durch Zentrifugation (2 min, 7.000 upm) pelletiert und 1 ml Überstand wird abgenommen. Im

restlichen Überstand werden die Bakterien wieder resuspendiert, auf Ampicillin (100 µg/ml) enthaltenden LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Ligation

Zu 50ng Vektor wird ein 3-6facher molarer Überschuss Insert gegeben. Diese Lösung wird mit einem gleichgroßen Volumen Ligationlösung aus dem Ligationsskit von TaKaRa, (Taufkirchen) gemischt. Der Ansatz wird für 30 min bei 16°C inkubiert. Als Kontrolle wird ein Ligationssatz ohne Insertzugabe legiert.

2.2.3 Glyzerindauerkulturen von *E. coli*

0.5 ml Übernachtskultur werden mit 0.5 ml 50%igem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.4 Präparation von Plasmid DNA

2.2.4.1 Aufreinigung analytischer DNA-Mengen

Um Bakterienklone nach Transformation auf die gewünschten Ligationssprodukte zu überprüfen, werden geringe Mengen DNA isoliert, so dass sie durch anschließenden Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese analysiert werden können. Zur Plasmidisolierung werden Einzelklone von LB-Agarplatten auf 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin umgeimpft und über Nacht bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Aus 1.5 ml dieser Bakterienkultur werden mittels des „Qiaprep Spin Miniprep Kits“ von Qiagen (Hilden) gemäß den Herstellerangaben das Plasmid aufgereinigt.

2.2.4.2 Aufreinigung präparativer DNA-Mengen

Für große DNA-Mengen, wie insbesondere für die Transfektion von CHO-Zellen mit NAGTI-pH-GFP wird dieses Plasmid aus 100 ml Bakterienkultur mit dem „EndoF free MidiPrep Kit“ von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Die DNA (0.5 bis 2 µg) wird entsprechend den Angaben des Herstellers mit 2-3 U des Restriktionsenzym (New England Biolabs, Schwalbach) pro Schnittstelle im mitgelieferten Puffer versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen wird so gewählt, dass das Volumen der eingesetzten Enzyme nicht mehr als 10% des Gesamtvolumens ausmacht.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung des gewünschten Produkts wird 10 ng DNA als *Template* mit jeweils 25 ng zweier entsprechender Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 60 µl Wasser aufgenommen und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Probe wird im Thermoblock für 5 min auf 95°C erhitzt und die fehlenden, entsprechend der nachfolgenden Liste in 40 µl Wasser gelöst. Reaktionskomponenten werden dazu pipettiert.

10 µl	10xPCR Puffer	(100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 0.01% (v/v) Gelatine)
6 µl	25 mM MgCl ₂	
10 µl	dNTP-Mix	(jedes Nukleotid 2.5 mM)
0.5 µl	Taq-Polymerase	(5 U/µl, Perkin Elmer)

Nach Zugabe aller Komponenten läuft folgendes Temperaturprogramm ab.

2 min	72°C	
40 sek	94°C	
1 min	55-65°C, variiert mit <i>Template</i>	35 Zyklen
1 min	72°C	
10 min	72°C	
unendlich	4°C	

2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung des NAGTIpHGFP's im pcDNA3-Vektor wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) als Doppelstrangsequenzierung mit T3- und T7-Oligonukleotiden durchgeführt.

2.2.8 Agarosegel-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Soweit nicht anders vermerkt wird, sind 1%ige Agarosegele verwendet worden. Hierzu wird eine 1% (w/v) Agaroselösung in TAE-Puffer durch Erhitzen bis zum Sieden hergestellt. Nachdem die Lösung sich auf ca. 50°C abgekühlt hat, wird pro 100 ml Gellösung 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) hinzugegeben und die Agaroselösung zum Erstarren in eine Gelkassette mit eingesetztem Kamm gegeben. Aus dem Gel werden Stücke gewünschter Größe ausgeschnitten und nachdem die 10:1 mit Probenpuffer versetzten DNA-Lösungen in die Taschen pipettiert sind, wird in einer TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer die DNA bei 10 V pro 10 cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt. Im UV-Licht erscheint die DNA als orangefarbene Bande, deren Größe durch Vergleich mit einem analog behandelten Größenstandard ermittelt werden kann.

TAE-Puffer 40 mM Tris-HCl, 10 mM NaOAc, 1 mM EDTA pH 7.8

Probenpuffer 50% (w/v) Glycerin, 0.25% (w/v) Bromphenolblau,
 0.25% (w/v) Xylencyanol FF

2.2.9 DNA-Größenstandards

Es wurden die 100 bp und 1 kb DNA Leitern der Firma New England Biolabs (Schwalbach) zur Bestimmung einzel- und doppelsträngiger DNA in Agarosegelen verwendet.

2.2.10 Isolierung von Nukleinsäure-Fragmenten

Die Isolierung von Nukleinsäure-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „GeneClean II Kit“ der Firma BIO 101, (CA, USA) bzw. dem der Firma Qiagen (Hilden). Die entsprechende DNA-Bande wird auf dem UV-Lichttisch mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und gemäß den Herstellerangaben der Kits weiterbearbeitet.

2.2.11 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1 entspricht dabei etwa 50 µg/ml DNA. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann dies zur Umrechnung einer gemessenen Extinktion in eine Konzentration verwendet werden.

2.2.12 Überexpression von ratiometrischem pH-GFP-GST-Fusionsprotein in *E. coli*

Zur Überexpression werden BL21 Bakterien mit dem ratiometrischem pH-GFP-GST Plasmid (von Dr. Gero Miesenböck zur Verfügung gestellt) transformiert. Mit diesen Bakterien werden 5 ml LB-Medium, welches Ampicillin enthält, angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C geschüttelt und zum Animpfen von 2 x 250 ml LB-Medium verwendet. Auch diese Kultur wird bei 37°C geschüttelt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.6 wird mit 1 mM IPTG die Expression induziert und die Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur fortgeführt. Die Bakterien werden durch Zentrifugation (7700 g, 4°C, 10 min) geerntet und in 10 ml 1% (w/v) Triton X-100 enthaltendem PBS resuspendiert. Durch 40 prozentige Ultraschallpulse bei einer Gesamtzeit von 5 min werden die Bakterien aufgeschlossen. Die Suspension wird für eine Stunde bei 4°C auf dem Rotierrad inkubiert und die Bakterentrümmer für 20 min bei 30.000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird eine Stunde auf dem Rotierrad bei Raumtemperatur mit Glutathionsepharose inkubiert und anschließend in Säulen gegossen. Der Durchfluss wird aufgehoben und die Säule mit vier Säulenvolumen PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wird mit 20 mM Glutathion in Tris-HCl pH 8 eluiert. Die Protein enthaltenden Elutionsfraktionen werden vereinigt und

einmal zwei Stunden und einmal über Nacht gegen PBS in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa dialysiert. Die Proteinlösung wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

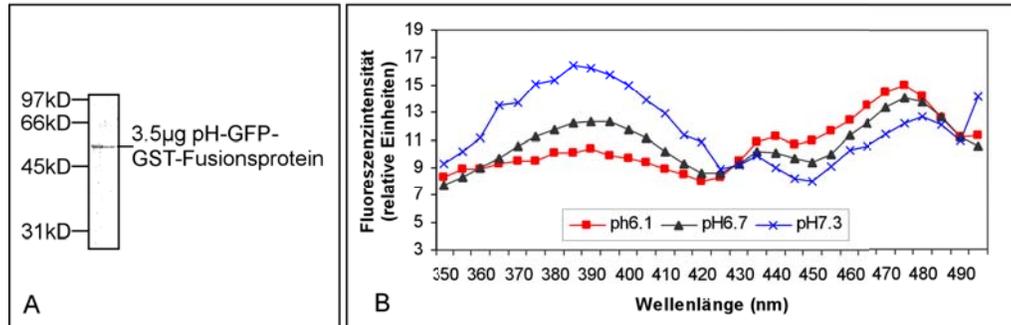


Abb. 23: Überexpression von ratiometrischem pH-sensitivem GFP und dessen Fluoreszenzspektren bei unterschiedlichen pH-Werten als Aktivitätstest. **A** Ratiometrisches pH-GFP-GST-Fusionsprotein wurde in *E. coli* nach Induktion mit 1 mM IPTG über Nacht bei Raumtemperatur überexprimiert. Nach Aufschluss der Bakterien wurde das Protein mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose aus dem Überstand isoliert und mittels 12% SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. **B** 1 µg des aufgereinigten pH-GFP-GST-Fusionsproteins wurde 1:3000 in 10 mM Tris-HCl mit den pH-Werten 6.1, 6.7 und 7.3 verdünnt und die Fluoreszenz bei 510 nm wurde in Abhängigkeit von der Anregung zwischen 350 und 495 nm gemessen.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung mit Bicinchinonsäure

Die Proteinbestimmung wurde mit Fertigreagenzien der Firma Pierce (Illinois, USA) durchgeführt. 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden in einer Microtiterplatte mit 200 µl einer 1:50 Verdünnung von Lösung B in A versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Eichung werden jeweils 10 µl einer Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin analog behandelt. Die Absorption bei 562 nm wird als Maß für die Proteinkonzentration verwendet.

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen werden SDS-Polyacrylamidgelle mit diskontinuierlichem Puffersystem verwendet. Trenn- und Sammelgele werden gemäß den nachstehenden Rezepturen hergestellt.

	10%	12%	14%	5% (Sammelgel)
30% (w/v) Acrylamid	3.3 ml	4 ml	4.7 ml	1.7 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2 ml	2 ml	2 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.6	-	-	-	2 ml
H ₂ O	4.5 ml	3.7 ml	3.2 ml	6.2 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	10 µl

Die frisch angesetzte Trenngellösung wird in die vormontierten Gelkassetten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wird das Isopropanol durch Waschen mit Wasser entfernt und die ebenfalls frisch angesetzte Sammelgellösung zugegeben, in die ein 10- oder 15-zähliger Kamm eingesetzt wird. Sobald das Sammelgel polymerisiert ist, können die Gelkassetten in den Elektrodenrahmen eingespannt und in den Elektrophoretank eingesetzt werden. Die Elektrodenräume werden mit Elektrophoresepuffer gefüllt, die entsprechend vorbereiteten Proben nach Entfernen des Kamms in die Geltaschen pipettiert und die Kammer mit dem zugehörigen Deckel verschlossen. Bis die Lauffront die Sammel-/Trenngelgrenze erreicht hat, wird bei konstant 100 V, danach mit konstant 200 V elektrophoriert.

Zu analysierende Protein-Proben werden entweder direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen oder in diesem 1:2 verdünnt und für 5 min auf 95°C erhitzt.

Elektrophoresepuffer 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS

SDS-Probenpuffer 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerin,
0.004% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol

2.3.3 2D-Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975)

Proteine werden in zwei Dimensionen in einer „Mini-Protean II 2-D Cell-Apparatur“ von BioRad (München) aufgetrennt. Die Gellösungen werden gemäß nachfolgender Zusammensetzung hergestellt und in Glaskapillaren luftblasenfrei gegossen. Nach dem Auspolymerisieren werden die Kapillaren in die Laufkammer eingesetzt, die Proben oben auf die Gele aufgetragen und von 10 µl *Overlay*-Puffer überschichtet. Der Anodenraum wird mit 20 mM NaOH, der Kathodenraum wird mit 10 mM H₃PO₄ befüllt und die Proben werden erst 10 min bei 500 V und dann 3.5 h bei 750 V elektrofokussiert. Die Gele werden

anschließend aus den Kapillaren mittels einer Spritze herausgedrückt und mit SDS-Probenpuffer inkubiert. Für die zweite Dimension werden die Gele auf normale 1mm dicke SDS-Gele aufgelegt und die Proteine wie unter VI.2.3.2 beschrieben aufgetrennt.

Probenpuffer	10 M Harnstoff, 2% Ampholite 7-9 (LKB), 4%NP-40, 0.1 M DTT	
<i>Overlay</i> -Puffer	8 M Harnstoff, 1% Ampholine 7-9 (LKB), 5% NP-40, 1 M DTT	
Acrylamidlösung	28.3% (w/v) Acrylamid, 1.6% (w/v) Bis-Acrylamid	
Gellösung	Harnstoff	2.87 g
	Acrylamidlösung	0.67 ml
	Wasser	0.88 ml
	Ampholine 5-7 (LKB)	0.278 ml
	Ampholine 3.5-10 (LKB)	0.101 ml
	10% (w/v) NP-40	1.01 ml
	TEMED	8 μ l
	10 % APS	8 μ l

2.3.4 Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE

Der verwendete „*broad range* Standard“ wurde von der Firma BioRad (München) bezogen und enthielt folgende Proteine:

Myosin	200 kDa
Phosphorylase B	97 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carboanhydrase	31 kDa
Trypsin-Inhibitor	21.5 kDa
Lysozym	14.4 kDa
Aprotinin	6 kDa

2.3.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Für die Färbung wird das entsprechend vorpräparierte Gel für 10 min in Coomassielösung inkubiert. Anschließend wird durch mehrere Waschschrte mit Entfärber so lange gewaschen, bis der Hintergrund wieder farblos ist.

Coomassielösung	0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue (R250) in Entfärber
Entfärber	30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

2.3.6 Silberfärbung von Proteingelen

Nach der Elektrophorese wird das SDS-Gel 30 min in Entfärber zur Fixierung der Proteine gewaschen. Das Gel wird dann für 90 sek in *Farmer's reducer* gelegt und dann so lange mit Wasser gewaschen, bis das Gel entfärbt ist. Für 15-30 min wird in 0.1% (w/v) AgNO₃-Lösung inkubiert. Überflüssige Silberionen werden durch kurzes Waschen mit 2.5% (w/v) Na₂CO₃-Lösung entfernt. Die verbliebenen Silberionen werden mit Formaldehyd (80 µl CH₂O in 50 ml 2.5% (w/v) Na₂CO₃-Lösung) reduziert. Bei Erreichen des gewünschten Schwärzungsgrads wird mit 10% (v/v) Essigsäure abgestoppt.

Farmer's reducer 30 mM Na₂S₂O₃, 30 mM K₃[Fe(CN)₆]

2.3.7 Chloroform/Methanol-Präzipitation

100 µl Probe und 300 µl eines Chloroform/Methanol-Gemischs aus einem Teil Chloroform und zwei Teilen Methanol werden gemischt und anschließend 30 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Proteinpellet wird entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder für eine Stunde bei 37°C getrocknet.

2.3.8 Western Blot

Der Proteintransfer erfolgt im *semi dry* Verfahren in Blotkammern der Firma BioRad (München). Hierzu werden drei in Transferpuffer getränkte Lagen 3MM Whatmanpapier auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Die PVDF-Membran wird zunächst in Methanol äquilibriert und dann in Transferpuffer getaucht, bevor sie auf das Whatmanpapier gelegt wird. Als nächstes folgt das vom Trenngel befreite Sammelgel und zum Schluss werden nochmals drei Lagen in Transferpuffer getränktes 3MM Whatmanpapier aufgelegt. Der Zusammenbau erfolgt luftblasenfrei. Die Kathode wird aufgesetzt und der Proteintransfer erfolgt für 90 min bei konstant 24 V.

Die transferierten Proteine können durch kurzes Anfärben mit Ponceaulösung und nachfolgendem Waschen mit Wasser detektiert werden.

Transferpuffer 25 mM Tris-HCl, 20 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol

Ponceaulösung 0.1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) Essigsäure

2.3.9 Proteinsequenzierung

Die Proteinsequenzierungen wurden von Prof. Dr. Friedrich Lottspeich (MPI, Martinsried) durchgeführt. Hierfür wurden GIC-Präparationen 1:3 mit eiskaltem PEN-Puffer verdünnt und im SW28 Rotor eine Stunde bei und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Proteine werden mittels 12% SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, allerdings erfolgt die Elektrophorese anders

als unter VI.2.3.2 beschrieben in größeren Gelen und über Nacht bei 4°C. Das Gel wird Coomassie gefärbt und abschließend mehrfach gewässert. Die zu analysierenden Banden werden mit einem neuen Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorfgläsern verschickt. Alle verwendeten Lösungen werden frisch angesetzt und sterilfiltriert.

2.4 Immunchemische Methoden

2.4.1 Immunnachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach der Ponceaufärbung wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in PBS mit 5% (w/v) Milchpulver zur Blockierung gegenüber unspezifischen Bindungen inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern entsprechend ihren spezifischen Verdünnungen in PBS mit entweder 5% Milchpulver oder 1% RSA für entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach drei 10 minütigen Waschschritten mit PBS-T wird die Membran für 1 Stunde mit einem Peroxidase markierten Ziegenantikörper gegen IgG der entsprechenden Spezies des Primärantikörpers (Verdünnung 1:5000 in PBS mit 5% Milchpulver) inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS-T (3x10 min) erfolgt die Detektion gebundener Antikörper mittels des ECL- oder ECL-Plus-Systems nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia England).

PBS 136 mM NaCl, 3 mM KCl, 35.7 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 14.3 mM KH₂PO₄

PBS-T PBS, 0.05% (w/v) Tween 20

2.4.2 Immunfluoreszenz

Zellen werden auf Deckgläschen in einer 24-Loch Platte in der gewünschten Verdünnung ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Die Fixierung erfolgt dann entweder für 20 min bei Raumtemperatur in 3.5% (w/v) PFA in PBS und anschließendem Absättigen des überschüssigen PFA für 10 min mit 50 mM NH₄Cl in PBS oder für 3 min bei -20°C in Methanol. Wird mit PFA fixiert, so müssen die Zellen noch für zweimal 5 min mit 0.05% Triton X-100 in PBS zur Permeabilisierung behandelt werden. Die Zellen werden dann dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min in PBS/1%RSA zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Die Antikörper werden ebenfalls in PBS/1%RSA verdünnt und die Deckgläser werden umgedreht für eine Stunde in 20 µl dieser Antikörperlösung gebettet. Wiederum wird dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläser in einer 1:100 Verdünnung in PBS/1%RSA der entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert. Zum Abschluss werden die Zellen nochmals dreimal mit PBS und einmal mit Wasser gewaschen

und dann in einem Tropfen Fluoromount G auf Objektträgern eingebettet. Nach einer Stunde bei 37°C oder einer Nacht bei Raumtemperatur können die Proben im Inversions-Fluoreszenzmikroskop angeschaut und fotografiert werden.

Zur Überprüfung der Spezifität mittels Immunfluoreszenz angefärbter Strukturen in der Zelle werden Vorinkubationen der Antikörper mit dem Peptid, welches zu ihrer Herstellung verwendet wurde, durchgeführt. Hierfür wird ein ca. 1000facher, molarer Überschuss des Peptids gegenüber der eingesetzten Antikörpermenge in PBS/1%RSA gelöst. Die Berechnung des Überschusses erfolgt dabei aufgrund der Annahme einer Konzentration spezifischer Antikörper von 1 µg/ml. Die Antikörper werden in der zuvor getesteten Verdünnung in der Peptidlösung verdünnt, für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann wie üblich in der Immunfluoreszenz eingesetzt.

2.4.3 Infektion von Vero-Zellen mit VSV ts045

Vero-Zellen werden in einer Petrischale mit Deckgläsern in der gewünschten Verdünnung ausgesät. Nach zwei Tagen wird das Medium entfernt und eine zuvor titrierte Viruslösung (VSV in PBS) direkt auf die Deckgläser pipettiert. Für 30 min wird bei Raumtemperatur und dann ohne zu waschen 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Medium ohne HCO_3^- , dafür mit 10 mM HEPES pH 7.4 und 5 mM Glukose, werden die Zellen für 2.5 Stunden bei 39.5°C temperiert. Um das angestaute VSV G-Protein aus dem ER zu entlassen, werden die Zellen für eine Stunde bei 31°C inkubiert und zudem 100 µM Cycloheximid ins Medium gegeben, um sicherzustellen, dass nur neusynthetisiertes VSV G untersucht wird. Die Zellen werden anschließend mittels der unter VI.2.4.2.2 beschriebenen Immunfluoreszenz analysiert.

2.5 Weitere Methoden

2.5.1 Isolierung von Golgimembranen aus CHO-Zellen

In Spinnerflaschen angezogene CHO-Zellen werden durch Zentrifugation für 10 min bei 500 g und 4°C geerntet. Die Zellen werden anschließend zweimal mit PBS und zweimal mit Homogenisationspuffer gewaschen. Sobald die Zellen sich in Homogenisationspuffer (0.2 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) befinden, muss aufgrund des Saccharosegehalts im Puffer mit 1500 g zentrifugiert werden. Im nächsten Schritt wird das Zellpellet in dem vierfachen Volumen Homogenisationspuffer resuspendiert und die Zellen werden im Balch-Homogenisator aufgeschlossen. Die Homogenisation wird durch Anfärben eines Aliquots mit Trypanblau kontrolliert. Das Homogenat wird mit 62% (w/w)

Saccharoselösung auf 37% (w/w) Saccharosegehalt und mit 100 mM EDTA pH 7.1 auf 53 mM EDTA-Konzentration eingestellt. In SW28-Zentrifugenröhrchen werden 12-14 ml dieses Homogenats mit 15 ml 35%iger und 9 ml 29%iger Saccharoselösung überschichtet. Nach 2.5 stündiger Zentrifugation bei 25.000 upm und 4°C werden 2-3 ml der trüben Interphase zwischen 35% und 29% Saccharose gezapft. Die so erhaltene Golgiangereicherte Fraktion wird entweder sofort weiter verwendet oder im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Saccharoselösungen sind jeweils in 10 mM Tris-HCl pH 7.4 gepuffert.

2.5.2 Isolierung Triton X-100 unlöslicher Komplexe aus Golgimembranen

Die gemäß VI.2.5.1 erhaltenen Golgimembranen werden 1:3 mit PEN-Puffer verdünnt und im SW28 Rotor eine Stunde bei 100.000 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in eiskaltem PEN-Puffer mit 1% Triton X-100 resuspendiert. Anschließend wird für 30 min bei 0°C inkubiert. Die Suspension wird mit dem gleichen Volumen 80%iger (w/v) Saccharoselösung auf 40%(w/v) Saccharosegehalt eingestellt. Im SW41 Zentrifugenröhrchen werden jeweils 4 ml dieser Suspension schrittweise mit je 1.3 ml 30% (w/v), 25% (w/v), 20% (w/v), 15% (w/v), 10% (w/v) und 5% (w/v) Saccharose in PEN-Puffer überschichtet und für 21 Stunden und 40 min bei 4°C zentrifugiert. Die opaleszente Bande bei 10-15% Saccharosegehalt wird gezapft und, falls nicht sofort weiter verwendet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

PEN-Puffer 25 mM Pipes pH6.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl

2.5.3 Präparation von Rinderhirnzytosol (Wattenberg und Rothman, 1986)

Drei schlachtfrische Rinderhirne werden in Puffer 1 auf Eis transportiert. Die Großhirnrinde wird von Blut, Hirnhäuten, Kleinhirn und weißer Zellschicht befreit. Jeweils ca. 450 g Hirn wird mit Puffer 2 auf ein Volumen von einem Liter aufgefüllt und zweimal 15 sek bei langsamer und dann einmal 30 sek bei hoher Geschwindigkeit im Waring-Blendor (Waring, Conn., USA) homogenisiert. Damit das Homogenat sich nicht erwärmt, werden Pausen eingelegt, in denen das Homogenat im Eiswasserbad gekühlt wird. Das Homogenat wird zunächst für 60 min bei 16.000 g und 4°C und der Überstand anschließend in TFT 50.38 Röhrchen für 90 min bei 160.000 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Überstand wird vereinigt und in einer mit Puffer 2 (ohne Inhibitoren) äquilibrierten Minitan-Tangentialfilteranlage (Millipore, Eschborn) ca. 7-8fach konzentriert. Das Konzentrat wird einmal drei Stunden und einmal über Nacht in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa jeweils gegen 30 l Puffer 3 dialysiert. Präzipitiertes Protein wird durch Zentrifugation bei

44.000upm im TFT 50.38 Rotor entfernt und das Zytosol wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer 1	25 mM Tris-HCl pH 7.4, 320 mM Saccharose
Puffer 2	25 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 250 mM Saccharose, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 Tablette Complete (Roche) Proteaseinhibitoren/50 ml
Puffer 3	25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1 mM DTT

2.5.4 Präparation von Rattenhirnzytosol

Die Präparation von Rattenhirnzytosol erfolgt größtenteils analog zur Präparation von Rinderhirnzytosol. Zwölf Ratten werden getötet, die Schädel geöffnet, das Gehirn entnommen und sofort in eiskaltem Puffer 1 überführt. Blut und Fremdgewebe wird entfernt und die Gehirne werden in Puffer 2 transferiert. Dabei wird ca. 2 ml Puffer pro Gramm Gehirn verwendet. Die Gehirne werden im *Dounce*-Homogenisator homogenisiert und anschließend bei 8.500 upm im SS-34 Rotor für eine Stunde bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird durch Gaze filtriert und erneut bei 35.000 upm im 60Ti-Rotor für 1.5 h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird dann dreimal für jeweils zwei Stunden gegen 50KTDG-Puffer dialysiert und abschließend als einzelne Tropfen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

50KTDG-Puffer: 50 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM DTT, 10% (w/v) Glycerin

2.5.5 Generierung von COPI-Transportvesikeln (Serafini et al., 1991)

Für einen 30 ml Reaktionsansatz werden auf Eis folgende Komponenten in einem Erlenmeyerkolben gemischt:

H ₂ O	17.3 ml
10x Assay-Puffer	3 ml
2 M KCl	240 μl
40 mM ATP	37.5 μl
100 mM UTP	37.5 μl
200 mM Kreatinphosphat	750 μl
1600 U/ml Kreatinkinase	250 μl
10 mg/ml RNase A	75 μl
Rinderhirnzytosol (34 mg/ml)	2.3 ml

Zum Schluss werden 6 ml einer CHO-Golginmembranpräparation hinzugegeben, die jedoch vorher mit 60 μl GTP γ S kurz auf Eis vorinkubiert wurden. Der komplette Ansatz wird unter

gelegentlichem Schwenken im 30°C Wasserbad für 20 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Abkühlen für 10 min im Eiswasserbad abgestoppt und anschließend werden die Membranen im JA 20 Rotor bei 14.000 upm für 30 min pelletiert.

Das Pellet wird in 600 µl LSSB aufgenommen und erneut für 15 min bei 17.000 upm zentrifugiert. Das Membranpellet wird dann intensiv in 600 µl HSSB homogenisiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Wiederum wird für 15 min bei 17.000 upm zentrifugiert und dann werden 550 µl Überstand mit 170 µl 55%iger (w/w) Saccharoselösung in HSSB auf 20% (w/w) Saccharose eingestellt und auf einen 5 ml Gradienten im SW55 Zentrifugenröhrchen geladen. Dieser Gradient besteht aus 714 µl Stufen folgender Saccharoselösungen in HSSB: 50%, 45%, 40%, 35%, 30% und 25% (jeweils w/w). Die Gradienten werden 18 Stunden bei 4°C und 33.000 upm (100.000 g) zentrifugiert und anschließend in 18 Fraktion à 250 µl von unten nach oben gezapft. Die COPI-Vesikel befinden sich in Fraktionen 7 und 8 bei 40% Saccharose.

10xAP	250 mM HEPES pH 7.2, 25 mM Mg(OAc) ₂
LSSB	50 mM KCl in 1xAP
HSSB	250 mM KCl in 1xAP

2.5.6 Intra-Golgi-Proteintransportassay (Balch et al., 1983)

Ein 25 µl Standard Transportassay besteht aus folgenden Komponenten.

³ [H]-GlcNAc (0.4 µCi)	0.3 µl
10xAssay-Puffer	2.5 µl
H ₂ O	12 µl
Rattenhirnzytosol (3.5 µg/ml)	5 µl
Donor-Membran	2.5 µl
Akzeptor-Membran	2.5 µl

Da das radioaktive GlcNAc in Ethanol gelöst vorliegt, wird dieses zuerst pipettiert und anschließend das Lösungsmittel verblasen. Bei 0°C werden dann Puffer, Wasser und Zytosol hinzugegeben und das GlcNAc darin wieder gelöst. Anstelle des Rattenhirnzytosols kann auch Rinderhirnzytosol verwendet werden. Zum Schluss werden die Golgimembranen hinzugegeben. Die Proben werden kurz gemischt und für zwei Stunden bei 30°C in Wasserbad inkubiert.

Die Reaktionen werden durch Zugabe von 25 µl Stopplösung beendet. Zur Herstellung dieser Lösung werden 1 µl monoklonaler anti-VSV G und 3 µl polyklonaler Ziege-anti-Maus-Antikörper gemischt und für 5 min aggregieren lassen, bevor 25 µl Stopppuffer

hinzugegeben wird. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben filtriert. Hierfür werden 0.45 μM Nitrozellulosefilter zunächst in einer 2.5%igen (w/v) Lösung von Milchpulver in Waschpuffer blockiert und dann zweimal mit jeweils 2.5 ml Waschpuffer gewaschen, bevor die Assays filtriert werden. Danach wird nochmals zweifach mit je 2.5 ml Waschpuffer gewaschen. Abschließend werden die Filter getrocknet und in Scintillationslösung im Scintillationszähler für 2 min gemessen.

10x Assay-Puffer	250 mM HEPES pH 7.0, 150 mM KCl, 25 mM Mg(OAc) ₂ , 0.5 mM ATP, 2.5 mM UTP, 50 mM Kreatinphosphat, 79 U/ml Kreatinphosphatkinase, 100 μM PLMCoA, 400 $\mu\text{g/ml}$ NMK
Stopppuffer	Waschpuffer mit 1% Triton X-100
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA pH 7.65

2.5.7 2-Stufen Intra-Golgi-Transportassay (Porat et al., 2000)

In einem 2-Stufen Intra-Golgi-Transportassay werden zwei Standard Intra-Golgi-Transportassays (Abschnitt VI.2.5.6) miteinander kombiniert. Nach einem ersten Assay (Standardzusammensetzung ohne ³[H]-GlcNAc) mit einer Inkubationszeit von 10 bis 15 min bei Raumtemperatur oder 30°C werden die Assays auf ein 15%iges (w/v) Saccharosekissen geladen und für 15 min bei 14.000 upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation der Proben wird der restliche Überstand abgenommen. Die pelletierten Membranen werden in 67% des ursprünglichen Volumens 30% (w/v) Saccharoselösung resuspendiert. Diese Membransuspension wird in einem zweiten Transportassay unter Standardbedingungen eingesetzt. In beiden Transportassays wird in Abweichung zum Standardprotokoll 30 ng His₆ α SNAP hinzugegeben, da α SNAP bei 2-Stufen Transportassays zum limitierenden Faktor werden kann. Der Einbau von radioaktivem ³[H]GlcNAc in das VSV G-Protein wird wie zuvor beschrieben gemessen.

2.5.8 Glykosylierungsassay nach (Taylor et al., 1994)

Der Glykosylierungsassay wird analog dem unter VI.2.5.6 beschriebenen Intra-Golgi-Transportassay allerdings mit folgenden Unterschieden durchgeführt:

Zum Reaktionsansatz wird kein Zytosol gegeben und es werden nur Golgimembranen von CHO-wt-Zellen verwendet. Die Zellen, aus denen diese Membranen isoliert wurden, sind vorher mit dem VS-Virus infiziert worden und die Isolierung erfolgte zu einem Zeitpunkt, zu dem sich die Hauptmenge des produzierten VSV G-Proteins im Golgi-Apparat befand. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Golgimembranen wurden von Prof. Dr. Z. Elazar

(Weizman Institut, Israel) zur Verfügung gestellt. Bevor die Membranen im Glykosylierungsassay eingesetzt wurden, sind sie mit 1 mM NEM für 15 min auf Eis inkubiert worden, um Intra-Golgi-Transport auszuschließen. Überschüssiges NEM wurde durch Zugabe von 2 mM DTT abgefangen.

2.5.9 Inkubation von Hirnzytosol mit M β CD

Das Hirnzytosol (Ratten- oder Rinderhirnzytosol) wird mit 1 mM M β CD versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wird das Zytosol auf Eis gelagert, bevor es mittels einer 10 ml Spritze durch eine Minigelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia, England) gepresst wird. Die Elution erfolgt mittels 50KTDG-Puffer (siehe Präparation von Rattenhirnzytosol).

2.5.10 Cholesterinextraktion mit M β CD

Golgimembranen werden 1:5 in 1x Assay-Puffer verdünnt und mit 0.5 bis 10 mM Methyl- β -Cyclodextrin für 15 min bis zwei Stunden bei 30°C inkubiert. Die Lösung wird auf ein 15%iges Saccharosekissen in RSA behandelten Eppendorfgefäßen geladen und für 30 min bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet kann zur Cholesterinbestimmung mittels ESI-MS/MS in 1,4-Dioxan aufgenommen werden.

Die Eppendorfgefäße werden zur RSA-Behandlung für eine Stunde mit 10 mg/ml RSA bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die RSA-Lösung wieder vollständig entfernt.

2.5.11 Synthese von M β CD-Cholesterin-Komplexen (Klein et al., 1995)

Zu einer auf 80°C erwärmten M β CD-Lösung (50 mg/ml) in Wasser wird Cholesterin (10mg/ml) gelöst in Methanol/Chloroform (Mischungsverhältnis 2:1) langsam unter kräftigem Schütteln zugetropft. Für eine maximale Beladung des M β CDs mit Cholesterin wird gemäß Abb. 24 250 μ l M β CD-Lösung und 250 μ l Cholesterinlösung verwendet. Der Reaktionsansatz wird weitere 3 h bei 80°C inkubiert und dann für 10 min und 14.000 upm bei Raumtemperatur zentrifugiert, um ausgefallenes Cholesterin abzutrennen. Der Überstand wird zur besseren Trennung von überschüssigem Cholesterin nur zum Teil (ca. 60%) vorsichtig abgenommen, in flüssigem Stickstoff gefroren und in der Speedvac getrocknet, um mögliche Reste organische Lösungsmittel zu entfernen. Der Cholesterin-Cyclodextrin-Komplex wird zum Gebrauch in Wasser gelöst und kann bis dahin bei -80°C gelagert werden.

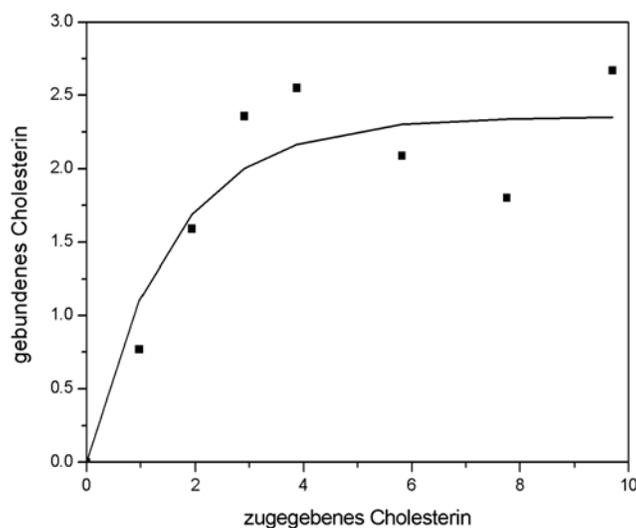


Abb. 24: Korrelation von an M β CD gebundenem Cholesterin und zugegebenem Cholesterin. Zunehmende Mengen Cholesterin (Angaben in μmol) wurden in der Synthese von M β CD-Cholesterin-Komplexen bei einer gleichbleibenden M β CD-Menge von 9.5 μmol eingesetzt. Anschließend wurde der Cholesteringehalt in den Komplexen wie unter VI.1.5.14 beschrieben im Massenspektrometer bestimmt.

2.5.12 Saure Lipidextraktion (Bligh und Dyer, 1959)

Zur Lipidextraktion wurde in 10 ml Glasgefäßen mit teflonbeschichteten Schraubdeckeln zu einem Volumenteil Probe 3.75 Volumenteile Bligh-und-Dyer-Lösung, ein Volumenteil Chloroform und ein Volumenteil Wasser gegeben. Nach Mischen wird für 10 min und 200 g zentrifugiert und die organische Phase abgenommen. Die organische Phase wird mit einem Volumen Wasser und die wässrige Phase mit einem Volumen Chloroform versetzt und jeweils geschüttelt. Wie zuvor wird zentrifugiert und das zur Extraktion der wässrigen Phase verwendete Chloroform wird abschließend nochmals mit Wasser gewaschen, bevor die vereinigten Chloroform-Phasen im Stickstoffstrom verblasen werden. Der Extrakt wird entweder sofort für die massenspektrometrische Lipidbestimmung weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.5.13 PC- und SM-Bestimmungen mittels ESI-MS/MS (Brügger et al., 1997)

Die nach VI.2.5.12 gewonnenen Lipidextrakte werden in Methanol/Chloroform (2:1) aufgenommen, die Standards werden zugegeben und die Lösung mit 100 mM NH_4OAc in Methanol (Endkonzentration 5 mM) angesäuert. im ESI-MS/MS gemessen. Die Proben werden bei 15.000 g für 5 min und 4°C zentrifugiert und der Überstand wird dann im ESI-Massenspektrometer durch Scannen im positiven Modus für Vorläuferionen mit $m/z = 184$

(Phosphocholin-Ion) gemessen. Als Standards werden nicht-natürliche PCs (z.B. 14:0/14:0, 16:0/16:0, 20:0/20:0 und 22:0/22:0) und SMs (z.B. 14:0, 18:1 und 25:0) verwendet.

2.5.14 Cholesterinbestimmung mittels ESI-MS/MS (Sandhoff et al., 1999)

In 0.5 ml Reaktionsgefäßen werden die zu analysierende Probe und 2,2,3,4,4,6-d₆-Cholesterin (Cambridge Isotope Laboratories Inc. MA, USA) oder 3,4-¹³C₂-Cholesterin (Prof. Dr. Lehman DKFZ, Heidelberg) als Standard gemischt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 20 µl Standard (10 µM) gelöst in 1,4-Dioxan und ebenfalls 20 µl Probe mit einer ähnlichen Cholesterinkonzentration verwendet. Die Lösungen werden in der SpeedVac bis zur Trockne eingedampft und anschließend wieder in 50 µl wasserfreiem 1,4-Dioxan aufgenommen. Die Proben werden dabei solange im Ultraschallbad beschallt, bis eventuell vorhandene Pellets zerfallen sind. Anschließend werden die Proben 20 min bei 14.000 upm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. Wieder werden die Proben in der SpeedVac zur Trockne einrotiert, dann mit 25 µl Sulfatierungsreagenz versetzt und gemischt. Das Sulfatierungsreagenz wird frisch durch Lösen von 25 mg Schwefeltrioxid-Pyridin-Addukt in 5 ml wasserfreiem Pyridin in einem ausgeheizten Schlenk-Kolben unter Argonatmosphäre dargestellt. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur werden 2.1 µl einer 713 mM Bariumacetatlösung, was 1.05 Äquivalent entspricht, hinzugegeben und die Lösung gemischt. Die Inkubation wird zunächst für weitere 10 min bei Raumtemperatur und dann für eine Stunde bei 4°C fortgeführt. Dann werden die Proben mit jeweils 120 µl Methanol versetzt, gemischt und für 20 min bei 14.000 upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird dann im ESI-Massenspektrometer durch Scannen im negativen Modus für Vorläuferionen mit m/z = 97 (HSO₄⁻) oder m/z = 80 (SO₃⁻) gemessen.

2.5.15 Etablierung der NAGTI-pH-GFP-CHO-Zelllinie

Mittels der in Abschnitt VI.2.2.6 beschriebenen PCR und den Oligonukleotiden NAGTI-for, NAGTI-rev, GFP-for und GFP-rev (VI.1.4) wurden Restriktionsschnittstellen in die DNA für ratiometrisches pHGFP (BamHI und XhoI) und der N-terminale Domäne der N-Acetylglucosamintransferase I (NAGTI) (HindIII und BamHI) synthetisiert. Nach Restriktionsverdau (VI.2.2.5), DNA-Isolierung (VI.2.2.4.1) und Ligation (VI.2.2.2) in den pcDNA3.1-Vektor, ergaben sich nach Transformation (VI.2.2.1) Bakterienklone mit folgender DNA-Sequenz (Abb. 24).

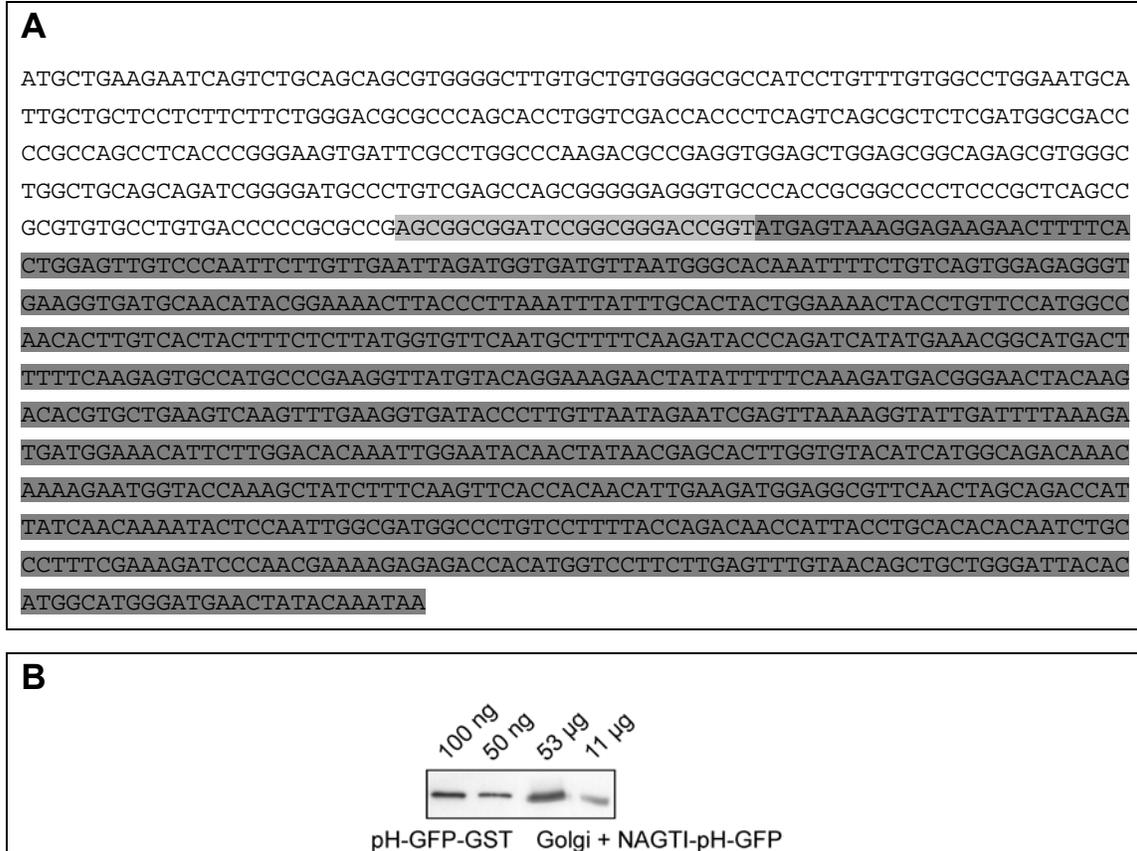


Abb. 24: DNA-Sequenz des NAGTI-pHGFP-Konstrukts und Western Blot von transfizierten Golgimembranen. **A** Die NAGTI-Sequenz (nicht hinterlegt) ist über eine Verbindungssequenz (hellgrau hinterlegt) mit pH-GFP-Sequenz (dunkelgrau hinterlegt) verbunden. **B** Im Western Blot wurden 100 bzw. 50 ng des aufgereinigten, ratiometrischen pH-GFP-GST-Fusionsproteins mit 53 bzw. 11 µg Golgimembranen aus NAGTI-pH-GFP transfizierten CHO-Zellen mittels eines GFP-Antikörpers analysiert.

Mit diesem Konstrukt wurden gemäß Abschnitt VI.2.1.6 CHO-wt-Zellen stabil transfiziert. Die erhaltenen drei Klone (NAGTI-pH-GFP 1, 5 und 13) wurden im FACS (VI.2.1.7), in der Immunfluoreszenz (VI.2.4.2) und im Western Blot (VI.2.3.8 bzw. VI.2.4.1) überprüft.

3 Literaturverzeichnis

- Bagnat, M., S. Keranen, A. Shevchenko, und K. Simons. 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3254-9.
- Balch, W.E., E. Fries, W.H. Dunphy, L.J. Urbani, und J.E. Rothman. 1983. Transport-coupled oligosaccharide processing in a cell-free system. *Methods-Enzymol.*:9837-47.
- Beckers, J.M., und J.E. Rothman. 1992. Transport between Golgi cisternae. *Methods Enzymol.* 219:5-12.
- Benting, J., A. Rietveld, I. Ansorge, und K. Simons. 1999a. Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. *FEBS Lett.* 462:47-50.
- Benting, J.H., A.G. Rietveld, und K. Simons. 1999b. N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol.* 146:313-20.
- Bligh, E.G., und W.J. Dyer. 1959. Lipid Extraction. *Can. J. Biochem. Phys.* 37:911-917.
- Blobel, G., und B. Dobberstein. 1975. Transfer of Proteins Across Membranes. *The Journal of Cell Biology.* 67:835-851.
- Block, M.R., B.S. Glick, C.A. Wilcox, F.T. Wieland, und J.E. Rothman. 1988. Purification of an N-ethylmaleimid-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:7852-6.
- Bowman, W.J., A. Siebers, und K. Altendorf. 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:7972-6.
- Bremser, M., W. Nickel, M. Schweikert, M. Ravazzola, M. Amherdt, C.A. Hughes, T.H. Sollner, J.E. Rothman, und F.T. Wieland. 1999. Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell.* 96:495-506.
- Brown, D.A., und E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* 275:17221-4.
- Brown, D.A., und J.K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68:533-44.
- Brugger, B., G. Erben, R. Sandhoff, F.T. Wieland, und W.D. Lehmann. 1997. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-

- electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:2339-44.
- Brügger, B., R. Sandhoff, S. Wegehingel, K. Gorgas, J. Malsam, J.B. Helms, W.D. Lehmann, W. Nickel, und F.T. Wieland. 2000. Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *J Cell Biol*. 151:507-18.
- Chamberlain, L.H., R.D. Burgoyne, und G.W. Gould. 2001. SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: Implications for the spatial control of exocytosis. *PNAS*. 98:5619-5624.
- Chavrier, P., R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, und M. Zerial. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*. 62:317-29 issn: 0092-8674.
- Cluett, E.B., E. Kuismanen, und C.E. Machamer. 1997. Heterogeneous distribution of the unusual phospholipid semilyso-bisphosphatidic acid through the golgi complex. *Molecular Biology Of The Cell*. Nov. 8:2233-2240.
- Cluett, E.B., und C.E. Machamer. 1996. The envelope of vaccinia virus reveals an unusual phospholipid in Golgi complex membranes. *J Cell Sci*. 109:2121-31.
- Codina, J., R. Gurich, und J. T.D. Dubose. 1999. Peptides from the human transferrin receptor stimulate endosomal acidification via a Gi-type protein. *Kidney Intern*. 55:2376-2382.
- Coxey, R.A., P.G. Pentchev, G. Campbell, und E.J. Blanchette-Mackie. 1993. Differential accumulation of cholesterol in Golgi compartments of normal and Niemann-Pick type C fibroblasts incubated with LDL: a cytochemical freeze-fracture study. *J Lipid Res*. 34:1165-76.
- Demaurex, N., W. Furuya, S. D'Souza, J.S. Bonifacino, und S. Grinstein. 1998. Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J Biol Chem*. 273:2044-51.
- Dermine, J.F., S. Duclos, J. Garin, F. St-Louis, S. Rea, R.G. Parton, und M. Desjardins. 2001. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem*. 276:18507-12.
- Desjardins, M., J.E. Celis, G. van Meer, H. Dieplinger, A. Jahraus, G. Griffiths, und L.A. Huber. 1994. Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem*. 269:32194-200.
- Eberle, H.B., R.L. Serrano, J. Füllekrug, A. Schlosser, W.D. Lehmann, F. Lottspeich, D. Kaloyanova, F.T. Wieland, und J.B. Helms. 2002. Identification and

- Characterization of a novel human plant pathogenesis-related protein that localizes to lipid-enriched microdomains in the Golgi complex. *J. Cell. Sci.* 4:827-838.
- Eckerskorn, C., und F. Lottspeich. 1989. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia.* 28:92-94.
- Elazar, Z., L. Orci, J. Ostermann, M. Amherdt, G. Tanigawa, und J.E. Rothman. 1994. ADP-ribosylation factor and coatamer couple fusion to vesicle budding. *J Cell Biol.* 124:415-24.
- Epand, R.M., S. Maekawa, C.M. Yip, und R.F. Epand. 2001. Protein-induced formation of cholesterol-rich domains. *Biochemistry.* 40:10514-21.
- Esko, J.D. 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 3:805-16.
- Farinas, J., und A.S. Verkman. 1999. Receptor-mediated targeting of fluorescent probes in living cells. *Journal of Biological Chemistry.* 274:7603-7606.
- Feng, Y., und M. Forgac. 1992a. Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle (H⁺)-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *J Biol Chem.* 267:5817-22.
- Feng, Y., und M. Forgac. 1992b. A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification. *J Biol Chem.* 267:19769-72.
- Finbow, M.E., und M.A. Harrison. 1997. The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J.* 324:697-712.
- Frey, D., T. Laux, L. Xu, C. Schneider, und P. Caroni. 2000. Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J Cell Biol.* 149:1443-54.
- Fujimoto, T., H. Kogo, K. Ishiguro, K. Tauchi, und R. Nomura. 2001. Caveolin-2 Is Targeted to Lipid Droplets, a New "Membrane Domain" in the Cell. *J. Biol. Chem.* 152:1079-1086.
- Gagescu, R., N. Demarex, R.G. Parton, W. Hunziker, L.A. Huber, und J. Gruenberg. 2000. The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *MBC.* 11:2775-2791.
- Gerst, J.E. 1999. SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:707-734.
- Gething, M.J., und J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* 355:33-45.

- Gkantiragas, I., B. Brugger, E. Stuken, D. Kaloyanova, X.Y. Li, K. Lohr, F. Lottspeich, F.T. Wieland, und J.B. Helms. 2001. Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol Biol Cell*. 12:1819-33.
- Gkantiragas, J. 2000. Sphingomyelinreiche Mikrodomänen am Golgi-Apparat. *Doktorarbeit*.
- Goldberg, J. 1999. Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell*. 96:893-902.
- Goldberg, J. 2000. Decoding of sorting signals by coatamer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell*. 100:671-9.
- Gommel, D.U., A.R. Memon, A. Heiss, F. Lottspeich, J. Pfannstiel, J. Lechner, C. Reinhard, J.B. Helms, W. Nickel, und F.T. Wieland. 2001. Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *Embo J*. 20:6751-6760.
- Grabe, M., und G. Oster. 2001. Regulation of organelle acidity. *J Gen Physiol*. 117:329-44.
- Grabe, M., H. Wang, und G. Oster. 2000. The mechanochemistry of V-ATPase proton pumps. *Biophys J*. 78:2798-813.
- Grimmer, S., T.G. Iversen, B. van Deurs, und K. Sandvig. 2000. Endosome to Golgi transport of ricin is regulated by cholesterol. *Mol Biol Cell*. 11:4205-16.
- Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:721-30.
- Gu, F., und J. Gruenberg. 2000. ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *J Biol Chem*. 275:8154-60.
- Hauri, H.P., F. Kappeler, H. Andersson, und C. Appenzeller. 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci*. 113:587-96.
- Haynes, M.P., M.C. Phillips, und G.H. Rothblat. 2000. Efflux of cholesterol from different cellular pools. *Biochemistry*. 39:4508-17.
- Helms, J.B. 1995. Role of heterotrimeric GTP binding proteins in vesicular protein transport: indications for both classical and alternative G protein cycles. *FEBS Lett*. 369:84-8.
- Helms, J.B., D. Helms-Brons, B. Brugger, I. Gkantiragas, H. Eberle, W. Nickel, B. Nurnberg, H.H. Gerdes, und F.T. Wieland. 1998. A putative heterotrimeric G protein inhibits the fusion of COPI-coated vesicles. Segregation of heterotrimeric G proteins from COPI-coated vesicles. *J Biol Chem*. 273:15203-8.

- Helms, J.B., D.J. Palmer, und J.E. Rothman. 1993. Two distinct populations of ARF bound to Golgi membranes. *J Cell Biol.* 121:751-60.
- Helms, J.B., und J.E. Rothman. 1992. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature.* 360:352-4.
- Heming, T.A., und A. Bidani. 1995. Effects of myristate phorbol ester on V-ATPase activity and Na(+)-H⁺ exchange in alveolar macrophages. *J Leukoc Biol.* 57:600-8.
- Holthuis, J.C., T. Pomorski, R.J. Raggars, H. Sprong, und G. Van Meer. 2001. The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev.* 81:1689-723.
- Huttner, W.B., und J. Zimmerberg. 2001. Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission. *Curr Opin Cell Biol.* 13:478-84.
- Iino, S., und S. Maekawa. 1999. Immunohistochemical demonstration of a neuronal calmodulin-binding protein, NAP-22, in the rat spinal cord. *Brain Res.* 834:66-73.
- Ikonen, E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.* 13:470-7.
- Ikonen, E., und R.G. Parton. 2000. Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic.* 1:212-7.
- Ikonen, E., und K. Simons. 1998. Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin Cell Dev Biol.* 9:503-9.
- Jamora, C., P.A. Takizawa, R.F. Zaarour, C. Denesvre, D.J. Faulkner, und V. Malhotra. 1997. Regulation of Golgi structure through heterotrimeric G Proteins. *Cell.* 91:617-626.
- Jamora, C., N. Yamanouye, J. Van Lint, J. Laudenslager, J.R. Vandenheede, D.J. Faulkner, und V. Malhotra. 1999. Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell.* 98:59-68.
- Kane, P.M. 1995. Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase *in vivo*. *J Biol Chem.* 270:17025-17032.
- Keller, P., und K. Simons. 1998. Cholesterol Is Required for Surface Transport of Influenza Virus Hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 140:1357-1367.
- Kim, J.H., L. Johannes, B. Goud, C. Antony, C.A. Lingwood, R. Daneman, und S. Grinstein. 1998. Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95:2997-3002.

- Kim, J.H., C.A. Lingwood, D.B. Williams, W. Furuya, M.F. Manolson, und S. Grinstein. 1986. Dynamic measurement of the pH of the Golgi complex in living cells using retrograde transport of the verotoxin receptor. *J. Cell. Biol.* 134(6):1387-99.
- Klein, U., G. Gimpl, und F. Fahrenholz. 1995. Alteration of the Myometrial Plasma Membrane Cholesterol Content with β -Cyclodextrin Modulates the Binding Affinity of the Oxytocin Receptor. *Biochem.* 34:13784-13793.
- Kneen, M., J. Farinas, Y. Li, und A.S. Verkman. 1998. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J.* 74:1591-9.
- Kobayashi, T., F. Gu, und J. Gruenberg. 1998. Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 9:517-526.
- Kornfeld, R., und S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 54:631-64.
- Kreis, T.E. 1986. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J.* 5:931-41.
- Kubler, E., H.G. Dohlman, und M.P. Lisanti. 1996. Identification of Triton X-100 insoluble membrane domains in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Lipid requirements for targeting of heterotrimeric G-protein subunits. *J. Biol. Chem.* 271:32975-80.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lafont, F., P. Verkade, T. Galli, C. Wimmer, D. Louvard, und K. Simons. 1999. Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Mardin-Darby canine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3734-8.
- Lang, T., D. Bruns, D. Wenzel, D. Riedel, P. Holroyd, C. Thiele, und R. Jahn. 2001. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20:2202-2213.
- Lange, Y., M.H. Swaisgood, B.V. Ramos, und T.L. Steck. 1989. Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* 264:3786-93.
- Legesse-Miller, A., Y. Sagiv, A. Porat, und Z. Elazar. 1998. Isolation and characterization of a novel low molecular weight protein involved in intra-Golgi traffic. *J Biol Chem.* 273:3105-9.

- Lesca, G.M., J. Seemann, J. Shorter, J. Vandekerckhove, and G. Warren. 2000. The amino-terminal domain of the golgi protein giantin interacts directly with the vesicle-tethering protein p115. *J Biol Chem.* 275:2831-6.
- Linstedt, A.D., S.A. Jesch, A. Mehta, T.H. Lee, R. Garcia-Mata, D.S. Nelson, and E. Sztul. 2000. Binding relationships of membrane tethering components. The giantin N terminus and the GM130 N terminus compete for binding to the p115 C terminus. *J Biol Chem.* 275:10196-201.
- Lipardi, C., L. Nitsch, and C. Zurzolo. 1999. Mechanisms of apical protein sorting in polarized thyroid epithelial cells. *Biochimie.* 81:347-53.
- Lipardi, C., L. Nitsch, and C. Zurzolo. 2000. Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting. *Mol Biol Cell.* 11:531-42.
- Lippincott, S.J., L.C. Yuan, J.S. Bonifacino, and R.D. Klausner. 1989. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell.* 56:801-13.
- London, E., and D.A. Brown. 2000. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta.* 1508:182-95.
- Maekawa, S., H. Kumanogoh, N. Funatsu, N. Takei, K. Inoue, Y. Endo, K. Hamada, and Y. Sokawa. 1997. Identification of NAP-22 and GAP-43 (neuromodulin) as major protein components in a Triton insoluble low density fraction of rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 1323:1-5.
- Maekawa, S., M. Maekawa, S. Hattori, and S. Nakamura. 1993. Purification and molecular cloning of a novel acidic calmodulin binding protein from rat brain. *J Biol Chem.* 268:13703-9.
- Maekawa, S., Y. Matsuura, and S. Nakamura. 1994. Expression and myristoylation of NAP-22 using a baculovirus transfer vector system. *Biochim Biophys Acta.* 1218:119-22.
- Maekawa, S., C. Sato, K. Kitajima, N. Funatsu, H. Kumanogoh, and Y. Sokawa. 1999. Cholesterol-dependent localization of NAP-22 on a neuronal membrane microdomain (raft). *J Biol Chem.* 274:21369-74.
- Majoul, I., M. Straub, S.W. Hell, R. Duden, and H.D. Soling. 2001. KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell.* 1:139-53.

- Malhotra, V., T. Serafini, L. Orci, J.C. Shepherd, und J.E. Rothman. 1989. Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*. 58:329-36.
- Malsam, J., D. Gommel, F.T. Wieland, und W. Nickel. 1999. A role for ADP ribosylation factor in the control of cargo uptake during COPI-coated vesicle biogenesis. *FEBS Lett*. 462:267-72.
- Mansour, S.J., J. Skaug, X.H. Zhao, J. Giodano, S.W. Scherer, und P. Melancon. 1999. p200 ARF-GEP1: a Golgi-localized guanine nucleotide exchange protein whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:7968-73.
- Mayor, S., S. Sabharanjak, und F.R. Maxfield. 1998. Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *Embo Journal*. 17:4626-4638.
- McNew, J.A., F. Parlati, R. Fukuda, R.J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T.H. Sollner, und J.E. Rothman. 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature*. 407:153-9.
- Melancon, P., B.S. Glick, V. Malhotra, P.J. Weidman, T. Serafini, M.L. Gleason, L. Orci, und J.E. Rothman. 1987. Involvement of GTP-binding "G" proteins in transport through the Golgi stack. *Cell*. 51:1053-62.
- Miesenböck, G., D.A. De Angelis, und J.E. Rothman. 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *nature*. 394:192-195.
- Mineo, C., und R.G. Anderson. 1996. A vacuolar-type proton ATPase mediates acidification of plasmalemmal vesicles during potocytosis. *Exp Cell Res*. 224:237-42.
- Moffet, S., D.A. Brown, und M.E. Lindner. 2000. Lipid-dependent Targeting of G Proteins into Rafts. *Journal of Biological Chemistry*. 275:2191-2198.
- Moriyama, Y., und N. Nelson. 1989. H⁺-translocating ATPase in Golgi apparatus. Characterization as vacuolar H⁺-ATPase and its subunit structures. *J Biol Chem*. 264:18445-50.
- Mosevitsky, M.I., J.P. Capony, G. Skladchikova, V.A. Novitskaya, A. Plekhanov, und V.V. Zakharov. 1997. The BASP1 family of myristoylated proteins abundant in axonal termini. Primary structure analysis and physico-chemical properties. *Biochimie*. 79:373-84.
- Mosevitsky, M.I., V.A. Novitskaya, A. Plekhanov, und G. Skladchikova. 1994. Neuronal protein GAP-43 is a member of novel group of brain acid-soluble proteins (BASPs). *Neurosci Res*. 19:223-8.

- Müller, O., M.J. Bayer, C. Peters, J.S. Andersen, M. Mann, und A. Mayer. 2002. The Vtc proteins in vacuolar fusion: coupling NSF activity to V_0 trans-complex formation. *Embo J.* 21:259-269.
- Muniz, M., und H. Riezman. 2000. Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *Embo J.* 19:10-5.
- Muroi, M., N. Shiragami, K. Nagao, M. Yamasaki, und A. Takatsuki. 1993. Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of V-ATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. *Cell Struct Funct.* 18:139-49.
- Nelson, N. 1992. The vacuolar H(+)-ATPase--one of the most fundamental ion pumps in nature. *J Exp Biol.* 172:19-27.
- Nelson, R.D., X.L. Guo, K. Masood, D. Brown, M. Kalkbrenner, und S. Gluck. 1992. Selectively amplified expression of an isoform of the vacuolar H(+)-ATPase 56-kilodalton subunit in renal intercalated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3541-5.
- Nichols, B.J., A.K. Kenworthy, R.S. Polishchuk, R. Lodge, T.H. Roberts, K. Hirschberg, R.D. Phair, und J. Lippincott-Schwartz. 2001. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol.* 153:529-41.
- Nickel, W., J. Malsam, K. Gorgas, M. Ravazzola, N. Jenne, J.B. Helms, und F.T. Wieland. 1998. Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J Cell Sci.* 111:3081-90.
- Nickel, W., T. Weber, J.A. McNew, F. Parlati, T.H. Sollner, und J.E. Rothman. 1999. Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12571-6.
- Nickel, W., und F.T. Wieland. 1998. Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem Cell Biol.* 109:477-486.
- Nishi, T., und M. Forgac. 2002. The Vacuolar (H⁺)-ATPases - Nature's Most Versatile Proton Pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:94-103.
- Nordstrom, T., S. Grinstein, G.F. Brisseau, M.F. Manolson, und O.D. Rotstein. 1994. Protein kinase C activation accelerates proton extrusion by vacuolar-type H(+)-ATPases in murine peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* 350:82-6.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250:4007-21.

- Ohtani, Y., T. Irie, K. Uekama, K. Fukunaga, und J. Pithia. 1989. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrin on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 186:17-22.
- Orci, L., V. Malhotra, M. Amherdt, T. Serafini, und J.E. Rothman. 1989. Dissection of a Single Round of Vesicular Transport: Sequential Intermediates for Intercisternal Movement in the Golgi Stack. *Cell.* 56:357-368.
- Orci, L., R. Montesano, P. Meda, F. Malaisse-Lagae, D. Brown, A. Perrelet, und P. Vassalli. 1981. Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. *PNAS.* 78:293-297.
- Orci, L., A. Perrelet, und J.E. Rothman. 1998. Vesicles on strings: morphological evidence for processive transport within the Golgi stack. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2279-83.
- Ostermeyer, A.G., J.M. Paci, Y. Zeng, D.M. Lublin, S. Munro, und D.A. Brown. 2001. Accumulation of Caveolin in the Endoplasmatic Reticulum Redirects the Protein to Lipid Droplets. *J. Cell Biol.* 152:1071-78.
- Pagano, R.E., M.A. Sepanski, und O.C. Martin. 1989. Molecular trapping of a fluorescent ceramide analogue at the Golgi apparatus of fixed cells: interaction with endogenous lipids provides a trans-Golgi marker for both light and electron microscopy. *J Cell Biol.* 109:2067-79.
- Palade, G.E. 1953. Fine structure of blood capillaries. *J - Appl. Physics.* 24:1424.
- Palokangas, H., K. Metsikko, und K. Vaananen. 1994. Active vacuolar H⁺ATPase is required for both endocytic and exocytic processes during viral infection of BHK-21 cells. *J Biol Chem.* 269:17577-85.
- Palokangas, H., M. Ying, K. Vaananen, und J. Saraste. 1998. Retrograde transport from the pre-Golgi intermediate compartment and the Golgi complex is affected by the vacuolar H⁺-ATPase inhibitor bafilomycin A1. *Mol Biol Cell.* 9:3561-78.
- Parlati, F., T. Weber, J.A. McNew, B. Westermann, T.H. Sollner, und J.E. Rothman. 1999. Rapid and efficient fusion of phospholipid vesicles by the alpha-helical core of a SNARE complex in the absence of an N-terminal regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12565-70.
- Pelham, H.R.B., und J.E. Rothman. 2000. The Debate about Transport in the Golgi-Two Sides of the Same Coin? *Cell.* 102:713-719.
- Pepperkok, R., J.A. Whitney, M. Gomez, und T.E. Kreis. 2000. COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J Cell Sci.* 113:135-44.

- Peters, C., M.J. Bayer, S. Buhler, J.S. Andersen, M. Mann, und A. Mayer. 2001. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature*. 409:581-8.
- Peyroche, P.A., B. Antonny, S. Ronineau, J. Acher, J. Cherfils, und C.L. Jackson. 1999. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol. Cell*. 3:275-85.
- Pol, A., R. Luetterforst, M. Lindsay, S. Heino, E. Ikonen, und R.G. Parton. 2001. A Caveolin Dominant Negative Mutant Associates with Lipid Bodies and Induces Intracellular Cholesterol Imbalance. *J. Biol. Chem.* 152:1057-1070.
- Porat, A., und Z. Elazar. 2000. Regulation of intra-Golgi membrane transport by calcium. *J Biol Chem*. 275:29233-7.
- Porat, A., Y. Sagiv, und Z. Elazar. 2000. A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport. *J Biol Chem*. 275:14457-65.
- Prydz, K., und K. Simons. 2001. Cholesterol depletion reduces apical transport capacity in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem J*. 357:11-5.
- Puglielli, L., A. Rigotti, A.V. Greco, M.J. Santos, und F. Nervi. 1995. Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 270:18723-6.
- Radhakrishnan, A., T.G. Anderson, und H.M. McConnell. 2000. Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:12422-7.
- Rapoport, T.A., K.E. Matlack, K. Plath, B. Misselwitz, und O. Staack. 1999. Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem*. 380:1143-50.
- Reinhard, C., C. Harter, M. Bremser, B. Brugger, K. Sohn, J.B. Helms, und F. Wieland. 1999. Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:1224-8.
- Reinhart, M.P., J.T. Billheimer, J.R. Faust, und J.L. Gaylor. 1987. Subcellular localization of the enzymes of cholesterol biosynthesis and metabolism in rat liver. *J Biol Chem*. 262:9649-55.
- Rinia, H.A., und B. de Kruijff. 2001. Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett*. 504:194-9.

- Rinia, H.A., M.M. Snel, J.P. van der Eerden, und B. de Kruijff. 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 501:92-6.
- Rodal, S.K., G. Skretting, O. Garred, F. Vilhardt, B. van Deurs, und K. Sandvig. 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* 10:961-74.
- Rothman, J.E., und F.T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science.* 272:227-34.
- Rozelle, A.L., L.M. Machesky, M. Yamamoto, M.H. Driessens, R.H. Insall, M.G. Roth, K. Luby-Phelps, G. Marriott, A. Hall, und H.L. Yin. 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol.* 10:311-20.
- Sandhoff, R., B. Brugger, D. Jeckel, W.D. Lehmann, und F.T. Wieland. 1999. Determination of cholesterol at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res.* 40:126-32.
- Schapiro, F.B., und S. Grinstein. 2000. Determinants of the pH of the Golgi complex. *J Biol Chem.* 275:21025-32.
- Schnitzer, J.E., P. Oh, und D.P. McIntosh. 1996. Role of GTP Hydrolysis in Fission of Caveolae Directly from Plasma Membranes. *Science.* 274:239-242.
- Schroeder, F., A.M. Gallegos, B.P. Atshaves, S.M. Storey, A.L. McIntosh, A.D. Petrescu, H. Huang, O. Starodub, H. Chao, H. Yang, A. Frolov, und A.B. Kier. 2001. Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp Biol Med (Maywood).* 226:873-90.
- Schutz, G.J., G. Kada, V.P. Pastushenko, und H. Schindler. 2000. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *Embo J.* 19:892-901.
- Seemann, J., E.J. Jokitalo, und G. Warren. 2000. The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo. *Mol Biol Cell.* 11:635-45.
- Serafini, T., L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R.A. Kahn, und J.E. Rothman. 1991. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell.* 67:239-53.
- Shima, D.T., K. Haldar, R. Pepperkok, R. Watson, und G. Warren. 1997. Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells. *J Cell Biol.* 137:1211-28.

- Simons, K., und E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. Jun. 387:569-572.
- Simons, K., und E. Ikonen. 2000. How cells handle cholesterol. *Science*. 290:1721-6.
- Simons, K., und G. van Meer. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. 27:6197-202 issn: 0006-2960.
- Smart, E.J., Y. Ying, W.C. Donzell, und R.G. Anderson. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem*. 271:29427-35.
- Sohn, K., L. Orci, M. Ravazzola, M. Amherdt, M. Bremser, F. Lottspeich, K. Fiedler, J.B. Helms, und F.T. Wieland. 1996. A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol*. 135:1239-48.
- Stevens, T.H., und M. Forgac. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:779-808.
- Strittmater, S.M., D. Valenzuela, T.E. Kennedy, E.J. Neer, und M.C. Fishman. 1990. Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature*. 334:836-841.
- Strittmater, S.M., D. Valenzuela, Y. Sudo, M.E. Linder, und M.C. Fishman. 1991. An Intracellular Guanine Nucleotide Release Protein for G_o. *J. Biol. Chem*. 266:22465-22471.
- Stuermer, C.A., D.M. Lang, F. Kirsch, M. Wiechers, S.O. Deininger, und H. Plattner. 2001. Glycosylphosphatidyl Inositol-anchored Proteins and fyn Kinase Assemble in Noncaveolar Plasma Membrane Microdomains Defined by Reggie-1 and -2. *Mol Biol Cell*. 12:3031-45.
- Szafer, E., E. Pick, M. Rotman, S. Zuck, I. Huber, und D. Cassel. 2000. Role of coatomer and phospholipids in GTPase-activating protein-dependent hydrolysis of GTP by ADP-ribosylation factor-1. *J Biol Chem*. 275:23615-9.
- Szafer, E., M. Rotman, und D. Cassel. 2001. Regulation of GTP hydrolysis on ADP-ribosylation factor-1 at the Golgi membrane. *J Biol Chem*. 9:9.
- Tanigawa, G., L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, J.B. Helms, und J.E. Rothman. 1993. Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol*. 123:1365-71.
- Taylor, T.C., M. Kanstein, P. Weidman, und P. Melancon. 1994. Cytosolic ARFs are required for vesicle formation but not for cell-free intra-Golgi transport: Evidence for coated vesicle-independent transport. *Mol Biol Cell*. 5:237-252.

- Thiele, C., M.J. Hannah, F. Fahrenholz, und W.B. Huttner. 1999. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol.* 2:42-49.
- Tooze, S.A., G.J. Martens, und W.B. Huttner. 2001. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* 11:116-22.
- Uittenbogaard, A., Y.S. Ying, und E.J. Smart. 1998. Characterization of a cytosolic heat-shock protein caveolin chaperone complex - Involvement in cholesterol trafficking. *Journal Of Biological Chemistry.* 273:6525-6532.
- Umemoto, N., T. Yoshihisa, R. Hirata, und Y. Anraku. 1990. Roles of the vma3 gene product, subunit c of the vacuolar membrane H⁺-ATPase on vacuolar acidification and protein transport. *J Biol Chem.* 265:18447-18453.
- Ungermann, C., W. Wickner, und Z. Xu. 1999. Vacuole Acidification is required for trans-SNARE pairing, LMA1 release and homotypic fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11194-11199.
- van Deurs, B., P.K. Holm, und K. Sandvig. 1996. Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells. *Eur J Cell Biol.* 69:343-50.
- van Hille, B., H. Richener, D.B. Evans, J.R. Green, und G. Bilbe. 1993. Identification of two subunit A isoforms of the vacuolar H(+)-ATPase in human osteoclastoma. *J. Biol. Chem.* 268:7075-80.
- van Meer, G. 1993. Transport and sorting of membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol.* 5:661-73.
- Wada, Y., Y. Ohsumi, und Y. Anraku. 1992. Genes for directing vacuolar morphogenesis in *Saccharomyces cerevisia*: isolation and characterization of two classes of vam mutants. *J Biol Chem.* 267:18665-18670.
- Wang, Y., C. Thiele, und W.B. Huttner. 2000. Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic.* 1:952-62.
- Wattenberg, B.W., und J.E. Rothman. 1986. Multiple cytosolic components promote intra-Golgi protein transport. Resolution of a protein acting at a late stage, prior to membrane fusion. *J. Biol. Chem.* 261:2208-13.
- Weber, T., B.V. Zemelman, J.A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T.H. Sollner, und J.E. Rothman. 1998. SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell.* 92:759-772.

- Widmer, F., und P. Caroni. 1990. Identification, localization, and primary structure of CAP-23, a particle-bound cytosolic protein of early development. *J Cell Biol.* 111:3035-47.
- Wilson, D.W., M.J. Lewis, und H.R. Pelham. 1993. pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J Biol Chem.* 268:7465-8.
- Wu, M.M., M. Grabe, S. Adams, R.Y. Tsien, H.-P.H. Moore, und T.E. Machen. 2001. Mechanisms of pH Regulation in the Regulated Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* 276:33027-33035.
- Yamaguchi, T., A. Yamamoto, A. Furuno, K. Hatsuzawa, K. Tani, M. Himeno, und M. Tagaya. 1997. Possible involvement of heterotrimeric G proteins in the organization of the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* 272:25260-25266.
- Yilla, M., A. Tan, K. Ito, K. Miwa, und H.L. Ploegh. 1993. Involvement of the vacuolar H(+)-ATPases in the secretory pathway of HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 268:19092-100.
- Ying, M., T. Flatmark, und J. Saraste. 2000. The p58-positive pre-golgi intermediates consist of distinct subpopulations of particles that show differential binding of COPI and COPII coats and contain vacuolar H(+)-ATPase. *J Cell Sci.* 113:3623-38.
- Zhao, L., J.B. Helms, B. Brugger, C. Harter, B. Martoglio, R. Graf, J. Brunner, und F.T. Wieland. 1997. Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:4418-23.
- Zhao, L., J.B. Helms, J. Brunner, und F.T. Wieland. 1999. GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatomer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem.* 274:14198-203.

VII Abkürzungsverzeichnis

a	Adenin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BASP1	<i>Brain Acid Soluble Protein 1</i>
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaar
c	Cytosin
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
Coatomer	<i>coat protomer</i>
COP	<i>coat protein</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DMEM	<i>Dubecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
g	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GEF	<i>guanosinnucleotide exchange factor</i>
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GSH	Glutathion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'(γ -thio)-triphosphat
GIC	<i>Golgi derived insoluble complex</i>
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IC	<i>intermediate compartment</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-galaktosid
kDa	Kilodalton
KLH	<i>Keyhole Lymphlet Hemocyanin</i>
M	Molar
MEM	<i>minimal essential medium</i>
min	Minute
m/z	Masse pro Ladung
α -CD	α -Cyclodextrin
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin

NAP-22	<i>neuronal tissue-enriched acidic protein 22 kDa</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NRK	<i>normal rat kidney</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimid-sensitive fusion protein</i>
OD	optische Dichte
OAc	Acetat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
Pipes	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PLMCoA	Palmitoyl-Coenzym A
PVDF	Polyvinylidendifluoriden
RSA	Rinderserum-Albumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
SM	Sphingomyelin
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>SNAP receptor</i>
t	Thymidin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Trishydroxyaminomethan
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitat-Monolaureat
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
VSV G	G-Protein des VSV
v/v	Volumenverhältnis
wt	Wildtyp
w/v	Gewichts-Volumenverhältnis

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

VIII Danksagung

Diese Arbeit wurde von Februar 1998 bis April 2002 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. T. Wieland durchgeführt und unter der Anleitung von Dr. J. B. Helms angefertigt. Prof. Dr. Wieland gilt mein Dank für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Dr. Helms möchte ich für die vielen Diskussionen, Ideen und seine Hilfestellungen danken. Neben der fachlichen Hilfe möchte ich mich aber auch für die menschlichen Aspekte der Zusammenarbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. I. Sinning danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt allen derzeitigen und früheren Mitgliedern der GIC-Gruppe, als da wären Heike, Kirk, Ioannis, Leo, Xueyi und Dora. Die Gruppe war ein tolles Team, in dem die Arbeit einfach Spass gemacht hat.

Ohne die tatkräftige Hilfe von Amir Porat wäre diese Arbeit nicht entstanden. Auch Prof. Dr. Z. Elazar und seiner Gruppe möchte ich für die überwältigende Gastfreundschaft und die außerordentliche Hilfe in allen Belangen des Intra-Golgi-Transports danken.

Dr. Roger Sandhoff und Dr. Britta Brügger möchte ich für die Hilfe bei den Cholesterinbestimmungen und allen Fragen zum ESI danken. Dr. Britta Brügger und Dr. Liyun Zhao danke ich ferner für die PC- bzw. SM-Bestimmungen.

Prof. Dr. F. Lottspeich gilt mein Dank für die Übernahme der Mikrosequenzierung zur Identifikation der vakuolären ATPase und von NAP-22.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Dr. Rainer Pepperkok vom EMBL und Dr. Eva-Maria Emig danke ich für die Einführung in und die Hilfe bei den Experimenten mit dem VS tsO45 Virus an Vero-Zellen.

Dr. Blanche Schwappach und Dr. Angelika Kehlenbach vom ZMBH danke ich für ihren Einsatz und die Hilfe mit den FACS-Messungen.

Den Mitarbeitern des 3. OG des BZH und insbesondere der gesamten Wieland-Gruppe gilt mein Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit auch bei den nicht wissenschaftlichen Aktivitäten.

Frau Adrian danke ich für die Unterstützung bei meinen Experimenten und Frau Weiß danke ich für die Hilfe in allen Belangen der Zellkultur.

Prof. Dr. G. Warren danke ich für die Bereitstellung des NAGTI-GFP-Konstrukts und Dr. Gero Miesenböck für die pH-sensitiven GFP-Konstrukte.

Meinen Eltern gilt mein besonderer Dank. Ohne sie wäre ich heute nicht das, was ich bin und diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die Liebe und Geduld.