

# INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Diplom-Chemiker Dominik Nikolaus Wegmann  
aus Freiburg im Breisgau

Tag der mündlichen Prüfung:

# **Identifizierung und Charakterisierung neuer Isotypen des Hüllprotein-Komplexes Coatomer**

Gutachter: Prof. Dr. Felix Wieland  
Prof. Dr. Michael Brunner

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>I Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1 Der sekretorische Weg .....	1
2 Vesikeltypen.....	3
2.1 COPII-Vesikel.....	3
2.2 COPI-Vesikel .....	3
2.3 Clathrin-umhüllte Vesikel .....	3
3 Aufbau und Bildung von COPI-Vesikeln .....	5
4 Die Coatomer-Untereinheiten (COPs) .....	7
5 Die neuen Untereinheiten $\gamma$ 2- und $\zeta$ 2-COP.....	9
6 Zielsetzung der Doktorarbeit.....	10
<b>II Ergebnisse.....</b>	<b>11</b>
1 Herstellung von Antisera gegen $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP.....	11
2 Klonierung von $\zeta$ 2-COP aus mhAT <sub>3</sub> -Zellen.....	12
3 Überexpression und Aufreinigung von rekombinantem His <sub>6</sub> - $\zeta$ 1- und His <sub>6</sub> - $\zeta$ 2-COP .....	14
4 Rückfaltung von His <sub>6</sub> - $\zeta$ 1- und His <sub>6</sub> - $\zeta$ 2-COP .....	15
5 Spezifität der Antikörper gegen $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP .....	16
6 Sensitivität der $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-spezifischen Antikörper.....	17
7 Expression von $\zeta$ 2-COP <i>in vivo</i> .....	18
8 Expression von $\zeta$ 2-COP in verschiedenen Organen .....	19
9 Stöchiometrie von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP im Maus-Leberzytosol.....	20
10 Immunpräzipitation mit $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörpern .....	22
11 Analyse der $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2-COP-Kombination im Coatomer-Komplex.....	23
12 Analyse der $\zeta$ 2-/ $\gamma$ -COP-Kombination .....	24
13 Analyse der $\zeta$ 1- $\gamma$ -COP-Kombinationen .....	25
14 Bindung von Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen von p24-Familien- mitgliedern.....	27
14.1 Vergleich der Affinität von $\gamma$ 1- und $\gamma$ 2-COP-Coatomer.....	27
14.2 Bindung von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP Coatomer an p24-Familienmitglieder .....	29
15 $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP in COPI-Vesikeln.....	31
16 Lokalisation von endogenem $\zeta$ 2-COP in Ratten-Hepatozyten .....	33

16.1 Kolokalisation von $\zeta$ 2-COP mit CM1 .....	34
16.2 Kolokalisation von $\zeta$ 2-COP mit KDEL-Rezeptor (KDEL-R) .....	36
16.3 Kolokalisation von $\zeta$ 2-COP mit GM130.....	37
16.4 Kolokalisation von $\zeta$ 2-COP mit TGN 38.....	38
16.5 Vergleich der Lokalisation von $\zeta$ 2-COP und HA- $\gamma$ 2 .....	39
16.6 Zusammenfassung der Immunfluoreszenz-Ergebnisse .....	40
<b>III Diskussion .....</b>	<b>42</b>
1 Charakterisierung von $\zeta$ 2-COP auf translationeller Ebene .....	42
2 Architektur von Coatomer.....	45
3 Funktion von $\zeta$ 2-COP .....	47
<b>IV Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>V Material.....</b>	<b>53</b>
1 Chemikalien .....	53
2 Peptide.....	53
3 Antikörper .....	53
3.1 Primärantikörper.....	53
3.2 Sekundärantikörper .....	54
4 Protein-Molekulargewichtsstandards .....	54
5 Primer .....	55
6 Plasmide .....	56
7 DNA-Größenstandards.....	56
8 Bakterienstämme.....	57
9 Zelllinien .....	57
10 Proteaseinhibitoren.....	57
11 Gewebezytosole .....	58
12 Rattenleber-Golgi.....	58
<b>VI Methoden.....</b>	<b>59</b>
1 Agarosegelelektrophorese .....	59
2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	59
3 Isolierung von PCR-Produkten und Plasmidfragmenten .....	59
4 Klonierung von $\zeta$ 2-COP aus mhAT <sub>3</sub> F-Zellen.....	60
4.1 Isolierung von mRNA aus mhAT <sub>3</sub> F-Zellen .....	60
4.2 Reverse Transkription der mRNA.....	61
4.3 PCR aus der mhAT <sub>3</sub> F-cDNA mit $\zeta$ 2-Primern.....	61
4.4 Ligation des PCR-Produkts in den pGEM-T-Vektor .....	62
4.5 Vermehrung und Reinigung des $\zeta$ 2-pGEM-T-Plasmids .....	63

---

5 Herstellung verschiedener $\zeta$ 2-COP-Konstrukte.....	63
5.1 PCR aus $\zeta$ 2-pGEM-T-Plasmid.....	63
5.2 Restriktionsverdau und Ligation.....	64
5.3 Vermehrung der Konstrukt-Plasmide in DH5 $\alpha$ -Zellen.....	64
6 DNA-Sequenzierung.....	64
7 Expression von N-His- $\zeta$ 1- und N-His- $\zeta$ 2-COP in <i>E. coli</i> .....	65
7.1 Überexpression.....	65
7.2 Aufschluss der Zellen mit Ultraschall.....	65
8 Reinigung von His <sub>6</sub> - $\zeta$ 1- und His <sub>6</sub> - $\zeta$ 2-COP unter denaturierenden Bedingungen.....	66
9 Rückfaltung von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP durch Dialyse.....	67
10 Herstellung von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörpern.....	67
11 Affinitätsreinigung der $\zeta$ 2-rb- und $\zeta$ 2-gp-Antikörper.....	68
12 Immunpräzipitation.....	68
13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	69
13.1 Stammlösungen.....	69
13.2 Trenngele.....	70
13.3 Sammelgele.....	70
13.4 Probenvorbereitung.....	71
13.5 TCA-Präzipitation aus Rattenleberzytosol.....	71
14 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	72
14.1 Coomassie-Färbung.....	72
14.2 Silberfärbung.....	72
15 Western Blot.....	73
15.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen ( <i>semi dry</i> ).....	73
15.2 Immunochemischer Nachweis auf PVDF-Membranen.....	73
16 Amidoschwarzfärbung von Nitrocellulose-Membranen.....	74
17 Quantitative Proteinbestimmungen.....	74
17.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	74
17.2 Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951).....	75
18 Isolierung von Coatomer aus Kaninchenleber und Rinderhirn.....	76
18.1 Verwendete Puffer.....	76
18.2 Gewinnung von Rinderhirn oder Kaninchenleberzytosol.....	77
18.3 Ammoniumsulfatpräzipitation.....	77
18.4 DEAE-Anionenaustauscherchromatographie des Ammoniumpräzipitats.....	78
18.5 SourceQ-Anionenaustauscherchromatographie des DEAE-Pools.....	78
18.6 Konzentrierung von Coatomer aus dem SourceQ-Pool.....	78
19 Stöchiometrie von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP im Mausleberzytosol.....	79
20 Analyse der Expression von $\zeta$ 2-COP in verschiedenen Organen.....	79
21 Analyse der $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2-COP-Kombination.....	80

---

22 Analyse der $\zeta 2$ -/ $\gamma$ -COP-Kombination .....	80
23 Analyse der $\zeta 1$ -/ $\gamma$ -COP-Kombinationen .....	80
23.1 $\zeta 2$ -COP-Depletion .....	80
23.2 Analyse des Überstands auf $\zeta 2$ -COP .....	81
23.3 Immunpräzipitation aus dem $\zeta 2$ -depletierten Zytosol mit dem $\beta^{\prime}$ -Antikörper .....	81
23.4 Immunpräzipitation aus dem $\zeta 2$ -depletierten Zytosol mit dem $\zeta 1$ -R-Antikörper .....	81
23.5 Western Blot .....	82
24 Coatomer-Bindung an p24-Familienmitglieder .....	82
24.1 Kopplung der Peptide .....	82
24.2 Bindung von Coatomer aus Rattenleberzytosol an Peptidsepharose .....	83
24.3 Bindung von Rinderhirn-Coatomer .....	84
25 COPI-Vesikelpräparation nach Serafini et al. ....	84
26 Immunfluoreszenz von $\gamma 1$ -HA/ $\gamma 2$ -HA-Zellen .....	86
<b>VII Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>VIII Danksagung .....</b>	<b>97</b>

# Abkürzungsverzeichnis

## Abkürzungen

AP	Adaptor-Komplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
BSA	Rinderserumalbumin
CGN	<i>cis</i> -Golgi-Netzwerk
Coatomer	<i>coat proatomer</i>
COP	<i>coat protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERGIC	ER-Golgi-intermediäres-Kompartiment
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTP-Hydrolyse aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanosinnukleotid-Austausch-Faktor
GMP-PNP	Guanosin-5'-[ $\beta$ , $\gamma$ -imido]-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
i.d.	Innendurchmesser
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton
MW	Molekulargewicht
NP-40	Nonidet-P40
OAc	Azetat
OD	optische Dichte

---

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Unit (Enzymaktivität)
w/v	Gewicht/Volumenverhältnis
w/w	Gewichtsverhältnis
WB	Western Blot

### Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin



# I Einleitung

## 1 Der sekretorische Weg

Eukaryontische Zellen besitzen eine Vielzahl membranumgrenzter Kompartimente. Durch diese topologische Trennung wird eine Spezialisierung der einzelnen Kompartimente bzw. Organellen auf bestimmte Funktionen ermöglicht. Eine Spezialisierung der Organellen setzt aber auch einen gezielt gesteuerten Transport der entsprechenden Proteine und Lipide nach ihrer Biosynthese an ihren Bestimmungsort voraus. Sind solche Prozesse gestört, können lebensnotwendige Funktionen der Zellen und damit auch eines ganzen Organismus nicht mehr aufrecht erhalten werden. Es gibt Beispiele, bei denen die Störung solcher Prozesse auf autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörungen zurückzuführen sind, wie z. B. Mukoviszidose (Welsh, M.J. und Smith, A.E., 1995) und Mucopolysaccharidose II, die auch als I-Zell Krankheit (I bedeutet *inclusion*) bezeichnet wird (Amara, J. et al., 1992).

Sekretorische Proteine wie z. B. Antikörper, Hormone, Kollagen sowie Membranproteine wie z. B. Rezeptoren oder Ionenporter werden während ihrer Biosynthese direkt in die Membran oder in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) translokiert. Von dort treten sie ihre gezielte Reise über den Golgi-Apparat bis zu ihrem Bestimmungsort an. Palade und Mitarbeiter beschrieben erstmals einen derart gerichteten Transport für pankreatisch exokrine Zellen der sog. Langerhans-Inseln (Palade, G., 1975).

Startpunkt für den Transport aller Membranproteine und sekretorischen Proteine ist das ER. Das ER bildet das größte Endomembransystem und erstreckt sich über die ganze Zelle. Das ER lässt sich morphologisch in drei Teilbereiche unterteilen: Die Kernmembran, das rauhe ER und das glatte ER. Die Bezeichnung rauhes ER beruht auf den membrangebundenen Ribosomen. Wie gelangt nun aber ein neu synthetisiertes Protein an die ER-Membran? Die Synthese eines Proteins startet am Ribosom. Aufgrund einer hydrophoben Signalsequenz der sich neu bildenden Polypeptidkette bindet diese an ein Signalerkennungspartikel (SRP, *signal recognition particle*) und wird zusammen mit dem Ribosom an die ER-Membran transportiert. Über mehrere Schritte wird die wachsende Polypeptidkette nach ihrer Rekrutierung in das Lumen des ER translokiert. (Wilkinson, B.M. et al., 1997; Kalies, K.U. und Hartmann, E., 1998). Sobald die Polypeptidkette das Lumen erreicht, übernehmen Chaperone des ER die Kontrolle und Steuerung der korrekten Faltung des entstehenden Proteins (Bukau, B. und Horwich, A.L., 1998). Im Lumen des ER erhalten die Proteine auch ihre ersten co- und posttranslationalen Modifikationen. Es können die Ausbildung von Disulfidbrücken (Gething, M.J. und Sambrook, J., 1992) oder das Anhängen von Oligosaccharyl-Seitenketten an Asparaginreste (N-glykosidisch) erfolgen (Abeijon, C. und Hirschberg, C.B., 1992). Proteine, die

richtig gefaltet sind und die Qualitätskontrolle des ER passiert haben, werden weiter zum Golgi-Apparat transportiert.

Auf dem Weg zum Golgi-Apparat passieren die Proteine zunächst das ER-Golgi-intermediäre-Kompartiment (ERGIC). Das ERGIC wird auch als 15 °C Kompartiment (Saraste, J. und Kuismanen, E., 1984) oder auch als VTCs (*tubular vesicular clusters*) (Balch, W.E. et al., 1994) bezeichnet. Die Bezeichnung 15 °C Kompartiment ist auf morphologische Studien mit Zellen zurückzuführen, die mehrere Stunden bei 15 °C gehalten wurden. Bei dieser Temperatur reicherten sich bestimmte sekretorische Proteine in einem Bereich in nächster Nähe zum Golgi-Apparat an, konnten diesem aber nicht zugeordnet werden (Saraste, J. und Kuismanen, E., 1984; Schweizer, A. et al., 1990). Das ERGIC lässt sich über die Marker Rab2, eine kleine GTPase (Chavrier, P. et al., 1990; Tisdale, E.J. und Balch, W.E., 1996) und über das intrazelluläre Lectin ERGIC-53/p58 charakterisieren (Saraste, J. et al., 1987; Schweizer, A. et al., 1988; Schindler, R. et al., 1993). Obwohl immer noch diskutiert wird, ob das ERGIC ein eigenständiges Kompartiment ist, wird inzwischen allgemein akzeptiert, dass es als Sortierungsstation sowohl im anterograden als auch im retrograden Transport eine Rolle spielen kann (Aridor, M. et al., 1995; Scales, S.J. et al., 1997; Tisdale, E.J. et al., 1997).

Nachdem ein sekretorisches Protein das ERGIC passiert hat, tritt es in den Golgi-Apparat auf seiner sogenannten *cis*-Seite ein. Man nennt diesen Bereich auch *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN). Das Protein wird anschließend über den *cis*- und *medial*- zum *trans*-Golgi transportiert. Der Golgi-Apparat lässt sich morphologisch durch seinen stapelförmigen Aufbau von abgeflachten Zisternen charakterisieren. *Cis*- und *trans*-Golgi-Netzwerk bestehen abhängig vom Zelltyp aus mehr oder weniger verzweigten tubulo-vesikulären Strukturen. In einer Zelle können 1 bis 100 Golgi-Stapel mit bis zu 20 Zisternen vorliegen (Rambourg, A. und Clermont, Y., 1997). *Cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi lassen sich auch biochemisch unterscheiden, da die Proteine, während sie den Golgi durchwandern, nach einer festgelegten Reihenfolge posttranslational modifiziert werden. Die Enzyme, durch welche die Modifikationen erfolgen, haben ihren festen Platz innerhalb des Golgi-Apparats und können daher als Marker dienen. Die Modifikationen bestehen aus dem Anhängen von O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharyl-Seitenketten, der Modifikation der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide und der Sulfatierung. Als Marker für den *cis*-Golgi kann die GlcNac-Phosphotransferase (Kornfeld, R. und Kornfeld, S., 1985), für den *medial*-Golgi die GlcNac-Transferase I (Dunphy, W.G. et al., 1985) und für den *trans*-Golgi die Sialyltransferase (Roth, J. et al., 1985) oder die Tyrosylprotein-Sulfotransferase (Huttner, W.B., 1988) dienen. Im *trans*-Golgi-Netzwerk verlassen die sekretorischen Proteine, nachdem sie entsprechend ihres Bestimmungsorts (Endosomen, Lysosomen oder Plasmamembran) sortiert wurden, den Golgi-Apparat (Griffiths, G. und Simons, K., 1986; Matter, K. und Mellman, I., 1994).

Der Transport innerhalb des sekretorischen Weges wird in allen eukaryontischen Organismen über proteinumhüllte Vesikel vermittelt. Hüllproteine werden an der Donor-Membran aus dem Zytosol rekrutiert. Ihre Assemblierung führt zu einer Einschnürung und letztendlich

zur Abknospung von Vesikeln. Die Vesikel wandern zu ihrer Zielmembran und verschmelzen mit dieser, nachdem sie ihre Hülle verloren haben. Bei der Verschmelzung mit der Zielmembran wird auch ihre Fracht wieder frei gesetzt (Rothman, J.E. und Wieland, F.T., 1996). Es konnten bisher drei Vesikeltypen näher charakterisiert werden:

## 2 Vesikeltypen

### 2.1 COPII-Vesikel

COPII-Vesikel (COP, *coat proatomer*) haben einen Durchmesser von 60-65 nm und vermitteln den Transport vom ER zum ERGIC. Sie lokalisieren daher hauptsächlich am ER (Barlowe, C. et al., 1994), (Barlowe, C., 1998). Ihre Hülle besteht aus der kleinen GTPase Sar1p (Nakano, A. und Muramatsu, M., 1989; Barlowe, C. et al., 1993) sowie den Sec23p- und Sec13p-Komplexen (Hicke, L. et al., 1992; Pryer, N.K. et al., 1993; Salama, N.R. et al., 1993).

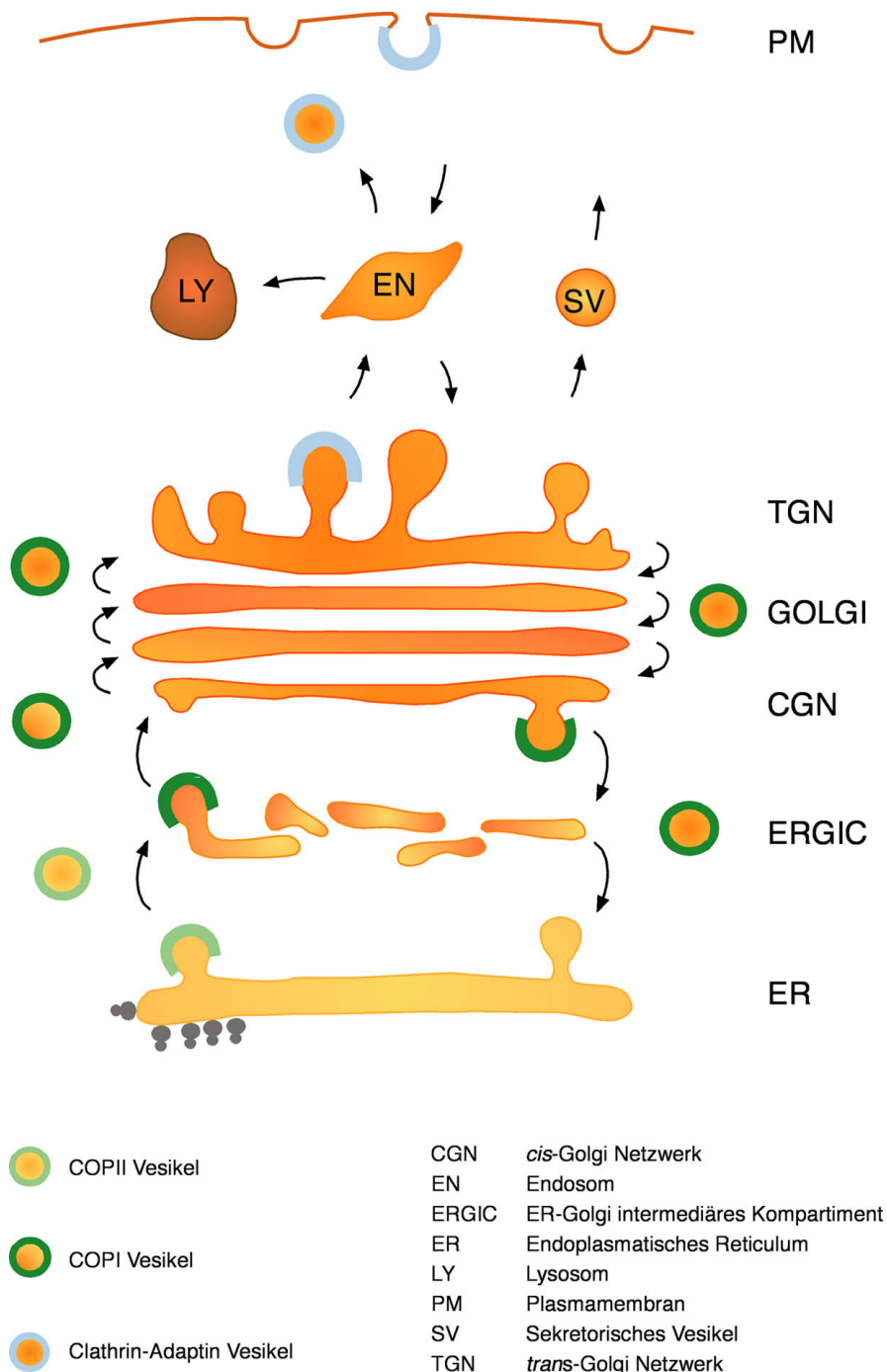
### 2.2 COPI-Vesikel

COPI-Vesikel haben einen Durchmesser von 80 nm und eine 10-18 nm dicke Proteinhülle (Orci, L. et al., 1986). Sie sind an mehreren Schritten des frühen sekretorischen Transports beteiligt und spielen eine Rolle im anterograden Transport zwischen ERGIC und Golgi (Lowe, M. und Kreis, T.E., 1998; Shima, D.T. et al., 1999). Ebenso sind sie verantwortlich für den Transport innerhalb des Golgi-Apparats sowie für den Rücktransport von Proteinen und Lipiden vom Golgi zum ER (Nickel, W. et al., 1998a; Harter, C. und Reinhard, C., 2000). Die Proteinhülle von COPI-Vesikeln besteht aus zwei Komponenten, der kleinen GTPase ARF1 (*ADP-ribosylation factor1*) (Serafini, T. et al., 1991a) und dem heterooligomeren Proteinkomplex Coatomer. Dieser Komplex besteht aus den sieben Untereinheiten  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und  $\zeta$ -COP (Waters, M.G. et al., 1991; Stenbeck, G. et al., 1992a; Stenbeck, G. et al., 1992b; Harrison-Lavoie, K.J. et al., 1993; Stenbeck, G. et al., 1993).

### 2.3 Clathrin-umhüllte Vesikel

Clathrin-umhüllte Vesikel vermitteln den Transport von Vesikeln im späten sekretorischen Transportweg zwischen TGN und späten Endosomen bzw. Lysosomen sowie zwischen frühen Endosomen und Plasmamembran (Mellman, I., 1996). Die Hülle dieser Vesikel besteht aus Clathrin und – abhängig vom Zielort – aus verschiedenen Adaptorkomplexen (AP) (Schmid, S.L., 1997; Hirst, J. und Robinson, M.S., 1998). Clathrin ist ein Proteinkomplex, der aus drei leichten und drei schweren Ketten besteht, die zusammen ein Triskelion bilden (Ungewickell, E. und Branton, D., 1981). Mehrere dieser Triskelien setzen sich zu einer regelmäßigen käfigartigen Struktur auf der Oberfläche der Vesikel zusammen. Die Adaptorkomplexe dienen sowohl der Clathrin-Rekrutierung an die Membran als auch der

Sortierung von Frachtmolekülen. Die Adaptorkomplexe AP1, AP3 und AP4 vermitteln z. B. den Transport vom TGN zu späten Endosomen oder Lysosomen, AP2 von der Plasmamembran zu den Endosomen (Boehm, M. und JS., B., 2001). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über alle Transportprozesse.



**Abb. 1. Modell des vesikulären Transports entlang des Sekretionswegs einer Säugerzelle.** (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Constanze Reinhard). Der Export vom ER zum ERGIC erfolgt in COPII-umhüllten Vesikeln. Der Transport vom ERGIC zum CGN - dem Eingang des Golgi Apparates - sowie der Transport innerhalb des Golgi wird von COPI-umhüllten Vesikeln übernommen. COPI-Vesikel sind auch am retrograden Transport innerhalb des Golgi zum ER involviert. Der Transport vom TGN - dem Ausgang des Golgis - kann abhängig von der Fracht von verschiedenen Vesikeltypen (z. B. Clathrin-AP1-Vesikeln) ausgeführt werden.

### 3 Aufbau und Bildung von COPI-Vesikeln

Wie bereits oben erwähnt, besteht die Proteinhülle von COPI-Vesikeln aus ARF1 und dem heterooligomeren Proteinkomplex Coatomer. Beide Proteine kommen im Zytoplasma als lösliche Proteine vor. Zur Bildung eines COPI-Vesikels müssen sie zuerst an die Donor-Membran rekrutiert werden.

Die kleine, monomere GTPase ARF1 gehört zu den niedermolekularen G-Proteinen der Ras-Familie und wurde ursprünglich als Co-Faktor der ADP-Ribosylierung von heterotrimeren G-Proteinen durch das Cholera-Toxin entdeckt (Kahn, R.A. und Gilman, A.G., 1986).

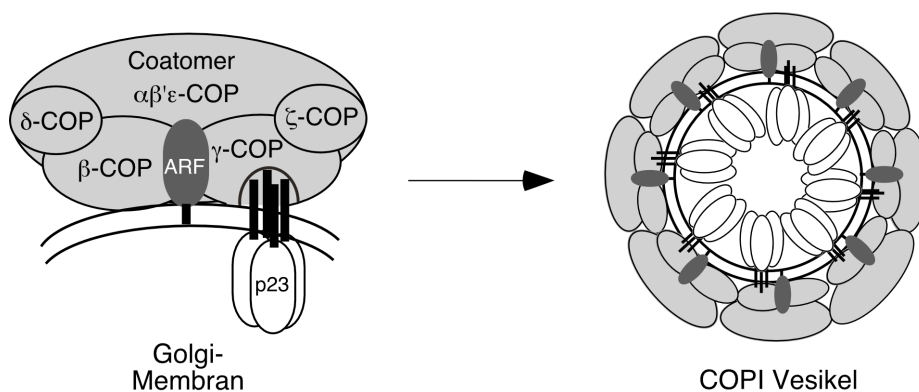
ARF1 kommt in der Zelle löslich oder membranassoziiert vor. In seiner löslichen Form hat ARF das Nukleotid GDP gebunden. Sein N-terminaler Myristyl-Rest ist in dieser Form im Inneren des Proteins verborgen (Donaldson, J.G. und Klausner, R.D., 1994). Bei der Bildung von COPI-Vesikeln kommt es zunächst zu einer Rekrutierung von ARF-GDP an die zytoplasmatische Domäne des Typ I Transmembranproteins p23 (Gommel, D. et al., 2001). Dies ermöglicht an der Membran den GEF-katalysierten (*guanin nucleotide exchange factor*) Austausch von GDP durch GTP (Chardin, P. et al., 1996; Peyroche, A. et al., 1996). Der GDP/GTP-Austausch bewirkt eine Konformationsänderung von ARF. Der zuvor noch verborgene Myristyl-Rest klappt heraus und verankert sich in der Membran (Kahn, R.A. und Gilman, A.G., 1986; Goldberg, J., 1998). Es kommt zur Dissoziation von p23 und ARF-GTP. ARF-GTP, in seiner membran-gebundenen Form, rekrutiert nun wiederum Coatomer an die Donor-Membran (Donaldson, J.G. et al., 1992; Palmer, D.J. et al., 1993), was durch die Interaktion mit der  $\gamma$ -COP-, und der  $\beta$ -COP-Untereinheit von Coatomer vermittelt wird (Zhao, L. et al., 1997; Zhao, L.Y. et al., 1999).

Ein zusätzlicher Coatomer-Rezeptor ist das Membranprotein p23 (Sohn, K. et al., 1996). p23 ist ein Golgi-lokalisiertes Transmembranprotein und gehört zur Gruppe der p24-Familienmitglieder. Bisher wurden sechs Proteine dieser Gruppe im Säugetier identifiziert (Emery, G. et al., 1999; Kaiser, C., 2000). Alle Proteine dieser Gruppe sind Typ I-Transmembranproteine und werden durch eine große luminal Domäne, eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne charakterisiert. Typisch für die p24-Familienmitglieder p23, p24, p25 und p27 ist die Bildung von heterooligomeren Komplexen (Belden, W.J. und Barlowe, C., 1996; Dominguez, M. et al., 1998; Gommel, D. et al., 1999; Marzioch, M. et al., 1999; Jenne, N. et al., 2002).

Bei der Bildung von COPI-Vesikeln wird p23 in diesen angereichert und liegt im Verhältnis 4:1 zu Coatomer vor (Sohn, K. et al., 1996). Die zytoplasmatische Domäne von p23 trägt ein dibasisches KKXX-ähnliches KKXXX-Motiv am C-Terminus. ER-residente Transmembranproteine tragen dieses KKXX-Motiv als Retentionssignal, um zu verhindern, dass sie aus dem ER entkommen (Nilsson, T. et al., 1989; Jackson, M.R. et al., 1990). Dieses Motiv, das in der Lage ist Coatomer zu binden, sorgt auch dafür, dass entkommene Proteine

wieder vom Golgi ins ER zurücktransportiert werden (Jackson, M.R. et al., 1993; Gaynor, E.C. et al., 1994; Townsley, F.M. und Pelham, H., 1994). Die Fähigkeit von KKXX-Motiven, Coatomer zu binden, lieferte den ersten Hinweis auf die Beteiligung von COPI-Vesikeln am retrograden Transport (Cosson, P. und Letourneur, F., 1994; Letourneur, F. et al., 1994). In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Coatomer mit der gleichen Effizienz an p23 rekrutiert wird wie an KKXX-Motive. Dabei stellte sich heraus, dass für die effiziente Coatomer-Bindung von p23 noch ein weiteres Motiv aus der zytoplasmatischen Domäne notwendig ist, nämlich die beiden konservierten Phenylalanine in Position -8 und -9 (Fiedler, K. et al., 1996; Sohn, K. et al., 1996). Außer p23 interagieren auch die zytoplasmatischen Domänen von p24 und p25 mit Coatomer (Dominguez, M. et al., 1998; Goldberg, J., 2000). Photocrosslinking-Experimente ergaben, dass nur die Coatomer-Untereinheit  $\gamma$ -COP mit den zytoplasmatischen Domänen von p23 und Wbp1, einer Untereinheit eines ER-residenten Transmembranproteins aus der Hefe, interagiert (Harter, C. et al., 1996; Harter, C. und Wieland, F.T., 1998).

Die zytoplasmatischen Domänen mehrerer p23-Proteine können Tetramere ausbilden. Diese Tetramere sind nicht nur in der Lage, Coatomer zu binden, sie lösen auch eine Konformationsänderung von Coatomer aus. Diese Konformationsänderung von Coatomer konnte auch an COPI-Vesikeln gezeigt werden (Reinhard, C. et al., 1999). Nach unserem Modell folgt auf die bivalente Interaktion von Coatomer mit Oligomeren der p24-Familie und ARF-GTP eine Konformationsänderung des Coatomer-Komplexes. Diese Konformationsänderung ist dann die treibende Kraft zur Ausstülpung der Membran und der Abschnürung eines COPI-Vesikels (Abbildung 2).



**Abb. 2.** Modell für die Bildung eines COPI-Vesikels an der Golgi-Membran. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Walter Nickel). ARF-GDP wird zunächst durch p23 an die Membran rekrutiert und bindet nach Austausch von GDP durch GTP über den Myristyl-Rest an die Membran. Anschließend bindet Coatomer in einer bivalenten Interaktion an ARF-GTP über die  $\gamma$ - und die  $\beta$ -Untereinheit und an ein Tetramer von p24-Familienmitgliedern über die  $\gamma$ -Untereinheit. Die Konformationsänderung von Coatomer führt zur Ausstülpung der Membran und zur Abschnürung eines COPI-Vesikels.

## 4 Die Coatomer-Untereinheiten (COPs)

Der heterooligomere Coatomer-Komplex besteht wie bereits erwähnt aus den sieben Untereinheiten  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und  $\zeta$ -COP (COP steht für *coat protoomer*). Ein Coatomer-Komplex enthält sowohl in seiner zytosolischen als auch in seiner membranassoziierten Form nur eine Kopie jeder Untereinheit. Der Komplex weist nach Assemblierung eine sehr hohe Stabilität auf. Es konnte auch im heptameren Komplex kein Austausch der einzelnen Untereinheiten beobachtet werden (Lowe, M. und Kreis, T.E., 1995). Nur die kleinste Untereinheit  $\zeta$ -COP konnte bisher als einzige Untereinheit monomer im Zytosol nachgewiesen werden (Kuge, O. et al., 1993). Bei der Charakterisierung der Architektur von Coatomer mittels *two-hybrid*-Analyse wurde eine Interaktion von  $\alpha$ - mit  $\epsilon$ -COP,  $\alpha$ - mit  $\beta'$ -COP,  $\gamma$ - mit  $\zeta$ -COP und  $\beta$ - mit  $\delta$ -COP nachgewiesen (Faulstich, D. et al., 1996). Durch reversible Dissoziation mit Dimethylmaleinsäureanhydrid (DMMA) konnten Teilkomplexe von nativem Coatomer erzeugt werden. DMMA bewirkt eine Umpolung der positiv geladenen Lysin-Seitenketten und führt damit zur Zerstörung von Quartärstrukturen unter milden Bedingungen und Bewahrung der Tertiärstruktur. Diese Teilkomplexe wurden durch die Kombinationen  $\alpha/\beta'/\epsilon$ ,  $\gamma/\zeta$  und  $\beta/\delta$  definiert (Pavel, J. et al., 1998), was die Ergebnisse des *two hybrid screens* bestätigte. Das fehlende Bindeglied zum Verständnis der Architektur des Gesamtkomplexes waren die Interaktionen, durch welche die Teilkomplexe zum Gesamtkomplex assembliert werden. Diese wurden durch weitere *two hybrid screens* wie folgt identifiziert (Eugster, A. et al., 2000): Der  $\beta/\delta$ -Teilkomplex wird mit dem  $\alpha/\epsilon/\beta'$ -Teilkomplex über eine  $\beta/\alpha$ - und  $\beta/\beta'$ -Wechselwirkung verbunden. Der  $\gamma/\zeta$ -Teilkomplex interagiert mit dem  $\alpha/\epsilon/\beta'$ -Teilkomplex über eine  $\gamma/\beta'$ - und die  $\gamma/\epsilon$ -Bindung (Eugster, A. et al., 2000). Außerdem ergab diese Studie, dass der trimere Teilkomplex  $\alpha/\epsilon/\beta'$  zusätzlich zu  $\alpha/\epsilon$  und  $\alpha/\beta'$  durch die Wechselwirkung  $\beta'/\epsilon$  stabilisiert wird. All diese Experimente zeigten keinen Hinweis einer direkten Interaktion des  $\beta/\delta$ - mit dem  $\gamma/\zeta$ -Subkomplex. Im folgenden werden die bisher bekannten Daten der sieben Untereinheiten zusammengefasst.

Die größte Untereinheit ist  $\alpha$ -COP mit 135 kDa (Faulstich, D. et al., 1996). Das Hefe-Homologe von  $\alpha$ -COP ist das Protein Ret1 (Letourneur, F. et al., 1994; Gerich, B. et al., 1995). Bestimmte Mutationen von Ret1 bewirkten Störungen im ER-Golgi-Rücktransport (Letourneur, F. et al., 1994) und in der Sekretion (Ret = *retrieval*) (Wuestehube, L.J. et al., 1996). Die Depletion von Ret1 in der Hefe ist letal. Dies gilt mit Ausnahme von  $\epsilon$ -COP auch für alle anderen COPs. Die Aminosäuresequenz von  $\alpha$ -COP weist sechs Wiederholungen des WD40-Motivs in der N-terminalen Region auf. Ein WD40-Motiv ist 40 Aminosäuren lang und seine Wiederholung kann zu propellerförmigen Strukturen führen (Neer, E.J. et al., 1994; Garcia-Higuera, I. et al., 1998; Eugster, A. et al., 2000).

Die Untereinheiten  $\beta$ ,  $\beta'$  und  $\gamma$ -COP werden aufgrund ihrer Masse auch unter der Bezeichnung 100-kDa-Familie zusammengefasst.  $\beta$ -COP, mit seinem Hefe-Homologen Sec26 (sec

für *secretion*), hat eine Masse von 105 kDa (Duden, R. et al., 1991; Serafini, T. et al., 1991b; Duden, R. et al., 1994). Es bildet, wie oben erwähnt, einen Teilkomplex mit  $\delta$ -COP. Bindungsstudien ergaben, dass dieser Teilkomplex als kleinste Einheit ARF-GTP-abhängig an Golgi-Membranen rekrutiert wird (Pavel, J. et al., 1998). Außerdem zeigt  $\beta$ -COP eine Homologie mit den großen  $\beta$ - und  $\beta'$ -Untereinheiten der Adaptine.  $\beta'$ -COP, mit dem Hefe-Homolog Sec27, hat ein Molekulargewicht von 102 kDa (Harrison-Lavoie, K.J. et al., 1993; Harter, C. et al., 1993; Stenbeck, G. et al., 1993; Duden, R. et al., 1994). Es kommt zusammen mit  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -COP in einem Teilkomplex vor und weist im N-terminalen Bereich fünf Wiederholungen des WD40-Motivs auf (Harrison-Lavoie, K.J. et al., 1993; Stenbeck, G. et al., 1993; Faulstich, D. et al., 1996).

Die meisten Daten wurden bisher von der 97 kDa großen Untereinheit  $\gamma$ -COP mit ihrem Hefe-Homologen Sec21 gesammelt. (Hosobuchi, M. et al., 1992; Stenbeck, G. et al., 1992b). Auch bei  $\gamma$ -COP besteht eine Verwandtschaft mit der großen  $\gamma$ -Untereinheit der Adaptine (Eugster, A. et al., 2000; Boehm, M. und JS., B., 2001). Wie bereits erwähnt, ergaben Interaktionsstudien, dass  $\gamma$ - und  $\zeta$ -COP einen Teilkomplex bilden. Einen wichtigen funktionellen Hinweis ergaben Photocrosslinking-Experimente, in denen eine exklusive Interaktion von  $\gamma$ -COP mit den zytoplasmatischen Domänen von p23 und Wbp1 gezeigt wurde (Harter, C. et al., 1996; Harter, C. und Wieland, F.T., 1998). Daraufhin wurden Bindungsstudien mit einem Tetramer der zytoplasmatischen Domäne von p23 durchgeführt. Dieses Tetramer induzierte eine Konformationsänderung in  $\gamma$ -COP (Reinhard, C. et al., 1999). Nach unserem Modell ist die Konformationsänderung die treibende Kraft bei der Einstülpung und Abschnürung der Membran. Als weiterer Interaktionspartner von  $\gamma$ -COP wurde in Photocrosslinking-Experimenten die GTPase ARF identifiziert (Zhao, L. et al., 1997; Zhao, L.Y. et al., 1999).

Die 57 kDa große Untereinheit  $\delta$ -COP (Faulstich, D. et al., 1996) ist mit der  $\mu$ -Untereinheit der Adaptine verwandt (Boehm, M. und JS., B., 2001). Eine Mutante des Hefe-Homologen Ret2 zeigt genau wie auch  $\alpha$ -COP Störungen des retrograden Transports (Cosson, P. et al., 1996).

Die einzige nicht essentielle Coatomer-Untereinheit in Hefe ist das 36 kDa große Protein  $\epsilon$ -COP (Hara-Kuge, S. et al., 1994) Das Hefe-Homologe ist Sec28 (Duden, R. et al., 1998). Die Depletion von  $\epsilon$ -COP führt jedoch zu einer Degradation von  $\alpha$ -COP und einer kürzeren Halbwertszeit von Coatomer (Duden, R. et al., 1998; Kimata, Y. et al., 1999).

Die kleinste Coatomer-Untereinheit  $\zeta$ -COP mit seinem Hefe-Homologen Ret3 (Cosson, P. et al., 1996) hat eine Masse von 20 kDa (Kuge, O. et al., 1993).  $\zeta$ -COP bildet zusammen mit  $\gamma$ -COP einen Teilkomplex (Pavel, J. et al., 1998) und wurde in Gelfiltrationsexperimenten als einzige Coatomer-Untereinheit monomer nachgewiesen (Kuge, O. et al., 1993).  $\zeta$ -COP weist außerdem eine Homologie zu den  $\sigma$ -Adaptinen auf.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über alle Coatomer-Untereinheiten.



**Tabelle 1.** Die Untereinheiten des Coatomer-Komplexes. (Die fettgedruckten COPs bei „Interaktionen“ stehen für die starken Interaktionen innerhalb eines Teilkomplexes)

Untereinheit	MW	Chromosom	Aminosäuren	Hefehomolog	Eigenschaften/Interaktion
$\alpha$ -COP	140 kDa	1	1223	Ret1p	WD-40 repeats/ <b><math>\beta'</math></b> -, <b><math>\epsilon</math></b> -, $\beta$ -COP
$\beta$ -COP	107 kDa	11	953	Sec26p	<b><math>\delta</math></b> -, $\alpha$ -, $\beta'$ -COP, ARF1
$\beta'$ -COP	102 kDa	3	905	Sec27p	WD-40 repeats/ <b><math>\epsilon</math></b> -, <b><math>\alpha</math></b> -, $\beta$ -, $\gamma$ -COP
$\gamma$ -COP	97 kDa	3	873	Sec21p	<b><math>\zeta</math></b> -, $\epsilon$ -, $\beta'$ -COP, ARF1, KKXX, p24-Familie
$\delta$ -COP	57 kDa	11	510	Ret2p	<b><math>\beta</math></b> -COP
$\epsilon$ -COP	35 kDa	19	308	Sec28p	<b><math>\alpha</math></b> -, <b><math>\beta'</math></b> -, $\gamma$ -COP
$\zeta$ -COP	20 kDa	12	177	Ret3p	<b><math>\gamma</math></b> -COP

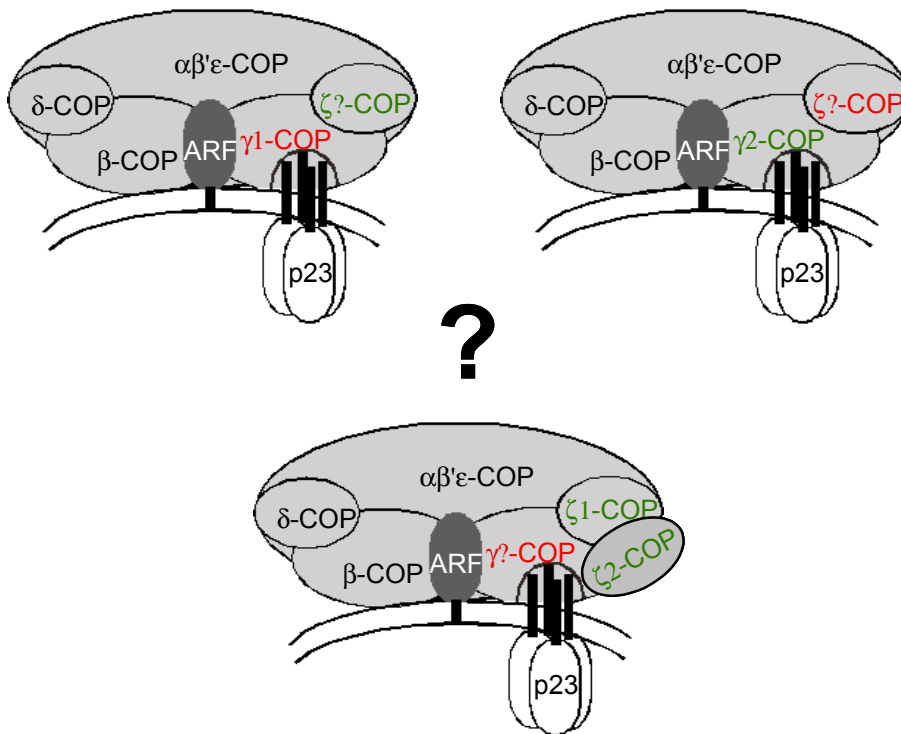
## 5 Die neuen Untereinheiten $\gamma_2$ - und $\zeta_2$ -COP

Bei der Identifizierung eines neuen imprimierten Genclusters auf dem humanen Chromosom-7 wurde ein Gen gefunden, das eine Homologie von 80% zu der Coatomer-Untereinheit  $\gamma$ -COP (in der Maus) aufwies. Das Gen wurde daher in Analogie dazu mit  $\gamma_2$ -COP und die bereits bekannte Untereinheit  $\gamma$ -COP mit  $\gamma_1$ -COP bezeichnet (Blagitko, N. et al., 1999). Auf transkriptioneller Ebene wurde  $\gamma_2$ -COP ubiquitär nachgewiesen. In Studien zur Protein-Expression wurde gezeigt, dass  $\gamma_2$ -COP in verschiedenen Spezies exprimiert wird und Bestandteil des Coatomer-Komplexes ist. Außerdem wurde eine ubiquitäre Verteilung von  $\gamma_2$ -COP beobachtet (Hess, P., 2001). Durch metabolische Markierung von Zellen mit anschließender Immunpräzipitation von Coatomer wurde der Anteil von  $\gamma_2$ -COP am Gesamt- $\gamma$ -COP-Pool auf 30% bestimmt. Außerdem zeigte sich, dass in einem Coatomer-Komplex nur eine der beiden  $\gamma$ -COP-Untereinheiten enthalten ist. Erste funktionelle Studien ergaben, dass  $\gamma_2$ -COP im klassischen COPI-Vesikel *budding assay* im Vergleich zu  $\gamma_1$ -COP bevorzugt in COPI-Vesikel eingebaut wird (Baier, C., 2002).

Auch für  $\zeta$ -COP wurde eine neue Isoform identifiziert (Futatsumori, M. et al., 2000). Diese wurde in Anlehnung an die  $\gamma$ -COP-Nomenklatur mit  $\zeta_2$ -COP, die bereits bekannte  $\zeta$ -COP-Untereinheit mit  $\zeta_1$ -COP bezeichnet. Der ORF des  $\zeta_2$ -COP-Gens kodiert für ein putatives Protein von 23,5 kDa. Zu Beginn dieser Arbeit war  $\zeta_2$ -COP nur auf *northern blot*-Ebene nachgewiesen worden (Futatsumori, M. et al., 2000).

## 6 Zielsetzung der Doktorarbeit

Bisher war man davon ausgegangen, dass der Coatomer-Komplex sieben verschiedene Untereinheiten enthält und dass jede Untereinheit nur in einer Kopie vorhanden ist. Auch die Untersuchung der neuen  $\gamma$ -COP-Isoform  $\gamma 2$ -COP auf translationeller Ebene ergab eine Exklusivität von  $\gamma 1$ - oder  $\gamma 2$ -COP im Coatomer-Komplex. Es stellte sich nun die Frage, ob dies auch für die neue  $\zeta$ -COP-Isoform  $\zeta 2$ -COP gilt. Da die neue  $\zeta 2$ -COP-Untereinheit bisher nur auf *northern blot*-Ebene nachgewiesen worden war, bestand eine wichtige Voraussetzung zur weiteren Untersuchung darin, spezifische Antikörper gegen  $\zeta 2$ -COP herzustellen. Mit diesen Antikörpern sollte die Expression von  $\zeta 2$ -COP auf translationaler Ebene analysiert werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob  $\zeta 2$ -COP, genau wie  $\zeta 1$ -COP, Bestandteil von Coatomer ist und ob ein Coatomer-Komplex, analog zu  $\gamma 1$ - und  $\gamma 2$ -COP, immer nur eines der beiden  $\zeta$ -COPs enthält. Wie bereits erwähnt, ist es möglich, Coatomer in Teilkomplexe zu zerlegen. Einer dieser Teilkomplexe wurde durch die Kombination  $\gamma/\zeta$  definiert. Es sollte daher außerdem untersucht werden, in welchen Kombinationen  $\zeta 2$ -COP mit  $\zeta 1$ -,  $\gamma 1$ - und  $\gamma 2$ -COP vorkommt. Abgesehen von Fragestellungen, welche die Architektur von Coatomer betreffen, sollten funktionelle Studien in Bezug auf  $\zeta 1$ - und  $\zeta 2$ -COP durchgeführt werden. Deshalb wurden Lokalisations-Untersuchungen in der Immunfluoreszenz und die Analyse von  $\zeta 2$ -COP im klassischen COPI-Vesikel *budding assay* geplant.



**Abb. 3.** Mögliche Coatomer-Komplex-Zusammensetzungen. Ist  $\zeta 2$ -COP Bestandteil der Coatomer-Komplexe? Wenn ja, welches sind die Kombinationen von  $\zeta 1$ -,  $\zeta 2$ -,  $\gamma 1$ - und  $\gamma 2$ -COP in den Komplexen?

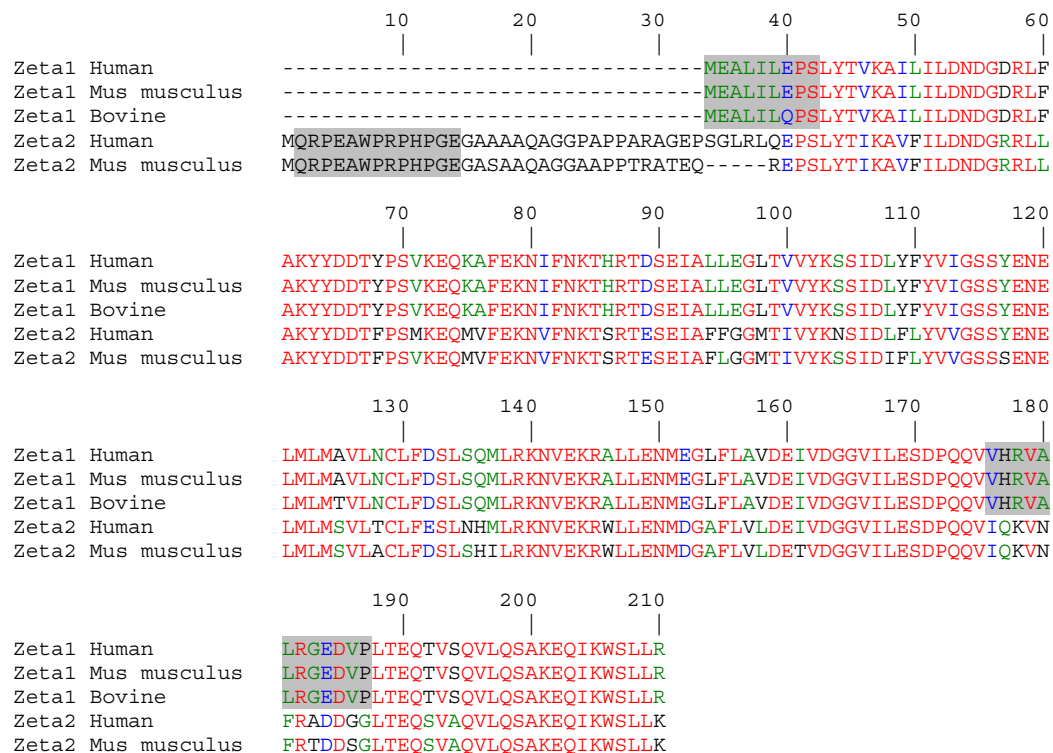
## II Ergebnisse

### 1 Herstellung von Antisera gegen $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP

Ausgangspunkt dieser Arbeit war, dass  $\zeta$ 2-COP auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden konnte (Futatsumori, M. et al., 2000). Um Expression und Funktion von endogenem  $\zeta$ 2-COP zu untersuchen, wurden spezifische Antisera gegen  $\zeta$ 2- und  $\zeta$ 1-COP benötigt.

Abbildung 4 zeigt eine Ausrichtung der Proteinsequenzen von  $\zeta$ 2- gegen  $\zeta$ 1-COP von Mensch, Rind und Maus.  $\zeta$ 2-COP des Menschen besitzt einen 33 Aminosäuren langen und  $\zeta$ 2-COP der Maus einen 28 Aminosäuren langen N-terminalen Überhang. Auffällig ist der hohe Gehalt an Prolin im Überhang von  $\zeta$ 2-COP. (8 Prolin pro 33 Aminosäuren (Mensch) bzw. 6 Prolin pro 28 Aminosäuren (Maus)). Im C-terminalen, überlappenden Bereich weisen  $\zeta$ 2- und  $\zeta$ 1-COP eine Identität von 74% auf.

Für die Herstellung spezifischer Antisera gegen  $\zeta$ 2-COP wurden zwei Kaninchen und ein Meerschweinchen mit einem synthetischen, 13 Aminosäuren langen Peptid, das dem extremen N-Terminus von  $\zeta$ 2-COP entspricht, immunisiert (CQRPEAWPRPHPGE).



**Abb. 4.** Ausrichtung der  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP-Sequenzen von Mensch, Rind und Maus. Die grau hinterlegten Bereiche markieren die Peptidsequenzen, die für die Immunisierung ausgewählt wurden.

Das Peptid wurde mit einem zusätzlichen Cystein am N-Terminus versehen. Über dieses Cystein sollte das Peptid später an Thiopropylsepharose gekoppelt werden, um eine Affinitätsreinigung mit den Antikörperseren durchführen zu können. Im extremen N-terminalen Bereich sind die  $\zeta$ 2-COP-Sequenzen von Mensch und Maus identisch. Das Peptid wurde vor der Immunisierung an KLH gekoppelt.

Um spezifische Antikörper gegen  $\zeta$ 1-COP zu erhalten, wurden zwei Epitope ausgewählt: Das erste ist ein neun Aminosäuren langes Peptid, welches dem extremen N-Terminus von  $\zeta$ 1-COP (Mensch und Maus) entspricht (MEALILEPS). Die N-terminale Sequenz vom Rind unterscheidet sich von der von Mensch oder Maus nur darin, dass EPS durch QPS ausgetauscht ist. Das zweite  $\zeta$ 1-spezifische Epitop ist ein über Mensch, Maus und Rind konserviertes internes Peptid (VHRVALRGEDVP-CONH<sub>2</sub>), das sich gegenüber der  $\zeta$ 2-Sequenz in sieben Aminosäuren unterscheidet.

Mit den KLH-gekoppelten Peptiden wurden jeweils vier Kaninchen und zwei Meerschweinchen immunisiert. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht von allen Peptiden, den damit erzeugten sechs Antiseren und der im folgenden Text verwendeten Nomenklatur.

**Tabelle 2.** Übersicht der  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörper

Antikörperbezeichnung	Spezies	Peptidsequenz
$\zeta$ 2-rb	Kaninchen	NH <sub>2</sub> -CQRPEAWPRPHPGE-COOH
$\zeta$ 2-gp	Meerschweinchen	NH <sub>2</sub> -CQRPEAWPRPHPGE-COOH
$\zeta$ 1-I-rb Tier 1	Kaninchen	NH <sub>2</sub> -VHRVALRGEDVP-CONH <sub>2</sub>
$\zeta$ 1-I-rb Tier 2	Kaninchen	NH <sub>2</sub> -VHRVALRGEDVP-CONH <sub>2</sub>
$\zeta$ 1-I-gp	Meerschweinchen	NH <sub>2</sub> -VHRVALRGEDVP-CONH <sub>2</sub>
$\zeta$ 1-II-rb	Kaninchen	NH <sub>2</sub> -MEALILEPS-COOH

## 2 Klonierung von $\zeta$ 2-COP aus mhAT<sub>3</sub>-Zellen

Die polyklonalen Antikörperseren sollten zunächst mit den rekombinanten Proteinen auf ihre Spezifität im Western Blot untersucht werden. Für die Expression des rekombinanten  $\zeta$ 1-COP wurde ein Konstrukt verwendet, welches für das Rinder- $\zeta$ 1-COP mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag codiert. Dieses Konstrukt wurde uns freundlicherweise von J. E. Rothman zur Verfügung gestellt.

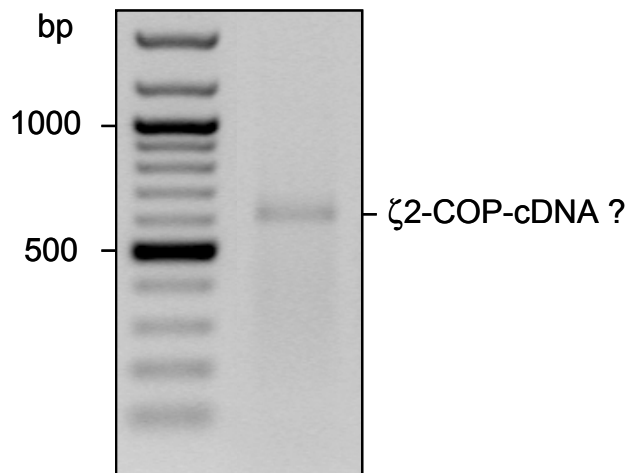
Für die Herstellung von rekombinantem  $\zeta$ 2-COP musste zunächst das entsprechende Gen isoliert und in *E. coli* Expressionsvektoren kloniert werden. Dazu wurde aus dem Lysat von Zellkultur-Maus-Hepatozyten (mhAT<sub>3</sub>-Zellen) mRNA über den poly-A-Tag isoliert und über eine RT-PCR in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Um die für  $\zeta$ 2-COP codierende DNA spezifisch durch PCR zu vermehren, wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert.

	1									70
ζ1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
ζ2	CCTAGTGCAG	GCAGCGAGCG	GAATGCAGCG	GCCGGAGGCC	TGGCCACGTC	CGCACCCGGG	GGAGGGGGCC			
	71									140
ζ1	-----	-----	-----GG	CAAGATCGAG	GCGCTGATTT	T--GGAGCCC	TCCCTGTACA			
ζ2	TCAGCCGCC	AAGCCGGGG	CGCAGCGCC	CCCACCCGAG	CCACGGAACA	GCGGGAACCT	TCTCTTACA			
	141									210
ζ1	CTGTCAAGGC	CATCCTGATT	CTGGACAATG	ATGGAGACCG	ACTCTTCGCC	AAGTACTATG	ACGACACCTA			
ζ2	CCATCAAGGC	TGTCTTCATC	TTAGATAATG	ACGGGCGAAG	GCTGCTGGCC	AAGTATTATG	ACGACACATT			
	211									280
ζ1	CCCCAGTGT	AAGGAGCAA	AGGCCTTTGA	GAAAGAACATT	TTCAACAAGA	CCCATCGGAC	GGATAGTGAA			
ζ2	TCCCCTCCGT	AAGGAGCAGA	TGGTTTTCGA	GAAAATATGT	TTCAACAAGA	CCAGCCGCAC	CGAAAGTGAA			
	281									350
ζ1	ATCGCTCTGT	TGGAAGGATT	GACAGTGGTC	TATAAAAGTA	GCATCGATCT	CTATTTCTAT	GTGATTGGCA			
ζ2	ATTGCATTTT	TGGGGGGCAT	GACTATCGTC	TACAAGAGCA	GCATTGACAT	CTTCCTGTAT	GTGGTGGGAT			
	351									420
ζ1	GCTCCTATGA	AAATGAGCTG	ATGCTTATGG	CTGTTCTGAA	CTGCCTCTTC	GATTCCCTGA	GCCAGATGCT			
ζ2	CTTCCTCCGA	GAATGAGCTG	ATGCTCATGT	CTGTGCTTGC	CTGCCTGTTT	GACTCTCTGA	GCCACATCTT			
	421									490
ζ1	GAGGAAAAAT	GTAGAAAAGC	GAGCTTTGCT	GGAGAACATG	GAGGGCCTCT	TCTTGGCTGT	GGATGAAATT			
ζ2	AAGGAAGAAC	GTGGAGAAAC	GCTGGTTGCT	GGAGAACATG	GACGGAGCCT	TCTTGGTGCT	GGATGAAACT			
	491									560
ζ1	GTAGATGGAG	GGGTGATCCT	AGAGAGCGAC	CCCAGCAAG	TGGTGCACCG	GGTGGCTTTG	AGGGGTGAAG			
ζ2	GTCGATGGAG	GTGTGATTCT	GGAGAGCGAC	CCCAGCAAG	TGATCCAGAA	AGTGAATTTT	AGGACTGATG			
	561									630
ζ1	ACGTCCCCCT	TACAGAGCAG	ACCGTGTCTC	AGGTGCTGCA	GTCAGCCAAA	GAACAGATCA	AGTGGTCCCT			
ζ2	ACAGTGGCCT	AACAGAACAG	AGTGTGGCCC	AGGTCTTCA	GTCAGCCAAAG	GAACAGATTA	AATGGTCCGT			
	631									700
ζ1	CCTTCGGTGA	AAGTGTCTG	AGCCAGTTC	CTTGCCCTC	AAAACCCACA	TCTGCTGTGA	CTTCTTATCC			
ζ2	ATTGAAATGA	AGACCTTGA	ATCAAGGCTC	CTT-CCCCAG	AGAACT----	-----	----TTGCC			
	701		720							
ζ1	AGGCCCCAA	CTTATGTCT								
ζ2	ACTCCCC--G	CGTAAGCCCC								

**Abb. 5.** Ausrichtung der m-RNA-Sequenzen von ζ1- und ζ2-COP aus *Mus musculus*. Die für die Primer ausgewählten Bereiche sind grau unterlegt. Start- und Stop-Codons sind grün unterlegt.

Für den N-Terminus wurde eine Sequenz ausgewählt, die einen Teil der nicht kodierenden und der kodierenden Region beinhaltet. Für den C-Terminus wurde eine Sequenz aus der nicht kodierenden Region verwendet (Abbildung 5). Die kodierende Region wäre aufgrund der stark ausgeprägten C-terminalen Homologie von ζ1- und ζ2-COP nicht geeignet gewesen.

Die Primer und die Maus-cDNA wurden in einer PCR eingesetzt. Es konnte eine spezifische Bande zwischen 600 und 700 Basenpaaren detektiert werden (Abbildung 6, berechnet: 675 bp). Zur Vermehrung der potentiellen ζ2-COP-DNA wurde diese in einen pGEMT-Vektor kloniert. Durch Sequenzierung konnte die Isolierung der ζ2-COP-cDNA bestätigt werden.



**Abb. 6.** PCR aus mhAT<sub>3</sub>-cDNA mit ζ2-spezifischen Primern. Das PCR-Produkt läuft zwischen 600 und 700 bp.

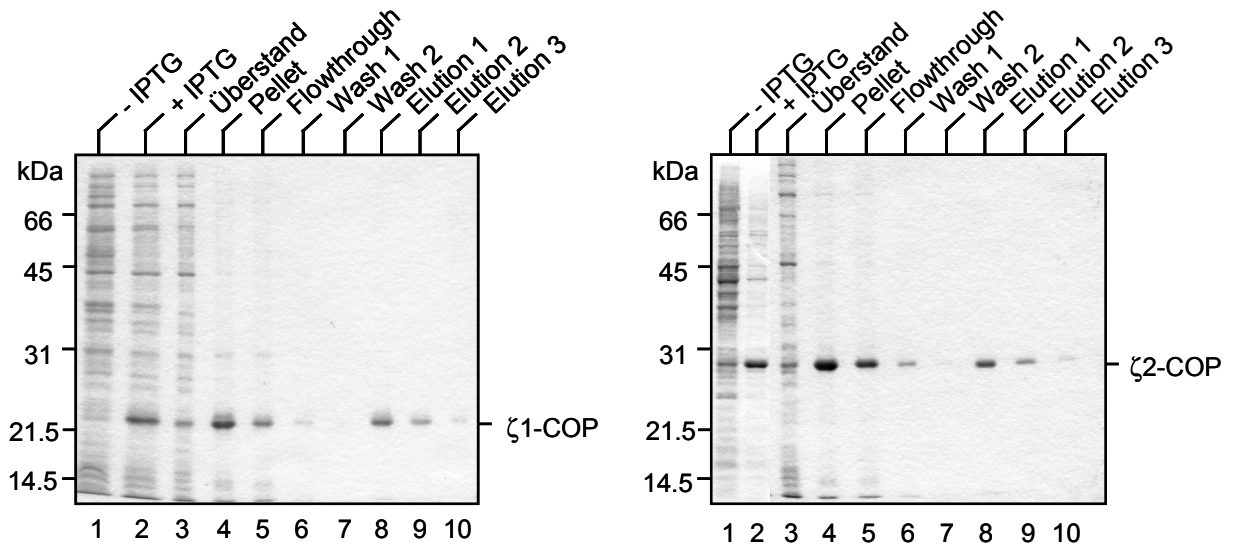
Der ζ2-pGEMT-Vektor diente als Vorlage für die Herstellung verschiedener Konstrukte. Zu diesem Zweck wurden Primer mit den passenden Schnittstellen synthetisiert und nach Vermehrung der DNA durch PCR und anschließendem Restriktionsverdau in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der hergestellten Konstrukte.

### 3 Überexpression und Aufreinigung von rekombinantem His<sub>6</sub>-ζ1- und His<sub>6</sub>-ζ2-COP

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Experimente sind mit dem N-terminal His<sub>6</sub>-getagtem ζ2-COP-Konstrukt durchgeführt worden. Daher wird im folgenden nur auf die Expression und Aufreinigung dieses Konstrukts eingegangen. Für die Überexpression von N-terminal His<sub>6</sub>-getagtem ζ1-COP wurde eine transformierte Dauerkultur aus unserer Gruppe eingesetzt. Für die Überexpression von His<sub>6</sub>-ζ2-COP wurden BL21-Zellen mit dem Konstrukt transformiert. Die genauen Expressionsbedingungen für His<sub>6</sub>-ζ1- und His<sub>6</sub>-ζ2-COP sind in den Kapiteln „Material“ und „Methoden“ beschrieben.

**Tabelle 3.** Übersicht der hergestellten ζ2-Expressionsvektoren.

Sequenz	Tag	Vektor
ζ2-full length	N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	pET 28 b (+)
ζ2-full length	C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	pET 24 a (+)
ζ2-full length	N-terminaler GST-Tag	pGEX 2T



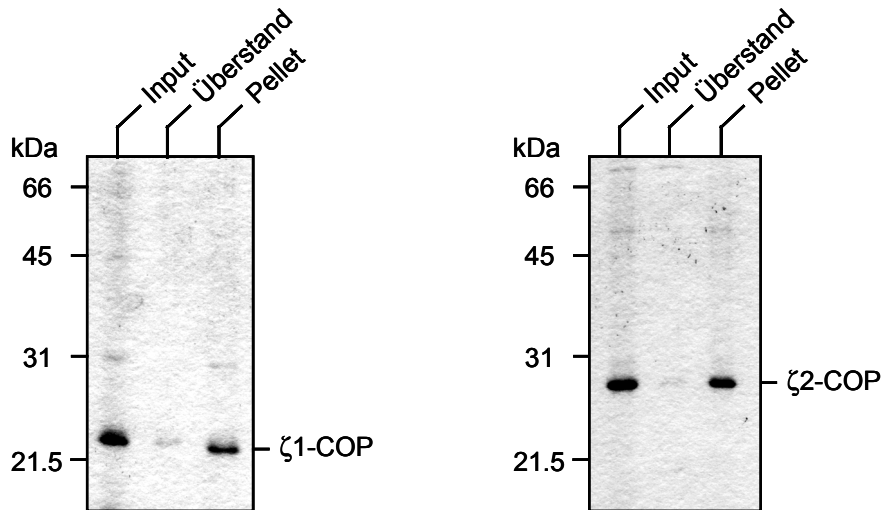
**Abb. 7.** Aufreinigung von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP (jeweils Spuren 1-10) unter denaturierenden Bedingungen (Coomassie gefärbte Gele): In den Spuren 1 und 2 sind jeweils *E. coli*-Zellen vor und nach 3 h Induktion mit 0,1 mM ( $\zeta$ 1) bzw. 0,5 mM ( $\zeta$ 2) IPTG aufgetragen. Spuren 3 und 4: Überstand und Pellet nach 100 000 x g Zentrifugation. Spuren 5: Protein, das nicht an die Nickel-Säule gebunden hat. Spuren 6 und 7: Waschfraktionen. Spuren 8 bis 10: Elution von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP mit 200 mM Imidazol.

Zuerst sollte die Löslichkeit von His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- und His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP nach Induktion untersucht werden. Dazu wurden die Zellen aufgeschlossen und nach 100 000 x g-Zentrifugation wurden Überstand und Pellet auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach erfolgter Elektrophorese mit Coomassie angefärbt (Abbildung 7). Sowohl nach Induktion von His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- als auch von His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP mit IPTG findet sich der überwiegende Teil der Proteine in den Pellets, d. h. in *inclusion bodies* wieder. Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung beider Proteine unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Die Zellen wurden nach der Induktion mit IPTG durch Ultraschall aufgeschlossen, pelletiert und die *inclusion bodies* in einem Puffer, der 7 M Harnstoff enthielt, aufgelöst. Die Anreicherung der rekombinanten  $\zeta$ -COPs erfolgte über ihren His<sub>6</sub>-Tag an Ni-NTA-Agarose. Die Konzentration der Elutionsfraktionen wurde nach Lowry bestimmt. Dafür wurde für His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- und His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP dieselbe BSA-Eichreihe verwendet, da beide Proteine später als Eichproteine für die Bestimmung des Verhältnisses von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP im Gewebezytosol verwendet werden sollten.

#### 4 Rückfaltung von His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- und His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP

Nach Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen sollte untersucht werden, ob durch Rückfaltung von His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- und His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP beide Proteine in löslicher Form vorliegen. Zu diesem Zweck wurde ein Teil der 7 M Harnstoff enthaltenden Elutionsfraktionen stufenweise gegen Puffer mit abnehmender Harnstoffkonzentration dialysiert. Das Dialysat wurde nach der letzten Dialyse gegen Puffer ohne Harnstoff 100 000 x g zentrifugiert und Überstand und Pellet auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel analysiert (Abbildung 8).



**Abb. 8.** Löslichkeit von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP nach Rückfaltung durch stufenweise Dialyse mit abnehmender Harnstoffkonzentration (Coomassie gefärbte Gele).

Weder His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- noch His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP lassen sich durch stufenweise Dialyse in eine größere Menge löslicher Fraktionen überführen. Der überwiegende Teil der Proteine findet sich im 100 000 x g Pellet wieder. Für die nachfolgend beschriebenen Experimente mit rekombinantem His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- und His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP wurden daher ausschließlich Stocklösungen von His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- und His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP in Probenpuffer verwendet, die aus den Harnstoff enthaltenden Eluaten der Nickel-Aufreinigung hergestellt wurden (siehe die Kapitel „Material“ und „Methoden“).

## 5 Spezifität der Antikörper gegen $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP

Um die Spezifität der Antikörperseren zu testen, wurde für jeden Antikörper jeweils gleiche Mengen rekombinantes  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP auf ein Gel aufgetragen. Die Gele wurden nach Elektrophorese geblottet und anschließend immunochemisch analysiert. Außer den gegen Epitope von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP hergestellten Anti-Peptid-Antikörpern, wurde ein Antikörper gegen  $\zeta$ 1-COP von Bernd Weigle (Weigle, B., 1997) mit beiden rekombinanten  $\zeta$ -COPs getestet. Dieser Antikörper war durch Immunisierung von Kaninchen mit dem kompletten rekombinanten  $\zeta$ 1-COP hergestellt worden. Er wird im folgenden mit  $\zeta$ 1-R bezeichnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 zusammengefasst.

Mit dem Antikörper, der gegen das rekombinante  $\zeta$ 1-COP hergestellt wurde ( $\zeta$ 1-R), lassen sich sowohl  $\zeta$ 1- als auch  $\zeta$ 2-COP detektieren. Er besitzt jedoch eine höhere Affinität gegenüber  $\zeta$ 1-COP.

Die Antikörper, die gegen den extremen N-Terminus von  $\zeta$ 2-COP gerichtet sind ( $\zeta$ 2-rb,  $\zeta$ 2-gp), erkennen spezifisch das rekombinante  $\zeta$ 2-COP.



ζ1   ζ2	ζ1   ζ2	ζ1   ζ2	ζ1   ζ2	ζ1   ζ2	ζ1   ζ2	ζ1   ζ2	ζ1   ζ2
	1:5000	1:5000	1:1000	1:5000	1:5000	1:1000	1:1000
Coomassie	ζ1-R	ζ2-rb	ζ2-gp	ζ1-I-rb Tier 1	ζ1-I-rb Tier 2	ζ1-I-gp	ζ1-II-rb

**Abb. 9.** Testen der Spezifität der Antikörperseren gegen die rekombinanten Proteine. In jeder Spur wurden 10 ng rekombinantes  $\zeta$ 1- oder  $\zeta$ 2-COP aufgetragen und nach Blotten mit den angegebenen Antikörper-Verdünnungen immunochemisch analysiert.

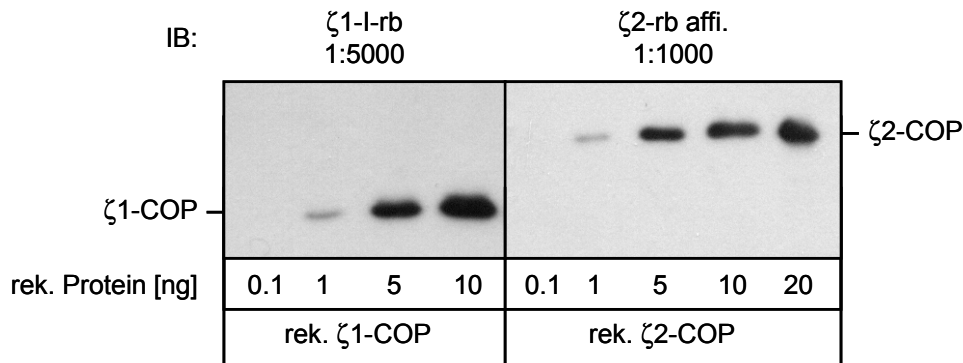
Spezifische Signale gegen das rekombinante  $\zeta$ 1-COP zeigten die Antikörperseren  $\zeta$ 1-I-rb, Tier 1 und 2, die gegen die interne Peptidsequenz von  $\zeta$ 1-COP hergestellt worden waren. Mit dem Meerschweinchen-Antiserum gegen dasselbe Epitop ließ sich auch nach längerer Exposition kein Signal detektieren. Der Antikörper  $\zeta$ 1-I-rb, Tier 1 zeigte eine höhere Affinität gegenüber  $\zeta$ 1-COP als der Antikörper  $\zeta$ 1-I-rb, Tier 2. Er wurde für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet und wird im folgenden zur Vereinfachung mit  $\zeta$ 1-I-rb bezeichnet.

Der Antikörper  $\zeta$ 1-II-rb, der gegen den extremen N-Terminus von  $\zeta$ 1-COP hergestellt worden war, detektierte weder  $\zeta$ 1- noch  $\zeta$ 2-COP.

Es stand nun eine Auswahl von Antikörpern zur Verfügung, mit denen sich spezifisch  $\zeta$ 1- oder  $\zeta$ 2-COP im Western Blot nachweisen ließen. Mit dem  $\zeta$ 1-R-Antiserum stand außerdem ein weiterer Antikörper zur Verfügung, mit dem, wenn auch mit unterschiedlichen Affinitäten, beide  $\zeta$ -COPs gleichzeitig nachweisbar waren. Da der  $\zeta$ 1-R-Antikörper gegen das komplette rekombinante Rinder- $\zeta$ 1-COP hergestellt worden war, ist jedoch nicht auszuschließen, dass mit rekombinantem Rinder- $\zeta$ 2-COP der Affinitätsunterschied nicht so stark ausfallen würde.

## 6 Sensitivität der $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-spezifischen Antikörper

Für die spezifische Detektion von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP im Western Blot wurden die Antikörper  $\zeta$ 1-I-rb und  $\zeta$ 2-rb verwendet. Um die Sensitivität dieser Antikörper im immunochemischen Nachweis zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach Elektrophorese geblottet. Die Detektion von  $\zeta$ 2-COP wurde mit dem affinitätsgereinigten  $\zeta$ 2-rb-Antikörper durchgeführt (Abbildung 10). Dadurch konnte ein besseres „Signal zu Hintergrund“-Verhältnis erzielt werden. Die Affinitätsreinigung erfolgte gegen das an Thiopropylsepharose immobilisierte antigene Peptid.



**Abb. 10.** Sensitivität der ζ1-I-rb- und ζ2-rb-Antikörper im Western Blot

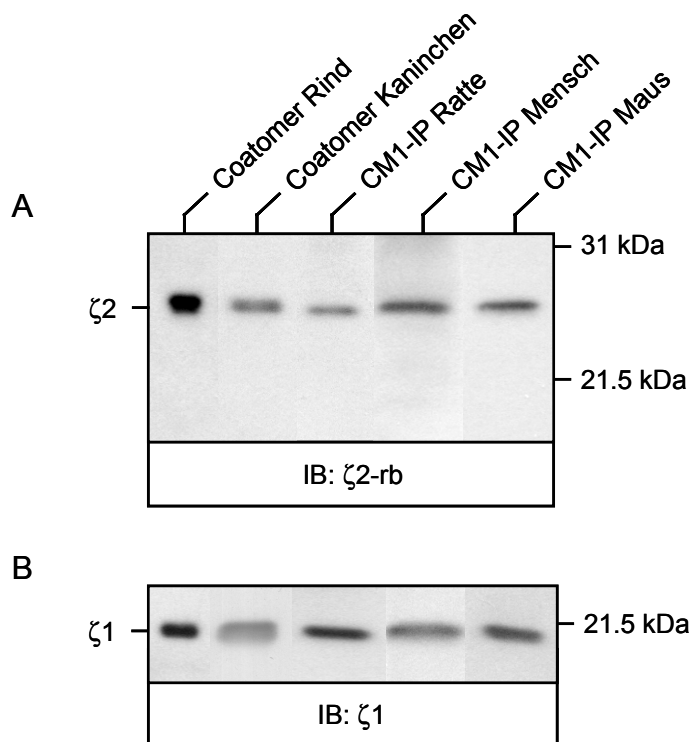
Mit beiden Antikörpern lassen sich ζ1- und ζ2-COP im untersten Nanogramm-Bereich nachweisen. Das Detektionslimit lag mit beiden Antikörpern bei 1 ng rekombinantem Protein. 0,1 ng ζ1- und ζ2-COP konnten nicht mehr im Western Blot nachgewiesen werden.

## 7 Expression von ζ2-COP *in vivo*

Es war bekannt, dass das 20 kDa große Protein ζ1-COP exprimiert wird und sowohl als Monomer als auch als Bestandteil des Coatomer-Komplexes vorkommt (Kuge, O. et al., 1993). ζ2-COP mRNA konnte auf Northern Blot Ebene in allen untersuchten Geweben durch Analyse eines humanen MTN (multiple tissue northern)-Blot nachgewiesen werden (Futatsumori, M. et al., 2000).

Unter Verwendung der neuen ζ2-COP-spezifischen Antikörper sollte nun untersucht werden, ob ζ2-COP in verschiedenen Spezies *in vivo* exprimiert wird und Bestandteil des Coatomer-Komplexes ist (Abbildung 11).

Zu diesem Zweck wurden Coatomer-Proben verschiedener Spezies analysiert. Coatomer von Rind und Kaninchen wurde aus Rinderhirnzytosol und Kaninchenleberzytosol nach Pavel angereichert (Pavel, J. et al., 1998). Ratten-, Maus- und Menschenleber-Coatomer wurde durch Immunpräzipitation mit dem monoklonalen CM1-Antikörper, welcher den nativen Coatomer-Komplex erkennt (Palmer, D.J. et al., 1993), aus den entsprechenden Zytosolen isoliert. Die Coatomer-Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und das Gel anschließend geblottet. Es wurde eine Acrylamidkonzentration gewählt, bei der theoretisch eine Auftrennung von ζ1- und ζ2-COP aufgrund ihrer berechneten Molekulargewichte (ζ1-COP 20 kDa, ζ2-COP 23,5 kDa) zu erwarten war. Der immunochemische Nachweis erfolgte zuerst durch Entwicklung des Western Blots mit dem ζ2-rb-Antikörper (Abbildung 11 A).



**Abb. 11.** Analyse der *in vivo*-Expression von  $\zeta 2$ -COP. A: Erstentwicklung mit  $\zeta 2$ -spezifischem Antikörper  $\zeta 2$ -rb. B: Detektion von  $\zeta 1$ -COP.

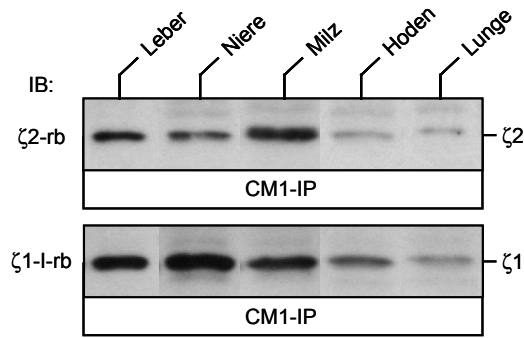
Aufgrund der Aminosäuresequenz von  $\zeta 2$ -COP waren Signale auf der Höhe von 23,5 kDa zu erwarten. Tatsächlich konnte bei allen untersuchten Spezies mit dem  $\zeta 2$ -rb-Antikörper eine spezifische Bande zwischen dem 21,5 kDa- und dem 31 kDa-Marker detektiert werden.  $\zeta 1$ -COP konnte durch Nachentwicklung des Western Blots mit  $\zeta 1$ -COP-spezifischen Antikörpern kurz unter dem 21,5 kDa-Marker nachgewiesen werden (Abbildung 11 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass  $\zeta 2$ -COP in den oben genannten Spezies exprimiert wird und Bestandteil des Coatomer-Komplexes ist.

## 8 Expression von $\zeta 2$ -COP in verschiedenen Organen

Es wäre denkbar, dass die exklusive Expression von  $\zeta 2$ -COP in bestimmten Organen einen ersten Hinweis auf die Funktion von  $\zeta 2$ - bzw.  $\zeta 1$ -COP aufzeigt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Zytosole der Maus aus verschiedenen Geweben untersucht. Es wurden Gewebe analysiert, von denen bekannt war, dass Coatomer in nachweisbaren Mengen exprimiert wird (Leber, Niere, Milz, Hoden, Lunge).

Coatomer wurde mit dem CM1-Antikörper, der nur den nativen Komplex erkennt, aus den Zytosolen immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert.  $\zeta 1$ -COP wurde mit dem  $\zeta 1$ -I-rb-Antikörper,  $\zeta 2$ -COP mit dem  $\zeta 2$ -rb-Antikörper detektiert (Abbildung 12).

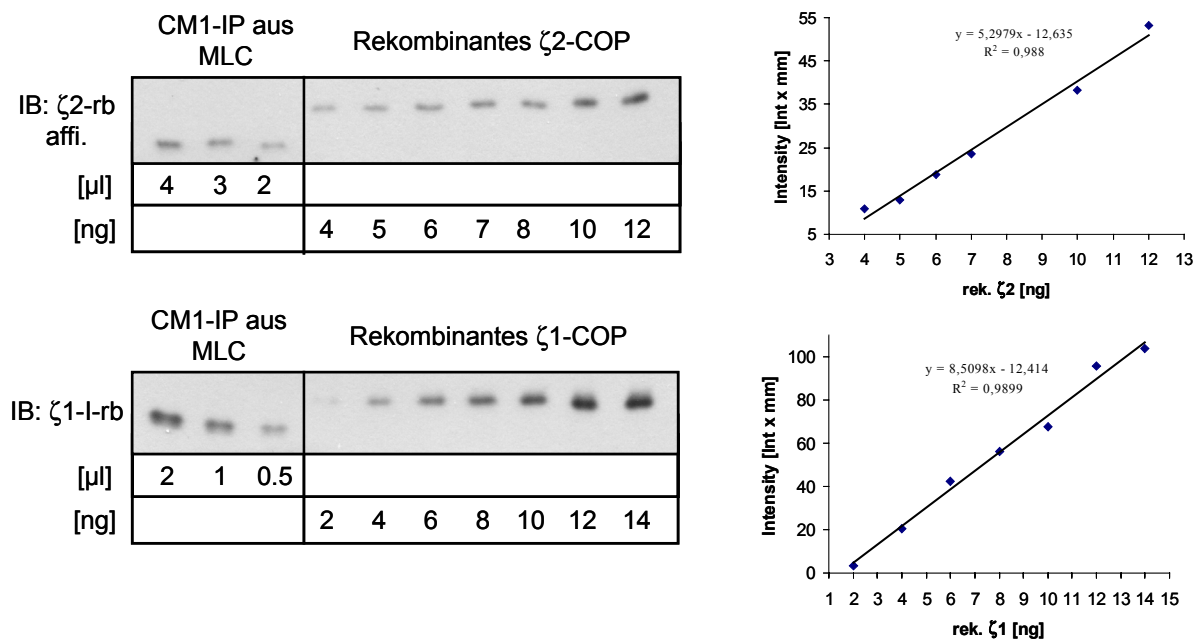


**Abb. 12.** Analyse der Expression von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP in verschiedenen Organen.

Es zeigte sich, dass sowohl  $\zeta$ 1- als auch  $\zeta$ 2-COP in allen untersuchten Geweben exprimiert werden und daher keine organspezifische Exklusivität nachweisbar war.

## 9 Stöchiometrie von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP im Maus-Leberzytosol

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass  $\zeta$ 2-COP Bestandteil des Coatomer-Komplexes ist, stellte sich die Frage, wie groß der Anteil von  $\zeta$ 2- gegenüber  $\zeta$ 1-COP ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurde Coatomer mit dem monoklonalen CM1-Antikörper aus Maus-Leberzytosol immunpräzipitiert und mit Probenpuffer eluiert. Von dem Eluat wurden verschiedene Mengen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden zur Eichung unterschiedliche Mengen rekombinantes  $\zeta$ 1-COP und  $\zeta$ 2-COP geladen. Nach Elektrophorese wurde das Gel geblottet und der Blot geteilt. Die Hälfte mit rekombinantem  $\zeta$ 1-COP und verschiedenen Mengen CM1-IP wurde mit dem  $\zeta$ 1-l-rb-Antikörper entwickelt.



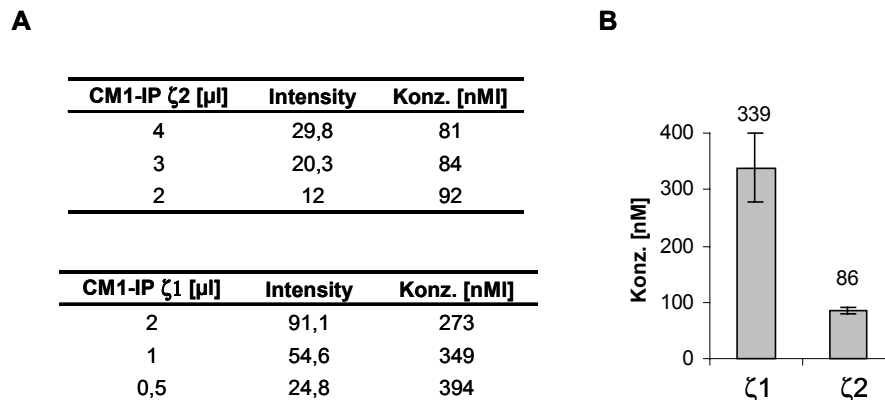
**Abb. 13.** CM1-Immünpräzipitation von Coatomer aus Maus-Leberzytosol und verschiedene Mengen rekombinantes  $\zeta$ 1- oder  $\zeta$ 2-COP (links). Eichkurven für rekombinantes  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP (rechts).

Die andere Hälfte des Western Blots mit rekombinantem  $\zeta$ 2-COP und verschiedenen Mengen CM1-IP-Eluat wurde mit dem affinitätsgereinigten  $\zeta$ 2-rb-Antikörper entwickelt. Die Filme wurden eingescannt und die Signalintensitäten mit der Software Quantity One<sup>®</sup> von BioRad bestimmt. Die Signalintensitäten der rekombinanten Proteine wurden gegen die geladenen Mengen in einem Diagramm aufgetragen und Eichgeraden berechnet (Abbildung 13).

Mit den Gleichungen der Eichgeraden wurden die Konzentrationen von immunpräzipitiertem  $\zeta$ 1- bzw.  $\zeta$ 2-COP im CM1-Eluat berechnet. Die so erhaltenen Werte wurden dann gemittelt. Abbildung 14 zeigt die Auswertung des oben gezeigten Beispiels.

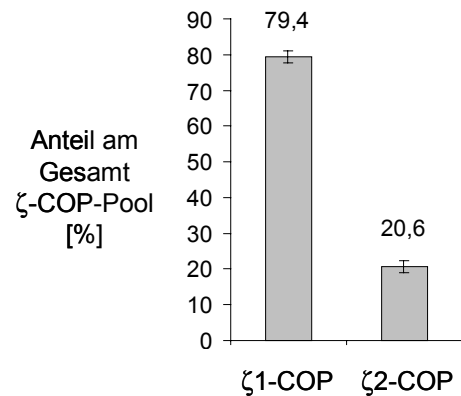
Der oben gezeigte Ansatz wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Es wurde für jeden Ansatz die Summe über die  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-Konzentration gebildet und die resultierende Gesamtkonzentration von  $\zeta$ -COP gleich 100% gesetzt. Der prozentuale Anteil der Konzentration von  $\zeta$ 2-COP am Gesamt- $\zeta$ -COP-Pool wurde bestimmt und über alle drei Ansätze gemittelt (Abbildung 15). Damit konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil von  $\zeta$ 2-COP im Coatomer-Pool von Maus-Leberzytosol ca. 20% bezogen auf die Summe von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP beträgt. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass  $\zeta$ 1-COP nicht ausschließlich in Kombination mit  $\zeta$ 2-COP in einem Coatomer-Komplex vorkommt. In diesem Fall wäre der Anteil von  $\zeta$ 2-COP bei 50% gelegen.

Carola Baier (Baier, C., 2002) konnte zeigen, dass es zwei unterschiedliche Coatomer-Komplexe gibt, die durch ihre  $\gamma$ -Untereinheit definiert werden. Der Anteil des  $\gamma$ 2-COP enthaltenden Coatomers wurde auf ca. 30% bestimmt.



**Abb. 14.** Beispiel für die Berechnung der Konzentrationen von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP im CM1-IP Eluat. **A:** Für jedes aufgetragene Volumen wurde die Konzentration von  $\zeta$ 1- bzw.  $\zeta$ 2-COP berechnet. **B:** Aus den berechneten Konzentrationen wurde jeweils der Durchschnitt gebildet.

Experiment	Anteil von $\zeta$ 2-COP	Durchschnitt
1	20,2	
2	19,1	20,6% +/- 1,7%
3	22,4	



**Abb. 15.** Berechnung des prozentualen Anteils von  $\zeta$ 2-COP am Gesamt- $\zeta$ -COP-Pool aus drei unabhängigen Experimenten.

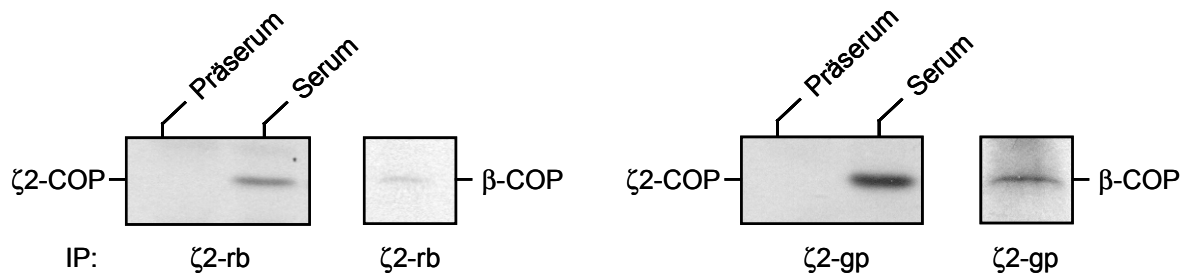
Unter Berücksichtigung der Fehler der  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2- und der  $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2-Bestimmungen war jetzt eine Kombination  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 2-COP und  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 1-COP im Coatomer-Komplex denkbar. Eine solche Vermutung ließe sich mit Antikörpern überprüfen, die in der Lage wären,  $\zeta$ 1- oder  $\zeta$ 2-COP spezifisch zu immunpräzipitieren.

## 10 Immunpräzipitation mit $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörpern

Die Immunpräzipitation von Coatomer mit dem CM1-Antikörper, welcher den nativen Komplex erkennt, liefert nur Hinweise auf den Gesamt-Coatomer-Pool. Um genauere Erkenntnisse über die Zusammensetzung von Coatomer bezüglich der  $\zeta$ -COP-Untereinheiten zu gewinnen, benötigt man Antikörper, die spezifisch  $\zeta$ 2-COP oder  $\zeta$ 1-COP immunpräzipitieren. Aus diesem Grund sollten die zur Verfügung stehenden  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antiseren in der Immunpräzipitation getestet werden.

Die Antiseren und Präseren der Antikörper  $\zeta$ 2-rb und  $\zeta$ 2-gp, die im Western Blot spezifisch  $\zeta$ 2-COP detektierten, wurden jeweils mit Protein-A-Sepharose inkubiert. Die Antikörper-Sepharose wurde anschließend mit Rattenleberzytosol inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit Probenpuffer eluiert und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Elektrophorese wurden die Proteine geblottet. Der Western Blot mit der  $\zeta$ 2-gp-Immunpräzipitation wurde mit dem  $\zeta$ 2-rb-Antikörper entwickelt, der Western Blot mit der  $\zeta$ 2-rb-Immunpräzipitation mit dem  $\zeta$ 2-gp-Antikörper. Dadurch ließ sich der Hintergrund reduzieren, welcher durch die IgGs verursacht wird, mit denen präzipitiert wurde. Für beide Immunpräzipitationen wurden gleiche Mengen Rattenleberzytosol und gleiche Mengen Antiserum bzw. Präserum eingesetzt.

Abbildung 16 zeigt, dass beide Antikörper ein Protein auf der Höhe von  $\zeta$ 2-COP präzipitierten, das von den  $\zeta$ 2-spezifischen Antikörpern detektiert wurde. Es konnte also gezeigt werden, dass beide Antikörper in der Lage sind,  $\zeta$ 2-COP zu immunpräzipitieren. Das  $\zeta$ 2-COP-Signal der  $\zeta$ 2-gp-Immunpräzipitation ist stärker als das der  $\zeta$ 2-rb-Immunpräzipitation. Es scheint, als würde der  $\zeta$ 2-gp-Antikörper mehr  $\zeta$ 2-COP präzipitieren als der  $\zeta$ 2-rb-Antikörper.



**Abb. 16.** Immunpräzipitation aus Rattenleberzytosol mit  $\zeta 2$ -spezifischen Antikörpern.

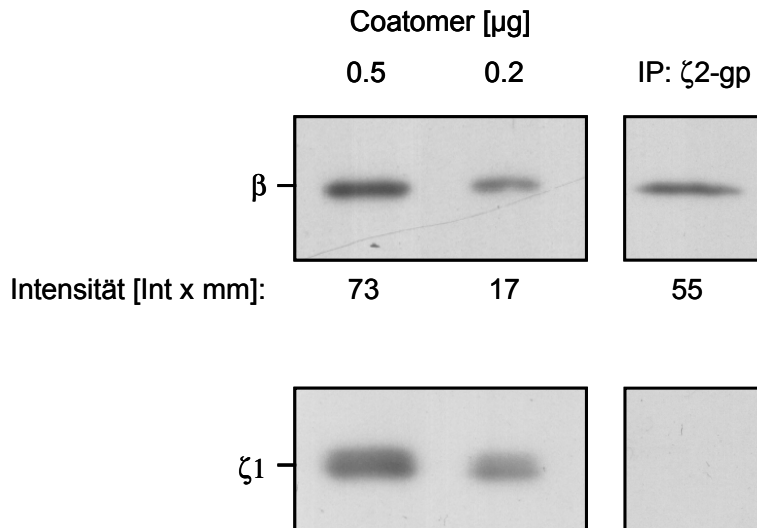
Dies könnte auf die unterschiedliche Affinität der Antiseren bei der Detektion zurückzuführen sein. Um nun zu unterscheiden, welcher der beiden Antikörper  $\zeta 2$ -COP effizienter präzipitiert, wurde der Western Blot mit einem  $\beta$ -COP-spezifischen Antikörper nachentwickelt und die  $\beta$ -COP-Signale bei gleicher Expositionszeit verglichen. Wie man in Abbildung 16 sieht, ist das  $\beta$ -COP-Signal der  $\zeta 2$ -gp-Immunpräzipitation stärker als das der  $\zeta 2$ -rb-Präzipitation. Der  $\zeta 2$ -gp-Antikörper ist also in der Lage,  $\zeta 2$ -COP effizienter zu präzipitieren als der  $\zeta 2$ -rb-Antikörper. Deshalb wurde für die folgenden Experimente der  $\zeta 2$ -gp-Antikörper in der Immunpräzipitation eingesetzt.

Dasselbe Experiment wurde mit den  $\zeta 1$ -COP-spezifischen Antiseren durchgeführt. Die Antikörper waren jedoch nicht in der Lage,  $\zeta 1$ -COP spezifisch zu immunpräzipitieren (ohne Abbildung).

## 11 Analyse der $\zeta 1/\zeta 2$ -COP-Kombination im Coatomer-Komplex

Die Bestimmung der  $\zeta 1/\zeta 2$ -COP-Stöchiometrie lieferte den ersten Hinweis dafür, dass nicht ausschließlich Coatomer-Komplexe existieren, die beide  $\zeta$ -COPs in einem Komplex vereinen. Mit dem  $\zeta 2$ -gp-Antikörper, der spezifisch  $\zeta 2$ -COP immunpräzipitiert, sollte jetzt die Architektur von Coatomer in Bezug auf  $\zeta 1$ - und  $\zeta 2$ -COP genauer untersucht werden. Kommen beide  $\zeta$ -COPs im selben Komplex vor, würde man bei einer  $\zeta 2$ -spezifischen Immunpräzipitation  $\zeta 1$ -COP kopräzipitieren.

Aus Kaninchenleber angereicherter Coatomer wurde mit dem Protein-A-Sepharosegekoppelten  $\zeta 2$ -gp-Antikörper präzipitiert und nach Elution auf ein SDS-Gel aufgetragen. Auf dasselbe Gel wurden aufsteigende Mengen Coatomer als Standard geladen. Nach Elektrophorese wurde das Gel geblottet und sowohl mit einem  $\beta$ -COP als auch mit einem  $\zeta 1$ -COP-spezifischen Antikörper entwickelt (Abbildung 17). Die Intensitäten der  $\beta$ -COP-Signale der Coatomer-Standards und der Immunpräzipitation wurden mit der Software Quantity One<sup>®</sup> bestimmt und verglichen.



**Abb. 17.** Analyse der Kombination  $\zeta_1/\zeta_2$ -COP durch Immunpräzipitation von Coatomer mit  $\zeta_2$ -COP-spezifischem Antikörper  $\zeta_2$ -gp

Die Intensität des  $\beta$ -COP-Signals der Immunpräzipitation beträgt 55 und liegt somit zwischen den Intensitäten des 0,5  $\mu\text{g}$  und des 0,2  $\mu\text{g}$  Standards (Int.: 73 und 17). Würden  $\zeta_1$ - und  $\zeta_2$ -COP zusammen in einem Coatomer-Komplex vorkommen, müsste die  $\zeta_1$ -COP-Signalintensität des immunpräzipitierten Coatomers zwischen den  $\zeta_1$ -COP-Intensitäten der 0,5 und 0,2  $\mu\text{g}$ -Standards liegen. Es konnte jedoch auch nach längerer Exposition kein  $\zeta_1$ -COP-Signal detektiert werden.

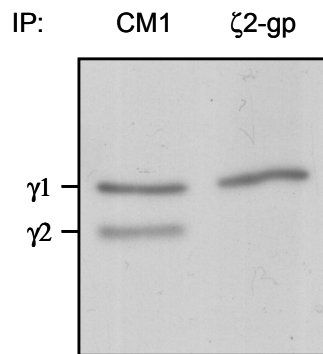
Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass  $\zeta_2$ -COP nicht in Kombination mit  $\zeta_1$ -COP in einem Coatomer-Komplex vorkommt.

## 12 Analyse der $\zeta_2$ -/ $\gamma$ -COP-Kombination

Die Existenz von zwei verschiedenen Coatomer-Komplexen mit  $\gamma_1$ - oder  $\gamma_2$ -COP (Hess, P., 2001; Baier, C., 2002), die Exklusivität der  $\zeta$ -COP-Untereinheiten im Coatomer-Komplex sowie die Stöchiometrie von  $\zeta_1$ - und  $\zeta_2$ -COP legten die Vermutung nahe, dass die beiden Coatomer-Komplexe durch die Kombination  $\zeta_1/\gamma_1$  und  $\zeta_2/\gamma_2$  definiert werden.

Um eine dieser Annahmen ( $\zeta_2/\gamma_2$ ) zu untersuchen, wurde Coatomer aus Rattenleberzytosol mit dem  $\zeta_2$ -gp-Antikörper immunpräzipitiert und auf einem 7,5% SDS-Gel aufgetrennt. Auf diesem Gelsystem werden  $\gamma_1$ - und  $\gamma_2$ -COP gut voneinander getrennt. Das Gel wurde im Western Blot mit dem  $\gamma$ -R-Antikörper analysiert (Abbildung 18). Der  $\gamma$ -R-Antikörper wurde in unserer Gruppe durch Immunisierung von Kaninchen mit dem kompletten rekombinanten  $\gamma_1$ -COP hergestellt. Dieser Antikörper detektiert  $\gamma_1$ - und  $\gamma_2$ -COP aus Rattenleberzytosol mit annähernd gleicher Intensität.





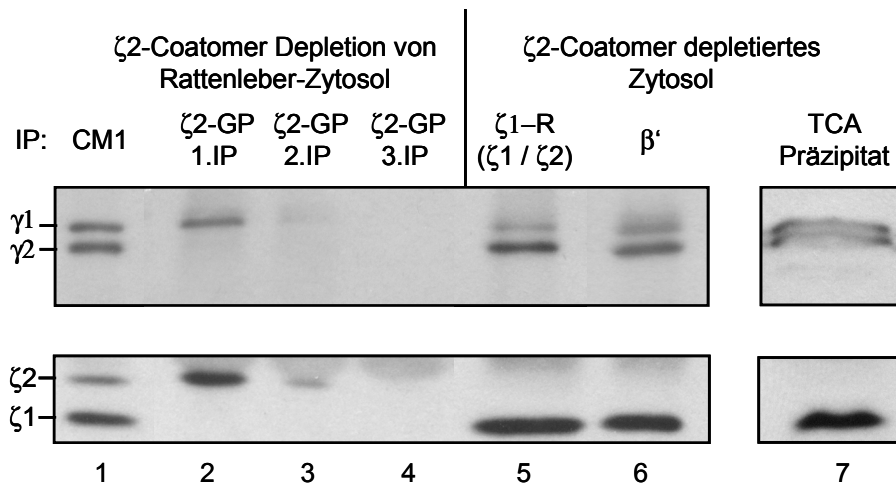
**Abb. 18.** Immunpräzipitation von Coatomer mit dem  $\zeta$ 2-spezifischen  $\zeta$ 2-gp-Antikörper. Der Western Blot wurde mit dem  $\gamma$ -R-Antikörper entwickelt, welcher  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP detektiert.

Überraschenderweise ließ sich bei der Immunpräzipitation von  $\zeta$ 2-COP aus Rattenleberzytosol nicht wie erwartet  $\gamma$ 2-COP, sondern ausschließlich  $\gamma$ 1-COP koimmunpräzipitieren. Auch bei längerer Exposition ließ sich kein  $\gamma$ 2-COP-Signal detektieren. Es konnte somit eine Coatomer-Spezies identifiziert werden, die durch die Kombination  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1-COP definiert wird. Der Anteil dieser Coatomer-Spezies im Zytosol beträgt nach der in Kapitel II-9 beschriebenen Quantifizierung ca. 20%.

### 13 Analyse der $\zeta$ 1-/ $\gamma$ -COP-Kombinationen

Nach der Identifizierung eines  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1-COP Coatomer-Komplexes stellten sich nun zwei Fragen: Wie konnte man ausschließen, dass durch die  $\zeta$ 2-COP-spezifische Immunpräzipitation mit dem  $\zeta$ 2-gp-Antikörper nicht alle  $\zeta$ 2-COP enthaltenden Coatomer-Spezies identifiziert wurden bzw. gibt es einen  $\zeta$ 2-COP-Pool, der mit dem  $\zeta$ 2-gp-Antikörper nicht präzipitiert werden konnte? Es wäre z. B. denkbar, dass eine maskierte Form von  $\zeta$ 2-COP vom Antikörper nicht erkannt wurde. Außerdem musste jetzt geklärt werden, wie es sich mit der Zusammensetzung eines  $\zeta$ 1-COP enthaltenden Coatomer-Komplexes verhält.

Die Antwort auf beide Fragen sollte das im folgenden beschriebene Experiment liefern (Abbildung 19). Um die Existenz eines  $\zeta$ 2-COP enthaltenden Coatomer-Pools zu analysieren, der nicht durch den  $\zeta$ 2-gp-Antikörper immunpräzipitiert werden konnte, wurde Rattenleberzytosol mit Protein-A-Sepharose-gekoppeltem  $\zeta$ 2-gp-Antikörper inkubiert. Der Überstand der Immunpräzipitation wurde auf frische  $\zeta$ 2-gp-Protein-A-Sepharose transferiert und inkubiert. Der Vorgang wurde noch einmal wiederholt und der Überstand aufgehoben. Die Protein-A-Sepharose aus den drei Immunpräzipitationen wurde in Probenpuffer aufgekocht und die Eluate auf einem SDS-Gel analysiert, mit dem sowohl  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP als auch  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP aufgetrennt werden konnten (Abbildung 19, Spuren 2-4). Als Standard für  $\zeta$ 1-,  $\zeta$ 2-,  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP im Western Blot diente Coatomer, der mit dem CM1-Antikörper aus Rattenleberzytosol präzipitiert worden war (Abbildung 19, Spur 1).



**Abb. 19.** Immunpräzipitation von Rattenleberzytosol mit  $\zeta$ 2-gp-Antikörper. Es wurden insgesamt drei Runden der Immunpräzipitation durchgeführt (Spuren 2-4). Das Zytosol wurde nach TCA-Fällung auf  $\zeta$ 2-COP untersucht (Spur 7). Das  $\zeta$ 2-COP-depletierte Zytosol wurde mit dem  $\zeta$ 1-R-Antikörper immunpräzipitiert (Spur 5). Als Inputs wurden Immunpräzipitationen mit Antikörpern durchgeführt, die alle Coatomer-Spezies immunpräzipitieren (Spuren 1 und 6).

Nach Elektrophorese wurde das Gel geblottet und mit Antikörpern gegen  $\zeta$ 1-,  $\zeta$ 2-,  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP entwickelt. Nach der zweiten Runde der Immunpräzipitation zeigte sich ein deutlich schwächeres Signal für  $\zeta$ 2- und  $\gamma$ 1-COP. Nach der dritten Runde konnten keine COPs mehr detektiert werden. Die  $\zeta$ 2-gp-Immunpräzipitation war somit quantitativ (Abbildung 19, Spur 4). Wie erwartet wurde  $\gamma$ 1-COP mit  $\zeta$ 2-COP kopräzipitiert. Um sicher zu gehen, dass das Rattenleberzytosol kein  $\zeta$ 2-COP mehr enthält, wurde der Überstand nach diesen drei Immunpräzipitationen mit TCA gefällt. Das TCA-Pellet wurde auf einem SDS-Gel und anschließendem Western Blot analysiert. Der Western Blot wurde mit Antikörpern gegen  $\zeta$ 1-,  $\zeta$ 2-,  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP entwickelt (Abbildung 19, Spur 7). Der Überstand der drei Immunpräzipitationen enthält noch  $\gamma$ 1-,  $\gamma$ 2- und  $\zeta$ 1-COP. Es konnte aber bei keiner Exposition  $\zeta$ 2-COP nachgewiesen werden.

Wie bereits erwähnt (Kapitel II-10), waren die  $\zeta$ 1-COP-spezifischen Antikörper nicht in der Lage,  $\zeta$ 1-COP zu immunpräzipitieren.  $\zeta$ 1-COP lässt sich aber mit dem  $\zeta$ 1-R-Antikörper präzipitieren, der gegen das rekombinante  $\zeta$ 1-COP hergestellt wurde. Dieser präzipitiert jedoch sowohl  $\zeta$ 1- als auch  $\zeta$ 2-COP. Mit dem  $\zeta$ 2-COP-depletierten Zytosol war es jetzt aber nur noch möglich,  $\zeta$ 1-COP und seine Bindungspartner zu immunpräzipitieren. Es konnte jetzt analysiert werden, ob  $\zeta$ 1-COP zusammen mit  $\gamma$ 1- oder mit  $\gamma$ 2-COP in einem Coatomer-Komplex vorkommt.

$\zeta$ 2-COP-depletiertes Rattenleberzytosol wurde mit dem  $\zeta$ 1-R-Antikörper immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Proteine auf einem SDS-Gel und Western Blot analysiert (Abbildung 19, Spur 5). Um die Integrität von Coatomer im depletierten Zytosol zu kontrollieren, wurde eine Immunpräzipitation mit dem  $\beta'$ -Antikörper durchgeführt (Abbildung 19, Spur 6). Man erkennt in Spur 5, dass mit  $\zeta$ 1-COP nicht nur  $\gamma$ 2-, sondern auch  $\gamma$ 1-COP kopräzipitiert wurde. Ein Coatomer-Komplex enthält aber nur entweder  $\gamma$ 1- oder

$\gamma$ 2-COP (Baier, C., 2002). Es konnten daher zwei Coatomer-Spezies identifiziert werden, die durch die Kombination  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 1 und  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 2 definiert werden. Es existieren also abhängig von ihrer  $\zeta$ / $\gamma$ -Kombination insgesamt drei verschiedene Coatomer-Komplexe.

## **14 Bindung von Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen von p24-Familienmitgliedern**

### **14.1 Vergleich der Affinität von $\gamma$ 1- und $\gamma$ 2-COP-Coatomer**

Durch den Nachweis von drei verschiedenen Coatomer-Komplexen stellte sich die Frage, ob diese unterschiedliche Funktionen ausüben. Um dieser Frage nachzugehen, sollte zunächst die Bindung von Coatomer an bekannte Bindungspartner untersucht werden. Cosson und Letourneur hatten gezeigt, dass Coatomer spezifisch an die zytoplasmatischen KKXX-Motive der ER-residenten Transmembranproteine E19 vom Adenovirus und Oligosaccharyltransferase Untereinheit Wbp1 aus Hefe bindet (Cosson, P. und Letourneur, F., 1994; Letourneur, F. et al., 1994). Sohn et al. konnten eine Interaktion von Coatomer mit der zytoplasmatischen Domäne des Coat-Rezeptors p23, die ein KKXX-ähnliches Motiv trägt, nachweisen (Sohn, K. et al., 1996). Auch die zytoplasmatischen Domänen von p24 und p25 sind in der Lage, Coatomer zu binden (Dominguez, M. et al., 1998; Goldberg, J., 2000). Durch Photocrosslinking-Experimente konnte C. Harter zeigen, dass die zytoplasmatischen Domänen von p23 und Wbp1 ausschließlich mit der  $\gamma$ -Untereinheit des Coatomer-Komplexes interagieren (Harter, C. et al., 1996; Harter, C. und Wieland, F.T., 1998). In diesen Experimenten wurden jedoch die unterschiedlichen  $\gamma$ / $\zeta$ -Komplexe nicht berücksichtigt, da sie zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt waren. In Bindungsstudien nach Sohn et al. sollte daher zunächst untersucht werden, ob unter den p24-Familienmitgliedern eine unterschiedliche Affinität in Bezug auf die Bindung von  $\gamma$ 1- oder  $\gamma$ 2-COP enthaltendem Coatomer besteht.

Um die Interaktion von Coatomer mit den p24-Familienmitgliedern systematisch zu untersuchen, wurden synthetische Peptide hergestellt, die den zytoplasmatischen Domänen der p24-Familienmitglieder entsprechen und N-terminal einen Cysteinrest tragen. Die Peptide wurden über ihren Cysteinrest an Thiopropylsepharose mittels Disulfidbrücken kovalent gebunden. Die Ausrichtung der Domänen entsprach dadurch der Ausrichtung auf der Zellmembran. Als Kontrolle für die Spezifität der Coatomer-Bindung diente Thiopropylsepharose ohne Peptid. Außerdem wurde außer den p24-Familienmitgliedern und der zytoplasmatischen Domäne von Wbp1 als Negativkontrolle eine p23-Doppelmutante immobilisiert. In dieser Doppelmutante waren die für die Coatomer-Bindung wichtigen Bindemotive FF und KK durch AA und SS ausgetauscht worden. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über alle gekoppelten Peptide. Die Kopplungsausbeuten wurden photometrisch bestimmt.

**Tabelle 4.** Übersicht über alle an Thiopropylsepharose-gekoppelten synthetischen Peptide

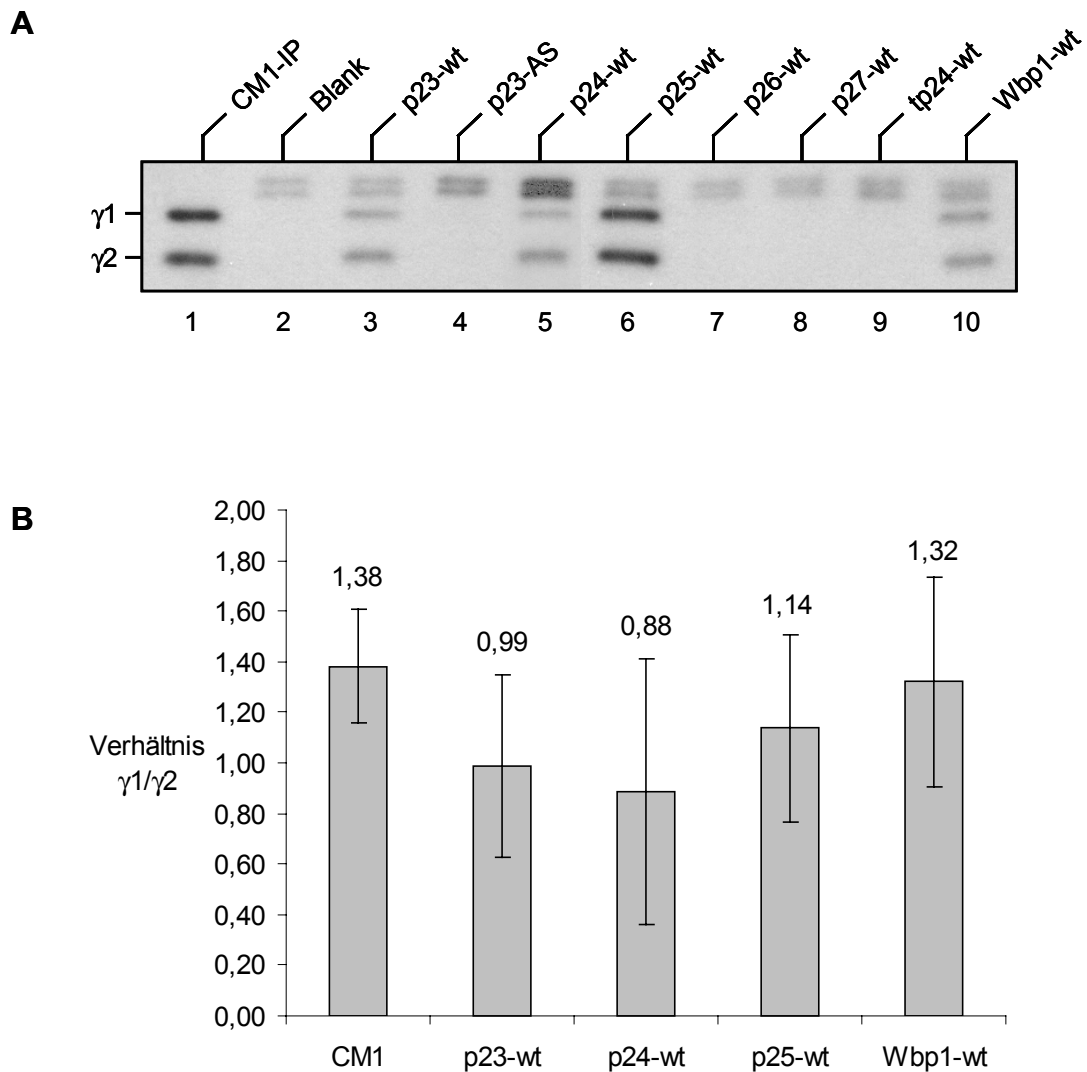
Peptidbezeichnung	Peptidsequenz
p23-wt	CYLRRFFKAKKLIE
p23-AS	CYLRAAKASSLIE
p24-wt	CYYLKRFFEVRVV
p25-wt	CYLKSFFEAKKLV
p26-wt	LLKSFFTEKRPISRAVHS
p27-wt	TLKRFFQDKRPVPT
tp24	LLKSFFSDKRTTTTRVGS
Wbp1	CYSSVGKKLETFKKTN

Das Verhältnis von  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP-Coatomer im Zytosol sollte durch eine Immunpräzipitation mit dem CM1-Antikörper repräsentiert werden.

Es wurden immer gleiche Mengen immobilisierten Peptids mit Rattenleberzytosol inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP wurden mit dem  $\gamma$ 1-R-Antikörper detektiert. Dieser Antikörper hat für  $\gamma$ 2-COP aus der Ratte eine höhere Affinität als für  $\gamma$ 1-COP. Obwohl der Anteil von  $\gamma$ 2-COP im Zytosol nur ca. 30% beträgt, ergeben sich dadurch vergleichbar starke Signale für  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP. Die  $\gamma$ -COP-Signale wurden eingescannt und die Pixeldichte mit der Software Quantity One<sup>®</sup> von BioRad bestimmt. Es wurde das Verhältnis aus der Signalintensität von  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP gebildet. Dieses Bindungsexperiment wurde mehrmals durchgeführt. Die berechneten Verhältnisse wurden dann jeweils gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Abbildung 20 A zeigt ein Beispiel für einen typischen Western Blot. Bei allen Experimenten mit der Thiopropylsepharose (Spuren 2-10) wurden unspezifisch zwei Proteine aus dem Zytosol rekrutiert, die oberhalb der  $\gamma$ -COP-Banden laufen und mit dem  $\gamma$ 1-R-Antikörper kreuzreagierten. Dies galt sowohl für die Thiopropylsepharose-Negativkontrolle ohne Peptid als auch für die Doppelmutante (Abbildung 20, Spuren 2 und 4).

Coatomer bindet ausschließlich an die zytoplasmatischen Domänen von p23-wt, p24-wt, p25-wt und Wbp1 (Spuren 3, 5, 6, 10). Für die Auswertung der  $\gamma$ -COP-Signale von p24-wt wurden längere Expositionen verwendet, da die Rekrutierung von Coatomer aus dem Zytosol schwächer war als bei p23-wt, p25-wt und Wbp1. Für die quantitative Auswertung wurde das  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2-Verhältnis von p23-wt, p24-wt, 25-wt Wbp1 und der CM1-Immunpräzipitation gebildet (Abbildung 20 B). Das Verhältnis von  $\gamma$ 1- zu  $\gamma$ 2-COP bei der Coatomer-Bindung an Wbp1 entspricht ungefähr dem Verhältnis der CM1-Immunpräzipitation, d. h. es besteht offensichtlich keine höhere Affinität für einen der drei Coatomer-Komplexe. Die Rekrutierung von Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen von p23-wt, p24-wt und p25-wt erfolgte mit einer leichten Veränderung des Verhältnisses zugunsten des  $\gamma$ 2-COP enthaltenden Coatomer-Komplexes. Am stärksten ausgeprägt ist der Effekt für p24-wt, am schwächsten für p25-wt.



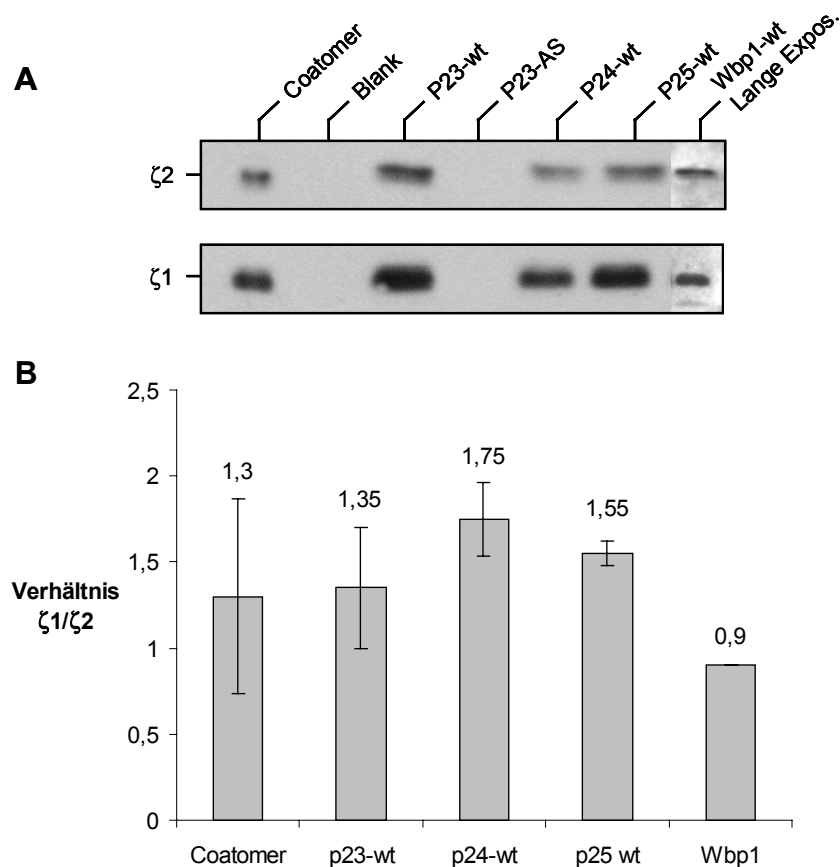
**Abb. 20.** Bindung von Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen der p24-Familienmitglieder (Spuren 3-9) und Wbp1 (Spur 10). Zum Vergleich wurde Coatomer mit dem CM1-Antikörper immunpräzipitiert (Spur1). Rattenleberzytosol wurde mit den immobilisierten Peptiden inkubiert und gebundene Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. **A** Western Blot, entwickelt mit dem  $\gamma_1$ -R-Antikörper, der  $\gamma_1$ - und  $\gamma_2$ -COP detektiert. **B** Nach quantitativer Auswertung der Banden wurde das Verhältnis aus  $\gamma_1$ - und  $\gamma_2$ -COP-Signal für p23, p24, p25 und Wbp1 bestimmt und mit dem  $\gamma_1/\gamma_2$ -Verhältnis der CM1-Immunpräzipitation verglichen.

Daraus ergibt sich eine leicht erhöhte Affinität für den  $\gamma_2$ -COP enthaltenden Coatomer-Komplex gegenüber den zytoplasmatischen Domänen von p23-wt, p24-wt und p25-wt. Die berechneten Werte für die Verhältnisse des  $\gamma_1$ - zum  $\gamma_2$ -COP-Signal überlappen jedoch innerhalb des Fehlerbereiches. Es kann daher nicht von einer Exklusivität der Bindung von p24-Familienmitgliedern an einen der drei Coatomer-Komplexe gesprochen werden.

#### 14.2 Bindung von $\zeta_1$ - und $\zeta_2$ -COP Coatomer an p24-Familienmitglieder

Die Rekrutierung von Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen von p23-wt, p24-wt, p25-wt und Wbp1 sollte auch in Bezug auf die  $\zeta$ -COP-Untereinheiten analysiert und mit dem vorherigen Ergebnis verglichen werden. Dazu wurde Rattenleberzytosol mit den immobili-

sierten Peptiden inkubiert und die gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. Es war jedoch keine quantitative Auswertung möglich, da die  $\zeta$ -COP-Signale durch den Hintergrund in diesem Bereich überlagert wurden. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass der Anteil von  $\zeta$ 2-COP am Gesamt- $\zeta$ -COP-Pool nur ca. 20% beträgt (s. Kapitel II-9) und der Hintergrund des  $\gamma$ -R-Antikörpers geringer ist als der des  $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörpers. Um trotzdem zu untersuchen, ob es eine Präferenz für die Bindung von  $\zeta$ 1- bzw.  $\zeta$ 2-COP-Coatomer an die p24-Familienmitglieder und Wbp1 gibt, wurde gereinigter Coatomer aus Rinderhirnzytosol mit den immobilisierten Peptiden inkubiert und gebundener Coatomer mit SDS-Probenpuffer eluiert. Die Spezifität der Coatomer-Bindung wurde mit der p23-AS-Doppelmutante und Thiopropylsepharose ohne Peptid kontrolliert. Als Standard wurde in einer Spur das Signalverhältnis von  $\zeta$ 1- zu  $\zeta$ 2-COP im Rinderhirn-Coatomer bestimmt. Nach SDS-PAGE und Western Blotting wurde mit spezifischen Antikörpern gegen  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP entwickelt.



**Abb. 21.** Bindung von Rinderhirn-Coatomer an die zytoplasmatischen Domänen von p23-wt, p23-AS, p24-wt, p25-wt und Wbp1. Zum Vergleich wurde gereinigter Rinderhirn-Coatomer direkt aufgetragen. Coatomer wurde mit den immobilisierten Peptiden inkubiert, gebundene Komplexe mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. **A** Western Blot, entwickelt mit den  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-spezifischen Antikörpern  $\zeta$ 1-I-rb und  $\zeta$ 2-rb. **B** Nach quantitativer Auswertung der Banden aus drei Experimenten wurde das Verhältnis aus dem  $\zeta$ 1- und dem  $\zeta$ 2-COP-Signal für p23, p24, p25 und Wbp1 bestimmt und mit dem  $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2-Verhältnis des Inputs verglichen (Coatomer).

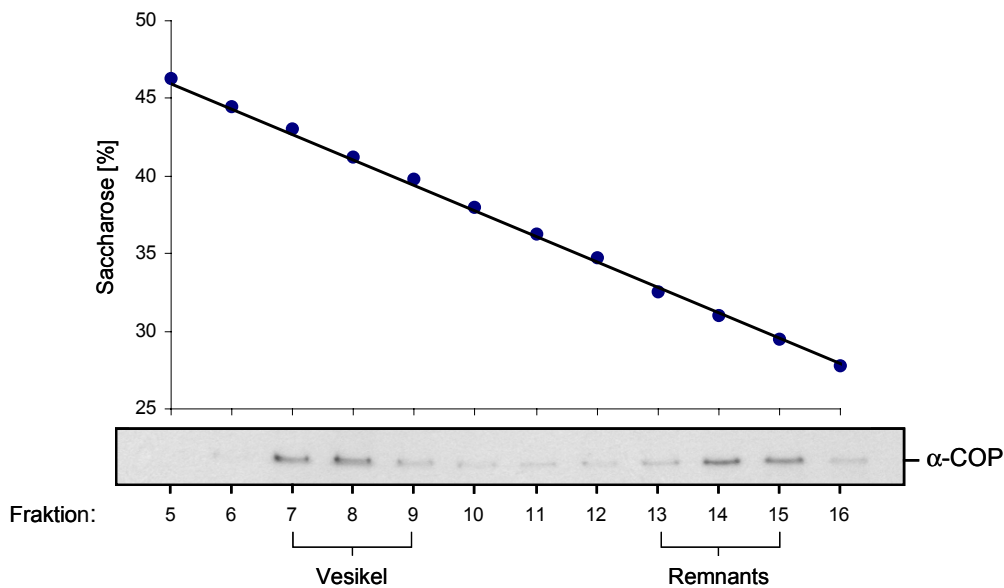
Die Signalintensitäten wurden mit der Software Quantity One<sup>®</sup> bestimmt. Die Signale von  $\zeta$ 1-COP wurden zu denen von  $\zeta$ 2-COP ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 21 B). Abbildung 21 A zeigt ein Beispiel für einen Western Blot. Sowohl  $\zeta$ 1- als auch  $\zeta$ 2-COP konnten an den gekoppelten zytoplasmatischen Domänen von p23, p24, p25 und Wbp1 detektiert werden. Das Signal für Wbp1 war sehr schwach, so dass für die Quantifizierung eine längere Exposition im Vergleich mit den anderen p24-Familienmitgliedern gewählt werden musste.

Eine Zunahme des  $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2-COP-Verhältnisses konnte für p23, p24 und p25 festgestellt werden. Am stärksten ausgeprägt war der Effekt beim p24-wt, am schwächsten für p23-wt. Bei der Bindung von Coatomer an die zytoplasmatische Domäne von Wbp1 ergab sich eine leichte Reduktion des Signalverhältnisses von  $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2-COP. Es ist jedoch zu beachten, dass für die Auswertung von Wbp1 aufgrund der schlechten Bindung (s. oben) nur ein Experiment ausgewertet werden konnte. Der Wert ist daher als unsicher zu bewerten.

Kombiniert man die in Abbildungen 20 und 21 gezeigten Ergebnisse, ergibt sich folgendes Bild: Sowohl der  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 2- als auch der  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1-Komplex binden an p23, p24, p25 und Wbp1. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der  $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2- und  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2-Stöchiometrie ist anzunehmen, dass der  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 1-Coatomer-Komplex ebenfalls an p23, p24, p25 und Wbp1 bindet, da man sonst eine starke Reduktion des  $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2- oder des  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2-Signalverhältnisses erwartet hätte. Die Ergebnisse zeigen dennoch aber klar Tendenzen für eine unterschiedliche Affinität der verschiedenen Coatomer-Komplexe gegenüber p24-Familienmitgliedern.

## 15 $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP in COPI-Vesikeln

Coatomer ist Hauptbestandteil der Proteinhülle von COPI-Vesikeln. Im minimalen System konnte gezeigt werden, dass für die Abschnürung eines COPI-Vesikels außer Coatomer die zytoplasmatische Domäne von p23-wt sowie ARF1-GTP notwendig sind (Bremser, M. et al., 1999). Sowohl ARF1 (Zhao, L. et al., 1997; Zhao, L.Y. et al., 1999) als auch die zytoplasmatische Domäne von p23 (Harter, C. und Wieland, F.T., 1998) interagieren mit der  $\gamma$ -COP-Untereinheit von Coatomer. C. Baier untersuchte das Verhältnis von  $\gamma$ 2-COP zu  $\gamma$ 1-COP in COPI-Vesikeln verglichen mit dem  $\gamma$ 2/ $\gamma$ 1-Verhältnis aus Coatomer, der vor der Vesikelbildung an Golgi-Membranen rekrutiert wurde. Sie konnte eine Anreicherung von  $\gamma$ 2- gegenüber  $\gamma$ 1-COP in COPI-Vesikeln zeigen (Baier, C., 2002). Dies bedeutet, dass sowohl  $\gamma$ 1- als auch  $\gamma$ 2-COP-Coatomer an die Golgimembran rekrutiert werden, jedoch bevorzugt  $\gamma$ 2-COP-Coatomer in die Vesikelhülle eingebaut wird. Kuge et al. wiederum konnten zeigen, dass  $\zeta$ 1-COP Bestandteil der Proteinhülle von COPI-Vesikeln ist (Kuge, O. et al., 1993). Es sollte nun im klassischen Golgi-Vesikel-*budding-assay* (Serafini, T. et al., 1991a) untersucht werden, ob auch  $\zeta$ 2-COP Bestandteil der Proteinhülle von COPI-Vesikeln ist.



**Abb. 22.** Saccharosegradient aus dem COPI-Vesikel Budding assay. Vesikelpool: Fraktionen 7-8 Remnants: Fraktionen 13-15

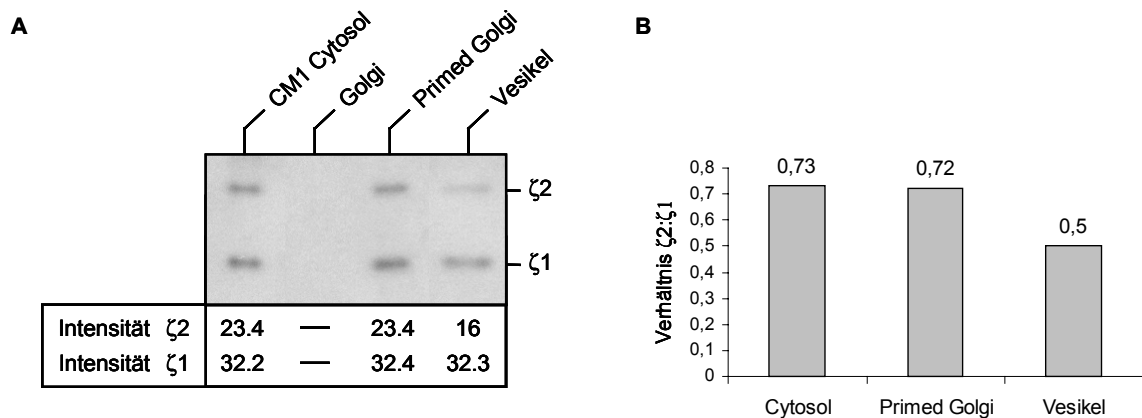
Es wurden Golgi-Membranen aus Rattenleber mit Rattenleberzytosol in der Anwesenheit von GMP-PNP, ATP und einem ATP regenerierenden System inkubiert.

Coatomer und ARF-GMP-PNP werden an die Golgi-Membran rekrutiert, was die Bildung von COPI-Vesikeln ermöglichte. Die Vesikel sind in dieser Phase noch an den Golgi-Apparat gebunden. Dieser Zustand wird im folgenden mit *primed Golgi* bezeichnet. Von dem pelletierten und resuspendierten *primed Golgi* wurde ein Aliquot für die spätere Analyse entnommen. Der restliche *primed Golgi* wurde nach erneuter Pelletierung mit Hochsalzpuffer behandelt, um die Vesikel freizusetzen. Der verbliebene Golgi wurde pelletiert und der Überstand, welcher die COPI-Vesikel enthält, auf einen 25%-50%igen-Saccharosegradienten aufgetragen. Nach 18 h Zentrifugation wurden Fraktionen gezapft und Aliquots nach Bestimmung der Saccharosekonzentration mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. Abbildung 22 zeigt die Saccharosekonzentration, aufgetragen gegen das  $\alpha$ -COP-Signal der jeweiligen Fraktionen.

Fraktionen 7-8 wurden vereinigt und repräsentieren den 40%-Pool, der die COPI-Vesikel enthält. In Fraktion 13-15 (30%-Pool) fanden sich die sog. Remnants. Es wurde von Dr. Britta Brügger die Phosphatidylcholkonzentration im *primed Golgi*, im Vesikelpool, und im Donor-Golgi bestimmt.

Es sollte nun das Verhältnis von  $\zeta$ 2- zu  $\zeta$ 1-COP in COPI-Vesikeln mit dem Verhältnis im *primed Golgi*, im Golgi und im Zytosol verglichen werden. Als Standard für das Verhältnis von  $\zeta$ 2- zu  $\zeta$ 1-COP im Zytosol wurde Coatomer aus Rattenleberzytosol mit dem CM1-Antikörper immunpräzipitiert. Es wurden anschließend verschiedene Mengen *primed Golgi*, Golgi, COPI-Vesikel und immunpräzipitierter Coatomer auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Western Blot wurde mit den  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörpern  $\zeta$ 1-I-rb und  $\zeta$ 2-rb entwickelt.





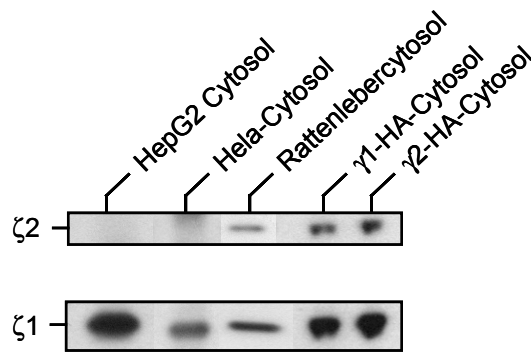
**Abb. 23.** Vergleich des  $\zeta_2/\zeta_1$ -COP Verhältnisses in COPI-Vesikeln, *primed Golgi*, Golgi und Zytosol. **A** Der Western Blot wurde mit  $\zeta_1$ - und  $\zeta_2$ -spezifischen Antikörpern entwickelt. Bezogen auf die Phosphatidylcholin-konzentration (PC) wurden aufgetragen: Golgi: 100 pmol PC, *primed Golgi*: 100 pmol PC, COPI-Vesikel: 20 pmol PC. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Software Quantity One<sup>®</sup>. **B** Graphische Darstellung der  $\zeta_2/\zeta_1$ -COP-Verhältnisse.

Die Signalintensitäten von  $\zeta_2$ - und  $\zeta_1$ -COP wurden mit der Software Quantity One<sup>®</sup> bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Abbildung 23 A zeigt die Spuren, bei denen die Intensitäten des  $\zeta_1$ -Signals vergleichbar waren (außer Golgi: kein Signal für  $\zeta_1$ - und  $\zeta_2$ -COP). Bezogen auf die PC-Konzentration war für den Golgi die gleiche Menge aufgetragen worden wie für den *primed Golgi*. Das  $\zeta_2/\zeta_1$ -Signalverhältnis des zytosolischen Coatomers betrug 0,73. An den Donor-Golgi-Membranen, die noch keinen zytosolischen Coatomer rekrutiert hatten, konnten weder  $\zeta_1$ - noch  $\zeta_2$ -COP detektiert werden. Nach Inkubation des Golgi mit Zytosol betrug das  $\zeta_2/\zeta_1$ -Signalverhältnis im *primed Golgi* 0,72 und entsprach damit dem Signalverhältnis des Zytosols. Anders verhielt es sich mit den COPI-Vesikeln aus dem 40%-Pool. Das  $\zeta_2/\zeta_1$ -COP-Signalverhältnis war mit 0,5 gegenüber dem *primed Golgi* und dem Zytosol um 30% reduziert.

Es konnte also gezeigt werden, dass nicht nur  $\zeta_1$ - sondern auch  $\zeta_2$ -COP Bestandteil von COPI-Vesikeln ist, die im klassischen Golgi-Vesikel-*budding-assay* erzeugt worden waren. Außerdem konnte ganz klar eine Abreicherung von  $\zeta_2$ -COP in COPI-Vesikeln gegenüber dem *primed Golgi* nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass  $\zeta_2/\zeta_1$ -COP-Coatomer an Golgi-Membranen rekrutiert wird, jedoch zu einem geringeren Ausmaß zur Vesikelbildung dient als  $\zeta_1/\zeta_2$ - bzw.  $\zeta_1/\zeta_1$ -COP-Coatomer.

## 16 Lokalisation von endogenem $\zeta_2$ -COP in Ratten-Hepatozyten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass  $\zeta_2$ -COP Bestandteil eines Coatomer-Komplexes ist, der durch die Kombination  $\zeta_2/\zeta_1$ -COP definiert wird und 20% des zytosolischen Coatomer-Pools ausmacht. Um weitere Hinweise auf die Funktion von  $\zeta_2$ -COP zu erhalten, sollte die Lokalisation von  $\zeta_2$ -COP in Zellkulturzellen mittels Immunfluoreszenz untersucht werden. Nakayama et al. etablierten eine stabile Zelllinie mit HA-*getagtem*  $\zeta_2$ -COP.



**Abb. 24.** Analyse der Expression von  $\zeta$ 2-COP in verschiedenen Zellkulturzellen. Vergleich mit Rattenlebercytosol.  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert.

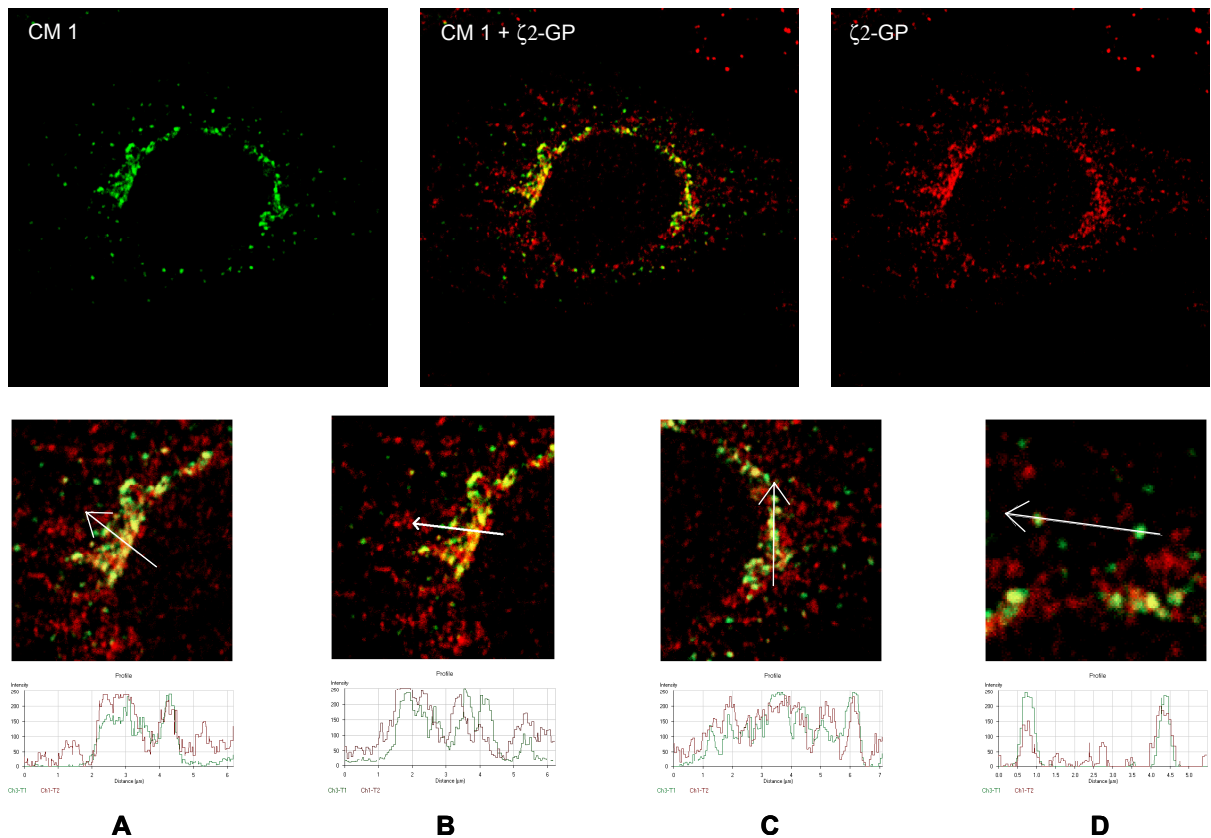
Über das HA-Signal konnten sie  $\zeta$ 2-HA mit  $\beta$ -COP kolokalisieren (Futatsumori, M. et al., 2000). Mit den neuen  $\zeta$ 2-spezifischen Antikörpern konnte jetzt auch die Lokalisation von endogenem  $\zeta$ 2-COP analysiert werden. Zusätzlich sollten Lokalisationsstudien mit verschiedenen Markern des sekretorischen Weges durchgeführt werden.

Bei den ersten Experimenten zur Bestimmung der Stöchiometrie von  $\zeta$ 2- und  $\zeta$ 1-COP im Zytosol gab es Hinweise darauf, dass die vorhandene Menge von  $\zeta$ 2-COP in bestimmten Zellkulturzellen sehr niedrig ist. Es wurde daher zuerst in verschiedenen Zellkulturzellen die Expression von  $\zeta$ 2-COP analysiert. Dazu wurde Zytosol von HepG2-, HeLa-, HA- $\gamma$ 1- und HA- $\gamma$ 2-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran transferiert. Der Western Blot wurde mit spezifischen Antikörpern gegen  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP entwickelt. Als Vergleich diente Rattenlebercytosol. HA- $\gamma$ 1- und HA- $\gamma$ 2-Zellen stammen aus Zelllinien, die stabil HA-getaggetes  $\gamma$ 1- oder  $\gamma$ 2-COP exprimieren und wurden uns freundlicherweise von K. Nakayama zur Verfügung gestellt.

Abbildung 24 zeigt, dass weder in HepG2- noch in HeLa-Zellen  $\zeta$ 2-COP nachgewiesen werden konnte. Auch bei längerer Exposition des Films war kein Signal zu detektieren, so dass beide Zelllinien für die Immunfluoreszenzanalyse unbrauchbar waren. Im Gegensatz dazu wird  $\zeta$ 2-COP sowohl in HA- $\gamma$ 1- als auch in HA- $\gamma$ 2-Zellen exprimiert. Der Anteil von HA-getagtem  $\gamma$ 1-COP bezogen auf die Gesamtmenge von  $\gamma$ 1-COP ist in der HA- $\gamma$ 1-Zelllinie sehr gering. Dadurch waren eine Überexpression und damit verbundene Misslokalisations-Artefakte auszuschließen. Die Lokalisationsstudien wurden daher mit diesen Zellen durchgeführt.

### 16.1 Kolokalisation von $\zeta$ 2-COP mit CM1

Die Verteilung des Gesamtcoatomer-Pools in der Zelle kann durch Detektion mit dem CM1-Antikörper analysiert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob mit dem  $\zeta$ 2-gp-Antikörper  $\zeta$ 2-COP spezifisch detektiert werden kann. Die HA- $\gamma$ 1-Rattenleber-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach zwei Tagen mit Paraformaldehyd und Pikrinsäure fixiert.



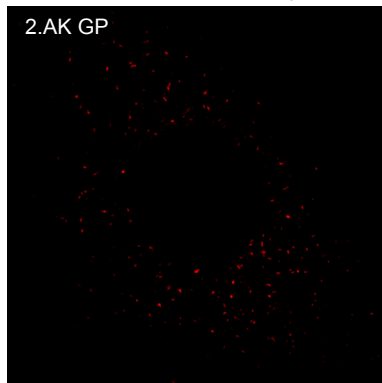
**Abb. 25.** Kolokalisation von Gesamtcoatomer (CM1) und  $\zeta$ 2-COP ( $\zeta$ 2-gp). Unten (A-D): Ausgewählte Bereiche der Kolokalisation wurden vergrößert und entlang des weißen Pfeils die Signalintensität des roten und grünen Kanals bestimmt.

Nach Permeabilisierung mit TritonX-100 wurden die Zellen mit dem CM1-Antikörper und dem affinitätsgereinigtem  $\zeta$ 2-gp-Antikörper inkubiert. Coatomer wurde über einen sekundären anti-Maus-Antikörper detektiert, der an Alexa-488-Farbstoff (grün) gekoppelt war. Die Detektion von  $\zeta$ 2-COP erfolgte über einen Alexa-546-gekoppelten (rot) anti-Meerschweinchen-Sekundärantikörper. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (Zeiss) aufgenommen. Abbildung 25 zeigt einen einzelnen Schnitt durch die Zelle.

Im grünen Kanal erkennt man die für den CM1-Antikörper typische perinukleäre Golgi-Struktur mit einzelnen punktförmigen Strukturen, die über das Zytoplasma verteilt sind. Der  $\zeta$ 2-COP-Antikörper zeigt eine sehr ähnliche Verteilung. In der Überlagerung des grünen und des roten Kanals kolokalisierten die meisten CM1-markierte Strukturen mit  $\zeta$ 2-gp-markierten Strukturen im Bereich des Golgi. Diese Beobachtung konnte durch Vergrößerung einzelner Bereiche und Bestimmung der Signalintensität entlang einer selbst gewählten Linie bestätigt werden (Abbildung 25 A-D). Einzelne CM1-markierte Strukturen kolokalisieren nicht mit den  $\zeta$ 2-gp-Strukturen. Dies war dann zu erwarten, wenn eine räumliche Trennung von verschiedenen Coatomer-Komplexen vorliegt (Abbildung 25, B).

Auch einzelne punktförmige CM1-markierte Strukturen kolokalisieren mit  $\zeta$ 2-gp (Abbildung 25 D).

Zusätzlich existieren jedoch punktförmige  $\zeta 2$ -gp-markierte Strukturen, die nicht mit CM1-markierten Strukturen kolokalisieren. Dies ist erstaunlich, da man annehmen muss, dass der CM1-Antikörper alle Coatomer-Spezies in der Zelle erkennt. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass  $\zeta 2$ -COP monomer, d. h. nicht Coatomer-gebunden in der Zelle vorkommt. Kuge et al. hatten dies bereits für  $\zeta 1$ -COP vorgeschlagen (Kuge, O. et al., 1993).



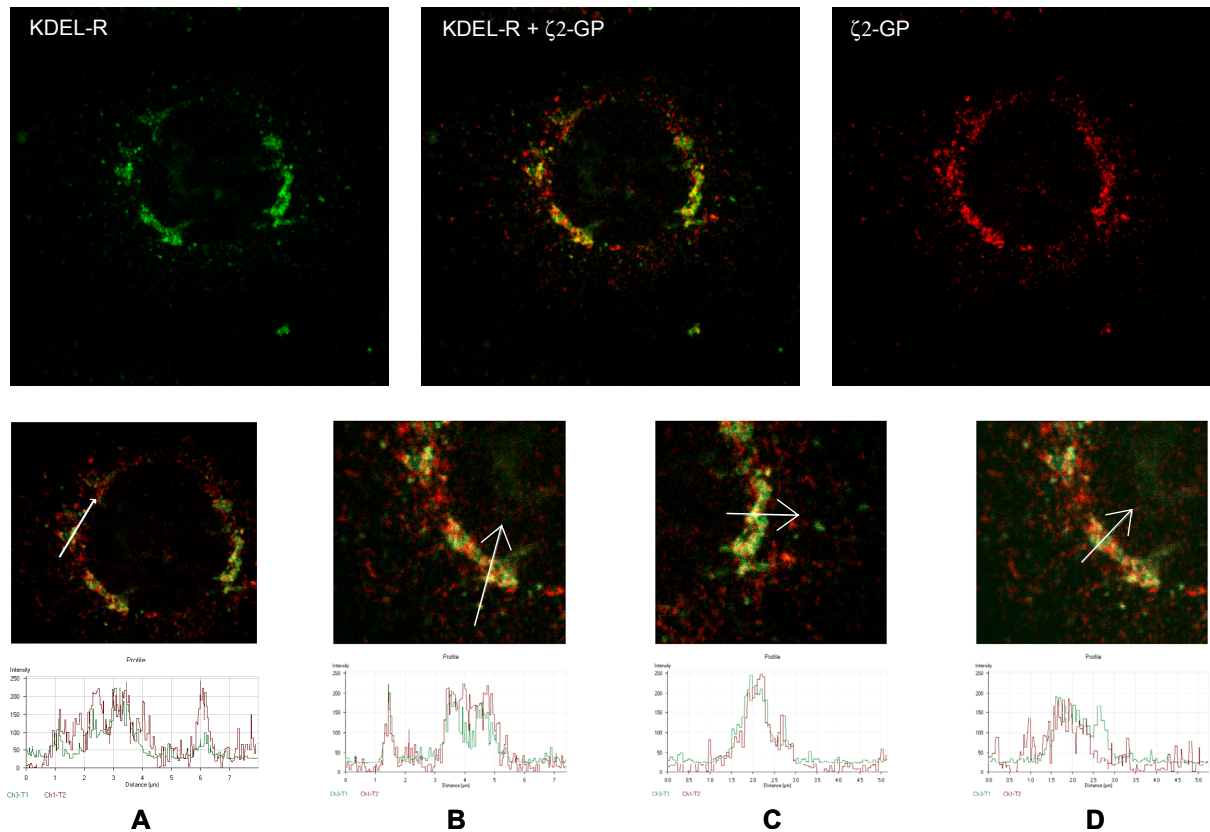
Es wurde jedoch auch die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung des Meerschweinchen-Sekundärantikörpers in Betracht gezogen. Zur Kontrolle wurden deshalb HA- $\gamma 1$ -Zellen nach Permeabilisierung nur mit Alexa-gekoppeltem Meerschweinchen-Sekundärantikörper inkubiert und in der Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 26).

**Abb. 26.** Unspezifische Bindung des Meerschweinchen-Sekundärantikörpers

Durch die unspezifische Bindung des Meerschweinchen-Sekundärantikörpers wurden vereinzelt punktförmige Strukturen angefärbt. Verglichen mit den Strukturen, die durch den  $\zeta 2$ -gp-Antikörper angefärbt wurden, ist der Anteil an unspezifisch markierten Bereichen gering. Man musste dies jedoch für die weiteren Analysen berücksichtigen. Nicht jede punktförmige Struktur, die durch den  $\zeta 2$ -gp-Antikörper markiert wurde, entsprach einer Lokalisation von  $\zeta 2$ -COP. Andererseits war jede Struktur, die durch andere Antikörper markiert wurde und nicht mit dem  $\zeta 2$ -gp-Antikörper kolokalisierte, räumlich von  $\zeta 2$ -COP in der Zelle getrennt.

## 16.2 Kolokalisation von $\zeta 2$ -COP mit KDEL-Rezeptor (KDEL-R)

Die Lokalisation des KDEL-Rezeptors sollte mit der von  $\zeta 2$ -COP verglichen werden. Der KDEL-Rezeptor dient als Marker für den cis-Golgi und für das *intermediate compartment* (Tang, B.L. et al., 1993; Griffiths, G. et al., 1994). Permeabilisierte und fixierte Zellen wurden mit dem affinitätsgereinigten  $\zeta 2$ -gp- und dem KDEL-R-Antikörper inkubiert.  $\zeta 2$ -gp-markierte Strukturen wurden mit dem Alexa 546-gekoppelten Meerschweinchen-Sekundärantikörper und KDEL-markierte Strukturen mit dem Alexa 488-gekoppelten Kaninchen-Sekundärantikörper detektiert. Abbildung 27 zeigt einen Schnitt durch die Zelle mit dem konfokalen Mikroskop.

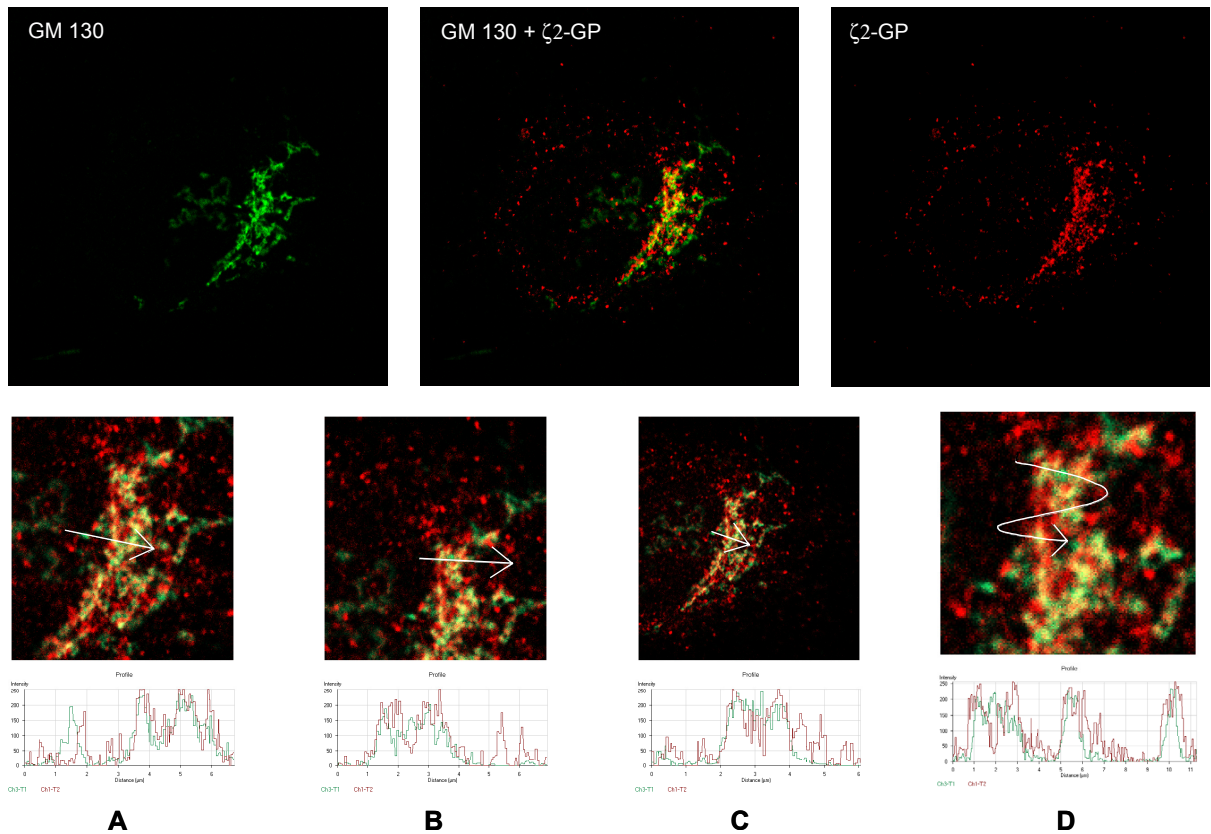


**Abb. 27.** Kolokalisation des KDEL-Rezeptors mit  $\zeta$ 2-COP.

Die KDEL-R-markierten Strukturen kolokalisieren weitestgehend mit den  $\zeta$ 2-gp-markierten Strukturen. Ausgewählte Bereiche der Kolokalisation wurden vergrößert und die Überlagerung des roten und grünen Kanals entlang der weißen Pfeile analysiert (Abbildung 27 A-D). Es konnten vereinzelt KDEL-markierte Strukturen detektiert werden, die nicht mit  $\zeta$ 2-gp-markierten Strukturen kolokalisieren (Abbildung 27 D). Der Anteil war jedoch eher gering.

### 16.3 Kolokalisation von $\zeta$ 2-COP mit GM130

GM130 ist ein Golgimatrixprotein und dient als Marker für das *cis-Golgi-Network* (Nakamura, N. et al., 1997). Um die Lokalisation von GM130 mit  $\zeta$ 2-COP zu vergleichen, wurden fixierte und permeabilisierte HA- $\gamma$ 1-Zellen mit einem Antikörper gegen GM130 und dem affinitätsgereinigten  $\zeta$ 2-gp-Antikörper inkubiert. Die Detektion  $\zeta$ 2-gp-markierter Strukturen erfolgte durch den Alexa 546-gekoppelten Meerschweinchen-Sekundärantikörper. GM130-markierte Strukturen wurden durch den Alexa 488-gekoppelten Maus-Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Abbildung 28 zeigt einen Schnitt durch eine Zelle, die im konfokalen Laserscan-Mikroskop analysiert worden war.



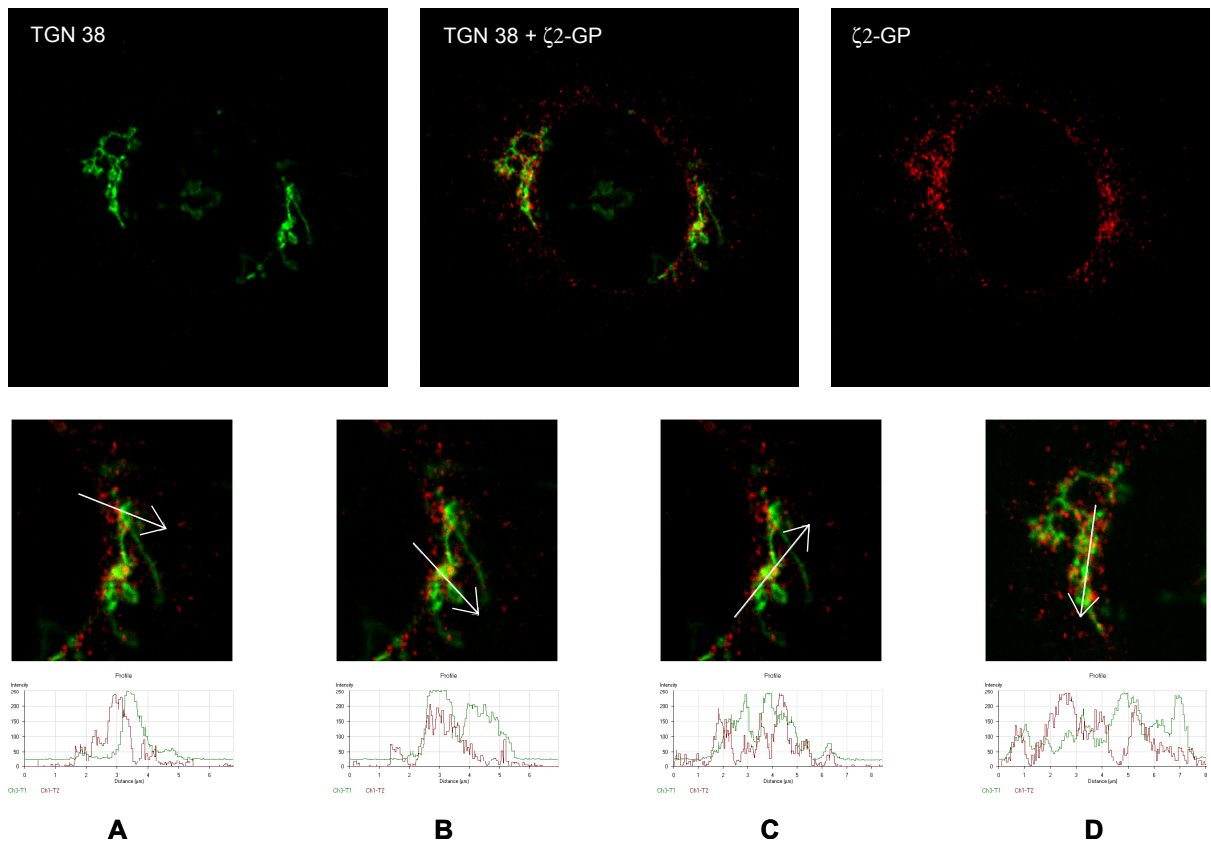
**Abb. 28.** Kolokalisation von GM130 mit  $\zeta$ 2-COP.

Wie für den frühen Golgi zu erwarten war, kolokalisieren auch GM130-Strukturen in weiten Bereichen mit den  $\zeta$ 2-gp-markierten Strukturen (Abbildung 28 A-D). Es treten jedoch im Vergleich zur KDEL-R-Markierung verstärkt kleinere Bereiche auf, in denen GM130-Strukturen nicht mit  $\zeta$ 2-gp-markierten Strukturen kolokalisieren (Abbildung 28 A und D).

#### 16.4 Kolokalisation von $\zeta$ 2-COP mit TGN 38

Um die Lokalisation von  $\zeta$ 2-COP im späten Golgi-Apparat zu untersuchen, wurde eine Kolokalisation mit einem Antikörper gegen das Protein TGN38 durchgeführt. TGN38 dient in der Immunfluoreszenz als Marker für das *trans Golgi network* (Luzio, J.P. et al., 1990). Fixierte und permeabilisierte HA- $\gamma$ 1-Zellen wurden mit dem  $\zeta$ 2-gp- und dem TGN-38-Antikörper inkubiert.  $\zeta$ 2-gp-markierte Strukturen wurden durch den Alexa 546-gekoppelten Meerschweinchen-Sekundärantikörper detektiert (roter Kanal). Die Detektion von TGN38-markierten Strukturen erfolgte mittels des Alexa 468-markierten Maus-Sekundärantikörpers (grüner Kanal). Abbildung 29 zeigt einen konfokalen Schnitt durch die abgebildete Zelle.



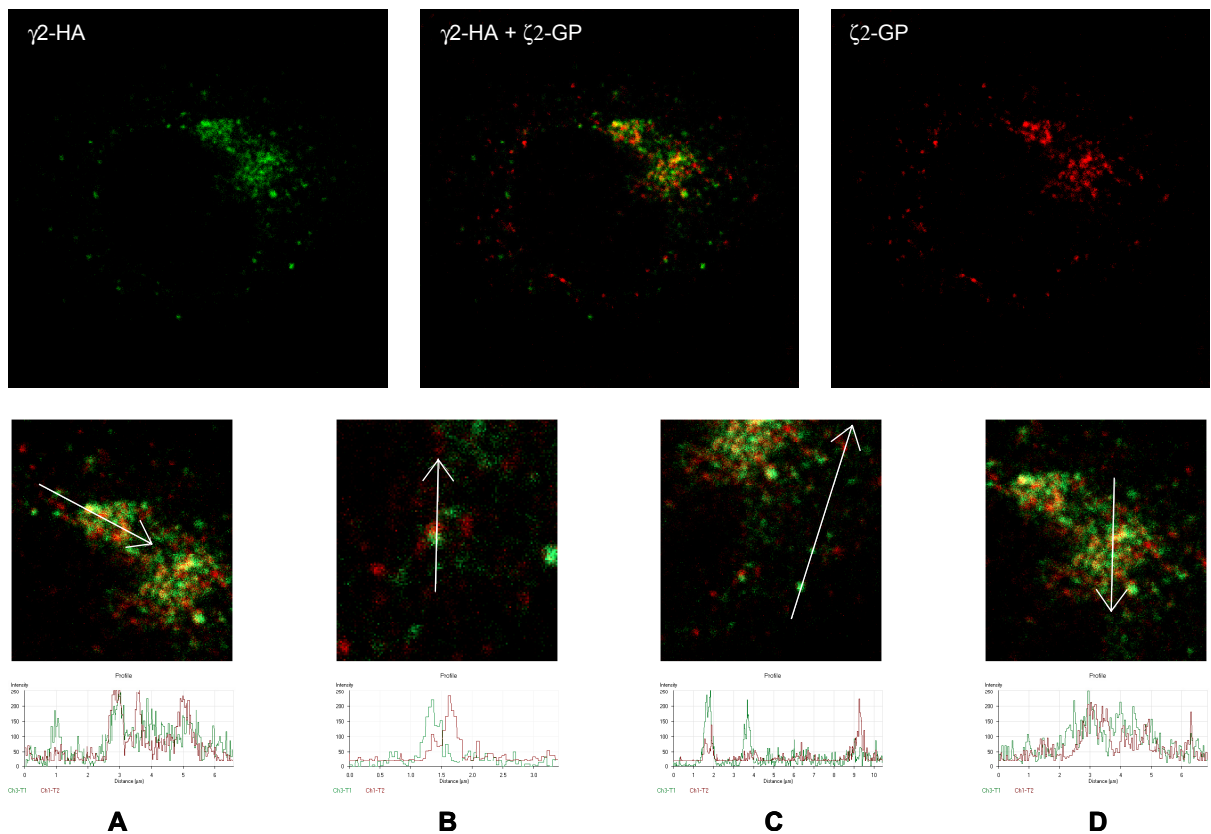


**Abb. 29.** Kolokalisation von TGN38 mit  $\zeta$ 2-COP.

Vergleicht man den roten mit dem grünen Kanal, erkennt man, dass bestimmte TGN38-markierte Strukturen (grüner Kanal) in den  $\zeta$ 2-gp-markierten Bereichen fehlen oder nur mit Unterbrechungen vorhanden sind. Die Analyse der Signalintensitäten des roten und grünen Kanals entlang einer selbst gewählten Linie ergab, dass viele TGN38-markierte Strukturen nicht mit  $\zeta$ 2-gp-markierten Strukturen kolokalisieren (Abbildung 29 A-D).

### 16.5 Vergleich der Lokalisation von $\zeta$ 2-COP und HA- $\gamma$ 2

Durch Immunpräzipitationen konnte nachgewiesen werden, dass drei verschiedene Coatomer-Komplexe existieren, die durch die Kombinationen  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 1,  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 2 und  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1 definiert werden (Kapitel 12 und 13). Es stellte sich die Frage, ob die verschiedenen Coatomer-Komplexe unterschiedliche Funktionen ausüben. Eine solche Spezialisierung individueller Coatomer-Komplexe könnte auch zu verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Zelle führen. Voraussetzung für die Unterscheidung der Komplexe waren geeignete Antikörper. Es standen aber keine  $\gamma$ 1-,  $\gamma$ 2- und  $\zeta$ 1-COP-spezifischen Antikörper für die Immunfluoreszenz zur Verfügung. Außer der Zelllinie, mit der die bisher gezeigten Lokalisationen durchgeführt worden waren, stand auch eine stabile Rattenleberzelllinie zur Verfügung, die HA-getagtes  $\gamma$ 2-COP exprimiert. Wie in Abbildung 24 dargestellt, konnte  $\zeta$ 2-COP auch in dieser Zelllinie nachgewiesen werden. Mit dieser Zelllinie sollte nun untersucht werden, ob  $\zeta$ 2-COP mit  $\gamma$ 2-COP kolokalisiert.



**Abb. 30.** Vergleich der Lokalisation von  $\zeta 2$ -COP und HA- $\gamma 2$ .

HA- $\gamma 2$ -Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und anschließend mit Antikörpern gegen  $\zeta 2$ -COP ( $\zeta 2$ -gp) und gegen das HA-Epitop inkubiert. Die Detektion von  $\zeta 2$ -gp-markierten Strukturen erfolgte über einen Alexa-546-gekoppelten Meerschweinchen-Sekundärantikörper. HA-markierte Strukturen wurden mit einem Alexa-488-gekoppelten Maus-Sekundärantikörper detektiert. In Abbildung 30 ist ein konfokaler Schnitt durch eine Zelle gezeigt.  $\zeta 2$ -gp-markierte Strukturen kolokalisierten zum Teil mit HA-markierten Strukturen. Durch Vergleich der Signalintensitäten des roten und grünen Kanals entlang selbst gewählter Linien konnte jedoch gezeigt werden, dass es viele Bereiche gibt, in denen  $\gamma 2$ -HA nicht mit  $\zeta 2$ -gp-markierten Strukturen kolokalisiert (Abbildung 30 A-D).

## 16.6 Zusammenfassung der Immunfluoreszenz-Ergebnisse

Die Markierung von Rattenleber-Zellen mit dem  $\zeta 2$ -spezifischen Antikörper  $\zeta 2$ -gp ergab, dass es einen  $\zeta 2$ -Gradienten entlang des frühen sekretorischen Weges gibt. Späte Stationen kolokalisieren schlechter mit  $\zeta 2$ -gp-markierten Strukturen als frühe. Außerdem konnten Bereiche identifiziert werden, in denen  $\zeta 2$ -gp-markierte Strukturen nicht mit HA- $\gamma 2$ -COP kolokalalisieren. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.



**Tabelle 5.** Qualitativer Vergleich der Kollokationen von  $\zeta$ 2-gp-markierten Strukturen mit verschiedenen Markern

Marker	Kollokalisation
CM1	++
KDEL	++
GM130	+
TGN38	-
$\gamma$ 2-HA	+/-

### III Diskussion

Die Haupthüllkomponente von COPI-Vesikeln ist der heterooligomere Proteinkomplex Coatomer. Zur Vesikelbildung muss dieser in einer bivalenten Interaktion mit Oligomeren der p24-Familie und ARF-GTP an die Donor-Membran rekrutiert werden (Wieland, F. und Harter, C., 1999). Man war lange davon ausgegangen, dass Coatomer ein heptamerer Komplex ist, der aus den Untereinheiten  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und  $\zeta$ -COP zusammengesetzt ist. Die Entdeckung und Charakterisierung der neuen  $\gamma$ -COP-Isoform  $\gamma_2$ -COP (Blagitko, N. et al., 1999) erlaubte die Definition von zwei verschiedenen Coatomer-Komplexen. Diese Komplexe enthalten entweder  $\gamma_1$ - oder  $\gamma_2$ -COP, und es gab erste Hinweise darauf, dass sie unterschiedliche Funktionen ausüben (Hess, P., 2001; Baier, C., 2002).

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Identifizierung der  $\zeta$ -COP-Isoform  $\zeta_2$ -COP auf transkriptioneller Ebene (Futatsumori, M. et al., 2000). Zunächst sollte untersucht werden, ob  $\zeta_2$ -COP in Säugetierzellen exprimiert wird. Des Weiteren wurde die Architektur von Coatomer bezüglich seiner  $\gamma/\zeta$ -Kombinationen analysiert. Die funktionellen Hinweise, die man durch Untersuchungen mit  $\gamma_2$ -COP gewonnen hatte, sollten im Hinblick auf die  $\zeta$ -COP-Untereinheiten überprüft und weitergeführt werden.

#### 1 Charakterisierung von $\zeta_2$ -COP auf translationeller Ebene

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass  $\zeta_2$ -COP auf transkriptioneller Ebene in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden konnte (Futatsumori, M. et al., 2000). Um jedoch die Expression von  $\zeta_2$ -COP auf translationeller Ebene analysieren zu können, wurden spezifische Antikörper gegen den N-terminalen Überhang hergestellt. Außerdem wurden spezifische Antikörper gegen  $\zeta_1$ -COP benötigt. Die Immunisierung mit einem Peptid, analog einer internen Sequenz von  $\zeta_1$ -COP, die sich deutlich von  $\zeta_2$ -COP unterscheidet, führte zum Erfolg. Man erhielt somit einen Satz von Antikörpern, mit dem sich spezifisch  $\zeta_1$ - und  $\zeta_2$ -COP im Western Blot unterscheiden ließen.

Es wurde zunächst untersucht, ob Coatomer  $\zeta_2$ -COP enthält und ob sich  $\zeta_2$ -COP in verschiedenen Säugetierspezies nachweisen lässt. Dazu wurde gereinigter oder aus Zytosol immunpräzipitierter Coatomer im Western Blot analysiert. Im Coatomer-Komplex von Mensch, Rind, Maus, Ratte und Kaninchen ließ sich  $\zeta_2$ -COP mit einem spezifischen Antikörper nachweisen. Offensichtlich ist die Sequenz, gegen die der Antikörper hergestellt worden war, bei allen untersuchten Spezies stark konserviert. Diese Annahme konnte durch den Vergleich der N-terminalen  $\zeta_2$ -COP-Sequenz von Mensch und Maus bestätigt werden.

Für Ratte, Rind und Kaninchen wurden noch keine  $\zeta$ 2-COP-Datenbankeinträge gefunden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass  $\zeta$ 2-COP in allen Säugetieren exprimiert wird.

Die Suche nach  $\zeta$ 2-COP verwandten Sequenzen in anderen Spezies war auch Gegenstand einer Datenbankrecherche. Auf Grundlage des Recherche-Ergebnisses wurde mit Hilfe des *alignment*-Programms *clustalw* eine Verwandtschaftsanalyse durchgeführt. Abbildung 31 zeigt den Stammbaum aller  $\zeta$ -COP-verwandten Sequenzen, die zu diesem Zeitpunkt gefunden wurden.

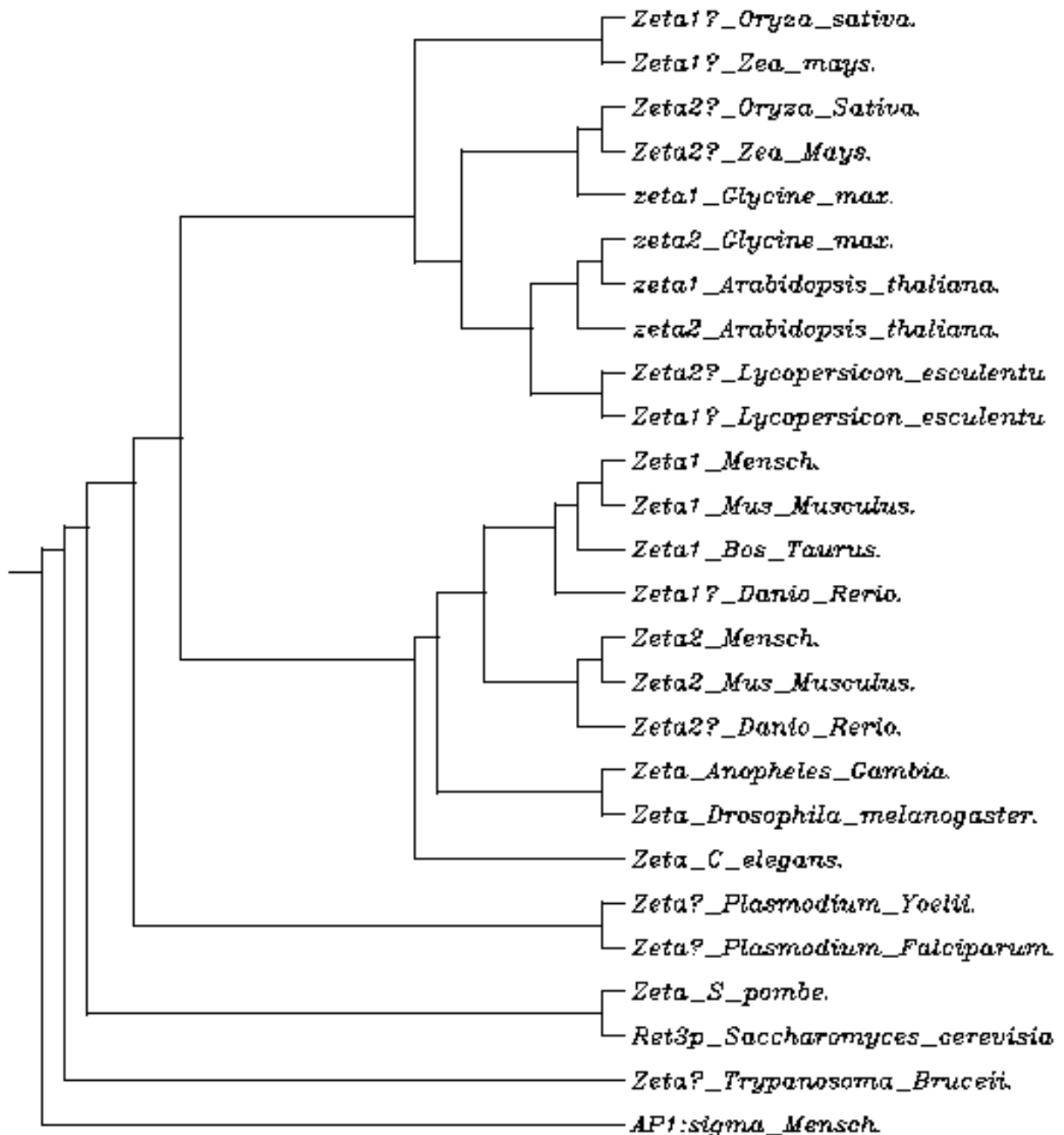


Abb. 31. N-J-Dendrogramm von  $\zeta$ -COP-Sequenzen, die über eine BLASTP-Suche ermittelt wurden.

Mit dieser Analyse wurde untersucht, ob für alle Spezies zwei verschiedene  $\zeta$ -COPs existieren und wann die Differenzierung in zwei verschiedene  $\zeta$ -COPs in der Evolution stattfand. Da, wie bereits in der Einleitung erwähnt, zwischen den  $\sigma$ -Untereinheiten der Adaptine und den  $\zeta$ -COPs eine Homologie besteht (Boehm, M. und JS., B., 2001), wurde zusätzlich zu den  $\zeta$ -COP Sequenzen die  $\sigma$ -Untereinheit des AP1-Komplexes in den Stammbaum mit einbezogen.

Die Datenbankrecherche ergab sowohl für Vertebraten als auch für Pflanzen zwei verschiedene  $\zeta$ -COPs. Für Hefen, Plasmodien, *C. elegans*, *Drosophila* und *Anopheles* wurde hingegen nur jeweils eine  $\zeta$ -COP-Sequenz ermittelt.



**Abb. 32.** Schematische Domänenstruktur aller gefundenen  $\zeta$ -COPs und des  $\sigma$ -Adaptins des AP1-Komplexes. Rote Blöcke: Hochkonservierte Bereiche d. h. die Aminosäuren sind für die  $\zeta$ -COPs aller Spezies und  $\sigma$ -Adaptin identisch. Blaue Blöcke: Konservierte Bereiche mit konservativem Austausch. Grauer Block: N-terminaler Überhang von  $\zeta$ 2-COP.

Auffällig an dem *alignment* aller  $\zeta$ -COPs ist die gemeinsame Domänenstruktur (Abbildung 32). Es existieren im internen Bereich drei hochkonservierte Boxen, die nicht nur über alle  $\zeta$ -COPs, sondern auch für die  $\sigma$ -Untereinheit des AP1-Komplexes identisch sind. Außerdem finden sich sechs weitere konservierte Boxen, in denen allenfalls ein konservativer Austausch von Glutamat durch Aspartat oder Valin durch Isoleucin auftritt. Auch diese Boxen finden sich in der  $\sigma$ -Untereinheit des AP1-Komplexes. Im N-terminalen Bereich nimmt die Variabilität der  $\zeta$ -COPs zu. Der N-terminale Überhang von  $\zeta$ 2-COP mit der Sequenz, gegen die der Antikörper hergestellt worden war, findet sich nur bei Mensch und Maus. Für Rind, Kaninchen und Ratte waren keine Sequenzdaten verfügbar. Die putativen  $\zeta$ 2-COPs aller anderen Spezies haben einen viel kürzeren oder gar keinen N-terminalen Überhang.  $\zeta$ 2-COP von Mensch und Maus ist dadurch mit ca. 23.5 kDa das größte gefundene  $\zeta$ -COP.  $\zeta$ 1-COP von Mensch hat eine Masse von ca. 20 kDa. Dies entspricht der Masse der meisten gefundenen  $\zeta$ -COPs, auch wenn zwei Isoformen gefunden wurden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die teils widersprüchliche Bezeichnung der  $\zeta$ -COP-Isoformen nicht aufgrund ihrer Homologie zu den Säugetier- $\zeta$ -COPs und auch nicht biochemisch, sondern rein willkürlich festgelegt wurde.

An dem Stammbaum fällt außerdem auch auf, dass zwischen  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP der Wirbeltiere ein wesentlich deutlicherer Unterschied besteht als zwischen den beiden  $\zeta$ -COPs der Pflanzen.  $\zeta$ 2-COP der Maus ist beispielsweise näher verwandt mit  $\zeta$ 2-COP des Menschen als mit  $\zeta$ 1-COP der Maus. Die  $\zeta$ -COPs der Pflanzen lassen sich anders als bei den Wirbeltieren nicht in zwei Hauptzweige aufteilen. Es sieht vielmehr danach aus, als ob die Trennung in zwei Isoformen erst sehr spät in der Evolution stattgefunden hat.

Die Frage, aus welchem der beiden  $\zeta$ -COPs sich das jeweils andere entwickelt hat, kann mit dieser Analyse nicht hinreichend beantwortet werden. Denkbar wäre, dass sich die  $\zeta$ 2-COPs der Säugetiere aus den  $\zeta$ 1-COPs entwickelt haben, da ein solch langer N-terminaler Überhang nur bei den höher entwickelten Lebewesen gefunden wurde. In einer phylogenetischen Studie mit den beiden  $\gamma$ -COP-Isoformen (Hahn Y, L.Y., Yun JH, Yang SK, Park CW, Mita K, Huh TL, Rhee M, Chung JH., 2000) wurde gezeigt, dass *Drosophila* und *S. cerevisiae* nur ein  $\gamma$ -COP enthalten. Für Maus, Mensch und Zebrafisch wurden zwei verschiedene  $\gamma$ -COPs gefunden. In der Gruppe der Pflanzen wurde das Auftreten von zwei  $\gamma$ -COP-Isoformen für Mais gefunden und für Reis (*Oryza sativa*) postuliert. Für *Arabidopsis thaliana* wurde bisher keine zweite  $\gamma$ -COP-Isoform ermittelt. Vergleicht man nun diese Daten mit der oben gezeigten  $\zeta$ -COP-Analyse, scheint es, als ob in den meisten Fällen mit einer Duplikation von  $\gamma$ -COP immer auch eine Duplikation von  $\zeta$ -COP einherging.

Mit den spezifischen  $\zeta$ 2-COP-Antikörpern wurde in dieser Arbeit die Expression von  $\zeta$ 2-COP in Coatomer-Komplexen verschiedener Gewebezytosole untersucht. Korrelierend zu den mRNA-Befunden (Futatsumori, M. et al., 2000) zeigte sich, dass alle untersuchten Gewebe sowohl  $\zeta$ 1- als auch  $\zeta$ 2-COP exprimierten. Eine gewebespezifische Funktion von  $\zeta$ 2- oder  $\zeta$ 1-COP konnte somit ausgeschlossen werden.

Das Organ mit dem höchsten Coatomer-Anteil ist die Leber. Dies verwundert nicht, da es sich bei der Leber um ein stark sezernierendes Gewebe handelt. Um eine Vorstellung davon zu bekommen, wie groß der Anteil von  $\zeta$ 2-COP am Gesamt- $\zeta$ -COP-Pool ist, wurde das Verhältnis von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP im Coatomer-Komplex von Leberzytosol untersucht. Der darin enthaltene Anteil von  $\zeta$ 2-COP wurde auf ca. 20% bestimmt.

## 2 Architektur von Coatomer

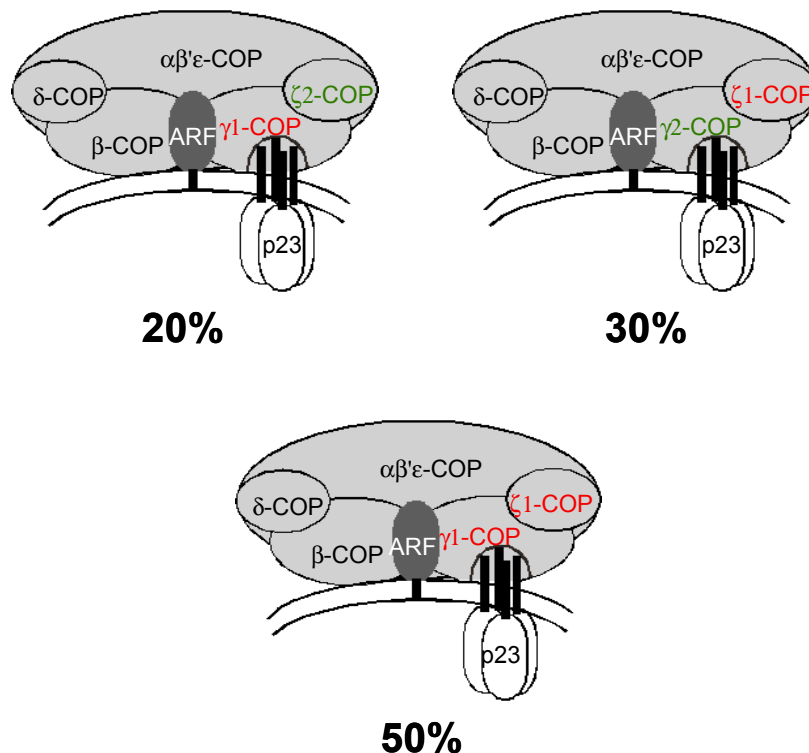
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, lässt sich Coatomer in drei definierte Subkomplexe zerlegen. Diese Subkomplexe werden durch die Kombinationen  $\alpha/\beta'/\epsilon$ ,  $\beta/\delta$  und  $\gamma/\zeta$  definiert (Faulstich, D. et al., 1996; Pavel, J. et al., 1998). Futatsumori et al. hatten in Hefe-*two hybrid*-Interaktionsstudien gezeigt, dass beide  $\zeta$ -COPs mit beiden  $\gamma$ -COPs interagieren können. Sie hatten daher postuliert, dass Coatomer die Subkomplexe  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 1,  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 2,  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 2 oder  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1 enthalten kann. Durch Immunpräzipitationsstudien mit hier beschriebenen spezifischen Antikörpern konnte dies nun mit den endogenen COPs überprüft werden.

Zunächst wurde in der Immunpräzipitation untersucht, ob  $\zeta$ 1- auch zusammen mit  $\zeta$ 2-COP in einem Coatomer-Komplex vorkommt. Da mit dem  $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörper aber kein  $\zeta$ 1-COP kopräzipitiert wurde, konnte gezeigt werden, dass immer nur eines der beiden  $\zeta$ -COPs im Coatomer-Komplex vorkommt. Aufgrund der Tatsache, dass Coatomer auch nur eine der beiden  $\gamma$ -COP-Untereinheiten enthält, kann nach wie vor davon ausgegangen werden,

dass es sich bei Coatomer um ein Gemisch von Komplexen aus je sieben Untereinheiten handelt.

Die Analyse der endogenen  $\gamma/\zeta$ -Kombinationen mittels Immunpräzipitation mit einem  $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörper ergab, dass ausschließlich die  $\gamma$ 1-COP-Untereinheit kopräzipitiert wurde. Dieser Befund war gleich in zweifacher Weise überraschend: Zum einen war aufgrund des relativ ähnlichen Anteils von  $\zeta$ 2- und  $\gamma$ 2-COP eine Kombination  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 2 erwartet worden. Zum anderen hatten Futatsumori et al. aufgrund ihrer *two-hybrid*-Analysen eine Interaktion  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1 und  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 2 gezeigt. Da die *two-hybrid* Analysen jedoch nur mit den einzelnen  $\gamma/\zeta$ -Untereinheiten durchgeführt wurden, was nicht zwangsläufig die Situation in einem funktionellen Gesamt-Coatomer-Komplex widerspiegelt, zeigt dies wohl die experimentellen Grenzen dieser Methode auf. Weniger leicht erklärbar war die Exklusivität für  $\zeta$ 2- und  $\gamma$ 1-COP im Hinblick auf die stöchiometrischen Befunde dieser Arbeit und der Arbeit von C. Baier (Baier, C., 2002). Wenn der Anteil von  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1-COP-Coatomer 20% beträgt und man gleichzeitig davon ausgeht, dass der andere Coatomer-Komplex durch die Kombination  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 2 definiert wird und sein Anteil 30% beträgt, wie erklärt man dann die verbleibenden 50%?

Die Antwort lieferte eine Immunpräzipitation mit dem  $\zeta$ 1-R-Antikörper aus  $\zeta$ 2-COP-depletierten Zytosol. Daraus resultierte, dass  $\zeta$ 1-COP nicht nur ausschließlich mit  $\gamma$ 2-COP in einem Komplex vorkommt. Es existiert noch ein dritter Komplex, der durch die Kombination  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 1 definiert wird. Abbildung 33 zeigt die drei verschiedenen Komplexe mit den berechneten Verhältnissen.



**Abb. 33.** Konstitution und Stöchiometrie der drei verschiedenen Coatomer-Komplexe.

### 3 Funktion von $\zeta$ 2-COP

Die oben gezeigten Ergebnisse standen im Widerspruch zu den experimentellen Befunden von Futatsumori et al, die eine generelle Austauschbarkeit der  $\zeta$ - und  $\gamma$ -COPs im Coatomer-Komplex und damit eine untergeordnete Funktion der Isoformen postuliert hatten. Die Identifizierung von drei statt bisher zwei verschiedenen Coatomer-Komplexen könnte vielmehr ein Hinweis darauf sein, dass diese auch unterschiedliche Funktionen ausüben.

Für  $\zeta$ 2-COP existierten zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Erkenntnisse zur Funktion. Die Identifizierung verschiedener Coatomer-Komplexe, abhängig von ihrer  $\zeta/\gamma$ -Kombination, deutete jedoch darauf hin, dass diese auch unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Möglich wäre ein Modell, nach dem es verschiedene COPI-Vesikelpopulationen gibt, deren Proteinhülle nur einen der möglichen Coatomer-Komplexe enthält. Nach diesem Modell könnte z. B. die Proteinhülle charakteristisch für die Richtung sein, in welche die Vesikel transportiert werden. Im klassischen COPI-Vesikel-*budding-assay* wurde gezeigt, dass sowohl  $\gamma$ 1- als auch  $\gamma$ 2-COP-Coatomer entsprechend dem zytosolischen Verhältnis an Golgi-Membranen rekrutiert werden. Coatomer, der  $\gamma$ 2-COP enthält, wird aber bevorzugt in COPI-Vesikel eingebaut (Baier, C., 2002).

In vorliegender Arbeit wurde auch die Konstitution von COPI-Vesikeln in Bezug auf ihre  $\zeta$ -COP-Untereinheiten untersucht. Dabei konnte im klassischen *budding-assay* klar eine Abreicherung von  $\zeta$ 2-COP in COPI-Vesikeln gegenüber dem *primed golgi* gezeigt werden. Da  $\zeta$ 2-COP-Coatomer ausschließlich in der Kombination  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1 existiert, hat eine Abreicherung von  $\zeta$ 2-COP automatisch eine Abreicherung von  $\gamma$ 1-COP und somit eine Anreicherung von  $\gamma$ 2-COP zur Folge. Die Daten waren also konsistent mit den Experimenten von C. Baier (Baier, C., 2002). COPI-Vesikel konnten auch über ihre  $\gamma$ 2-Untereinheit immunisoliert werden, und es zeigte sich, dass in diesen Vesikeln die  $\gamma$ 1-Untereinheit drastisch abgereichert war (persönliche Mitteilung von C. Reinhard).

Eine mögliche Erklärung dafür, dass COPI-Vesikel nicht exklusiv  $\gamma$ 1- oder  $\gamma$ 2-COP enthalten, liegt in der Verwendung einer nicht hydrolysierbaren Form von GTP (GMP-PNP) im COPI-Vesikel-*budding-assay*. Es ist schon länger bekannt, dass die Hydrolyse von GTP notwendig ist, um eine Sortierung von Frachtmolekülen in COPI-Vesikel zu gewährleisten (Nickel, W. et al., 1998a). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Untersuchung, ob bekannte Coatomer-Rezeptoren wie die p24-Familienmitglieder (Fiedler, K. et al., 1996; Sohn, K. et al., 1996; Dominguez, M. et al., 1998; Goldberg, J., 2000) oder Frachtproteine wie z. B. Wbp1 (Cosson, P. und Letourneur, F., 1994; Letourneur, F. et al., 1994) unterschiedlich starke Affinitäten für die verschiedenen Coatomer-Komplexe haben. Dies ist besonders spannend, weil sich die Mitglieder der p24-Familie im frühen sekretorischen Transportweg unterschiedlich verhalten (Jenne, N. et al., 2002). Es wäre durchaus denkbar, dass über die Hüllrezeptoren auch die Zusammensetzung der Hülle von COPI-Vesikeln gesteuert wird. Wenn nun aber nicht nur Fracht-Proteine, sondern auch Hüll-Rezeptoren in

GMP-PNP-Vesikeln nicht richtig sortiert würden, könnte daraus eine unphysiologische Repräsentanz von Coatomer-Komplexen in der Hülle von COPI-Vesikeln resultieren. Da es die  $\gamma$ -Untereinheiten sind, die mit den Coatomer-Rezeptoren interagieren, war es von Interesse, die relativen Bindungsfähigkeiten der Coatomer-Isotypen mit den zytoplasmatischen Domänen der p24-Proteinfamilie zu analysieren.

Die Bindungspräferenzen der verschiedenen Komplexe an Coatomer-Rezeptoren wurden in einem Bindungsassay nach Sohn et al. (Sohn, K. et al., 1996) analysiert. Die zytoplasmatischen Domänen von p24-Familienmitgliedern und von Wbp1 waren dabei kovalent an Thiopropylsepharose gekoppelt worden. Coatomer wurde ausschließlich an die p24-Familienmitglieder p23, p24, p25 und an Wbp1 rekrutiert. Das Verhältnis von  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP entsprach bei Wbp1 ungefähr dem natürlichen Verhältnis im Zytosol, d. h. es konnte keine Präferenz für die Bindung von  $\gamma$ 2- oder  $\gamma$ 1-COP-Coatomer beobachtet werden. Anders verhielt es sich mit den p24-Familienmitgliedern. Die zytoplasmatischen Domänen von p23, p24 und p25 zeigten eine höhere Affinität für  $\gamma$ 2-COP-Coatomer als für  $\gamma$ 1-COP-Coatomer. Am stärksten war der Effekt für p24 ausgeprägt, am schwächsten für p25. Eine Exklusivität für  $\gamma$ 1- oder  $\gamma$ 2-COP konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Rekrutierung von Coatomer an p23, p24 und p25 zeigte zudem eine Präferenz für  $\zeta$ 1-COP-Coatomer. Dabei war der Effekt am stärksten für p24 ausgeprägt, am schwächsten für p23. Da  $\gamma$ 2-COP nur im Komplex mit  $\zeta$ 1-COP vorkommt, ergänzen sich die Ergebnisse. Man kann demnach postulieren, dass  $\zeta$ 1/ $\gamma$ 2-COP-Coatomer eine höhere Affinität für p24 hat als die beiden anderen Coatomer-Komplexe.

Es stellte sich aber auch die Frage, warum die Affinitätsunterschiede in diesem Experiment so gering ausfielen. Dabei muss man allerdings berücksichtigen, dass die p24-Familienmitglieder in der Zelle auch in Form von heterooligomeren Komplexen vorkommen (Belden, W.J. und Barlowe, C., 1996; Dominguez, M. et al., 1998; Gommel, D. et al., 1999; Marzioch, M. et al., 1999; Jenne, N. et al., 2002). Diese Komplexe sind bei Bindungsexperimenten an Thiopropylsepharose nicht zu simulieren. Der Oligomerisierungsgrad von p24-Familienmitgliedern auf der Sepharose hängt mit der lokalen Konzentration der Peptide auf der Oberfläche und damit mit der Kopplungsausbeute zusammen. Nach Kopplung einer Mischung von zwei p24-Familienmitgliedern lässt sich jedoch nicht kontrollieren, ob tatsächlich Heterooligomere auf der Oberfläche exponiert werden. In einem Testsystem mit definierten Heterooligomeren wäre es möglich, dass der Affinitätsunterschied für die verschiedenen Coatomer-Komplexe stärker ausfallen würde.

Eine weitere Möglichkeit, verschiedene Coatomer-Komplexe nicht nur biochemisch, sondern auch topologisch zu unterscheiden, bietet die Immunfluoreszenzanalyse. Zunächst wurde die Lokalisation von  $\zeta$ 2-COP in der Zelle durch Kolokalisation mit verschiedenen Markern des sekretorischen Wegs untersucht.  $\zeta$ 2-COP kolokalisierte am besten dem KDEL-Rezeptor, welcher ein Marker für das ERGIC und den *cis*-Golgi darstellt. Am schlechtesten kolokalisierte  $\zeta$ 2-COP mit TGN38, einem Marker für das Trans-Golgi-Network. Diese



Ergebnisse zeigten für  $\zeta$ 2-COP eine ähnliche Verteilung, wie sie bereits mit anderen Coatomer-Markern beobachtet worden war, die nicht zwischen den verschiedenen Komplexen unterscheiden konnten. Die jetzt mögliche Feinanalyse auf der Ebene der Immunfluoreszenz zeigt, dass innerhalb verschiedener Stationen des frühen sekretorischen Wegs eine ungleichmäßige Verteilung der drei Coatomer-Komplexe vorliegt.

Rattenleberzellen, die stabil HA-markiertes  $\gamma$ 2-COP exprimierten, zeigten eine deutlich geringe Kolo-kalisation des HA-Konstrukts mit  $\zeta$ 2-COP. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass  $\gamma$ 2-COP wesentlich schlechter mit dem KDEL-Rezeptor kolo-kalisiert als  $\zeta$ 2-COP (persönliche Mitteilung von Dr. C. Reinhard). Natürlich muss man hier im Prinzip die Möglichkeit einer Mislokalisierung von HA- $\gamma$ 2-COP bzw. HA- $\gamma$ 2-Coatomer in der Zelle in Betracht ziehen. Es hat sich jedoch in einer Reihe von Experimenten gezeigt, dass die Einführung von „Tags“ in Coatomer-Untereinheiten (z. B. GFP- $\epsilon$ -COP, Presley, J. et al., 2002) keinen Einfluss auf die Lokalisation der jeweiligen Komplexe hatte. Insgesamt kann man diese Experimente also als Hinweis darauf werten, dass die verschiedenen Coatomer-Komplexe innerhalb der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind, und daher auch unterschiedliche Funktionen haben.

Für den intrazellulären Transport im frühen sekretorischen Weg werden seit geraumer Zeit zwei verschiedene Modelle diskutiert. Außer dem bereits in der Einleitung vorgestellten Modell des vesikulären Transports (Palade, G., 1975) wurde, vor allem für den Transport großer Moleküle (z. B. Prokollagen (Bonfanti, L. et al., 1998) oder Algenschalen (Becker, B. et al., 1995)), das Modell der zisternalen Reifung postuliert. Nach diesem Modell wird die Fracht durch progressive Reifung der Golgi-Zisternen vorwärts transportiert. Dadurch verbleibt die Fracht während des Transports im Lumen der Golgi-Zisternen. Damit die beobachtete Verteilung von Golgi-Enzymen aufrecht erhalten wird, wurde ein Rücktransport der entsprechenden Proteine in Vesikeln oder in tubulären Strukturen vorgeschlagen (Mironov, A.A. et al., 1997). Im Gegensatz dazu konnten Volchuk et al. (Volchuk, A. et al., 2000) sogenannte Megavesikel (ca 400 nm i.d.) identifizieren, die sich von den Enden der Golgi-Zisternen abschnüren und mit denen größere Proteinaggregate vorwärts transportiert werden. An diesen Megavesikeln wurde auch Coatomer nachgewiesen. Diese Beobachtungen schließen deshalb einen Transport größerer Moleküle durch COPI-vermittelten Transport nicht unbedingt aus.

Das vesikuläre Modell erfordert mindestens zwei verschiedene Vesikeltypen. Ein Vesikeltyp wäre für den intra Golgi-Transport verantwortlich, der andere für den Transport vom Golgi zurück zum ER. Sehr wahrscheinlich ist es, dass es verschiedene COPI-Vesikeltypen für den anterograden und den retrograden Transport gibt (Orci, L. et al., 1997; Nickel, W. et al., 1998b). Durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Charakterisierung von drei verschiedenen Coatomer-Komplexen, deren Stöchiometrie (20:30:50 =  $\zeta$ 2/ $\gamma$ 1: $\zeta$ 1/ $\gamma$ 2: $\zeta$ 1/ $\gamma$ 1) quantitativ bestimmt werden konnte, wird die Existenz verschiedener Vesikeltypen im COPI-vermittelten Transport unterstützt. Nach unserer Vorstellung enthält ein COPI-Vesikel nur

---

einen der drei Coatomer-Komplexe, was für einen Komplex bereits gezeigt wurde. Dadurch ergeben sich mindestens drei verschiedene Vesikeltypen, die nun verschiedenen Aufgaben übernehmen können. Ein Vesikeltyp wäre beispielsweise für den anterograden intra-Golgi-Transport, ein anderer für den retrograden intra-Golgi-Transport und ein dritter für den retrograden Transport vom Golgi zurück zum ER verantwortlich. Diese Vorstellung wird durch die dargestellten Befunde zur Lokalisierung von COPI-Hüllkomponenten unterstützt. Zukünftige Experimente erfordern Werkzeuge, mit denen alle vorhandenen Vesikelpopulationen einzeln identifiziert und charakterisiert werden können. Durch Immuno-Elektronenmikroskopie könnte z. B. die Lokalisation von verschiedenen Vesikeltypen mit unterschiedlichen Markern des frühen sekretorischen Wegs untersucht werden.

## IV Zusammenfassung

COPI-Vesikel vermitteln den Transport von Proteinen im frühen sekretorischen Weg. Ihre Proteinhülle besteht aus ARF-GTP und Coatomer, einem heptameren Proteinkomplex. Dieser besteht aus den Untereinheiten  $\alpha$ -,  $\beta'$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und  $\zeta$ -COP. Zur Vesikelbildung wird Coatomer in einer bivalenten Interaktion mit ARF-GTP und Oligomeren der p24-Familienmitglieder an die Donormembran rekrutiert. Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass eine zweite Isoform von  $\gamma$ -COP existiert, die mit  $\gamma_2$ -COP bezeichnet worden war. Diese Untereinheit wird ubiquitär exprimiert und ist Bestandteil des Coatomer-Komplexes. Ein Coatomer-Komplex enthält jedoch immer nur eine der beiden  $\gamma$ -COP-Isoformen. Auch für die Untereinheit  $\zeta$ -COP war auf Genebene eine neue  $\zeta_2$ -Isoform beschrieben worden, deren Transkriptionsprodukte in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde diese neue Untereinheit  $\zeta_2$ -COP biochemisch und funktionell charakterisiert.

Es wurden spezifische Antikörper gegen  $\zeta_2$ - und  $\zeta_1$ -COP hergestellt, um zwischen den beiden  $\zeta$ -COPs unterscheiden zu können. Mit einem  $\zeta_2$ -COP spezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, dass  $\zeta_2$ -COP ubiquitär exprimiert wird und Bestandteil des Coatomer-Komplexes ist. Der Anteil von  $\zeta_2$ -COP am Gesamt- $\zeta$ -COP-Pool im Zytoplasma von Leberzellen wurde auf 20% bestimmt.

Durch Immunpräzipitation mit einem  $\zeta_2$ -COP-spezifischen Antikörper konnte zudem nachgewiesen werden, dass ein Coatomer-Komplex immer nur eine der beiden  $\zeta$ -COP-Untereinheiten enthält. Es stellte sich nun die Frage, in welchen Kombinationen die  $\zeta$ -COPs mit den beiden  $\gamma$ -COP-Untereinheiten vorkommen. Koimmunpräzipitationsstudien ergaben, dass  $\zeta_2$ -COP ausschließlich mit  $\gamma_1$ -COP, und  $\zeta_1$ -COP sowohl mit  $\gamma_1$ - als auch mit  $\gamma_2$ -COP in einem Komplex vorkommt. Es wurden somit drei Coatomer-Spezies identifiziert, die durch die Kombinationen  $\zeta_2/\gamma_1$  (20%),  $\zeta_1/\gamma_1$  (50%) und  $\zeta_1/\gamma_2$  (30%) definiert werden.

Im klassischen COPI-Vesikel-*budding-assay* mit Zytosol und gereinigtem Golgi wurde der Einbau von  $\zeta_2$ -COP in COPI-Vesikel nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass sowohl  $\zeta_1$ - als auch  $\zeta_2$ -COP-Coatomer an Golgi Membranen rekrutiert werden, bevorzugt jedoch  $\zeta_1$ -COP-enthaltender Coatomer in COPI-Vesikel eingebaut wird.

Die *Coat*-Rezeptoren p23, p24 und p25 sind in der Lage, Coatomer zu binden. Für p23 wurde bereits eine direkte Interaktion mit der  $\gamma$ -Untereinheit von Coatomer nachgewiesen. Daher wurde die Affinität der zytoplasmatischen Domänen von p24-Familienmitgliedern und Wbp1, einem klassischen Frachtprotein, gegenüber verschiedenen Coatomer-Komplexen untersucht.  $\gamma_2$ -COP-Coatomer zeigte eine erhöhte Affinität für die p24-Familienmitglieder

p23, p24 und p25 verglichen mit  $\gamma$ 1-COP-Coatomer. Der Effekt war am stärksten ausgeprägt für p24, am schwächsten bei p25. Für das Frachtprotein Wbp1 zeigte sich keine unterschiedliche Affinität gegenüber  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP-Coatomer. Dasselbe Experiment wurde auch in Hinblick auf die  $\zeta$ -COP-Untereinheiten durchgeführt. Entsprechend der gefundenen Kombinationen ließ sich der beobachtete Trend mit den  $\zeta$ -COPs bestätigen.

Schließlich wurde die Lokalisation von  $\zeta$ 2-COP mit verschiedenen Markern des frühen sekretorischen Weges analysiert. Es zeigte sich, dass es einen  $\zeta$ 2-Gradienten entlang des frühen sekretorischen Weges gibt. Späte Stationen kolokalisierten schlechter mit  $\zeta$ 2-COP-markierten Strukturen als frühe. In einer Zelllinie, die stabil HA-getaggt  $\gamma$ 2-COP exprimiert, wurde die Lokalisation von  $\zeta$ 2-COP und  $\gamma$ 2-COP verglichen. Die biochemischen Daten hatten aufgezeigt, dass  $\zeta$ 2- und  $\gamma$ 2-COP nicht zusammen in einem Coatomer-Komplex vorkommen. Auch in der Immunfluoreszenz konnten viele Bereiche identifiziert werden, in denen  $\zeta$ 2-COP und  $\gamma$ 2-COP nicht kolokalisierten. Dies deutete nicht nur auf eine konstitutionelle, sondern auch auf eine topologische Differenzierung hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Zusammensetzung der Vesikelhülle von COPI-Vesikeln wesentlich komplexer ist als bisher angenommen. Bisher wurde vermutet, dass eine funktionelle Variabilität von COPI-Vesikeln durch Heterooligomere der Rezeptoren für Coatomer, der p24-Familienmitglieder, erzeugt wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch eine Varianz des Hüllproteins selbst, die notwendigerweise bei künftigen Modellen zur Funktion von COPI-umhüllten Vesikeln berücksichtigt werden muss. Es bieten sich dadurch auch neue Erklärungsmöglichkeiten für die Befunde, dass COPI-Vesikel im frühen sekretorischen Weg sowohl anterograde als auch retrograde Transportfunktionen übernehmen.

# V Material

## 1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen BioRad (München), Calbiochem (Bad Soden/Taunus), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein) und Roche (Mannheim) bezogen.

## 2 Peptide

Die synthetischen Peptide für die Coatomer-Bindungsexperimente und für die Immunisierung wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. R. Piepkorn (DKFZ, Heidelberg) oder in der Peptidsynthese-Abteilung des ZMBH, Heidelberg synthetisiert. Die Aufreinigung der Rohprodukte erfolgte über RP-HPLC.

**Tabelle 6.** Übersicht über synthetische Peptide

Peptidbezeichnung	Sequenz	Chargen-Nummer
ζ2-N-Terminus	CQRPEAWPRPHPGE	442
ζ1-intern	VHRVALRGEDVP-CONH <sub>2</sub>	468
ζ1-N-Terminus	MEALILEPS-COOH	439
p23-wt	CYLRRFFKAKKLIE	440
p23-AS	CYLRRAAKASSLIE	W03/29/00
p24-wt	CYYLKRFFEVRRVV	W03/30/00
p25-wt	CYLKSFFEAKKLV	2469
p26-wt	CLLKSFFTEKRPISRAVHS	428
tp24	CLLKSFFSDKRTTTTRVGS	2138
p27-wt	CTLKRFFQDKRPVPT	2501
Wbp1	CYSSVGKKLETFFKKTN	2308

## 3 Antikörper

### 3.1 Primärantikörper

Die polyklonalen Antikörperseren 883, γ-R, ζ1-R und 891 wurden in unserer Gruppe von Dr. Cordula Harter, der monoklonale Antikörper CM1 von J. E. Rothman zur Verfügung gestellt. ζ1- und ζ2-COP-spezifische Antikörper wurden wie unter Kapitel VI-10 beschrieben hergestellt.

**Tabelle 7.** Primärantikörper

Antigen	Bezeichnung	Epitop	Spezies	IP	Quelle	Verdünnung/ Bemerkungen
$\alpha$ -COP	883	N-Terminus	Kaninchen	-	C. Harter (Wieland)	1:1000 (WB)/Kreuzreagiert mit N-Terminus von $\gamma$ -COP
$\gamma$ 1-COP	$\gamma$ -R	Rekombinantes $\gamma$ 1-COP (Rind)	Kaninchen	+	B. Weigle (Wieland)	1:10000 (WB) Kreuzreagiert mit $\gamma$ 2-COP
$\beta$ -COP	M3A5	Internes Peptid	Maus	-	T. Kreis	1:100 (WB)
$\beta$ '-COP	891	Internes Peptid	Kaninchen	+	C. Harter (Wieland)	
Coatomer	CM1	Nativer Coatomer	Maus	+	J. E. Rothman	
$\zeta$ 1-COP	$\zeta$ 1-I-rb	Internes Peptid	Kaninchen	-	diese Arbeit	1:5000 (WB)
$\zeta$ 2-COP	$\zeta$ 2-rb	N-Terminus	Kaninchen	+	diese Arbeit	1:5000/1:1000 (affi.) (WB)
$\zeta$ 2-COP	$\zeta$ 2-gp	N-Terminus	Meerschweinchen	+	diese Arbeit	1:1000 (WB) 1:10 affi. (IF)
$\zeta$ 1-COP	$\zeta$ 1-R	Rekombinantes $\zeta$ 1-COP	Kaninchen	+	B. Weigle (Wieland)	1:5000 (WB)/Kreuzreagiert mit $\zeta$ 2-COP
TGN38	TGN38	N-Terminus	Maus	-	Dianova	1:500 (IF)
KDEL- Rezeptor	ERD2-4	k. A.	Kaninchen	-	H. D. Söling	1:400 (IF)
GM130	G65120	C-Terminus	Maus	-	BD Transduction Laboratories	1:1000 (IF)

### 3.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 8.** Sekundärantikörper

Bezeichnung	gekoppelt an	Firma	Verdünnung
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Meerrettichperoxidase	Dianova	1:5000
Maus-anti-Kaninchen IgG (monoklonal, Klon RG16)	Meerrettichperoxidase	Sigma	1:5000
Ziege-anti-Maus IgG	Meerrettichperoxidase	BioRad	1:5000
Ziege-anti-Meerschweinchen	Meerrettichperoxidase	Dianova	1:5000
anti-Maus	Alexa 488	Molecular Probes, Leiden	1:1000
anti-Meerschweinchen	Alexa 546	Molecular Probes, Leiden	1:200
anti-Kaninchen	Alexa 488	Molecular Probes, Leiden	1:1000

## 4 Protein-Molekulargewichtsstandards

Als Protein-Molekulargewichtsstandards wurden der BMW-Marker (*broad molecular weight*), und der *Precision-Prestained*-Marker (*broad range*) von BioRad (München) verwendet. Diese enthalten die folgenden Proteine:

**Tabelle 9.** BMW-Marker

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Myosin	200
$\beta$ -Galactosidase	116
Phosphorylase B	97
Rinderserumalbumin	68
Ovalbumin	45
Carboanhydrase	30
Trypsin-Inhibitor	20
Lysozym	14,3
Aprotinin	6,5

**Tabelle 10.** Precision-Prestained-Marker

Molekulargewicht [kDa]
250
150
100
75
50
37
25
15
10

## 5 Primer

Für die Vermehrung von  $\zeta$ 2-COP-cDNA zur Herstellung verschiedener Konstrukte wurden synthetische Oligonukleotide verwendet, die ausschließlich von der Firma Thermo Hybaid (Ulm) bezogen wurden.

**Tabelle 11.** Primer in der PCR zur Herstellung verschiedener Konstrukte

Name	Sequenz	Konstrukt
zeta2-fw3	CAGCGAGCGGAATGCAGCG	$\zeta$ 2-pGEM-T (Klonierung von $\zeta$ 2-COP)
zeta2-rev2	GGACTGGCAAAAGTTCTCTGGGGAAG	$\zeta$ 2-pGEM-T (Klonierung von $\zeta$ 2-COP)
Z2-GST-fw1	CGGGATCCATGCAGCGGCCGGAGGCCTGGC	$\zeta$ 2-N-GST (pGEX2T)
Z2-GST-rev1	CGGAATTCAGGTCTTCATTTCAATAGCG	$\zeta$ 2-N-GST (pGEX2T)
Z2-CNHis-fw1	GGAATTCCATATGCAGCGGCCGGAGGCCTGGC	$\zeta$ 2-C-His pET 24a (+) $\zeta$ 2-N-His pET 28b (+) $\zeta$ 2-N-Terminus-C-His pET 24a (+)
Z2-CHis-rev1	CCGCTCGAGTTTCAATAGCGACCATTTAATCTG	$\zeta$ 2-C-His pET 24a (+)
Z2-NHis-rev1	CGGGATCCAGGTCTTCATTTCAATAGCG	$\zeta$ 2-N-His pET 28b (+)
Z2-NTerm-rev1	CCGCTCGAGTTCCGTGGCTCGGGTGGGCG	$\zeta$ 2-N-Terminus-C-His pET 24a (+)
Z2-Nterm-fw Eco	CGGAATTCATGCAGCGGCCGGAGGCCTGGC	$\zeta$ 2-N-Terminus-N-GFP pEGFP N1
Z2-NTerm-rev Bam	CGGGATCCCCTTCCGTGGCTCGGGTGGGCG	$\zeta$ 2-N-Terminus-N-GFP pEGFP N1
Z2-NTerm-fw Bam	CGGGATCCATGCAGCGGCCGGAGGCCTGGC	$\zeta$ 2-N-Terminus pcDNA 3.1 (+)
Z2-NTerm-rev Eco	CGGAATTCTCATTCCGTGGCTCGGGTGGGCG	$\zeta$ 2-N-Terminus pcDNA 3.1 (+)

## 6 Plasmide

Für die Klonierung von  $\zeta$ 2-COP und für die Herstellung verschiedener Konstrukte wurden folgende Plasmide hergestellt:

**Tabelle 12.** Verwendete Plasmide

Name	Hersteller	Tag	Insert	Schnittstellen
$\zeta$ 2-pGEM-T	Promega (USA)	-	$\zeta$ 2-full length	-
$\zeta$ 2-pET 28b (+)	Novagen	N-terminaler His-tag	$\zeta$ 2-full length	NdeI/BamH1
$\zeta$ 2-pET 24a (+)	Novagen	C-terminaler His-tag	$\zeta$ 2-full length	NdeI/XhoI
$\zeta$ 2-N-Terminus-pET 24a (+)	Novagen	C-terminaler His-tag	$\zeta$ 2-N-terminaler Überhang	NdeI/XhoI
$\zeta$ 2-N-Terminus pEGFP N1	Clontech	C-terminaler GFP-tag	$\zeta$ 2-N-terminaler Überhang	EcoRI/BamH1
$\zeta$ 2-N-Terminus pcDNA 3.1 (+)	Invitrogen	-	$\zeta$ 2-N-terminaler Überhang	BamH1/EcoRI

## 7 DNA-Größenstandards

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden die Standards „100 bp DNA Ladder“ und „1 kb DNA Ladder“ der Firma BioLabs (New England, USA) eingesetzt. In Tabelle 13 sind die einzelnen Fragmentgrößen aufgelistet.

**Tabelle 13.** DNA-Größenstandards

1 kb DNA Ladder	Größe [kb]	100 bp DNA Ladder	Größe [bp]
1	10	1	1517
2	8	2	1200
3	6	3	1000
4	5	4	900
5	4	5	800
6	3	6	700
7	2	7	600
8	1,5	8	500/517
9	1	9	400
10	0,5	10	300
		11	200
		12	100



## 8 Bakterienstämme

**Tabelle 14.** Verwendete *E. coli* Bakterienstämme

Name	Firma
BL21 (DE3)	Novagen
DH5 $\alpha$	Invitrogen
M15 [pREP4]	Qiagen

## 9 Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank der Firma Haereus (Hanau). Zellkulturmedien wurden von Biochrom KG und fötales Kälberserum (FKS) von PAN<sup>TM</sup> bezogen.

**Tabelle 15.** Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Kultur
HepG2-Zellen	ATTC: HB-8065 Hepatozelluläres Karzinom freundlicherweise von der Gruppe W. Just zur Verfügung gestellt	D-MEM 10% FKS 1% Glutamin 500 Einheiten Penicillin und Streptomycin pro ml
Klon 9-HA- $\gamma$ 1	Rattenleberhepatozyten, stabil transformiert mit N-terminal HA-getaggttem $\gamma$ 1-COP wurden freundlicherweise von K. Nakayama zur Verfügung gestellt.	Hams F12-Medium 10% FKS 1% Glutamin 0.5 mg/ml Genitacin
Klon 9-HA- $\gamma$ 2	Rattenleberhepatozyten, stabil transformiert mit N-terminal HA-getaggttem $\gamma$ 2-COP wurden freundlicherweise von K. Nakayama zur Verfügung gestellt.	Hams F12-Medium 10% FKS 1% Glutamin 0.5 mg/ml Genitacin
mhAT <sub>3</sub> F-Zellen	Hepatozytenzelllinie aus einer transgenen Maus, welche das T-Antigen unter der Kontrolle der regulatorischen Region des Gens Antithrombin III exprimiert. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von der Gruppe W. Just zur Verfügung gestellt.	D-MEM F12-Medium 5 % FKS 500 Einheiten Penicillin und Streptomycin pro ml 10 <sup>-8</sup> M Insulin 10 <sup>-6</sup> M Dexamethason 10 <sup>-6</sup> M Trijodothyronin

## 10 Proteaseinhibitoren

Protease-Inhibitor-Tabletten „Complete“, mit EDTA und EDTA-frei wurden von der Firma Roche (Mannheim) bezogen.

## **11 Gewebezytosole**

Rattenleberzytosol und Mäusegewebezytosole wurden freundlicherweise von Herrn Pablo Hess und Frau Carola Baier zur Verfügung gestellt.

## **12 Rattenleber-Golgi**

Rattenleber-Golgi wurde freundlicherweise von Frau Ingrid Meißner zur Verfügung gestellt. Die Proteinkonzentration betrug 2.4 mg/ml.

# VI Methoden

## 1 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erfolgte mit 1%igen Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer. Zur Detektion wurde den Gelen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,05 µg/ml zugesetzt. Agarose wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die Proben wurden mit 0,25 Volumina eines 5 x Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V (Gele, die für die Isolierung von DNA aus dem Gel vorgesehen waren) oder 200 V konstanter Spannung (analytische Gele). Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer.

Verwendete Lösungen:

TAE-Puffer (50 x):	24,2% Tris-HCl (w/v)
	5,71% HOAc (v/v)
	10% 0,5 M EDTA (v/v), pH 8

DNA-Probenpuffer (5 x):	50% Glycerin (w/v)
	0,25% Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
------------------------	------------------------------

## 2 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde die optische Dichte bei 260 nm gemessen und nach folgendem Zusammenhang ausgewertet: Eine optische Dichte von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Dies gilt für doppelsträngige DNA.

## 3 Isolierung von PCR-Produkten und Plasmidfragmenten

Für die Isolierung von PCR-Produkten wurde das PCR-Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte mit einer Ausnahme nach den Angaben des Herstellers: Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 30 µl leicht alkalischen, sterilen Wassers (mit Tris auf pH 8 eingestellt). Es wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und

anschließend zentrifugiert. Um eine möglichst quantitative Ausbeute zu erhalten, wurde der Vorgang mit 20 µl Wasser wiederholt.

Die Isolierung von Restriktionsfragmenten wurde durch Ausschneiden der Banden und anschließende Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Es wurde bis auf die oben beschriebene veränderte Elutionsbedingung nach den Angaben des Herstellers verfahren.

## 4 Klonierung von ζ2-COP aus mhAT<sub>3</sub>F-Zellen

### 4.1 Isolierung von mRNA aus mhAT<sub>3</sub>F-Zellen

Die Isolierung von mRNA aus mhAT<sub>3</sub>F-Zellen erfolgte mit dem Dynabeads mRNA DIRECT™ Kit der Firma Dynal (Hamburg).

Es wurden bis auf das DEPC-Wasser die folgenden Originalpuffer verwendet:

Lyse/Bindungspuffer:	100 nM Tris-HCl, pH 7,5
	500 mM LiCl
	10 mM EDTA
	1% LiDS
	5 mM DTT

Waschpuffer A:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	0,15 M LiCl
	1 mM EDTA
	0,1% LiDS

Waschpuffer B:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	0,15 M LiCl
	1 mM EDTA

DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser (pH 8)

Zwei konfluent bewachsene 10-cm-Zellkulturplatten mit mhAT<sub>3</sub>F-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen trypsiniert. Die Zellen wurden in PBS suspendiert und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Nach Pelletieren der Zellen für 5 min bei 1000 rpm in einer Haereus-Kühlzentrifuge wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Das Zellhomogenat wurde in ein RNase freies 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dann 5 min bei 2000 rpm in einer gekühlten Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nach Zugabe von

1 ml Lyse/Bindungspuffer durch wiederholtes Pipettieren aufgeschlossen. Das Zelllysate war klar und viskos. Die Viskosität wurde durch stufenweise Scherung mit den Kanülen 21 (0.8 mm i. d.), 24 (0.55 mm i. d.) und 27 (0.4 mm i. d.) herabgesetzt.

Für die RNA-Bindung wurden die Dynabeads wie folgt vorbereitet: Es wurden 250 µl Dynabeads-Suspension in ein 1.5-ml-RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde auf einen Magnetständer gestellt und nach Klärung der Lösung der Überstand verworfen. Es wurde einmal mit 250 µl Lyse/Bindungspuffer gewaschen und der Überstand verworfen. Das Lysat wurde zu den Dynabeads gegeben. Anschließend wurde 15 min bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Klärung der Lösung auf dem Magnetständer wurde der Überstand verworfen. Die Dynabeads wurden zweimal mit je 750 µl Waschpuffer A und zweimal mit je 750 µl Waschpuffer B gewaschen. Nach möglichst quantitativer Entfernung des Überstands wurden die *Beads* in 20 µl DEPC-Wasser suspendiert. Die Elution erfolgte durch zweiminütiges Erhitzen der Suspension bei 80 °C. Nach Klärung der Lösung auf dem Magnetständer wurde das Eluat in ein RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Ein 2-µl-Aliquot wurde auf einem Agarosegel analysiert. Der Rest wurde auf Eis gestellt und direkt in der anschließenden RT-PCR eingesetzt.

#### 4.2 Reverse Transkription der mRNA

20 µl der mRNA-Lösung wurde nach Zugabe von 5 µl sterilem DEPC-Wasser und 2.5 µl Oligo-(dT)<sub>15</sub>-Universal-Primern (Gibco, BRL) durch dreiminütiges Erhitzen auf 65 °C denaturiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt. Es wurden die folgenden Komponenten zugegeben:

**Tabelle 16.** RT-PCR-Ansatz

Komponente	Volumen [µl]
First strand buffer (Gibco, BRL)	10
0.1 M DTT (Gibco, BRL)	5
dNTP-Mix (Hybaid, Heidelberg)	2.5
Rnase Inhibitor (Roche, Mannheim)	2 (80 U)

Der Ansatz wurde 2 min bei 42 °C erwärmt und es wurden 1.5 µl (300 U) SuperScript II reverse Transkriptase (Gibco, BRL) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde das Enzym durch dreiminütiges Erhitzen der Reaktionsmischung bei 95 °C deaktiviert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufgehoben.

#### 4.3 PCR aus der mhAT<sub>3</sub>F-cDNA mit ζ<sub>2</sub>-Primern

Die spezifische Vermehrung der ζ<sub>2</sub>-COP DNA erfolgte mit den Primern zeta2-fw3 und zeta2-rev2 (s. Tabelle 11). Es wurde folgender Ansatz verwendet:

**Tabelle 17.** PCR aus mhAT<sub>3</sub>F-cDNA

Komponente	Menge (Endkonzentration)
steriles Wasser	32 µl
10 x PCR-Puffer (Hybaid, Heidelberg)	5 µl
40 mM dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)	2.5 µl (4 mM je Nukleotid)
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Hybaid, Heidelberg)	3 µl (1.5 mM)
Taq-Polymerase (Roche)	0.5 µl
25 µM zeta2-fw3-Primer in Wasser	1 µl (0.5 µM)
25 µM zeta2-rev2-Primer in Wasser	1 µl (0.5 µM)
mhAT <sub>3</sub> F-cDNA	5 µl

Die Komponenten wurden gemischt und nach folgendem Temperaturprogramm in einer PCR-Print-Maschine der Firma Hybaid (Heidelberg) prozessiert.

**Tabelle 18.** Temperaturprogramm zur Amplifizierung der ζ<sub>2</sub>-COP-DNA

Dauer [min]	Temperatur	
5	95 °C	
0.5	94 °C	
0.5	55 °C	35 Zyklen
1	72 °C	
4	72 °C	
∞	4 °C	

#### 4.4 Ligation des PCR-Produkts in den pGEM-T-Vektor

Das PCR-Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung über Nacht bei 4 °C in einen pGEM-T-Vektor (Promega) legiert:

**Tabelle 19.** Ligatio von PCR-Produkt in einen pGEM-T-Vektor

Komponente	Menge
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase-Puffer (2 x)	5 µl
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	1 µl (1U)
pGEM-T-Vektor	1 µl (50 ng)
PCR-Produkt	3 µl

Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Aufreinigung für die Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt.

#### 4.5 Vermehrung und Reinigung des $\zeta$ 2-pGEM-T-Plasmids

Es wurden 30  $\mu$ l kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen (Invitrogen) mit 10  $\mu$ l Ligationsansatz nach Angaben des Herstellers transformiert. Die Bakterien wurden auf X-Gal enthaltende LB-Amp-Platten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Entsprechend der Weiß/Blau-Selektion wurden weiße Klone gepickt und in LBA-Medium über Nacht vermehrt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Nucleospin-Kit von Macherey und Nagel bis auf eine Ausnahme nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte durch 50  $\mu$ l steriles Wasser (pH 8). Die Isolierung der  $\zeta$ 2-COP-DNA wurde durch anschließende Sequenzierung bestätigt.

LB-Medium: 0.75% NaCl (w/v)  
 1% Bacto-Trypton (w/v)  
 0.5% Hefe-Extrakt (w/v)

LBA-Medium: LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin

LBA-Plattenmedium mit IPTG/X-Gal: 0.5% NaCl (w/v)  
 1% Bacto-Trypton (w/v)  
 0.5% Hefe-Extrakt (w/v)  
 1.5% Bacto-Agar  
 100  $\mu$ g/ml Ampicillin  
 0.08% X-Gal (w/v)  
 20 mM IPTG

## 5 Herstellung verschiedener $\zeta$ 2-COP-Konstrukte

Als Vorlage für die Herstellung verschiedener  $\zeta$ 2-COP-Konstrukte diente der  $\zeta$ 2-pGEM-T-Klon.

### 5.1 PCR aus $\zeta$ 2-pGEM-T-Plasmid

Unter Verwendung der in Tabelle 11 beschriebenen Primer wurden PCR-Reaktionen mit dem in Tabelle 20 beschriebenen Ansatz durchgeführt. Für alle Konstrukte wurde die PCR in einer PCR-Print-Maschine der Firma Hybaid (Heidelberg) mit dem in Tabelle 18 beschriebenen Temperaturprogramm durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des QIAquick *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution der DNA aus den *spin columns* erfolgte mit sterilem Wasser (pH 8).

**Tabelle 20.** Standardansatz für die PCR mit verschiedenen Primern aus dem  $\zeta$ 2-pGEM-T-Vektor

Komponente	Menge (Endkonzentration)
steriles Wasser	32.5 $\mu$ l
10 x PCR-Puffer (Hybaid, Heidelberg)	5 $\mu$ l
40 mM dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)	2 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Hybaid, Heidelberg)	3 $\mu$ l (1.5 mM)
Taq-Polymerase (Roche)	0.5 $\mu$ l
<i>Forward Primer</i> in Wasser	1 $\mu$ l (0.5 $\mu$ M)
<i>Revers-Primer</i> in Wasser	1 $\mu$ l (0.5 $\mu$ M)
$\zeta$ 2-pGEM-T-Plasmid (10 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l

## 5.2 Restriktionsverdau und Ligation

Die PCR-Produkte und die entsprechenden Vektoren wurden unter Verwendung der in Tabelle 12 beschriebenen Restriktionsenzyme der Firma BioLabs nach Angaben des Herstellers für 1 h prozessiert. Dabei wurden pro  $\mu$ g DNA maximal 1-10 Enzymeinheiten eingesetzt. Es wurden die entsprechenden Puffer der Firma BioLabs verwendet. Die Aufreinigung der Verdaufragmente erfolgte unter Verwendung des QIAquick *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA aus den *spin columns* erfolgte mit sterilem Wasser (pH 8).

Für die Ligation der Restriktionsverdau-Fragmente in die in Tabelle 12 beschriebenen Vektoren wurde das TaKaRa-Ligationskit nach Angaben des Herstellers benutzt. Der Ligationsansatz wurde nicht weiter aufgereinigt und bis zur Transformation bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 5.3 Vermehrung der Konstrukt-Plasmide in DH5 $\alpha$ -Zellen

Es wurden je 50  $\mu$ l kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen (Invitrogen) mit je 5  $\mu$ l Ligationsansatz nach Angaben des Herstellers transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LBA- oder LBK-Platten ausplattiert und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Es wurden jeweils mehrere Klone gepickt und in LBA- oder LBK-Medium vermehrt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte über das Qiafilter Midi Prep Kit. Jeweils drei Klone wurden durch DNA-Sequenzierung analysiert.

## 6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung des  $\zeta$ 2-pGEM-T-Klons wurde durch die Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt. Die Analyse aller anderen beschriebenen Klone erfolgte durch die Firma GATC in Konstanz. Für die Sequenzierung aller Konstrukte wurden Standard-Primer verwendet.







## 9 Rückfaltung von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP durch Dialyse

Dialysepuffer:                    50 mM HEPES KOH pH 7.4  
    100 mM KOAc  
    10% Glycerin (w/v)  
    1 mM EDTA  
    1 mM DTT

Dialysepuffer mit 2 M Harnstoff

Dialysepuffer mit 4 M Harnstoff

Die His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1- bzw. His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP enthaltenden Elutionsfraktionen wurden 5 min bei 16 000 x g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Zwei 1-ml-Kollodiumbags (Sartorius) wurden 10 min in Wasser gewaschen und anschließend mit jeweils 1 ml des Überstands nach der 16 000 x g-Zentrifugation gefüllt. Es wurde 2 h gegen jeweils 2 l Dialysepuffer mit 4 M Harnstoff bei 4 °C dialysiert. Der Vorgang wurde mit jeweils 2 l Dialysepuffer mit 2 M Harnstoff wiederholt. Zuletzt wurde über Nacht gegen jeweils 2 l Dialysepuffer ohne Harnstoff dialysiert. Die Dialysate wurden bei 4 °C und 100 000 x g in einer *table top*-Ultrazentrifuge für 15 min zentrifugiert. Input, Überstand und Pellet wurden mittels 12% SDS-PAGE (AA/Bis = 37.5:1) und anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

## 10 Herstellung von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP-spezifischen Antikörpern

**Tabelle 21.** Peptide zur Herstellung  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP-spezifischer Antikörper

Peptidbezeichnung	Sequenz	Spezies	Chargen-Nummer
$\zeta$ 2-N-Terminus	CQRPEAWPRPHPGE	Human/Maus	442
$\zeta$ 1-intern	VHRVALRGEDVP-CONH <sub>2</sub>	Human/Maus/Rind	468
$\zeta$ 1-N-Terminus	MEALILEPS-COOH	Human/Maus	439

Alle Peptide wurden von Karolin Frey an KLH (keyhole) gekoppelt. Mit den gekoppelten Peptiden wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Pineda (Antikörper-Service, Berlin) jeweils zwei Kaninchen und ein Meerschweinchen immunisiert.

Von den Tieren, die mit dem N-terminalen  $\zeta$ 2-COP Peptid (442) immunisiert worden waren, starb innerhalb der ersten 60 Tage ein Kaninchen. Von den Tieren, die mit dem N-terminalen  $\zeta$ 1-COP-Peptid (439) immunisiert worden waren, starben ein Kaninchen und ein Meerschweinchen innerhalb der ersten 60 Tage.

## 11 Affinitätsreinigung der $\zeta$ 2-rb- und $\zeta$ 2-gp-Antikörper

Elutionspuffer: 0.1 M Glycin HCl pH 2.8

Neutralisationspuffer: 1 M Tris HCl pH 8.8

Es wurden 1.5  $\mu$ mol des N-terminalen  $\zeta$ 2-COP-Peptids CQRPEAWPRPHPGE nach dem unter Kapitel VI-24.1 beschriebenen Protokoll an 250 mg Thiopropylsepharose gekoppelt. Für eine Affinitätsreinigung wurden jeweils 500  $\mu$ l sedimentierte *beads* eingesetzt.

Die *beads* wurden durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml PBS vorbereitet. Die Antikörperseren wurden immer vor der Affinitätsreinigung 10 min bei 10 000 x g und 4 °C zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen. Vom Überstand wurden 1.5 ml mit den *beads* für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die *beads* wurden dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS suspendiert. Eine 2-ml-BioRad-Säule wurde mit der Suspension befüllt und mit 20 ml PBS gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit Elutionspuffer eluiert und in zehn Fraktionen à 500  $\mu$ l gesammelt. In jedem Fraktionsröhrchen waren je 25  $\mu$ l Neutralisationspuffer vorgelegt worden. Sobald eine Fraktion gesammelt war, wurde kurz gemischt und die Probe auf Eis gestellt. Von jeder Fraktion wurde jeweils 1  $\mu$ l auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen und durch Amidoschwarz-Färbung (s. Kapitel VI-16) auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die proteinreichsten Fraktionen wurden vereinigt und in 1-ml-Kollodiumbags (Sartorius) zweimal 2 h und einmal über Nacht bei 4 °C gegen jeweils 0.5 l PBS dialysiert. Das Dialysat wurde in 10- $\mu$ l-Aliquots bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufgehoben.

## 12 Immunpräzipitation

IP-Puffer: 25 mM Tris HCl pH 7.4  
150 mM KCl  
1 mM EDTA

IP-Puffer mit 0.5% NP40 (w/v)

SDS-Probenpuffer (4x) 200 mM Tris HCl pH 6.8  
12%  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v)  
8% SDS (w/v)  
40% Glycerin (v/v)  
0.2% Bromphenolblau (w/v)

Soweit nicht anders angegeben, wurden Immunpräzipitationen ohne Detergens durchgeführt. Das Koppeln der Antikörper an Protein-A-Sepharose wurde in Anwesenheit von Detergens durchgeführt.

Es wurden pro IP 20  $\mu$ l einer sedimentierten 1:1-Mischung aus Protein A- und C14B-Sepharose dreimal mit je 1 ml IP-Puffer mit NP40 gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, und es wurden 250  $\mu$ l IP-Puffer mit NP40 zugegeben. Die Suspension wurde mit der erforderlichen Menge des zu koppelnden Antikörpers versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde dreimal mit je 1 ml IP-Puffer mit NP40 und dreimal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Immunpräzipitationen in einem Volumen von 250  $\mu$ l pro 20  $\mu$ l sedimentierter Antikörper-gekoppelter-Protein-A-Sepharose durchgeführt. Dazu wurde 30 min bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml IP-Puffer entfernt. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 15  $\mu$ l 4x SDS-Probenpuffer und Erhitzen für 5 min bei 95 °C eluiert.

**Tabelle 22.** Eingesetzte Mengen Antikörperserum pro 20  $\mu$ l sedimentierte Protein-A-Sepharose. Alle Angaben beziehen sich auf den Glycerin-Stock (50% Glycerin)

Antikörper	Eingesetzte Menge
CM1	10 $\mu$ l
891	2 $\mu$ l
$\zeta$ 2-gp	3 $\mu$ l
$\zeta$ 1-R	6 $\mu$ l

## 13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung SDS-denaturierter Proteine nach ihrer molekularen Masse wurde unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelsystem nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, U.K., 1970). Die Elektrophorese erfolgte bei 35 mA konstanter Stromstärke.

### 13.1 Stammlösungen

Acrylamid-Lösung 100/1:	30% Acrylamid (w/v) 0.3% N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)
Acrylamid-Lösung 37.5/1:	30% Acrylamid (w/v) 0.8% N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)
4 x Trenngelpuffer:	1.5 M Tris HCl, pH 8.8 0.4% SDS (w/v)

4 x Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris HCl, pH 6.8  
0.4% SDS (w/v)

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0.4% SDS (w/v)

### 13.2 Trenngele

In dieser Arbeit wurden Trenngele mit 7.5%, 10% oder 12% Acrylamid verwendet. Für die 7.5% und 10% Trenngele wurde die Acrylamidlösung 100/1 verwendet. Für die 12% Trenngele wurde die Acrylamidlösung 37.5/1 mit mehr Quervernetzer verwendet.

**Tabelle 23.** Trenngele (10 ml)

	7.5%	10%	12%
Acrylamid-Lösung 37.5/1			4 ml
Acrylamid-Lösung 100/1	2.5 ml	3.3 ml	
4 x Trenngelpuffer	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
H <sub>2</sub> O	5 ml	4.2 ml	3.5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
APS (10% (w/v))	40 µl	40 µl	40 µl

Für die gleichzeitige Trennung von  $\zeta$ 1-,  $\zeta$ 2-,  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP wurden Gradiententrenngele mit 7.5%-15% Acrylamid benutzt. Die Gradientengele wurden mit der Acrylamidlösung 100/1 hergestellt.

**Tabelle 24.** Lösungen für 7.5% - 15% Gradientengel (15 x 7.5 cm)

	7.5%	15%
Acrylamid-Lösung 100/1	1.3 ml	2.75 ml
4 x Trenngelpuffer	1.3 ml	1.3 ml
H <sub>2</sub> O	2.9 ml	1.45 ml
TEMED	5.2 µl	5.2 µl
APS (10% (w/v))	20.8 µl	20.8 µl

Für die Herstellung von homogenen Gelen wurde die Trenngellösung in eine Glaskassette gegossen. Gradiententrenngele wurden mit einem Gradientenmischer hergestellt. Die Gele wurden sofort mit n-Butanol überschichtet. Danach erfolgte eine Polymerisation der Trenngele von mindestens 45 min.

### 13.3 Sammelgele

Nachdem die Trenngele polymerisiert waren, wurde das n-Butanol mit Wasser weggespült. Anschließend wurde das Wasser möglichst vollständig entfernt. Für die Herstellung von

Sammelgelen wurde die Acrylamidlösung 37.5/1 verwendet. Die Gellösung wurde in die Glaskassette gegossen und ein Plastikamm zur Aussparung von Taschen eingesetzt.

**Tabelle 25.** Sammelgellösung

	3.3% Acrylamid
Acrylamid-Lösung 37.5/1	0.65 ml
4 x Sammelgelpuffer	1.25 ml
H <sub>2</sub> O	3.1 ml
TEMED	6 µl
APS (10% (w/v))	30 µl

Man ließ das Sammelgel mindestens 45 min polymerisieren. Kurz vor Verwendung des Gels wurden der Kamm entfernt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült.

### 13.4 Probenvorbereitung

SDS-Probenpuffer (4x)	200 mM Tris HCl pH 6.8
	12% β-Mercaptoethanol (v/v)
	8% SDS (w/v)
	40% Glycerin (v/v)
	0.2% Bromphenolblau (w/v)

Die Proteinproben wurden mit der berechneten Menge 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und in einem Thermoblock für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde kurz zentrifugiert.

### 13.5 TCA-Präzipitation aus Rattenleberzytosol

Zur Untersuchung des ζ2-COP depletierten Rattenleberzytosols wurden die Proteine vor der Elektrophorese mit TCA gefällt. Die Probe wurde mit eiskalter 50%iger TCA-Lösung auf 10% TCA eingestellt und für 10 min auf Eis gestellt. Präzipitiertes Protein wurde für 30 sec bei 3000 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Es wurden ein paar Krümel Tris hinzugefügt bis die Farbe der Lösung von gelb nach blau umschlug. Um die gefällten Proteine wieder möglichst quantitativ aufzulösen, wurde 15 min bei 70 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde die Probe immer wieder gevortext.

## 14 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

### 14.1 Coomassie-Färbung

Coomassie-Stammlösung:                    1 g Serva-Blue G  
     4 g Serva-Blue R  
     ad 50 ml Wasser

Coomassie-Färbelösung:                    5% Coomassie-Stammlösung (w/v)  
     25% Isopropanol (v/v)  
     10% Essigsäure (v/v)

Entfärbelösung:                            10% Essigsäure (v/v)  
     10% Isopropanol (v/v)

Die Gele wurden mindestens eine Stunde in der Färbelösung geschwenkt und anschließend so lange mit Entfärbelösung gewaschen, bis der gewünschte Kontrast erreicht war.

### 14.2 Silberfärbung

Die Gele wurden nach folgendem Protokoll prozessiert:

**Tabelle 26.** Silberfärbung von SDS-Gelen

Schritt	Dauer	Lösungen
Fixierung	1 h	50% MeOH (v/v) 12% HOAc (v/v)
Waschen	2 x 15 min	50% EtOH
Inkubation	1 min	10 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in 50 ml H <sub>2</sub> O
Waschen	2 x 20 sec	Wasser
Inkubation	20 min	100 mg AgNO <sub>3</sub> in 50 ml Wasser kurz vorher Zugabe von 37.5 µl Formalin
Waschen	2 x 20 sec	Wasser
Färbung	bis gewünschter Färbungsgrad erreicht ist	3 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 50 ml Wasser, 1 ml der Thiosulfatlösung (s. oben), 25 µl Formalin kurz vorher dazugeben
Stoppen der Färbung	mind. 5 min	10% HOAc



## 15 Western Blot

Proteine, die gelelektrophoretisch aufgetrennt worden waren, wurden nach dem *semi dry*-Verfahren auf PVDF-Membranen transferiert und immunochemisch analysiert.

### 15.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (*semi dry*)

Anoden-Puffer 1:	300 mM	Tris
	20%	Methanol (v/v)
Anoden-Puffer 2:	25 mM	Tris
	20%	Methanol (v/v)
Kathoden-Puffer:	25 mM	Tris
	40 mM	6-Aminohexansäure
	20%	Methanol (v/v)

Es wurden sieben Whatman-3-MM-Filterpapiere und eine Immobilon-P-PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) passend der Gelgröße zugeschnitten. Der Western Blot-Sandwich wurde in einer Blot-Apparatur der Firma BioRad (München) wie folgt zusammengebaut:

Es wurden zwei Filterpapiere in Anodenpuffer I getränkt und auf die untere Elektrodenplatte gelegt. Zwei weitere Filterpapiere wurden in Anodenpuffer 2 getränkt und daraufgestapelt. Die PVDF-Membran wurde nach kurzem Benetzen in Methanol in Anodenpuffer 2 equilibriert, auf den Filterpapierstapel gelegt und mit dem Gel bedeckt. Die verbleibenden Filterpapiere wurden in Kathodenpuffer getränkt und auf den Stapel gelegt. Durch Abrollen eines 50-ml-Falkon-Röhrchens wurden eventuell vorhandene Luftblasen entfernt. Nach Aufsetzen der Kathodenplatte wurden die Proteinen bei 24 V konstanter Spannung für 1.5 Stunden auf die Membran transferiert.

### 15.2 Immunochemischer Nachweis auf PVDF-Membranen

PBS pH 7.4:	35.7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	14.3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	136 mM NaCl
	3 mM KCl
PBS-T:	0.05% Tween 20 in PBS (v/v)
Blockierlösung:	5% Magermilchpulver (w/v) in PBS



(anthos2001) die Absorption bei 620 nm gemessen. Anhand der BSA-Eichgeraden wurde dann die Konzentration der Lösung mit unbekannter Proteinmenge bestimmt.

### 17.2 Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Natrium-Desoxycholat                    0.2% in Wasser (w/v)

SDS    1% in Wasser (w/v)

Trichloressigsäure                    10% in Wasser (w/v)

BSA    1 mg/ml in Wasser (w/v)

Lowry A:                                    2 g K/Na-Tartrat  
    100 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
    in 500 ml 1 N NaOH lösen  
    auf 1 l Wasser auffüllen

Lowry B:                                    1 g CuSO<sub>4</sub>-Pentahydrat in  
    90 ml Wasser lösen  
    auf 100 ml mit NaOH auffüllen  
    1 N

Lowry C:                                    Folin-Cicocalteus-Reagenz 1:10 in Wasser verdünnt

Die Lösungen Lowry A und B wurden bei Raumtemperatur gelagert. Lowry C wurde kurz vor Gebrauch hergestellt.

Die zu bestimmende Proteinlösung wurde in ein Endvolumen von 50 µl verdünnt. Als Standards dienten BSA-Lösungen die zwischen 2.5-20 µg BSA pro 50 µl Wasser enthielten. Diese BSA-Lösungen wurden genauso prozessiert wie die Proteinlösungen unbekannter Konzentration. Als Blindwert dienten 50 µl Wasser.

Alle Proben (50 µl pro Probe) wurden mit 10 µl DOC-Lösung versetzt und nach Mischen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von je 150 µl 10%iger TCA 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 1800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in jeweils 10 µl 1%iger SDS-Lösung aufgenommen.

Nach Zugabe von 50 µl Lowry A wurde für 10 min bei 50 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend ließ man die Proben unter Schütteln auf Raumtemperatur abkühlen. Für die Farbreaktion wurden die Lösungen mit 10 µl Lowry B versetzt und 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterer Zugabe von jeweils 150 µl Lowry C wurde für 10 min bei 50 °C geschüttelt. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden je 150 µl in eine 96-well-Platte pipettiert und die Absorption in einem ELISA-Reader bei 620 nm (anthos2001) bestimmt. Die Konzentration wurde dann anhand der BSA-Eichgerade ermittelt.

## 18 Isolierung von Coatomer aus Kaninchenleber und Rinderhirn

Coatomer wurde aus Kaninchenleber und Rinderhirn nach einem leicht modifizierten Protokoll von J. Pavel (Pavel, J. et al., 1998) angereichert.

### 18.1 Verwendete Puffer

Homogenisationspuffer:	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 500 mM KCl 250 mM Saccharose 2 mM EGTA-KOH 1 mM DTT 1 Tablette/100 ml Complete-Proteaseinhibitor (EDTA-frei)
Homogenisationspuffer-2:	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 2 mM EGTA-KOH 1 mM DTT
Resuspensionspuffer:	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 200 mM KCl 1 mM DTT 1 Tablette/50 ml Complete-Proteaseinhibitor (EDTA-frei)
IEX-1:	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 200 mM KCl 1 mM DTT 10% Glyzerin (w/v)
IEX-2:	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 1 M KCl 1 mM DTT 10% Glyzerin (w/v)

---

Leitfähigkeitspuffer:	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 1 mM DTT 10% Glyzerin (w/v)
IEX-3:	25 mM HEPES-KOH, pH 7.4 100 mM KCl 10% Glyzerin (w/v)
IEX-4:	25 mM HEPES-KOH, pH 7.4 1 M KCl 10% Glyzerin

## 18.2 Gewinnung von Rinderhirn oder Kaninchenleberzytosol

Für eine Kaninchen-Coatomer-Präparation wurden 3 Kaninchenlebern (zusammen ca. 160 g) von frisch geschlachteten Kaninchen verwendet, die zuvor mindestens 12 h gehungert hatten. Die Lebern wurden sofort nach der Entnahme auf Eis gepackt. Für eine Rinderhirn-Coatomer-Präparation wurde das Hirn eines frisch geschlachteten Rinds entnommen und sofort auf Eis gepackt. Das Rinderhirn wurde vor der Homogenisation gehäutet. Das gehäutete Rinderhirn bzw. die Kaninchenlebern wurden mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und sofort in eiskaltem Homogenisationspuffer gegeben. Die Homogenisierung der Gewebe erfolgte in einem Waring-Blender mit einem zweifachen High-Speed-Puls von je 30 sec und einer Kühlpause dazwischen von 2 min auf Eis. Das Homogenat wurde für 1 h bei 15 000 x g und 4 °C zentrifugiert (Haereus-Suprafuge 22, Rotor HFA 12.500). Man dekantierte den Überstand durch 4 Lagen Verbandsmull und zentrifugierte das Filtrat für 2 h bei 100 000 x g und 4 °C (Ultrazentrifuge, Rotor: TFT 50.38). Bei diesem Zentrifugationsschritt bildete sich meistens ein dünner Fettfilm mit fester Konsistenz, der mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt wurde. Der Überstand der 100 000 x g-Zentrifugation wurde anschließend durch 4 Lagen Verbandsmull in einen eisgekühlten Messzylinder dekantiert und das Volumen des Zytosols bestimmt.

## 18.3 Ammoniumsulfatpräzipitation

Das Rinderhirn- bzw. Kaninchenleberzytosol wurde 1:2 mit eiskaltem Homogenisationspuffer verdünnt und in ein Becherglas überführt. Fein pulverisiertes Ammoniumsulfat wurde unter ständigem Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 35% (w/v) in kleinen Portionen zugegeben. Anschließend ließ man mind. weitere 45 min rühren. Das Präzipitat wurde für 30 min bei 10 000 x g und 4 °C (Haereus-Suprafuge 22, Rotor: HFA 12.500) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 ml eisgekühltem Resuspensionspuffer mit einer 10 ml Pipette aufgenommen und im Douncer homogenisiert. Anschließend wurde 2 x

1 h und über Nacht bei 4 °C gegen jeweils 5 l IEX-1 dialysiert. Am nächsten Tag wurde das Dialysat für 30 min bei 100 000 x g und 4 °C zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Rotor: TFT 50.38). Der Überstand wurde mit einer 10-ml-Spritze mit einem 0.45 µm Ultrafilteraufsatz filtriert. Dabei musste der Filter mehrmals gewechselt werden.

#### **18.4 DEAE-Anionenaustauscherchromatographie des Ammoniumpräzipitats**

Eine 300-ml-DEAE-FF Säule (Pharmacia, Freiburg) wurde mit IEX-1 (Flussrate: 10 ml/min) equilibriert. Das gefilterte Dialysat der Ammoniumpräzipitation wurde mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die Säule geladen. Nicht gebundenes Protein wurde mit IEX-1 bis zum Erreichen der Basisabsorption (280 nm) von der Säule gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit einer Flussrate von 10 ml/min und 50% IEX-1/50% IEX-2 isokratisch eluiert. Der Proteinpeak wurde gesammelt und mit Leitfähigkeitspuffer auf die Leitfähigkeit von IEX-1 eingestellt („DEAE-Pool“).

#### **18.5 SourceQ-Anionenaustauscherchromatographie des DEAE-Pools**

Eine XK-16-Säule (Pharmacia, Freiburg) wurde mit 15 ml SourceQ-Material gefüllt und mit IEX-1-Puffer (Flussrate: 2 ml/min) equilibriert. Der DEAE-Pool wurde über Nacht auf die Säule geladen (max. Flussrate: 2 ml/min). Nicht gebundenes Protein wurde bis zur Erreichung der Basisabsorption mit IEX-1 Puffer von der Säule gewaschen. Gebundene Proteine wurden in einem linearen Gradienten von 100% IEX-1 nach 100% IEX-2 in einem Volumen von 200 ml eluiert. Es wurden Fraktionen à 3 ml gesammelt und 5 µl auf einem Silber-gefärbten 10%-SDS-Gel und 1 µl auf einem 10%-SDS-Gel mit anschließendem Western Blot analysiert. Die Coatomer enthaltenden Fraktionen, die am reinsten waren, wurden vereinigt und mit Leitfähigkeitspuffer auf die Leitfähigkeit von IEX-1 eingestellt („SourceQ-Pool“).

#### **18.6 Konzentrierung von Coatomer aus dem SourceQ-Pool**

Eine HR-Säule (Pharmacia, Freiburg) mit 5 mm i. d. wurde mit 1 ml SourceQ-Material gefüllt und mit IEX-1 Puffer (Flussrate 250 µl/min) equilibriert. Der SourceQ-Pool wurde mit einer maximalen Flussrate von 250 µl/min auf die Säule geladen. Die Säule wurde auf IEX-3 umequilibriert. Gebundene Proteine wurden in einem linearen Gradienten von 100% IEX-3 nach 60% IEX-4 in einem Volumen von 6.5 ml eluiert. Es wurden Fraktionen à 300 µl gesammelt und mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung bzw. im Western Blot analysiert. Es wurden Pools verschiedenen Reinheitsgrades gebildet und in 10-µl-Aliquots bei -80 °C aufbewahrt. Die Präparation von Coatomer aus Kaninchenleber ergab in der Regel zwischen 5-15 mg angereicherten Coatomers. Die Anreicherung von Coatomer aus dem Zytosol eines Rinderhirns ergab aufgrund des geringen Vorkommens im Hirn nur eine Ausbeute von 1 mg. Im Gegensatz zu Kaninchenleber-Coatomer, dessen Reinheit im saubersten Pool ca. 90% betrug, wurde die Reinheit von Rinderhirn-Coatomer auf ca. 50%

bestimmt. Die COP-Untereinheiten des Rinderhirn-Coatomers waren jedoch weniger degradiert als die des Kaninchenleber-Coatomers.

## 19 Stöchiometrie von $\zeta$ 1- und $\zeta$ 2-COP im Mausleberzytosol

Die Stöchiometrie von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP im Mausleberzytosol wurde unter Verwendung von rekombinantem  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP als Eichproteine bestimmt. Dazu wurde Coatomer nach dem Protokoll in Kapitel VI-12 mit dem CM1-Antikörper immunpräzipitiert und mit 4 x SDS-Probenpuffer eluiert. Von dem Eluat wurden drei verschiedene Volumina auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen. In die nächsten sieben Spuren wurden aufsteigende Mengen rekombinantes His<sub>6</sub>- $\zeta$ 1-COP geladen. Auf die zweite Hälfte des Gels wurden nochmals drei verschiedene Volumina CM1-Eluat geladen und anschließend steigende Mengen rekombinantes His<sub>6</sub>- $\zeta$ 2-COP. Nach Elektrophorese wurde das Gel geblottet, der Blot in der Mitte geteilt und die  $\zeta$ 1-Hälfte mit dem  $\zeta$ 1-I-rb-Antikörper und die zweite Hälfte mit dem  $\zeta$ 2-rb-(affi)-Antikörper entwickelt. Die Banden wurden eingescannt und die Pixeldichte mit der Software Quantity One<sup>®</sup> bestimmt. Für die rekombinanten Proteine wurden Eichgeraden erstellt und die Intensitätswerte der Immunpräzipitationen in die entsprechenden Gleichungen eingesetzt. Die  $\zeta$ 1- bzw.  $\zeta$ 2-COP Konzentrationen für die verschiedenen geladenen Volumina der CM1-Immunpräzipitationen wurden berechnet und gemittelt. Die Bestimmung wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

## 20 Analyse der Expression von $\zeta$ 2-COP in verschiedenen Organen

Um die Expression von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP in verschiedenen Organen (Leber, Niere, Milz, Hoden, Lunge) zu untersuchen, sollte Coatomer aus den Zytosolen verschiedener Gewebe der Maus mit dem CM1-Antikörper immunpräzipitiert werden. Die Durchführung erfolgte nach dem in Kapitel VI-12 beschriebenen Protokoll mit folgender Abwandlung: Es wurden doppelte Ansätze durchgeführt, d. h. es wurden immer 20  $\mu$ l CM1-Antikörper an 40  $\mu$ l Protein-A-Sepharose gekoppelt. Für jede Immunpräzipitation wurde Zytosol mit einem Gesamtproteingehalt von je 1.6 mg eingesetzt. Die entsprechende Menge Zytosol wurde für die Immunpräzipitation auf jeweils 400  $\mu$ l aufgefüllt. Nach Waschen der *beads* wurden gebundene Proteine mit 30  $\mu$ l 4 x SDS-Probenpuffer eluiert und auf einem 12% SDS-Gel analysiert. Zur Detektion von  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP wurden jeweils 15  $\mu$ l Eluat in getrennten Spuren auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde geblottet und der Blot geteilt.  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert.

## 21 Analyse der $\zeta$ 1/ $\zeta$ 2-COP-Kombination

Um zu untersuchen, ob  $\zeta$ 1- und  $\zeta$ 2-COP zusammen in einem Coatomer-Komplex vorkommen, sollte nach Immunpräzipitation mit dem  $\zeta$ 2-COP-spezifischen  $\zeta$ 2-gp-Antikörper die Kopräzipitation von  $\zeta$ 1-COP analysiert werden.

Aufsteigende Mengen von Kaninchenleber-Coatomer wurden auf einem 12%-SDS-Gel aufgetrennt. Auf dasselbe Gel war das Eluat einer Immunpräzipitation mit dem  $\zeta$ 2-gp Antikörper aus 30  $\mu$ g Kaninchenleber-Coatomer geladen worden (einfache Ansätze nach Kapitel VI-12). Das Gel wurde geblottet und der Blot zuerst mit dem  $\beta$ -COP-spezifischen Antikörper M3A5 und anschließend mit dem  $\zeta$ 1-R-Antikörper entwickelt. Die  $\beta$ -COP-Banden wurden eingescannt und die Pixeldichte mit der Software QuantityOne (BioRad, München) bestimmt. Man verglich jetzt das  $\zeta$ 1-COP-Signal der Immunpräzipitation mit den  $\zeta$ 1-COP-Signalen der Coatomer-Standards, deren  $\beta$ -COP-Signale im Bereich des  $\beta$ -COP-Signals der Immunpräzipitation lag.

## 22 Analyse der $\zeta$ 2-/ $\gamma$ -COP-Kombination

Es wurden 1 mg Rattenleberzytosol mit 20  $\mu$ l  $\zeta$ 2-gp-gekoppelter Protein-A-Sepharose (s. Kapitel VI-12) für 30 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert und nicht gebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit IP-Puffer entfernt. Als  $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2-Standard diente eine CM1-Immunpräzipitation von Coatomer aus 400  $\mu$ g Rattenleberzytosol (s. Kapitel VI-12). Gebundene Proteine wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels 7.5% SDS-PAGE und immunochemischem Nachweis im Western Blot analysiert. Der Western Blot wurde mit dem  $\gamma$ -R-Antikörper entwickelt, der beide  $\gamma$ -COP-Isoformen erkennt.

## 23 Analyse der $\zeta$ 1-/ $\gamma$ -COP-Kombinationen

### 23.1 $\zeta$ 2-COP-Depletion

Um Rattenleberzytosol von  $\zeta$ 2-COP zu depletieren, wurden insgesamt drei Runden Immunpräzipitation mit dem  $\zeta$ 2-gp-Antikörper durchgeführt. Dazu wurden für jede Runde 100  $\mu$ l *beads* mit 15  $\mu$ l  $\zeta$ 2-gp-Antikörperserum (Glyzerin Stock) nach dem unter Kapitel VI-12 beschriebenen Protokoll gekoppelt, d. h. es wurden drei fünffache Ansätze vorbereitet. Anschließend wurden 204  $\mu$ l (5 mg) Rattenleberzytosol mit IP-Puffer (s. Kapitel VI-12) auf 1 ml aufgefüllt und mit den ersten 100  $\mu$ l  $\zeta$ 2-gp-Antikörpersepharose für 30 min auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand der ersten Immunpräzipitation wurde mit den nächsten *beads* wieder 30 min inkubiert. Der Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Nach der dritten Runde wurde der Überstand für weitere Analysen aufgehoben. Die *beads* wurden jeweils viermal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und gebundene Proteine mit



je 75  $\mu$ l 4 x SDS-Probenpuffer eluiert. Die Volumen aller drei Eluate wurde bestimmt und jeweils ein Fünftel (ca. 20  $\mu$ l) auf einem 7.5-15%-SDS-Gel analysiert.

Der  $\zeta$ 2-COP-depletierte Überstand nach den drei Immunpräzipitationen wurde wie folgt aufgeteilt: Zwei Fünftel des Gesamtvolumens wurden in einer Immunpräzipitation mit dem  $\zeta$ 1-R-Antikörper eingesetzt (s. Kapitel VI-12). Zwei Fünftel wurden in einer Immunpräzipitation mit dem  $\beta'$ -spezifischen 891-Antikörper eingesetzt (s. Kapitel VI-12). Aus dem verbleibenden Fünftel wurden die Proteine mit TCA gefällt (s. Kapitel VI-13.5).

### 23.2 Analyse des Überstands auf $\zeta$ 2-COP

Ein Fünftel des Überstands nach drei Runden Immunpräzipitation sollte auf seinen  $\zeta$ 2-COP-Gehalt untersucht werden. Dazu wurden die Proteine nach dem unter Kapitel VI-13.5 beschriebenen Protokoll mit TCA gefällt. Das TCA-Präzipitat wurde in 40  $\mu$ l 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Davon wurden 20  $\mu$ l auf einem 7.5-15% SDS-Gel analysiert.

### 23.3 Immunpräzipitation aus dem $\zeta$ 2-depletierten Zytosol mit dem $\beta'$ -Antikörper

Die Integrität von Coatomer im  $\zeta$ 2-COP-depletierten Zytosol sollte durch Immunpräzipitation mit einem  $\zeta$ - und  $\gamma$ -COP-unabhängigen Antikörper untersucht werden. Dazu wurden 20  $\mu$ l Protein-A-Sepharose-*beads* in einem einfachen Ansatz nach dem Protokoll in Kapitel VI-12 an den  $\beta'$ -COP-spezifischen Antikörper 891 gekoppelt. Die 891 *beads* wurden mit zwei Fünftel des  $\zeta$ 2-COP-depletierten Zytosols für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach drei Waschschritten mit je 1 ml IP-Puffer wurden gebundene Proteine mit 15  $\mu$ l SDS-Probenpuffer eluiert und auf einem 7.5-15%-SDS-Gel aufgetrennt.

### 23.4 Immunpräzipitation aus dem $\zeta$ 2-depletierten Zytosol mit dem $\zeta$ 1-R-Antikörper

Um zu analysieren, mit welcher  $\gamma$ -COP-Untereinheit  $\zeta$ 1-COP zusammen in einem Coatomer-Komplex vorkommt, wurden die anderen zwei Fünftel des  $\zeta$ 2-COP-depletierten Zytosols mit dem  $\zeta$ 1-R-Antikörper immunpräzipitiert. Dazu wurden nach Kapitel VI-12 20  $\mu$ l Protein-A-Sepharose-*beads* in einem einfachen Ansatz an den  $\zeta$ 1-R-Antikörper gekoppelt und mit dem  $\zeta$ 2-COP-depletierten Überstand für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Ungebundene Proteine wurden durch viermaliges Waschen mit je 1 ml IP-Puffer entfernt. Gebundene Proteine wurden mit 15  $\mu$ l 4 x SDS-Probenpuffer eluiert und auf einem 7.5-15%-SDS-Gel analysiert.

### 23.5 Western Blot

Wie oben beschrieben wurden alle Proben auf ein 7.5-15% Gradientengel geladen. Als Coatomer-Standard wurde eine nach Kapitel VI-12 durchgeführte Immunpräzipitation aus 400 µg Rattenleberzytosol mit dem CM1-Antikörper auf dem gleichen Gel aufgetrennt. Nach Elektrophorese wurde das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Spuren mit den ζ1-R- und 891-Immunpräzipitationen wurden abgeschnitten. Die beiden Blots wurden zunächst mit dem γ-R Primärantikörper entwickelt. Dabei war es wichtig, die beiden ζ1-R- und 891-Spuren anschließend mit dem monoklonalen RG16-Sekundärantikörper zu inkubieren, da die Antikörper, mit denen präzipitiert worden war, aus derselben Spezies wie der γ-R Antikörper stammten (Kaninchen). Der IgG-Hintergrund konnte dadurch reduziert werden. Die Western Blots wurden anschließend mit dem ζ2-rb- und zuletzt mit dem ζ1-R-Antikörper entwickelt.

## 24 Coatomer-Bindung an p24-Familienmitglieder

### 24.1 Kopplung der Peptide

Kopplungspuffer:                    100 mM Tris HCl pH 7.5  
   500 mM NaCl  
   1 mM EDTA

Blockierungspuffer:                100 mM NaOAc pH 4.5  
   500 mM NaCl

Kopplungspuffer mit 4 M Harnstoff

Man ließ 125 mg gefriergetrocknete Thiopropylsepharose 6B (Pharmacia, Freiburg) für mindestens 15 min bei Raumtemperatur in Kopplungspuffer quellen. Je 750 nmol des cysteinhaltigen Peptids wurden in 500 µl Kopplungspuffer mit 4 M Harnstoff gelöst und zur vorbereiteten Thiopropylsepharose gegeben. Als Blindwert wurde die Thiopropylsepharose nur mit Kopplungspuffer mit 4 M Harnstoff ohne Peptid versetzt. Die Proben wurden über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und für die Bestimmung der Kopplungsausbeute aufgehoben. Um die Kopplungsausbeute möglichst genau zu bestimmen, wurde die Thiopropylsepharose nochmals mit 1 ml Blockierungspuffer gewaschen und der Überstand ebenfalls für die Bestimmung der Kopplungseffizienz aufgehoben. Die Thiopropylsepharose wurde dreimal mit je 10 ml Blockierungspuffer gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch 20 min Inkubation der Thiopropylsepharose in 10 ml Blockierungspuffer mit 14 µl (200 µmol) β-Mercaptoethanol auf einem Überkopfschüttler blockiert. Die Sepharose wurde fünfmal mit je



Software Quantity One<sup>®</sup> (BioRad München) bestimmt. Es wurden Expositionen ausgewählt, bei denen die  $\gamma$ -COP-Signale im linearen Bereich der immunologischen Detektion liegen.

Als Standard für das natürlich im Rattenleberzytosol vorkommende Verhältnis von  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2-COP wurde Coatomer aus 200  $\mu$ g Rattenleberzytosol mit dem CM1-Antikörper in Gegenwart von 0.5% NP40 nach dem unter Kapitel VI-12 beschriebenen Protokoll immunpräzipitiert und zusammen mit den anderen Proben mittels SDS-PAGE analysiert.

### 24.3 Bindung von Rinderhirn-Coatomer

Bindungspuffer:                    25 mM Tris HCl pH 7.4  
    150 mM KCl  
    1 mM EDTA

Bindungspuffer mit 0.5 mg/ml BSA

Es wurden pro Peptid 240  $\mu$ l (entsprechend 6 nmol Peptid) und 480  $\mu$ l (entsprechend 12 nmol Peptid) Peptidsepharose-Suspension dreimal mit Bindungspuffer gewaschen. Nach Zugabe von je 1 ml Bindungspuffer mit BSA wurde 1 h bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, die *beads* wurden mit 400  $\mu$ l (pro 240  $\mu$ l *beads*) oder mit 800  $\mu$ l (pro 480  $\mu$ l *beads*) Bindungspuffer mit BSA versetzt. Zu dem 240  $\mu$ l *beads*-Ansatz wurden 2  $\mu$ l (2  $\mu$ g) und zu dem 480  $\mu$ l *beads*-Ansatz 4  $\mu$ l (4 $\mu$ g) Coatomer gegeben, der aus Rinderhirn angereichert worden war (s. Kapitel VI-18). Die Proben wurden eine halbe Stunde bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht gebundener Coatomer wurde durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml Bindungspuffer ohne BSA entfernt. Gebundener Coatomer wurde anschließend durch Elution mit je 15  $\mu$ l 2 x SDS-Probenpuffer eluiert. Coatomer wurde mittels 12% SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit den spezifischen Antikörpern  $\zeta$ 1-I-rb und  $\zeta$ 2-rb analysiert. Die 240  $\mu$ l *beads*-Ansätze wurden mit dem  $\zeta$ 1-spezifischen Antikörper, die 480  $\mu$ l *beads*-Ansätze mit dem  $\zeta$ 2-spezifischen Antikörper entwickelt. Es wurden Expositionen aus dem linearen Signalbereich des Antikörpers mit der Software Quantity One<sup>®</sup> (BioRad, München) ausgewertet.

## 25 COPI-Vesikelpräparation nach Serafini (Serafini, T. et al., 1991a)

COPI-Vesikel wurden *in vitro* durch Inkubation von Golgi-Membranen mit Zytosol in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems und einem nicht hydrolysierbaren Analogon von GTP (GMP-PNP) generiert.

10 x Assaypuffer:	250 mM HEPES KOH pH 7.0 25 mM MgCl <sub>2</sub>
Niedrigsalzpuffer:	25 mM HEPES KOH pH 7.2 2.5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> 0.2 M Saccharose
Hochsalzpuffer:	25 mM HEPES KOH pH 7.2 250 mM KCl 2.5 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> 0.2 M Saccharose
Saccharose-Lösungen:	55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% Die Saccharose wurde in Hochsalzpuffer ohne 0.2 M Saccharose angesetzt.
Creatinphosphat:	500 mM
Creatinkinase:	4 mg/ml in bidest, frisch ansetzen
RNAse:	10 mg/ml in bidest, frisch ansetzen
ATP:	40 mM
GMP-PNP:	10 mM

Tabelle 27 zeigt das Pipettierschema für die einzelnen Komponenten. Es wurden zuerst alle Komponenten bis auf den Golgi in der angegebenen Reihenfolge zusammengegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Rattenleber-Golgi zugegeben und nochmals kurz gemischt.

**Tabelle 27.** Pipettierschema für COPI-Vesikel-Präparation für einen 1.5 ml Ansatz

Komponente	Volumen
10 x Assaypuffer	150 µl
Creatinphosphat	15 µl
Creatinkinase	3.75 µl
RNAse A	3.75 µl
ATP	1.9 µl
GMP-PNP	15 µl
Zytosol	408 µl (10 mg)
Wasser	820 µl
Golgi	83 µl (200 µg)

Der Ansatz wurde für 25 min bei 37 °C auf einem Thermobock inkubiert, ohne die Probe zu schütteln. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Die Membranen wurden bei 16 000 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600 µl Niedrigsalzpuffer gewaschen. Dazu wurde das Pellet zuerst mit einem Teflonpistill in 150 µl Niedrigsalzpuffer resuspendiert und nach Zugabe von weiteren 450 µl Niedrigsalzpuffer mit einer blauen Pipettenspitze homogenisiert. Von der Suspension, die den *primed Golgi* enthielt, wurde ein Aliquot für die Lipidanalytik und für die Analyse im Western Blot aufgehoben. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die gewaschenen Membranen nochmals für 20 min bei 16 000 x g und 4 °C pelletiert. Um die COPI-Vesikel freizusetzen, wurde das Pellet wie oben beschrieben in 600 µl Hochsalzpuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 16 000 x g für 10 min bei 4 °C pelletiert und der Überstand, der die COPI-Vesikel enthält, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Volumenbestimmung wurde die Lösung mit 55% Saccharose in Hochsalzpuffer auf eine Konzentration von 20% Saccharose durch vorsichtiges Mischen mit einer blauen, abgeschnittenen Spitze eingestellt. Die Probe wurde auf einen 50%- bis 25%-Saccharosegradienten (sechs Stufen à 720 µl) geladen. Der Gradient wurde für 18 h bei 100 000 x g in einem SW 55-Rotor zentrifugiert. Es wurden Fraktionen à 250 µl gezapft, die dann im Western Blot auf ihren Coatomer-Gehalt untersucht wurden. Die Vesikelfraktionen wurden vereinigt und die Vesikel nach 1:4-Verdünnung mit PBS für 1 h bei 100 000 x g pelletiert. Zuvor war noch ein 200-µl-Aliquot für die Lipidanalytik entnommen worden. Die pelletierten Vesikel wurden in 2 x Probenpuffer aufgenommen und für die Analyse des  $\zeta_1/\zeta_2$ -COP-Verhältnisses im Western Blot eingesetzt.

## 26 Immunfluoreszenz von $\gamma_1$ -HA/ $\gamma_2$ -HA-Zellen

PBS-IF:                                   100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit HCl auf pH 7.4 einstellen  
   150 mM NaCl  
   2.5 mM KCl

Fixierlösung:                            3% PFA (w/v)  
   1% einer gesättigten Pikrinsäurelg. in Wasser (v/v)  
   in PBS-IF

Permeabilisierlösung:                1% Triton-X-100 (v/v) in PBS-IF

Zellen, die auf 10 cm i. d. Platten konfluent gewachsen waren, wurden trypsiniert und in 10 ml Medium suspendiert. Die Suspension wurde mit Medium 1:20 verdünnt und je 0.5 ml

der Zellsuspension auf Deckgläschen in 24-Loch-Platten ausgesät (1 Deckglas/*well*). Man ließ die Zellen bis zur 80%igen Konfluenz wachsen, mindestens aber drei Tage.

Die Deckgläschen wurden zweimal kurz mit PBS-IF gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden zweimal kurz gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen für jeweils 5 min in PBS-IF wurden die Deckgläschen vorsichtig am Rand mit Filterpapier abgetupft, um das PBS möglichst vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden für 30 min mit je 45 µl Primärantikörperlösung bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Verdünnungen sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Die Antikörper waren in PBS-IF verdünnt und vor Gebrauch für 1 h bei 16 000 x g bei 4 °C zentrifugiert worden. Nach der Primärantikörper-Inkubation wurden die Zellen zweimal 10 min mit PBS-IF gewaschen und anschließend für 30 min mit je 45 µl Sekundärantikörperlösung bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde nach Tabelle 8 in PBS-IF verdünnt und die Verdünnung vor Gebrauch für eine Stunde bei 16 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Nichtgebundene Sekundärantikörper wurden durch zweimaliges Waschen der Zellen für je 10 min in PBS-IF entfernt. Die Deckgläser wurden kurz in Wasser getaucht. Dann wurde das Wasser durch vorsichtiges Absaugen am Rande des Deckgläschens möglichst vollständig entfernt. Die Zellen wurden in 7 µl Mowiol eingebettet.

Die konfokalen Aufnahmen wurden mit einem Laserscan-Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt.

## VII Literaturverzeichnis

- Abeijon, C. und Hirschberg, C.B. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 17:32-36.
- Amara, J., Cheng, S.H. und Smith, A. 1992. Intracellular protein trafficking defects in human disease. *Trends Cell Biol.* 2:145-49.
- Aridor, M., Bannykh, S.I., Rowe, T. und Balch, W.E. 1995. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to golgi transport. *J. Cell Biol.* 131:875-93.
- Baier, C. 2002. Charakterisierung der  $\gamma$ 2-Untereinheit des Coatomer-Komplexes. *Diplomarbeit, Universität Heidelberg.*
- Balch, W.E., McCaffery, J.M., Plutner, H. und Farquhar, M.G. 1994. Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 76:841-52.
- Barlowe, C. 1998. COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404:67-76.
- Barlowe, C., d'Enfert, C. und Schekman, R. 1993. Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 268:873-79.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. und Schekman, R. 1994. COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 77:895-908.
- Becker, B., Boelinger, B. und Melkonian, M. 1995. Anterograde transport of algal scales through the Golgi complex is not mediated by vesicles. *Trends Cell Biol.* 5:305-307.
- Belden, W.J. und Barlowe, C. 1996. Erv25p, a component of copii coated vesicles, forms a complex with emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to golgi transport. *J. Biol. Chem.* 271:26939-46.
- Blagitko, N., Schulz, U., Schinzel, A.A., Ropers, H.H. und Kalscheuer, V.M. 1999.  $\gamma$ 2-COP, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome. *Hum Mol Genet.* 8:2387-96.
- Boehm, M. und JS., B. 2001. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell.* 12:2907-20.
- Bonfanti, L., Mironov, A.A., Martinez Menarguez, J.A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H.J. und Luini, A. 1998. Procollagen traverses



- the Golgi stack without leaving the lumen of Cisternae: Evidence for cisternal maturation. *Cell*. 95:993-1003.
- Bremser, M., Nickel, W., Schweikert, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Hughes, C.A., Sollner, T.H., Rothman, J.E. und Wieland, F.T. 1999. Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell*. 96:495-506.
- Bukau, B. und Horwich, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92:351-66.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud Dufour, S., Jackson, C.L. und Chabre, M. 1996. A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*. 384:481-84.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. und Zerial, M. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*. 62:317-29.
- Cosson, P., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R. und Letourneur, F. 1996.  $\delta$ - and  $\zeta$ -COP, two coatomer subunits homologous to clathrin associated proteins, are involved in retrieval. *Embo Journal*. Apr. 15:1792-1798.
- Cosson, P. und Letourneur, F. 1994. Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*. 263:1629-31.
- Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.P., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J. und Nilsson, T. 1998. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J. Cell Biol.* 140:751-65.
- Donaldson, J.G., Cassel, D., Kahn, R.A. und Klausner, R.D. 1992. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein  $\beta$ -COP to Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:6408-12.
- Donaldson, J.G. und Klausner, R.D. 1994. ARF: A key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:527-32.
- Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P. und Kreis, T.E. 1991.  $\beta$ -COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to  $\beta$ -adaptin. *Cell*. 64:649-65.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B. und Schekman, R. 1994. Yeast  $\beta$ - and  $\beta'$ -coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J Biol Chem*. 269:24486-24495.
- Duden, R., Kajikawa, L., Wuestehube, L. und Schekman, R. 1998.  $\epsilon$ -COP is a structural component of coatomer that functions to stabilize  $\alpha$ -COP. *Embo Journal*. 17:985-995.
- Dunphy, W.G., Brands, R. und Rothman, J.E. 1985. Attachment of terminal N-acetylglucosamine to asparagine-linked oligosaccharides occurs in central cisternae of the Golgi stack. *Cell*. 40:463-72.

- Emery, G., Gruenberg, J. und Rojo, M. 1999. The p24 family of transmembran proteins at the interface between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Protoplasma*. 207:24-30.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. und Duden, R. 2000. COPI domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO*. 19:3905-3917.
- Faulstich, D., Auerbach, S., Orci, L., Ravazzola, M., Wegehingel, S., Lottspeich, F., Stenbeck, G., Harter, C., Wieland, F.T. und Tschochner, H. 1996. Architecture of coatomer: molecular characterization of  $\delta$ -COP and protein interactions within the complex. *Journal Of Cell Biology*. Oct. 135:53-61.
- Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M.A. und Rothman, J.E. 1996. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science*. 273:1396-99.
- Futatsumori, M., Kasai, K., Takatsu, H., Shin, H.W. und Nakayama, K. 2000. Identification and characterization of novel isoforms of COPI subunits. *J Biochem (Tokyo)*. 128:793-801.
- Garcia-Higuera, I., Gaitatzes, C., Smith, T.F. und Neer, E.J. 1998. Folding a WD repeat propeller - Role of highly conserved aspartic acid residues in the G protein beta subunit and Sec13. *Journal of Biological Chemistry*. 273:9041-9049.
- Gaynor, E.C., Te, H.S., Graham, T.R., Aebi, M. und Emr, S.D. 1994. Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J. Cell Biol.* 127:653-65.
- Gerich, B., Orci, L., Tschochner, H., Lottspeich, F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Wieland, F. und Harter, C. 1995. Non-clathrin-coat protein  $\alpha$  is a conserved subunit of coatomer and in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for growth. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 92:3229-3233.
- Gething, M.J. und Sambrook, J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*. 355:33-45.
- Goldberg, J. 1998. Structural basis for activation of ARF GTPase: Mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*. 95:237-48.
- Goldberg, J. 2000. Selecting sorting signals. *trends in cell biology*. 10:225-226.
- Gommel, D., Memon, A., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner, J., Reinhard, C., Helms, J., Nickel, W. und Wieland, F. 2001. Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J*. 20:6751-60.
- Gommel, D., Orci, L., Emig, E.M., Hannah, M.J., Ravazzola, M., Nickel, W., Helms, J.B., Wieland, F.T. und Sohn, K. 1999. p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated transport vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between the organelles of the early secretory pathway. *FEBS Lett*. 447:179-185.
- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse, L.J., Nilsson, T., Goud, B., Soeling, H.D., Tang, B.L., Wong, S.H. und Hong, W. 1994. Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J Cell Biol*. 127:1557-1574.

- Griffiths, G. und Simons, K. 1986. The trans Golgi Network: Sorting at the Exit Site of the Golgi Complex. *Science*. 234:438-43.
- Hahn Y, L.Y., Yun JH, Yang SK, Park CW, Mita K, Huh TL, Rhee M, Chung JH. 2000. Duplication of genes encoding non-clathrin coat protein  $\gamma$ -COP in vertebrate, insect and plant evolution. *FEBS Lett*. 482:31-6.
- Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F.T. und Rothman, J.E. 1994. En Bloc Incorporation of Coatomer Subunits during the Assembly of COP-coated Vesicles. *J Cell Biol*. 124:883-92.
- Harrison-Lavoie, K.J., Lewis, V.A., Hynes, G.M., Collison, K.S., Nutland, E. und Willison, K.R. 1993. A 102 kDa subunit of a Golgi-associated particle has homology to  $\beta$  subunits of trimeric G proteins. *Embo J*. 12:2847-53.
- Harter, C., Draken, E., Lottspeich, F. und Wieland, F.T. 1993. Yeast coatomer contains a subunit homologous to mammalian  $\beta'$ -COP. *Febs Lett*. 332:71-3.
- Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehangel, S., Tschochner, H. und Wieland, F. 1996. Nonclathrin coat protein  $\gamma$ , a subunit of coatomer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:1902-6.
- Harter, C. und Reinhard, C. 2000. The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell. Biochem*. 34:1-38.
- Harter, C. und Wieland, F.T. 1998. A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the  $\gamma$  subunit of coatomer. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 95:11649-54.
- Hess, P. 2001.  $\gamma$ 2-COP: Eine neue Untereinheit des COPI-Vesikel-Hüllproteins Coatomer. *Dissertation, Universität Heidelberg*.
- Hicke, L., Yoshihisa, T. und Schekman, R. 1992. Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*. 3:667-76.
- Hirst, J. und Robinson, M.S. 1998. Clathrin and adaptors. *Biochim. Biophys. Acta*. 1404:173-93.
- Hosobuchi, M., Kreis, T. und Schekman, R. 1992. SEC21 is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer. *Nature*. 360:603-5.
- Huttner, W.B. 1988. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu. Rev. Physiol*. 50:363-76.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. und Peterson, P.A. 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 9:3153-62.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. und Peterson, P.A. 1993. Retrieval of Transmembrane Proteins to the Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Biol*. 121:317-33.

- Jenne, N., Frey, K., Brugger, B. und Wieland, F. 2002. Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* 277:46504-11.
- Kahn, R.A. und Gilman, A.G. 1986. The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J. Biol. Chem.* 261:7906-11.
- Kaiser, C. 2000. Thinking about p24 proteins and how transport vesicles select their cargo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3783-5.
- Kalies, K.U. und Hartmann, E. 1998. Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)-two similar routes with different modes. *Eur. J. Biochem.* 254:1-5.
- Kimata, Y., Lim, C.R., Kiriya, T., Nara, A., Hirata, A. und Kohno, K. 1999. Mutation of the yeast  $\epsilon$ -COP gene ANU2 causes abnormal nuclear morphology and defects in intracellular vesicular transport. *Cell Structure and Function.* 24:197-208.
- Kornfeld, R. und Kornfeld, S. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-64.
- Kuge, O., Hara, K.S., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Tanigawa, G., Wieland, F.T. und Rothman, J.E. 1993.  $\zeta$ -COP, a subunit of coatamer, is required for COP-coated vesicle assembly. *J. Cell Biol.* 123:1727-34.
- Kuge, O., Hara, K.S., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Tanigawa, G., Wieland, F.T. und Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H. und Cosson, P. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell.* 79:1199-207.
- Lowe, M. und Kreis, T.E. 1995. In vitro assembly and disassembly of coatamer. *Journal Of Biological Chemistry.* Dec. 270:31364-31371.
- Lowe, M. und Kreis, T.E. 1998. Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell.* 1404:53-66.
- Luzio, J.P., Brake, B., Banting, G., Howell, K.E., Braghetta, P. und Stanley, K.K. 1990. Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). *Biochem J.* 270:97-102.
- Marzioch, M., Henthorn, D.C., Herrmann, J.M., Wilson, R., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J.M., Solari, R.C.E. und Rowley, A. 1999. Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol. Biol. Cell.* 10:1923-38.
- Matter, K. und Mellman, I. 1994. Mechanisms of cell polarity: Sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:545-54.
- Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology.* 12:575-625.

- Mironov, A.A., Weidman, P. und Luini, A. 1997. Variations on the intracellular transport theme: Maturing cisternae and trafficking tubules. *JCB*. 138:481-484.
- Nakamura, N., Lowe, M., Levine, T.P., Rabouille, C. und Warren, G. 1997. The vesicle docking protein p115 binds gm130, a cis golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell*. May. 89:445-455.
- Nakano, A. und Muramatsu, M. 1989. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 109:2677-91.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. und Smith, T.F. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature (London)*. 371:297-300.
- Nickel, W., Brugger, B. und Wieland, F.T. 1998a. Protein and lipid sorting between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:493-501.
- Nickel, W., Malsam, J., Gorgas, K., Ravazzola, M., Jenne, N., Helms, J.B. und Wieland, F.T. 1998b. Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTP  $\gamma$  S in vitro. *Journal of Cell Science*. 111 Part 20:3081-3090.
- Nilsson, T., Jackson, M. und Peterson, P.A. 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 58:707-18.
- Orci, L., Glick, B.S. und Rothman, J.E. 1986. A new type of Coated Vesicular Carrier that appears not to contain Clathrin: Its possible role in protein transport within the Golgi Stack. *Cell*. 46:171-184.
- Orci, L., Stannnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Söllner, T.H. und Rothman, J.E. 1997. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-Coated vesicles. *Cell*. 90:335-349.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 189:347-58.
- Palmer, D.J., Helms, J.B., Beckers, C.J., Orci, L. und Rothman, J.E. 1993. Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* 268:12083-89.
- Pavel, J., Harter, C. und Wieland, F.T. 1998. Reversible dissociation of coatomer: Functional characterization of a  $\beta/\delta$ -coat protein subcomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:2140-45.
- Peyroche, A., Paris, S. und Jackson, C.L. 1996. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature*. 384:479-81 issn: 0028-0836.
- Presley, J., Ward, T., Pfeifer, A., Siggia, E., Phair, R. und Lippincott-Schwartz, J. 2002. Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature*. 417:187-93.
- Pryer, N.K., Salama, N.R., Schekman, R. und Kaiser, C.A. 1993. Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. *J. Cell Biol.* 120:865-75.

- Rambourg, A. und Clermont, Y. 1997. Three-dimensional structure of the golgi apparatus in mammalian cells. *In* The Golgi Apparatus. J.Roth, E.G.B.a., editor. Birkenhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin. 37-61.
- Reinhard, C., Harter, C., Bremser, M., Brugger, B., Sohn, K., Helms, J.B. und Wieland, F. 1999. Receptor-induced polymerization of coatomer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:1224-8.
- Roth, J., Taatjes, D.J., Lucocq, J.M., Weinstein, J. und Paulson, J.C. 1985. Demonstration of an extensive trans-tubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell*. 43:287-95.
- Rothman, J.E. und Wieland, F.T. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272:227-34.
- Salama, N.R., Yeung, T. und Schekman, R.W. 1993. The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *EMBO J*. 12:4073-82.
- Saraste, J. und Kuismanen, E. 1984. Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface. *Cell*. 38:535-49.
- Saraste, J., Palade, G.E. und Farquhar, M.G. 1987. Antibodies to rat pancreas Golgi subfractions: identification of a 58- kD cis-Golgi protein. *J. Cell Biol*. 105:2021-29.
- Scales, S.J., Pepperkok, R. und Kreis, T.E. 1997. Visualization of ER to Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for copii and copI. *Cell*. 90:1137-48.
- Schindler, R., Itin, C., Zerial, M., Lottspeich, F. und Hauri, H.P. 1993. ERGIC-53, a membrane protein of the ER-Golgi intermediate compartment, carries an ER retention motif. *Eur. J. Cell Biol*. 61:1-9.
- Schmid, S.L. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem*. 66:511-48.
- Schweizer, A., Fransen, J.A., Bachi, T., Ginsel, L. und Hauri, H.P. 1988. Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol*. 107:1643-53.
- Schweizer, A., Fransen, J.A., Matter, K., Kreis, T.E., Ginsel, L. und Hauri, H.P. 1990. Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *Eur. J. Cell Biol*. 53:185-96.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A. und Rothman, J.E. 1991a. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*. 67:239-53.
- Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J.E. und Wieland, F.T. 1991b. A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein  $\beta$ -adaptin. *Nature*. 349:215-20.
- Shima, D.T., Scales, S.J., Kreis, T.E. und Pepperkok, R. 1999. Segregation of COPI-rich and anterograde-cargo-rich domains in endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport complexes. *Curr Biol*. 9:821-4.

- Sohn, K., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Bremser, M., Lottspeich, F., Fiedler, K., Helms, J.B. und Wieland, F.T. 1996. A major membrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J. Cell Biol.* 135:1239-48.
- Stenbeck, G., Harter, C., Brecht, A., Herrmann, D., Lottspeich, F., Orci, L. und Wieland, F.T. 1993.  $\beta'$ -COP, a novel subunit of coatomer. *Embo J.* 12:2841-5.
- Stenbeck, G., Harter, C., Brecht, A., Herrmann, D., Lottspeich, F. und Wieland, F.T. 1992a.  $\beta$ -COP, a Novel Subunit of Coatomer with Homology to the  $\beta$ -Subunits of Trimeric G Proteins.
- Stenbeck, G., Schreiner, R., Herrmann, D., Auerbach, S., Lottspeich, F., Rothman, J.E. und Wieland, F.T. 1992b.  $\gamma$ -COP, a coat subunit of non-clathrin-coated vesicles with homology to Sec21p. *Febs Lett.* 314:195-8.
- Tang, B.L., Wong, S.H., Qi, X.L., Low, S.H. und Hong, W. 1993. Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J Cell Biol.* 120:325-38.
- Tisdale, E.J. und Balch, W.E. 1996. Rab2 Is Essential For the Maturation of Pre Golgi Intermediates. *J. Biol. Chem.* 271 (46):29372-79.
- Tisdale, E.J., Plutner, H., Matteson, J. und Balch, W.E. 1997. P53/58 binds copi and is required for selective transport through the early secretory pathway. *J. Cell Biol.* 137:581-93.
- Townsley, F.M. und Pelham, H. 1994. The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast. *Eur. J. Cell Biol.* 64:211-16.
- Ungewickell, E. und Branton, D. 1981. Assembly Units of Clathrin Coats. *Nature.* 289:420-22.
- Volchuk, A., Amherdt, M., Ravazzola, M., Brugger, B., Rivera, V., Clackson, T., Perrelet, A., Sollner, T., Rothman, J. und Orci, L. 2000. Megavesicles implicated in the rapid transport of intracisternal aggregates across the Golgi stack. *Cell.* 102:335-48.
- Waters, M.G., Serafini, T. und Rothman, J.E. 1991. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature.* 349:248-51.
- Weigle, B. 1997. Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Coatomer-Hüllproteinkomplexes nicht-Clathrin-umhüllter intrazellulärer Transportvesikel. *Dissertation, Universität Heidelberg.*
- Welsh, M.J. und Smith, A.E. 1995. Cystic fibrosis. *Sci Am.* 273:52-9.
- Wieland, F. und Harter, C. 1999. Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Current Opinion in Cell Biology.* 11:440-446.
- Wilkinson, B.M., Regnacq, M. und Stirling, C.J. 1997. Protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J. Membr. Biol.* 155:189-97.

- 
- Wuestehube, L.J., Duden, R., Eun, A., Hamamoto, S., Korn, P., Ram, R. und Schekman, R. 1996. New mutants of *saccharomyces cerevisiae* affected in the transport of proteins from the endoplasmic reticulum to the golgi complex. *Genetics . Feb.* 142:393-406.
- Zhao, L., Helms, J.B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J. und Wieland, F.T. 1997. Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit  $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4418-23.
- Zhao, L.Y., Helms, J.B., Brunner, J. und Wieland, F.T. 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.



## Danksagung

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

Herrn Professor Dr. Felix Wieland für die interessante Themenstellung, die wertvollen Anregungen sowie die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Brunner für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Constanze Reinhard für ihre überaus große Hilfsbereitschaft, für ein äußerst motivierendes und diskussionsfreudiges Arbeitsklima und nicht zuletzt für das schnelle Korrekturlesen.

Dr. Pablo Hess, Dr. Cordula Harter, Carola Baier, Dorothee Lay, Dr. Eva-Maria Emig, Jutta Worsch und Oliver Schmitt für die tolle Zusammenarbeit.

Dr. Britta Brügger für die zuverlässige und schnelle Lipidanalytik von COPI-Vesikeln.

Frau Ingrid Meißner und Herrn Prof. Jeckel für die großzügige Überlassung von gereinigten Golgi-Membranen.

Karolin Frey für das Versorgen mit *goodies*.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wieland und des Biochemiezentrum Heidelberg für die angenehme Atmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie und vor allem meiner Frau Luisa für ihre große Geduld und Unterstützung.