

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen

Gesamtfakultät der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom Biologin Stefanie Hubich

aus

Sulzbach an der Murr

Tag der mündlichen Prüfung:

Charakterisierung des Guaninnukleotid- Austauschfaktors GBF1

1. Gutachter: Prof. Dr. Felix T. Wieland

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Brunner

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Zusammenfassung/Abstract | 6 |
| 1.1 | Zusammenfassung | 6 |
| 1.2 | Abstract | 7 |
| 2 | Einleitung | 9 |
| 2.1 | Die eukaryontische Zelle und ihre Kompartimentierung | 9 |
| 2.2 | Der sekretorische Transportweg | 9 |
| 2.2.1 | Überblick: COPII, COPI und Clathrin-Vesikel | 10 |
| 2.3 | COPI-Vesikel | 12 |
| 2.3.1 | Hauptkomponenten | 12 |
| 2.3.2 | Funktion der COPI-Vesikel | 13 |
| 2.3.3 | Biogenese der COPI-Vesikel | 14 |
| 2.3.4 | Existenz unterschiedlicher COPI-Vesikeltypen | 16 |
| 2.4 | Die p24 Proteinfamilie | 16 |
| 2.5 | ArfGAPs | 19 |
| 2.6 | Arf Proteine und Arf GEFs | 20 |
| 2.6.1 | BFA-resistente Arf GEFs | 22 |
| 2.6.2 | BFA-sensitive Arf GEFs | 23 |
| 2.6.2.1 | BIG1 und BIG2 | 23 |
| 2.6.2.2 | GBF1 | 24 |
| 2.7 | Ziel der Arbeit | 26 |
| 3 | Ergebnisse | 27 |
| 3.1 | Expression und Aufreinigung von rekombinantem GBF1 | 27 |
| 3.1.1 | Klonierung von GBF1 in den Transfervektor pFastBac | 27 |
| 3.1.2 | Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA, Transfektion von Sf9-Zellen, Virus Amplifikation und GBF1 Expression | 29 |
| 3.2 | Expression und Aufreinigung von rekombinantem GBF1 | 29 |
| 3.3 | Generierung eines GBF1-spezifischen Antikörpers | 30 |
| 3.4 | Quantifizierung von endogenem GBF1 in HeLa Zellen | 33 |
| 3.5 | Rekrutierung von rekombinantem GBF1 an die Golgi-Membranen | 34 |
| 3.6 | GBF1 Aktivität | 36 |
| 3.6.1 | Expression und Aufreinigung von NΔ17Arf1 | 36 |
| 3.6.2 | NΔ17Arf1: Kontrolle des Nukleotidzustandes | 38 |
| 3.6.3 | GBF1 Aktivität | 40 |
| 3.7 | Coatomer als Interaktionspartner von GBF1 | 42 |
| 3.8 | Direkte Interaktion von GBF1 mit Mitgliedern der p24 Proteinfamilie (Photokreuzvernetzung-Experimente) | 43 |
| 3.9 | GBF1 interagiert mit dimeren Mitgliedern der p24 Familie | 44 |
| 3.10 | GBF1, Arf1 und dimere Mitglieder der p24 Familie bilden trimere Komplexe | 46 |
| 3.11 | Die p24 Proteinfamilie beeinflusst den GBF1-vermittelten Nukleotidaustausch an Arf1 | 49 |
| 3.12 | Quenching Effekte von p23 | 54 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.13 | Inhibition der COPI Vesikel Biogenese | 55 |
| 3.14 | Dimeres p27 inhibiert auch die ArfGAP-Aktivität | 57 |
| 4 | Diskussion | 59 |
| 4.1 | Expression und Aufreinigung großer ArfGEFs..... | 59 |
| 4.2 | GBF1: Bindung an die Golgi-Membran..... | 59 |
| 4.3 | GBF1 katalysierter GDP/GTP Austausch an Arf1 | 60 |
| 4.4 | Interaktionspartner von GBF1 | 61 |
| 4.5 | Regulation der GBF1 Aktivität | 65 |
| 5 | Material und Methoden | 69 |
| 5.1 | Material..... | 69 |
| 5.1.1 | Chemikalien | 69 |
| 5.1.2 | Geräte | 69 |
| 5.1.3 | Allgemeine Puffer und Lösungen | 69 |
| 5.1.4 | Antibiotika..... | 69 |
| 5.1.5 | Nährmedien..... | 70 |
| 5.1.6 | Peptide | 70 |
| 5.1.7 | Primärantikörper..... | 71 |
| 5.1.8 | Sekundärantikörper..... | 72 |
| 5.1.9 | Protein-, Molekulargewichts- und Gelfiltrationstandards | 72 |
| 5.1.10 | DNA-Größenstandards | 73 |
| 5.1.11 | Plasmide | 73 |
| 5.1.12 | Oligonukleotide | 74 |
| 5.1.13 | Bakterienstämme | 75 |
| 5.1.14 | Zelllinien..... | 75 |
| 5.2 | Molekularbiologische Methoden | 75 |
| 5.2.1 | Bestimmung der DNA-Konzentration | 75 |
| 5.2.2 | Ethanolpräzipitation von DNA | 75 |
| 5.2.3 | Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese | 76 |
| 5.2.4 | Umpufferung von DNA-Fragmenten..... | 76 |
| 5.2.5 | PCR-Screening | 76 |
| 5.2.6 | Plasmidisolierung | 77 |
| 5.2.7 | Restriktionsverdau..... | 78 |
| 5.2.8 | Ligation..... | 78 |
| 5.2.9 | Herstellung elektrokompetenter DH10MultiBac-Zellen..... | 78 |
| 5.2.10 | DNA-Transformation | 79 |
| 5.2.11 | DNA-Sequenzierung | 79 |
| 5.2.12 | Herstellung rekombinanten MultiBac-Bacmids..... | 79 |
| 5.2.13 | Bacmidisolierung..... | 80 |
| 5.2.14 | Kultivieren von Insektenzellen..... | 81 |
| 5.2.15 | Lipo-Transfektion von Sf9-Zellen, Virusamplifikation und Überexpression von Proteinen | 81 |
| 5.2.16 | Herstellung von Sf9-Zellhomogenaten..... | 81 |
| 5.3 | Biochemische Methoden | 82 |
| 5.3.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 82 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.3.2 | Anfärbung von Proteinen..... | 83 |
| 5.3.3 | Western Blot (WB)..... | 83 |
| 5.3.4 | Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford..... | 84 |
| 5.3.5 | Präparation von humanem, myristoyliertem Arf1 | 84 |
| 5.3.6 | Aufreinigung von NΔ17Arf1-GDP..... | 86 |
| 5.3.7 | Aufreinigung von monomeren und dimeren Thioredoxin-p24 Fusionsproteinen (Trx- p24 Fusionsproteine)..... | 88 |
| 5.3.8 | Gelfiltration von NΔ17Arf1 und dimeren Trx-p24 Fusionsproteinen..... | 88 |
| 5.3.9 | Aufreinigung von rekombinantem Coatomer | 89 |
| 5.3.10 | Aufreinigung von rekombinantem GBF1 | 90 |
| 5.3.11 | Photokreuzvernetzungs- und Kompetitions-Experimente | 90 |
| 5.3.12 | Immunpräzipitations-Experimente: GBF1 und Trx-p24 Fusionsproteine..... | 91 |
| 5.3.13 | Immunpräzipitations-Experimente: GBF1 und Coatomer- Isotypen..... | 92 |
| 5.3.14 | Herstellung von Golgi- <i>like</i> Liposomen..... | 92 |
| 5.3.15 | Tryptophan Fluoreszenz Messungen..... | 93 |
| 5.3.16 | Bindung an Golgi-Membranen/ Bindung an Liposomen..... | 94 |
| 5.3.17 | Präparative Methoden..... | 95 |
| | 5.3.17.1 Isolierung von Golgi aus Rattenleber..... | 95 |
| | 5.3.17.2 Vesikel Präparation..... | 96 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 98 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis..... | 108 |
| 8 | Danksagung | 110 |
| 9 | Erklärung | 112 |

1 Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Im initiierenden Schritt der COPI-Vesikelbiogenese wird die kleine GTPase Arf1 von den beiden zur p24 Proteinfamilie gehörenden Typ I-Transmembranproteinen p23 bzw. p24 an die Membran rekrutiert. Dort vermittelt GBF1 (*Golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1*), ein sogenanntes Arf GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), in Arf1 den Nukleotidaustausch von GDP nach GTP. Das nun in seinen aktiven Zustand überführte Arf1-GTP exponiert nach einer Konformationsänderung eine N-terminale amphiphatische Helix und einen Myristoylanker und bindet über diese fest an die Membran. Im Anschluss definieren Arf1-GTP und p23 bzw. p24 den sogenannten „*priming complex*“, über welchen das Hüllprotein Coatomer aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert wird, was letztendlich zur Ausbildung eines COPI-Vesikels führt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es nun erstmals gelungen, das für die COPI-Vesikelbiogenese physiologisch relevante Arf GEF GBF1, mit einem Molekulargewicht von ungefähr 200 kDa, im baculoviralen System zu exprimieren und anschließend aufzureinigen. Das rekombinante GBF1 wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit charakterisiert, an isolierte Golgi-Membranen zu binden und an Arf1 den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP durchzuführen. Zusätzlich wurde eine bereits beschriebene Interaktion von GBF1 mit Coatomer nachgewiesen, die in der hier vorliegenden Arbeit auf bestimmte Coatomer-Isotypen weiter eingegrenzt werden konnte. Durch Photokreuzvernetzungsstudien wurde eine direkte Interaktion von GBF1 mit p23 nachgewiesen. Sich daran anschließende Kompetitions- und Koimmunpräzipitations-Experimente zeigten, dass neben p23 auch die p24 Proteinfamilienmitglieder p24, p25, p26 und p27 in jeweils dimerer Form mit GBF1 interagieren. Wurde Arf1 in die Koimmunpräzipitations-Experimente eingeschlossen, so zeigten sich trimere Komplexe bestehend aus Arf1, GBF1 und dimeren Mitgliedern der p24 Familie. Mit Hilfe von Tryptophan Fluoreszenz Messungen in einem löslichen und liposomalen System wurde anschließend die Aktivität von GBF1 an Arf1 in der Gegenwart von monomeren und dimeren p24 Familienmitgliedern untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur dimere p23, p24 und p27 die Aktivität von GBF1 inhibieren.

Entsprechend fand sich in *in vitro* Experimenten eine verringerte Ausbeute an COPI-Vesikeln in der Gegenwart von p27. Neben der Inhibition von GBF1 sind p23, p24 und p27 wahrscheinlich auch für eine Inhibition der ArfGAP1 (*GTPase-activating protein*)-vermittelten GTP-Hydrolyse an Arf1 verantwortlich.

Mit dem hier generierten, rekombinanten GBF1 steht nun eine weitere, physiologisch relevante Komponente der COPI Maschinerie für Interaktions- und Aktivitätsstudien zur Verfügung, wodurch diese Arbeit einen wichtigen Schritt zur vollständigen Aufklärung der COPI-Vesikelbiogenese liefert.

1.2 Abstract

In the initial step of COPI vesicle biogenesis the small GTPase Arf1 is recruited to the membrane via direct interaction with p23 and p24 both members of the p24 family of type I transmembrane proteins. There GBF1 (*Golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1*), an Arf *guanine nucleotide exchange factor* (Arf GEF), mediates the nucleotide exchange on Arf1 from GDP to GTP. Subsequently the active Arf1-GTP binds tightly to the membrane through its N-terminal amphiphatic helix and myristoyl anchor and dissociates from p23 or p24. Finally coatomer is recruited from the cytosol to the membrane *en bloc* leading to the formation of a COPI vesicle.

Here the expression and purification of recombinant full-length GBF1 (200 kDa) which is the physiologically relevant Arf GEF for the COPI vesicle biogenesis was established. GBF1 was characterised by its ability to bind to isolated Golgi membranes. An already described interaction of GBF1 and coatomer was verified and showed furthermore preferences for specific coatomer isotypes. Beside this, an interaction of p23 with GBF1 was observed by using photocrosslinking approaches. Subsequent competition and coimmunoprecipitation experiments revealed in addition all dimeric members of the p24 family as interaction partners of GBF1. Also trimeric complexes consisting of Arf1, GBF1 and dimeric members of the p24 family were shown to exist. Tryptophan fluorescence measurements detecting the nucleotide exchange activity of GBF1 on Arf1 were performed in the presence and absence of monomeric and dimeric p24 family members while using a completely soluble system and a liposomal system. GBF1-mediated nucleotide exchange on Arf1 was significantly inhibited by dimeric p23, p24 and p27. This observation is consistent with the finding that less COPI

vesicles are formed in the presence of dimeric p27. In addition evidence is reported that the hydrolysis of GTP by ArfGAP1 (*GTPase-activating protein*) on Arf1 is also inhibited by p23, p24 and p27.

In this study recombinant GBF1, a physiological relevant component of the COPI machinery, was generated. Further interaction and activity studies will be provide an important step towards the full elucidation of the initial steps in the biogenesis of COPI vesicles.

2 Einleitung

2.1 Die eukaryontische Zelle und ihre Kompartimentierung

Alle Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben, die sie gegen das umgebende Milieu abgrenzt. Eukaryontische Zellen besitzen darüberhinaus intrazelluläre Membranen, die verschiedene Reaktionsräume umschließen. Zu diesen Kompartimenten, auch Organellen genannt, zählen der Nukleus, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Mitochondrien, Lysosomen und Endosomen.

Jedes Kompartiment enthält ein spezifisches Repertoire an Lipiden und Proteinen, die seine Identität bestimmen und gleichzeitig den Ablauf verschiedener, individueller Stoffwechselfvorgänge ermöglichen. Dabei findet zwischen den einzelnen Kompartimenten ein ständiger Stofftransport statt, der zur Prozessierung von Zellbestandteilen oder Stoffwechselprodukten und für die Integrität der Kompartimente notwendig ist. Dieser wird meist von sphärischen Vesikeln vermittelt, die sowohl lösliche als auch Membranproteine und Lipide transportieren.

2.2 Der sekretorische Transportweg

Cytosolische Proteine werden im Cytosol von freien Ribosomen synthetisiert und verbleiben dort. Proteine, die eine Signalsequenz besitzen, werden ebenfalls zunächst ins Cytosol abgegeben, dann aber zum Kern, den Mitochondrien oder zu den Peroxisomen transportiert. Alle Proteine mit einer ER-Signalsequenz fließen in den sekretorischen Weg (Blobel and Dobberstein, 1975a; Blobel and Dobberstein, 1975b). Zu diesen zählen lösliche und Membranproteine des ER, des Golgi-Apparates (Golgi), der Endosomen, der Lysosomen, der Vakuolen, der Plasmamembran sowie extrazelluläre (sezernierte) Proteine. Auf diesem sekretorischen Weg finden, nach korrekter Faltung der Proteine, in verschiedenen Schritten posttranslationale Modifizierungen statt. Dabei werden z.B. Disulfidbrücken gebildet, N- und O-Glykosylierungen (Abeijon and Hirschberg, 1992; Gething and Sambrook, 1992), Prolin-Hydroxylierungen (Suokas et al., 2003), Tyrosin-Sulfatierungen oder die Anheftung von GPI-Ankern durchgeführt. Dabei können 4 voneinander abgegrenzte Schritte unterschieden werden:

ER-Import und Qualitätskontrolle, Transport vom ER zum Golgi, intra-Golgi Transport und Rückführung vom Golgi zum ER, sowie post-Golgi Transport. Der Transport zwischen den Organellen sowie zum Zielort hin wird durch Vesikel vermittelt.

Für den ER-Import bestimmte Proteine werden mit einer hydrophoben ER-Signalsequenz translatiert. Diese wird vom sogenannten *signal-recognition particle* (SRP) erkannt und gebunden (Wild et al., 2004). Dadurch wird die Polypeptid-Elongation so lange unterbrochen (Blobel and Potter, 1967a; Blobel and Potter, 1967b; Walter and Blobel, 1981a; Walter and Blobel, 1981b; Walter et al., 1981) bis das SRP an den ER-ständigen SRP-Rezeptor (SR) bindet (Wild et al., 2004). Durch diese Interaktion wird ein Kontakt zwischen Ribosom und einem proteinleitendem Kanal, der ER-Translokase, vermittelt. Nach GTP-Hydrolyse dissoziieren SRP und SRP-Rezeptor ab und eine cotranslationale Translokation der naszierenden Kette durch die ER-Translokase findet statt (Matlack et al., 1999; Plath et al., 1998). Dabei werden Membranproteine in die ER-Membran inkorporiert, während lösliche, lysosomale, vakuoläre oder für die Sekretion bestimmte Proteine ins ER-Lumen transloziert werden (Deshaies et al., 1991; Deshaies and Schekman, 1989). Zwei voneinander unabhängige, ER-assoziierte Systeme, *unfolded protein response* (UPR) und *ER-associated degradation* (ERAD) genannt, verhindern dabei die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen und transportieren diese gegebenenfalls mit Hilfe von Translokatoren zurück ins Cytosol (Friedlander et al., 2000; Travers et al., 2000). Dort findet, nach Deglykosylierung (Plemper and Wolf, 1999) und Ubiquitinierung (Hershko et al., 1979), der Abbau durch spezifische Proteasen statt (Haass and Kloetzel, 1989).

Haben Proteine hingegen die Qualitätskontrolle passiert, so werden sie als Frachtmoleküle weiter zum Golgi transportiert.

2.2.1 Überblick: COPII, COPI und Clathrin-Vesikel

Die Frachtmoleküle werden im ER von COPII (*coat protein complex II*)-Vesikel aufgenommen und anschließend zum *ER-Golgi-intermediate-compartment* (ERGIC) transportiert (Barlowe et al., 1994), (Abbildung 1).

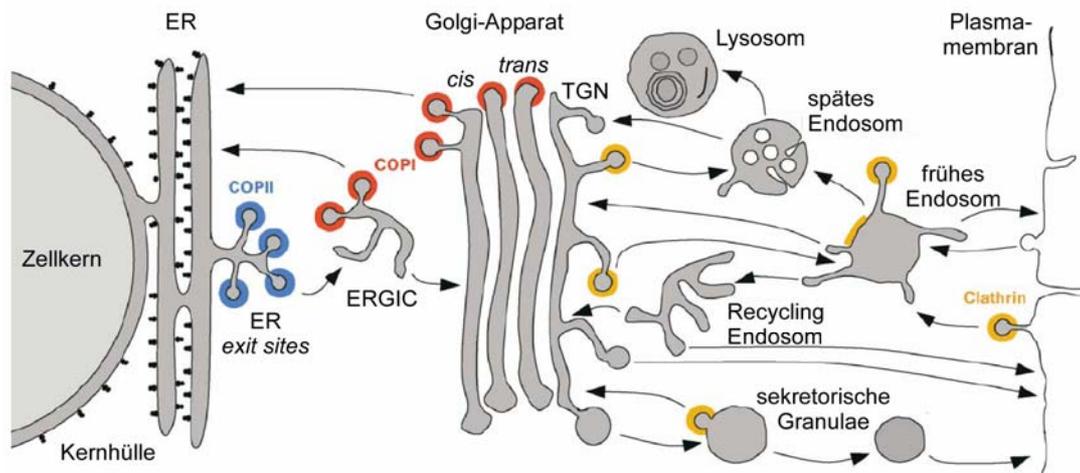


Abbildung 1: Überblick über die intrazellulären Transportwege

Schematischer Überblick über den sekretorischen Weg mit COPII-Vesikeln in blau, COPI-Vesikeln in rot und Clathrin-Vesikeln in gelb. Die Abbildung wurde modifiziert nach Bonifacino und Glick, 2004.

Der in der ER-Membran lokalisierte Nukleotidaustauschfaktor Sec12 aktiviert dabei die lösliche kleine GTPase Sar1p (Barlowe et al., 1993; Barlowe and Schekman, 1993). Diese bindet über ihre N-terminale, amphiphatische Helix an die Membran und rekrutiert sequentiell den heterodimeren Sec23/24 Komplex sowie den heterotetrameren Sec13/31 Komplex (Fath et al., 2007; Matsuoka et al., 1998). Die Hydrolyse-Aktivität von Sar1p, welche durch das Sec23 Protein aktiviert wird, führt zum Verlust der Proteinhülle (Yoshihisa et al., 1993). Durch Membranfusion mit dem ERGIC werden die Frachtmoleküle anschließend an diese Organellen abgegeben.

Das ERGIC wird auch als *15°C-Kompartiment* oder als *vesicular-tubular-cluster (VTC)* bezeichnet und definiert sich über das Vorhandensein von Markerproteinen, wie dem intrazelluläre Lektin ERGIC53 (Hauri et al., 2000). Verschiedene Modelle werden für die Entstehung des ERGIC diskutiert. Einerseits geht man davon aus, dass sich dieses *de novo* durch homotypische Fusion von COPII-Vesikeln bildet (Glick and Malhotra, 1998), während in anderen Modellen das ERGIC ein bereits bestehendes Kompartiment ist, mit welchem COPII-Vesikel heterotypisch fusionieren (Bannykh and Balch, 1998).

Da im ERGIC sowohl Markerproteine für COPII- als auch für COPI-Vesikel nachweisbar sind, wird für dieses Organell eine Funktion als Sortierungsstelle zwischen anterogradem und retrogradem Transport angenommen (Martinez-Menarguez et al., 1999; Scales et al., 1997). Dabei

übernehmen COPI-Vesikel den retrograden Transport von Membranproteinen, die zwischen ER und dem Golgi zyklisieren. Der anterograde Transport sekretorischer Proteine in Richtung *cis*-Golgi erfolgt im Gegensatz dazu wahrscheinlich COPI unabhängig.

Nachdem die Frachtmoleküle den *cis*-Golgi erreicht haben, werden sie weiter in anterograder Richtung durch die Zisternen des *medial*- und *trans*-Golgi transportiert, bis sie schließlich das *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) erreichen. COPI-Vesikel übernehmen dabei den bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparates (Orci et al., 1986; Ostermann et al., 1993; Rothman and Wieland, 1996), sind aber auch für die Rückführung von Proteinen in das ER verantwortlich (Cosson and Letourneur, 1994; Letourneur et al., 1994; Majoul et al., 2001).

Im TGN angelangt werden die sekretorischen Proteine schließlich sortiert und anschließend zu ihren Bestimmungsorten wie Endosomen, Lysosomen oder der Plasmamembran transportiert. An dieser Stelle kann der sekretorische Weg in regulierte und konstitutive Prozesse unterteilt werden. Die regulierten Prozesse beschränken sich dabei auf endokrine und neuroendokrine Zellen (Tooze et al., 2001), konstitutive Prozesse existieren dagegen in allen Zellentypen und werden durch Clathrin-umhüllte Vesikel (CCVs) vermittelt (Pearse, 1975).

Bei der Biogenese von Clathrin-Vesikeln rekrutiert die kleine GTPase Arf1 (*ADP ribosylation factor 1*) die Adaptor-Protein Komplexe (AP) AP1, AP3 und AP4 und an die Membran, während AP2 für die Membranrekrutierung Arf6 benötigt (Paleotti et al., 2005). Die Adaptorproteine bilden die innere Hülle der Clathrin-Vesikel, welche von einer äußeren, aus Clathrin bestehenden Hülle umgeben sind. Die AP-Komplexe AP1, AP3 und AP4 vermitteln den Transport vom TGN zu den Endosomen und Lysosomen, der Transport von der Plasmamembran zu den Endosomen ist AP2-abhängig (Boehm and Bonifacino, 2001).

2.3 COPI-Vesikel

2.3.1 Hauptkomponenten

Die minimale Maschinerie zur Bildung von COPI-Vesikeln wurde in einem liposomalen System ermittelt, in dem definierte Protein- und

Lipidkomponenten eingesetzt wurden (Bremser et al., 1999). Dabei stellte sich heraus, dass homogene COPI-umhüllte, kleine Liposomen entstehen, wenn man große Liposomen mit der cytoplasmatischen Domäne von p23, myristoyliertem Arf1 (myrArf1), dem heptameren Proteinkomplex Coatomer (*coat protomer*) bestehend aus den Untereinheiten α , β , β' , δ , ε , γ , und ζ sowie GTP versetzt. p23 ist ein Vertreter der p24-Proteinfamilie (Sohn et al., 1996), bei deren Mitgliedern es sich um Typ I-Transmembranproteine handelt, die im frühen Transportweg zyklisieren (Emery et al., 2000). Zur p24-Familie gehören auch p24, sowie p25, p26, p27 und tp24 (Details siehe auch Kapitel 2.4).

2.3.2 Funktion der COPI-Vesikel

COPI-Vesikel sind einerseits für den retrograden Transport vom *cis*-Golgi zum ER zuständig, andererseits vermitteln sie den bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparates.

Für den retrograden Transport ER-residenter Membranproteine sind C-terminale di-Lysin Motive in Form von KKXX oder KXKXX verantwortlich. Diese Erkennungssequenzen werden direkt von den Coatomer Untereinheiten α und β' erkannt (Cosson and Letourneur, 1994; Lowe and Kreis, 1995). Luminale ER residente Proteine, wie z.B. die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) enthalten die Signalsequenz KDEL oder HDEL. Sie werden vom transmembranen KDEL Rezeptor Erd2p im *cis*-Golgi gebunden. Anschließend wird durch dessen KKXX Sequenz, der gesamte Rezeptor-Ligand Komplex in COPI-Vesikel überführt (Aoe et al., 1997; Majoul et al., 1998; Majoul et al., 2001; Munro and Pelham, 1987; Sonnichsen et al., 1996).

Auch Mitglieder der p24-Familie zyklisieren mit Hilfe von COPI-Vesikeln zwischen den Organellen des frühen sekretorischen Transportweges (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Fullekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999; Jenne et al., 2002; Nickel et al., 1997). Sie besitzen ein abgewandeltes KKXX Motiv und binden an zwei voneinander unabhängige Bindestellen in γ -COP (Bethune et al., 2006).

2.3.3 Biogenese der COPI-Vesikel

Im einleitenden Schritt der COPI-Vesikel Biogenese wird inaktives, GDP-gebundenes Arf1 aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert (Abbildung 2). Neben dem v-SNARE Protein Membrin (Honda et al., 2005), als möglichen Rezeptor für Arf1-GDP, wird diese Anbindung von den beiden p24-Familienmitgliedern p23 und p24 initiiert (Gommel et al., 1999; Majoul et al., 2001).

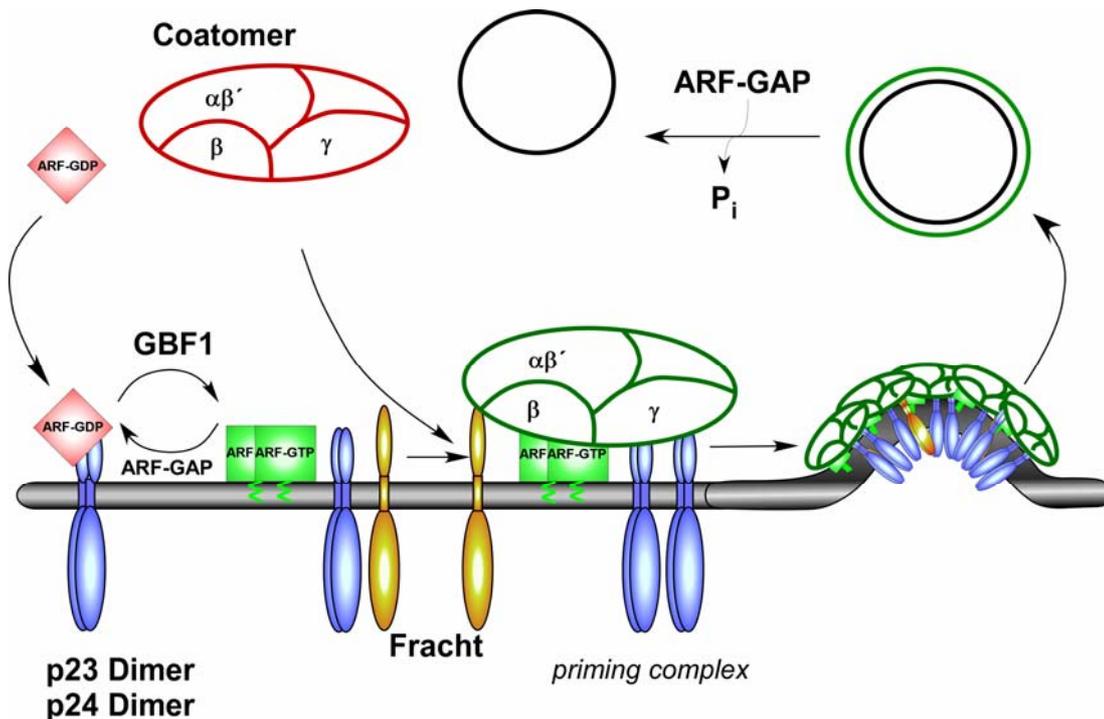


Abbildung 2: Modell der COPI-Biogenese.

Schematischer Überblick über die COPI-Biogenese. Mitglieder der p24-Proteinfamilie sind blau und Frachtmoleküle gelb dargestellt. Details siehe Text.

Das an die Membran rekrutierte Arf1-GDP wird nun durch Nukleotidaustausch von GDP zu GTP in den aktiven Zustand überführt (Donaldson and Jackson, 2000; Zhao et al., 2002) und dimerisiert (Beck et al., 2008). Katalysiert wird dieser Prozeß durch den Nukleotidaustauschfaktor GBF1 (*Golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1*), (Claude et al., 1999). Dieser gehört zur Proteinfamilie der Arf GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), die sich durch eine hochkonservierte, katalytisch aktive Sec7 Domäne auszeichnen (Chardin et al., 1996) und in Kapitel 2.6 genauer besprochen werden.

Der Nukleotidaustausch von GDP zu GTP geht einher mit einer Konformationsänderung von Arf1, wodurch dessen N-terminale, amphiphatische α -Helix und der daran gebundene Myristoylrest in die Membran inseriert werden (Antonny et al., 1997; Franco et al., 1995). Arf1 dissoziiert nun von p23 bzw. p24 ab, bildet jedoch gleichzeitig mit diesen den sogenannten *priming complex*, der Coatomer *en bloc* aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert (Hara-Kuge et al., 1994).

Es wurde gezeigt, dass Arf1 an Coatomer über die β -, β' -, δ - und γ -Untereinheit bindet (Sun et al., 2007; Zhao et al., 1997; Zhao et al., 1999), während Mitglieder der p24-Proteinfamilie über zwei voneinander unabhängige Bindestellen in der *trunk* und *appendage* Domäne von γ -COP mit Coatomer interagieren (Bethune et al., 2006; Harter and Wieland, 1998). Die Bindung erfolgt dabei an beide Bindestellen ausschließlich über dimere p24 Proteine. Dieser Befund ist übereinstimmend mit der in Präzipitationsexperimenten gefundenen 4:1 Stöchiometrie von p23 zu Coatomer (Reinhard et al., 1999). p25, welches als einziger Vertreter der p24-Familie ein klassisches KKXX Motiv aufweist, kann zusätzlich als Monomer an α - und β' -COP binden (Bethune et al., 2006; Dominguez et al., 1998; Fiedler et al., 1996; Reinhard et al., 1999).

Nach der Bindung von p23- oder p24-Dimeren findet in Coatomer eine Konformationsänderung statt, welche den Coatomer-Komplex in der Abwesenheit von Membranen aggregieren läßt (Bethune et al., 2006; Langer et al., 2008; Reinhard et al., 1999). Somit ist durchaus vorstellbar, dass diese Interaktion die Coatomer-Polymerisation während der COPI-Biogenese an der Membran auslöst (Wieland and Harter, 1999).

Damit ein COPI-Vesikel mit einer Zielmembran fusionieren kann, ist die Dissoziation seiner Hüllproteine notwendig. Dazu muss an Arf1-gebundenes GTP hydrolysiert werden (Tanigawa et al., 1993). Die relativ geringe intrinsische GTPase-Aktivität von Arf1 wird durch GTPase-aktivierende Proteine (Arf-GAPs) stimuliert (Goldberg, 1999). Die GTP-Hydrolyseaktivität dient neben der Dissoziation der Hüllproteine zur Frachtaufnahme (Lanoix et al., 2001; Malsam et al., 1999; Nickel and Wieland, 1998; Pepperkok et al., 2000).

An ihrer Zielmembran angekommen fusionieren die COPI-Vesikel mit Hilfe von SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*) Proteinen, die in der Membran der Vesikel (v-SNAREs) und an der Zielmembran (t-SNAREs) lokalisiert sind (Sollner et al., 1993).

2.3.4 Existenz unterschiedlicher COPI-Vesikeltypen

Der Coatomer-Komplex besteht aus den 7 Untereinheiten α , β , β' , δ , ε , γ , und ζ -COP, die in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vorliegen. In Säugetieren existieren jeweils zwei Isoformen der γ - und ζ -Untereinheit: γ 1- und γ 2-COP sowie ζ 1- und ζ 2-COP (Blagitko et al., 1999; Futatsumori et al., 2000). Die daraus resultierenden vier verschiedenen Coatomer-Isotypen (Abbildung 3) lassen die Existenz verschiedener COPI-Vesikel vermuten. Tatsächlich konnte eine differentielle Lokalisierung und Mengenverteilung der einzelnen Isotypen im sekretorischen Weg nachgewiesen werden (Moelleken et al., 2007; Wegmann et al., 2004). Für γ 1 ζ 1 und γ 1 ζ 2 wurde über quantitative Immunelektronenmikroskopie eine präferentielle *cis*-Golgi Lokalisation nachgewiesen, während γ 2 ζ 1 am *trans*-Golgi lokalisiert ist. Betrachtet man den Gesamtcoatomer, so ist γ 1 ζ 1 mit 53 % der am häufigsten vertretene Coatomer-Isotyp, gefolgt von γ 2 ζ 1 mit 26 % und γ 1 ζ 2 mit 16 %. Mit weniger als 5 % wäre der γ 2 ζ 2 Coatomer-Isotyp der seltensten, allerdings ist seine *in vivo* Existenz noch fraglich.

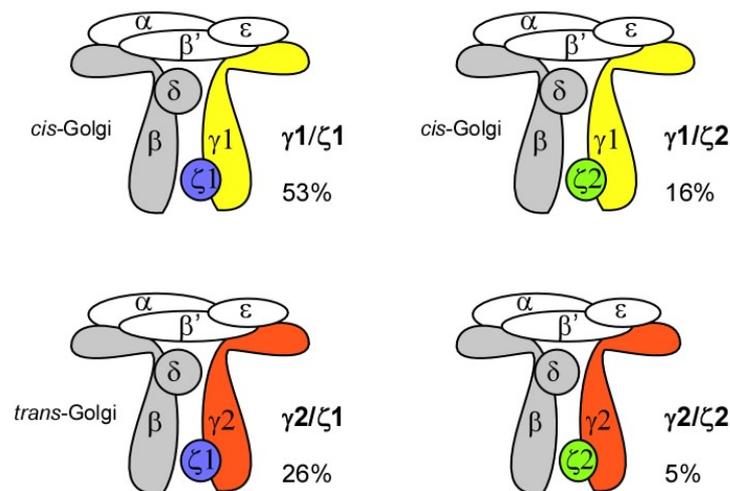


Abbildung 3: Die vier verschiedenen Coatomer-Isotypen

Schematisch gezeigt sind jeweils alle Untereinheiten der vier möglichen Coatomer-Isotypen. Details siehe 2.3.4.

2.4 Die p24 Proteinfamilie

Die Mitglieder der p24 Proteinfamilie sind integrale Typ I-Transmembranproteine mit 22-24 kDa. Sie bestehen aus einer relativ großen, luminalen Domäne mit einer *coiled-coil* Struktur, einem Transmembranabschnitt und

einem kurzen, 10 bis 15 Aminosäuren langen, cytoplasmatischen Schweif. Die p24 Proteinfamilie ist in Säugerzellen mit mindestens 10, in Hefezellen mit 8 und in *C. elegans* mit 5 Mitgliedern vertreten. Basierend auf ihrer Sequenzhomologie lassen sie sich in die vier Untergruppen α (p25), β (p24), γ (p26) oder δ (p23) unterteilen (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000), (Tabelle 1).

| | systematische Bezeichnung (Datenbank-Bezeichnung) | Alternative Bezeichnung | Säuger | Hefe |
|----------------------------|--|---|---------------|-------------------------|
| α | p24 α_1 | gp25L | + | Erp1p Erp5p Erp6p |
| | p24 α_2 (TMED9) | p25 , GMP25, gp25L2, p24d, p24D | + | |
| | p24 α_3 (TMED4) | GMP25iso | + | |
| β | p24 β_1 (TMED2) | p24 , p24a | + | Emp24p |
| γ | p24 γ_1 | tp24, T1/ST2 receptor binding protein | + | Erp2p Erp3p Erp4p |
| | p24 γ_2 (TMED5) | p28, T1/ST2 iso | + | |
| | p24 γ_3 (TMED7) | (g)p27 | + | |
| | p24 γ_4 (TMED3) | p26 , p24b | + | |
| | p24 γ_5 (TMED6) | | + | |
| δ | p24 δ_1 (TMED10) | p23 , tmp21(-I), p24c | + | Erv25p |
| | p24 δ_2 | p23iso | - | |

Tabelle 1: Nomenklatur und Verteilung der p24-Proteinfamilie

Die entsprechende Bezeichnung der Datenbank ist in Klammern angegeben, wobei TMED für *transmembrane emp24 protein transport domain containing* steht (Emp24 ist das erste identifizierte Hefe p24-Protein (Schimmoller et al., 1995)). Da sich die einzelnen Vertreter der p24 Familie in der Hefe und in Vertebraten unabhängig voneinander entwickelt haben, sind sie wahrscheinlich keine Orthologen (Strating, persönliche Mitteilung). Die Tabelle wurde modifiziert nach Strating, 2008 (unveröffentlichte Daten).

Alle Mitglieder zyklisieren im frühen sekretorischen Weg (Gommel et al., 1999; Jenne et al., 2002; Nickel et al., 1997), wobei für p27 zusätzlich ein Transport in den *trans*-Golgi vermutet wird, da es Glykosylierungen des späten Golgi aufweist (Fullekrug et al., 1999).

Der Transport der p24 Mitglieder ist aneinander gekoppelt (Emery et al., 2000). Dabei interagieren sie wahrscheinlich über ihre *coiled-coil* Domänen miteinander. Die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren wird durch den Befund gestützt, dass bei Mutation im ER-Rückführungssignal von p25 nicht nur dieses selbst an der Plasmamembran lokalisiert, sondern zum Teil auch andere Vertreter der p24 Familie (Emery et al., 2000). Auch führt die Überexpression eines p24 Mitglieds zur Akkumulation mehrerer Vertreter im

ER. Werden aber mehrere p24 Mitglieder simultan überexprimiert, so ist dies teilweise wieder aufgehoben (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Fullekrug et al., 1999). Auch zeigen *in vivo* durchgeführte FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) Experimente eine Interaktion von p23 und p24 (Majoul et al., 2001).

In vitro wurden durch Koimmunpräzipitations-Experimente Heterodimere der p24-Proteinfamilie nachgewiesen (Fullekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999). Außer für p26, welches wahrscheinlich nur in monomerer Form existiert, wurden für alle anderen Mitglieder monomere und dimere Formen identifiziert. Zusätzlich durchgeführte Gelfiltrationsexperimente zeigen, dass dabei Dimere als höchste Oligomerisierungsform vorliegen (Jenne et al., 2002).

Die Mitglieder der p24 Familie übernehmen im vesikulären Transport eine wichtige Rolle. So sind sie am initiierenden Schritt der COPI-Biogenese, der Rekrutierung von Arf1-GDP an die Membran beteiligt. Dies konnte durch Photokreuzvernetzungs-Experimente mit photolabilen Peptiden, die der cytoplasmatischen Domäne von p23 entsprechen, nachgewiesen werden (Gommel et al., 2001). Bekräftigt wurden diese Daten durch FRET-Analysen in einem *in vivo* System, die auf eine Wechselwirkung von p23 und Arf-GDP hinwiesen (Majoul et al., 2001). Neben homodimerem p23 werden auch p24-Dimere als Rezeptor für Arf1-GDP vermutet, während die entsprechenden Monomere ausgeschlossen werden konnten. Für p25, p26 und p27 (Monomere oder Dimere) konnte ebenfalls keine Interaktion mit Arf1-GDP nachgewiesen werden (Anderl, 2008; Gommel et al., 2001).

Obwohl nur p23 und p24 mit Arf1-GDP interagieren, zyklisieren alle p24 Mitglieder Coatomer-abhängig innerhalb des sekretorischen Weges. Dabei weist ihr cytoplasmatisches Ende eine abgeänderte Version des ER-Rückführungssignals KKXX auf: FFXBB(X)_n mit $n \geq 2$ und B = Arginin (R) und Lysin (K) (Cosson and Letourneur, 1994). Durch diese Signalsequenz erfolgt die Bindung in ausschließlich dimerer Form an zwei voneinander unabhängige Bindestellen in der *trunk* und *appendage* Domäne von γ -COP (Bethune et al., 2006). Zusätzlich ist monomeres p25 in der Lage, mit seinem „echten“ KKXX Rückführungssignal über α - und β -COP an Coatomer zu binden.

2.5 ArfGAPs

Die Golgi-lokaliserten ArfGAPs (*GTPase-activating proteins*) 1-3 sind am COPI-vermittelten Transport beteiligt (Frigerio et al., 2007). Ihre Aktivität stimuliert die Hydrolyse von GTP zu GDP in Arf1, wodurch Arf1 seine Fähigkeit an die Membran zu binden verliert, vom Vesikel abdissoziiert und so die Depolymerisation der Coatomerhülle initiiert (Cukierman et al., 1995; Reinhard et al., 2003; Tanigawa et al., 1993). Gleichzeitig ist die Hydrolyseaktivität auch für eine effiziente Frachtaufnahme notwendig (Lanoix et al., 2001; Malsam et al., 1999; Nickel and Wieland, 1998; Pepperkok et al., 2000). ArfGAP1 enthält im Gegensatz zu ArfGAP2 und ArfGAP3 zwei sogenannte *ArfGAP1 lipid-packing sensor* (ALPS) Motive (Bigay et al., 2005; Mesmin et al., 2007), die eine Bindung an stark gekrümmte Membranen, wie sie in Vesikeln vorkommen, ermöglicht. Dadurch ist die Hydrolyseaktivität von ArfGAP1 an Vesikeln sehr hoch, an flachen Membranen jedoch auf eine Basalaktivität reduziert (Bigay et al., 2005; Bigay et al., 2003). Im Gegensatz dazu werden ArfGAP2 und ArfGAP3 Coatomer-abhängig an die Membran rekrutiert, möglicherweise in einer 1:1 Stöchiometrie (Frigerio et al., 2007). Wahrscheinlich ist Coatomer kein Kofaktor für die katalytische Aktivität von ArfGAP2 und ArfGAP3, sondern vor allem für deren effiziente Membranrekrutierung notwendig (Weimer et al., 2008).

Früheren Studien gründeten auf der Hypothese, dass die Anwesenheit von Coatomer eine stimulierende Wirkung auf die Hydrolyse-Aktivität von ArfGAP1 hat, wohingegen die cytoplasmatische Domäne von p24 β 1 (p24) eine Inhibition hervorruft (Goldberg, 1999; Goldberg, 2000). Dabei wurde davon ausgegangen, dass p24 an Coatomer bindet und in diesem eine Konformationsänderung hervorruft, welche die ArfGAP1-stimulierende Wirkung aufhebt. Allerdings stellten darauffolgende Experimente einen Einfluß von Coatomer auf die ArfGAP1 Aktivität in Frage (Szafer et al., 2000). Die ArfGAP1 hemmende Wirkung von p24 β 1 (p24) ließ sich hingegen verifizieren (Lanoix et al., 2001). In Bindungs-Experimenten mit radioaktiv markiertem GTP wurde die Hydrolyse-Aktivität von ArfGAP1 am Golgi und an Liposomen getestet. In beiden Systemen trat in Anwesenheit von p24 eine Inhibition der ArfGAP1 Aktivität ein. Ähnliche Effekte, wenn auch weniger ausgeprägt und nur für das liposomale System, wurden auch für p23 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu hatte die Gegenwart von p25 im Testansatz keine Wirkung. Zusätzlich durchgeführte *pull-down* Experimente zeigten weiter, dass ArfGAP1 auch mit p26 und p27 interagiert, doch deren

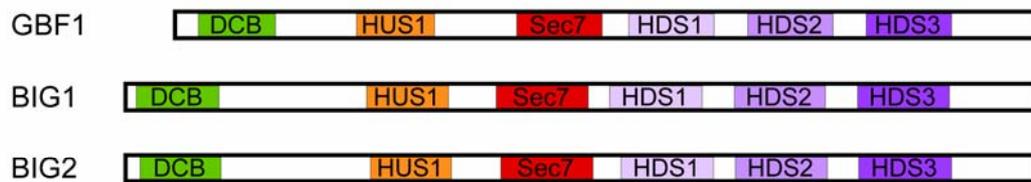
Effekte auf die Hydrolyse-Aktivität von ArfGAP1 wurden nicht im Detail analysiert (Lanoix et al., 2001).

2.6 Arf Proteine und Arf GEFs

Arf Proteine sind kleine GTPasen und gehören zur Superfamilie der Ras-Proteine. In *S. cerevisiae* werden drei Arf Isoformen exprimiert, in Säugern dagegen sind insgesamt sechs Vertreter nachgewiesen. Sie können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in drei Klassen unterteilt werden: Arf1, Arf2 und Arf3 gehören zur Klasse I, Arf4 und Arf5 bilden Klasse II und Arf6 ist alleiniger Vertreter der Klasse III (Tsuchiya et al., 1991). Arf Proteine der Klasse I und II sind vor allem am Golgi zu finden, übernehmen aber auch Funktionen an endosomalen Kompartimenten. Im Gegensatz dazu ist Arf6 an der Zellperipherie lokalisiert, wo es sowohl in endozytische, als auch in Transportprozesse zwischen Endosomen und Plasmamembran involviert ist (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).

Wie die meisten GTPasen benötigen auch Arf Proteine für ihren Nukleotidaustausch von GDP zu GTP akzessorische Proteine, die sogenannten GEFs (*GTP exchange factors*). Das menschliche Genom codiert für 15 Arf GEFs, in *Arabidopsis* sind es 8 und jeweils 5 in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae*. In eukaryontischen Zellen werden diese anhand ihrer Domänenstruktur in die 5 Familien *Golgi Brefeldin A (BFA)-resistent factor 1/ BFA-inhibited guanine nucleotide exchange protein* (GBF1/BIG; alle BFA-sensitiv, s. 2.6.2), *Arf nucleotide binding site opener* (ARNO/Cytohesin) (Abbildung 4), *exchange factor for Arf6* (EFA6), *Brefeldin-resistent Arf GEF* (BRAG) und *F-box only protein 8* (FBX8) eingeteilt. Während die GBF1/BIG Familie in allen Eukaryonten vertreten ist, findet sich Vertreter aller anderen Familien ausschließlich in Metazoen.

A GBF1/BIG



B Cytohesine



Abbildung 4: Domänenstruktur der GBF1/BIG und Cytohesin Familie

Entnommen aus Casanova, 2007. Details siehe Kapitel 2.6.1 und 2.6.2

Arf-GEF Proteine zeichnen sich durch einen ungefähr 200 Aminosäuren langen, zentral gelegenen und katalytisch aktiven Bereich aus, der aufgrund seiner Homologie zum Hefe Sec7p Protein Sec7 Domäne genannt wird (Cox et al., 2004; Jackson and Casanova, 2000). Dieser ist für die Bindung an Arf und den Austausch von GDP zu GTP verantwortlich. Die Struktur dieser Domäne ist zylindrisch und besteht aus 10 querverlaufenden α -Helices, die eine dem Medium zugewandte, hydrophobe Furche bilden (Cherfils et al., 1998; Goldberg, 1998). Diese bindet an Arf und induziert in diesem eine Konformationsänderung. Dabei wird ein an der Spitze eines hydrophoben *loops* zwischen Helix 6 und 7 sitzender *glutamic finger* in die Arf Nukleotidbindetasche inseriert. Dort konkurriert die Carboxylgruppe des Glutamatrestes elektrostatisch mit dem β -Phosphat des GDP (Beraud-Dufour et al., 1998), wodurch dieses aus der Nukleotidbindetasche verdrängt wird (Renault et al., 2003).

Das Pilzgift Brefeldin A (BFA) ist in der Lage, diesen Arf GEF-vermittelten Nukleotidaustausch an Arf zu inhibieren (Donaldson et al., 1992). Dabei bindet BFA nicht direkt an das GEF, sondern an den Komplex Arf-GDP mit Sec7 Domäne. Dadurch wird ein abortives Intermediat der Reaktion generiert (Peyroche et al., 1999). In solchen Komplexen unterbleibt der Kontakt des *glutamic fingers* mit dem Nukleotid, da die dafür notwendige

Konformationsänderung in Arf1 nicht mehr stattfinden kann (Mossesso et al., 2003; Renault et al., 2003).

Interessanterweise sind weder alle GEF Proteine, noch alle Arf Isotypen BFA-sensitiv (s.u.). So wurde gezeigt, dass nur Arf Proteine der Klasse I und II eine Angriffsfläche für BFA bieten, während Arf6 nicht mit BFA interagiert (Peyroche et al., 1999; Robineau et al., 2000; Sata et al., 1999; Zeeh et al., 2006)

In Säugetierzellen gibt es drei BFA-sensitive Arf GEFs, GBF1 (Claude et al., 1999), BIG1 und BIG2 (Togawa et al., 1999). Zusätzlich wurde mittels Datenbankanalysen eine vierte Isoform entdeckt, die BIG3 genannt wird. Diese besitzt jedoch keinen *glutamic finger* und übernimmt daher wahrscheinlich auch keine katalytische Funktionen (Casanova, 2007). Interessanterweise besitzt die Hefe zwei Orthologe für GBF1, nämlich Gea1p und Gea2p (Peyroche et al., 1996), gleichzeitig sind BIG1 und BIG2 mit Sec7p nur einmal vertreten (Cox et al., 2004).

2.6.1 BFA-resistente Arf GEFs

Die am besten charakterisierte Familie der Arf GEFs ist die Klasse der ARNO/Cytohesine, die nur in Vertebraten zu finden ist. Dabei exprimieren alle Vertebraten vier Cytohesin-Isoformen: Cytohesin-1, Cytohesin-2/ARNO, Cytohesin-3/Grp1/ARNO3 und Cytohesin-4. Es handelt sich dabei um relativ kleine Proteine (45-50 kDa), die eine ähnlich organisierte Struktur aufweisen. N-terminal befindet sich eine *coiled-coil* Struktur, gefolgt von der katalytisch aktiven Sec7 Domäne, einer PH-Domäne (*pleckstrin homology*) und einem positiv geladenen C-Terminus (Abbildung 4).

Cytohesine sind vor allem an der Zellperipherie lokalisiert (Frank et al., 1998), wo sie durch Interaktion ihrer PH-Domäne mit Phosphoinositiden, vor allem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphat, an die Membran rekrutiert werden (Cullen and Chardin, 2000; Jackson and Casanova, 2000; Jackson et al., 2000). Neben dieser Protein-Lipid Interaktion spielen vermutlich auch Protein-Protein Interaktionen bei der Membranrekrutierung eine wichtige Rolle. So wurde für die PH-Domäne von ARNO auch eine Interaktion mit aktivem, GTP-beladenem Arf6 nachgewiesen (Cohen et al., 2007).

Die Substratspezifität der Cytohesine wird kontrovers diskutiert und ist noch nicht vollständig geklärt. So ist ihre Nukleotidaustauscheffizienz *in vitro*

an Arf Proteinen der Klasse I am effektivsten, während sie *in vivo* mit Arf6 an der Plasmamembran kolokalisieren. Bestätigt werden diese Daten dadurch, dass bei Überexpression von ARNO eine erhöhte Aktivierung von Arf6 zu beobachten ist (Santy and Casanova, 2001).

2.6.2 BFA-sensitive Arf GEFs

Sequenzanalysen von 42 aus unterschiedlichen Organismen stammenden GBF1/BIG Familienmitgliedern identifizierten fünf homologe Regionen innerhalb dieser Klasse. Nahe am N-terminus gelegen befindet sich die sogenannte DCB Domäne (*dimerization and cyclophilin binding*), unmittelbar dahinter die sogenannte HUS-Box (*Homology upstream of Sec7*), die ein konserviertes N(Y/F)DC(D/N) Motiv enthält (Mouratou et al., 2007) (Abbildung 4). Sowohl die DCB als auch die HUS-Box sind für die Ausbildung von Dimeren verantwortlich (Ramaen et al., 2007). Der katalytisch aktiven Sec7 Domäne folgen drei weitere sogenannte HDS Domänen (*Homology downstream of Sec7*), deren genaue Funktion, ebenso wie die der HUS-BOX, bis dato noch völlig unklar ist (Abbildung 4).

2.6.2.1 BIG1 und BIG2

BIG1 mit 209 kDa und BIG2 mit 202 kDa (Morinaga et al., 1996) sind am späten Golgi lokalisiert (Zhao et al., 2002). BIG1 ist dabei vor allem am *trans*-Golgi und im TGN zu finden, wo es teilweise mit BIG2 kolokalisiert. Zusätzlich scheint BIG2 am Recycling von Endosomen beteiligt zu sein (Shen et al., 2006; Shin and Nakayama, 2004). Beide BIG Proteine sind wahrscheinlich in den Clathrin-vermittelten Transport involviert, wobei BIG2 auch in der Lage, ist das GGA1 Protein (*Golgi associated, gamma adaptin homologous, Arf interacting protein 1*) an die Membran zu rekrutieren (Garcia-Mata et al., 2003; Manolea et al., 2008; Zhao et al., 2002). Wird BIG2 überexprimiert, wird dadurch eine BFA-induzierte Dissoziation des Clathrin AP-1 Komplexes und des GGA1 vom TGN verhindert (Shinotsuka et al., 2002). Gleichzeitig ruft die Expression einer inaktiven BIG2 Mutante diesen Effekt hervor (Shinotsuka et al., 2002). Dass BIG1 und BIG2 unterschiedliche Funktionen haben, zeigen *knockdown* Experimente mit RNA *interference* (RNAi) von BIG1 und BIG2, die nur bei letzterem zu einer veränderten Morphologie der Endosomen und einem langsameren Recycling des Transferrin-Rezeptors führen (Shin and Nakayama, 2004). Auch die

Substratspezifität von BIG1/2 ist noch nicht im Detail verstanden. So wurde zwar *in vitro* eine Austauschfähigkeit an Arf1, Arf3, Arf5 und Arf6 nachgewiesen, *in vivo* jedoch scheinen beide für Arf1 und Arf3 spezifisch zu sein (Islam et al., 2007; Shin and Nakayama, 2004; Shinotsuka et al., 2002).

Wenig ist darüber bekannt, wie BIG1 und BIG2 an die Membran rekrutiert werden. Sicher ist nur, dass die N-terminalen 560 Aminosäuren von BIG1 daran beteiligt sind (Mansour et al., 1999).

2.6.2.2 GBF1

Das BFA-sensitive GBF1 wurde zuerst von Melancon und Kollegen als ein Faktor isoliert, dessen Überexpression in Säugerzellen eine Resistenz gegenüber BFA verleiht (Claude et al., 1999). Mit Golgi-Membranen angereicherte Fraktionen aus Zellen, in denen exogenes GBF1 überexprimiert wurde, zeigten dabei eine BFA-resistente Nukleotidaustauschaktivität an Arf1 und Arf3, die beide zur Arf I Klasse gehören. Kurioserweise wies teilweise aufgereinigtes GBF1 *in vitro* stattdessen Aktivität an Arf5 auf und war an Arf1 und Arf3 kaum aktiv (Claude et al., 1999). Darauf aufbauende Experimente deuteten jedoch auf eine *in vivo* Aktivität an Arf Proteinen der Klasse I und II hin, da Überexpression von GBF1 zu einer erhöhten Membranrekrutierung von Arf1, Arf3 und Arf5 führte (Kawamoto et al., 2002). Auch kann GBF1 zusammen mit Arf1 und Arf4 aus Zellen kopräzipitiert werden (Sun et al., 2007).

Neben seiner Nukleotidaustauschfähigkeit an Arf1 gibt es weitere Hinweise, dass GBF1 am COPI-vermittelten Transport involviert ist: GBF1 lokalisiert mit β -COP in Golgi-Regionen, sowie am ERGIC (Garcia-Mata et al., 2003). Durch Überexpression von GBF1 ist es möglich, eine BFA-induzierte Dissoziation von COPI und Arf Proteinen (Arf1, Arf3 und Arf5) zu blockieren (Kawamoto et al., 2002). Wird dagegen die katalytisch inaktive GBF1 Mutante E794 überexprimiert, ist ein BFA-ähnlicher Effekt zu beobachten, bei welchem β -COP ins Cytosol entlassen wird (Garcia-Mata et al., 2003). Ähnliche Effekte können auch durch Mikroinjektion von GBF1-inhibierenden Antikörpern (Zhao et al., 2006), Depletionsanalysen mit gegen GBF1 gerichteten siRNAs (Szul et al., 2007) oder durch *Knockdown* Experimente (Manolea et al., 2008) nachgewiesen werden.

Auch führt die Expression einer dominant-negativen Form von Rab1 zur Dissoziation von Coatomer, was durch die Überexpression von entweder GBF1 oder Arf1 wieder aufgehoben werden kann (Alvarez et al., 2003).

Rab1b moduliert die Rekrutierung von COPI, allerdings sind die genauen Mechanismen dieser Reaktion noch unklar. Die Expression einer auf ihre GTP-beladene Form beschränkte Rab1b Mutante führt zu einer erhöhten Membranassoziation von GBF1 und COPI an ER *exit sites* und Golgi-Membranen. Dabei befindet sich die Interaktionsstelle in GBF1 im N-terminalen Bereich der ersten 380 Aminosäuren, welcher die DCB Domäne, nicht aber die HUS-Box enthält (Monetta et al., 2007).

Überraschenderweise deuten Daten von Lefrancois und McCormick darauf hin, dass GBF1 auch bei der Rekrutierung von GGAs (*Golgi-localized γ -ear-containing, ADP ribosylation factor (Arf-) binding proteins*) an die Membran beteiligt ist. Diese rekrutieren nach Bindung an einen cytoplasmatischen Rezeptor Clathrin an die Membran, was für eine zusätzliche Rolle von GBF1 im Clathrin-vermittelten, lysosomalen Transport spricht (Lefrancois and McCormick, 2007).

Trotz dieser Ergebnisse scheint die Hauptfunktion von GBF1 im frühen sekretorischen Weg zu liegen, wie zahlreiche Immunfluoreszenz Analysen zeigen, in welchen GBF1 mit den *cis*-Golgi Markerproteinen p115 und ERGIC-53 sowie mit β -COP kolokalisiert (Garcia-Mata and Sztul, 2003; Garcia-Mata et al., 2003; Kawamoto et al., 2002; Zhao et al., 2002). Auch eine Kolokalisation mit der COPII Untereinheit Sec31 wurde nachgewiesen, worauf man auf eine Assoziation von GBF1 mit ER *exit sites* schließen kann (Garcia-Mata et al., 2003). Gleichzeitig zeigen mit GBF1 durchgeführte FRAP-Experimente an VTCs und am *cis*-Golgi eine hohe Assoziations- und Dissoziationsrate mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 16 ± 1.9 Sekunden. Dabei ist die Verweildauer an der Membran kürzer als die von Arf1 (Niu et al., 2005; Sztul et al., 2005; Zhao et al., 2006). Diese Membranassoziation von GBF1 kann durch BFA Behandlung stabilisiert werden (Niu et al., 2005). Der genaue Ablauf der Membranrekrutierung von GBF1 ist nur unvollständig verstanden. So konnten für die GBF1 Homologe der Hefe Gea1p und Gea2p das am Golgi lokalisierte Transmembranprotein Gmh1p als Interaktionspartner nachgewiesen werden. Wird dieses jedoch depletiert, so ist die Membranassoziation von Gea1/2p nur unwesentlich beeinflusst (Chantalat et al., 2003). Zusätzlich wurde für GBF1 eine Interaktion mit dem Tether Protein p115 und für Gea2p eine Bindung an die Phosphatidylserin Flippase Drs2p nachgewiesen. Aber auch diese scheinen für die Membranrekrutierung von GBF1 allein nicht ausreichend zu sein (Chantalat et al., 2004; Garcia-Mata and Sztul, 2003).

2.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das für die COPI-Biogenese physiologisch relevante Arf GEF GBF1 *in vitro* im Hinblick auf die initialen und kritischen Schritte der COPI-Biogenese mit biochemischen Methoden genauer zu untersuchen.

Dafür sollte GBF1 im baculoviralen System rekombinant exprimiert und mit Hilfe von Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Im Anschluß daran sollte das Enzym, bezüglich seiner Fähigkeit, an isolierte Golgi-Membranen zu binden und seiner Nukleotidaustauschaktivität an Arf1, genau charakterisiert werden. Für die dafür durchgeführten Tryptophan Fluoreszenz Messungen war es nötig, ein lösliches System mit N Δ 17Arf1 und ein liposomales System mit myrArf1 zu etablieren.

Die anfänglich vermutete Interaktion von p23 mit GBF1, basierend auf der Arbeit von D. Gommel (2001) mit p23 und ARNO, sollte durch direkte Interaktionsstudien anhand von Photokreuzvernetzungs-Experimenten analysiert werden. Sich daran anschließende Kompetitions- und Koimmunpräzipitations-Experimente sollten zeigen, ob weitere Mitglieder der p24 Familie in Abhängigkeit von ihrem oligomeren Zustand als Interaktionspartner von GBF1 agieren. Dabei sollte in die Untersuchungen miteinbezogen werden, ob sich trimere Komplexe bestehend aus GBF1, Arf1 und Mitgliedern der p24 Familie bilden.

Um einen Einblick in die Regulation der GBF1-vermittelten Nukleotidaustausches an Arf1 zu erhalten, sollten GBF1-Aktivitätstests in der Gegenwart von monomeren und dimeren p24 Proteinfamilienmitgliedern durchgeführt werden. Dabei beobachtete Effekte sollten, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Membranrekrutierung von Arf1 und die *in vitro* Generierung von COPI-Vesikeln hin, weiter analysiert und miteinander verglichen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem GBF1

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von GBF1, ein vor allem am *cis*-Golgi und im ERGIC lokalisierter Nukleotidaustauschfaktor für Arf1. Hierfür mußte dieser zunächst exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Ein erster Ansatz zielte darauf ab, ein die Sec7 Domäne umfassendes Fragment von GBF1 in *E. coli* Zellen zu exprimieren, jedoch war dies unlöslich. Auch eine komplette Entfaltung in 6 M Harnstoff und eine sich daran anschließende, schrittweise Rückfaltung führten nicht zur adäquaten Ausbildung der nativen Struktur (nicht gezeigt). Auf einen Versuch, das gesamte GBF1 Protein in *E. coli* zu exprimieren wurde verzichtet, da andere Arbeitsgruppen, u.a. die Forschungsgruppe von Frank van Kuppeveld (Nijmegen, persönliche Mitteilung), dies zuvor ohne Erfolg getestet hatten.

Stattdessen wurden eukaryontische Expressionssysteme verwendet, um die Chancen einer möglichst korrekten GBF1 Faltung zu erhöhen. Dafür wurde in einem ersten Ansatz die cDNA von GBF1 in den entsprechenden Expressionsvektor umkloniert, um damit rekombinante *Pichia pastoris* Zellen zu generieren. Doch trotz umfangreicher *Screenings* konnte kein rekombinanter Klon identifiziert werden (nicht gezeigt).

Darüberhinaus wurde als alternatives eukaryontisches Expressionssystem das Baculosystem verwendet. Hierbei findet die Expression in Sf9 Insektenzellen statt, die zuvor mit rekombinanten Baculoviren infiziert wurden. Mit Hilfe dieser Zellen gelang es schließlich, lösliches GBF1 zu exprimieren, welches anschließend über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte. In den nun folgenden Kapiteln werden die dafür notwendigen Arbeitsschritte im Einzelnen genauer beschrieben.

3.1.1 Klonierung von GBF1 in den Transfervektor pFastBac

Die cDNA von humanem GBF1 wurde freundlicherweise von E. Sztul (Birmingham, USA) zur Verfügung gestellt und hat eine Länge von 5577 bp. Die für GBF1-kodierende Sequenz befindet sich zwischen den Restriktionsschnittstellen *NotI* und *XhoI* (Abbildung 5). Da ein direktes Umklonieren des GBF1-Gens in den pFasBac Transfervektor scheiterte,

wurde eine sukzessive Klonierungsstrategie angewandt. Dabei machte man sich eine interne, natürlich vorkommende *NheI* Restriktionsschnittstelle zu Nutzen, die es ermöglichte, *gbf1* in ein 1865 bp (*NotI* bis *NheI*) und ein 3712 bp Fragment (*NheI* bis *XhoI*) zu schneiden. Parallel dazu wurde der Zielvektor pFastBac über *NcoI* und *XhoI* geöffnet und zwei miteinander hybridisierte Oligonukleotide eingesetzt. Dadurch entstand ein in seiner *multiple cloning site* (MCS) modifizierter pFastBac Vektor. Die dabei generierte MCS wurde zwischen den flankierenden Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* um *NotI* und *NheI* erweitert (Abbildung 5B).

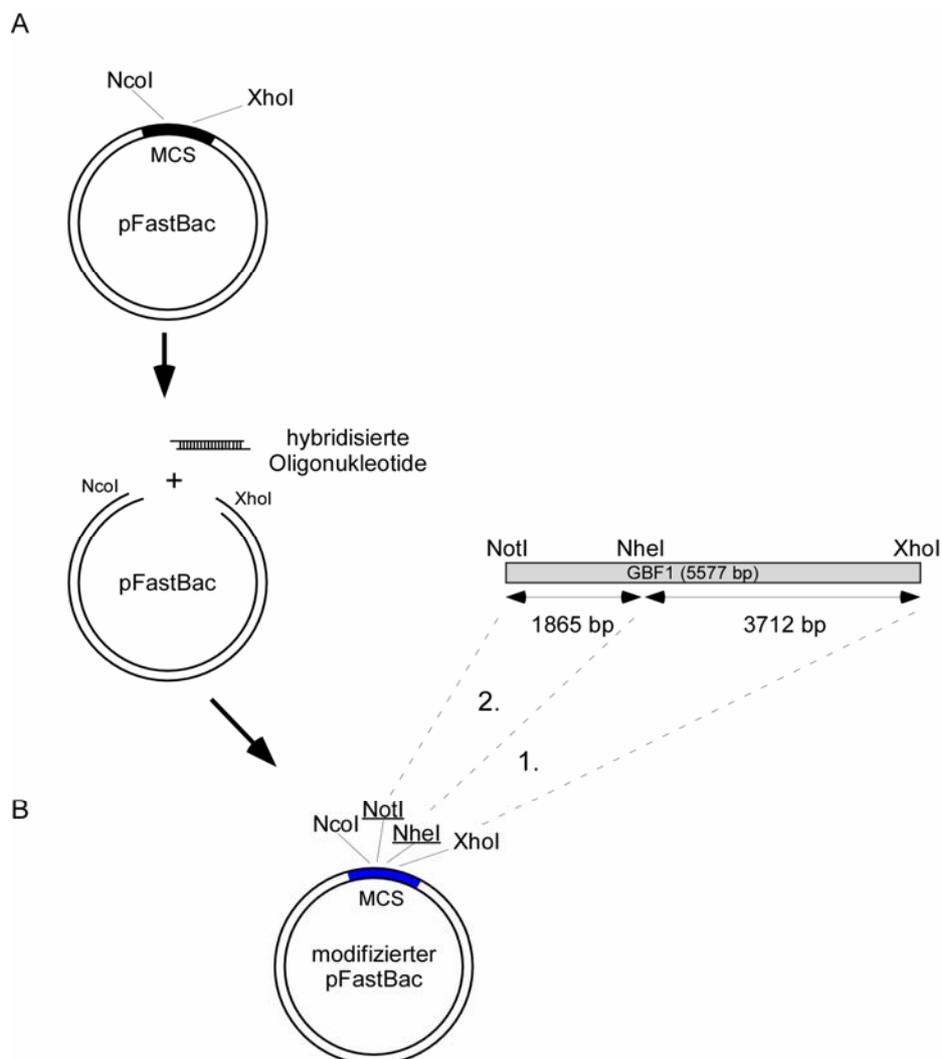


Abbildung 5: Klonierung von *gbf1* in den modifizierten pFastBac Transfervektor

Der pFastBac Vektor wurde über *NcoI* und *XhoI* geöffnet und zwei miteinander hybridisierte Oligonukleotide eingesetzt (A und B). Auf diesen modifizierten pFastBac Vektor (C) wurde nun zuerst das 3712 bp (*NheI* und *XhoI*), dann das 1865 bp Fragment (*NotI* und *NheI*) kloniert.

Dieser modifizierte pFastBac Vektor wurde zuerst über *NheI* und *XhoI* geöffnet und das 3712 bp *gbf1*-Fragment eingebracht. In einem zweiten Klonierungsschritt wurde der Vektor mit *NotI* und *NheI* geschnitten und das kleinere, 1856 bp *gbf1*-Fragment vor das bereits im Vektor enthaltene, größere *gbf1*-Fragment ligiert. Dabei wurde gleichzeitig die GBF1-kodierende Sequenz hinter eine 6 Histidinreste kodierende Sequenz (His₆-Tag) kloniert, was eine spätere Aufreinigung via Nickel-Affinitätschromatographie ermöglichte. Die korrekte Sequenz des His₆-GBF1-cDNA-Konstruktes wurde durch Sequenzierung bestätigt.

3.1.2 Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA, Transfektion von *Sf9*-Zellen, Virus Amplifikation und GBF1 Expression

Das His₆-GBF1 pFastBac Konstrukt wurde durch Elektroporation in elektrokompetente *DH10MultiBac*-Zellen eingebracht (s. 5.2.12). Dort wurde die GBF1-kodierende Sequenz über Tn7-Transposition in das MultiBac-Bacmid integriert und positive Rekombinanten durch Blau/Weiß Selektion identifiziert. Anschließend wurde deren Bacmid-DNA aufgereinigt (s. 5.2.13) und für die Lipo-Transfektion von *Sf9*-Zellen (s. 5.2.15) verwendet. Das so erhaltene Primärvirus wurde durch Infektion von *Sf9*-Zellen in Suspensionskulturen zur weiteren Virusamplifikation eingesetzt und der daraus resultierende, hochkonzentrierte Virusstock (P3) für die GBF1 Expression verwendet (s. 5.2.15).

3.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem GBF1

Bei der baculoviralen Expression von rekombinantem GBF1 wurden *Sf9*-Zellen mit hochkonzentriertem Virusstock (P3) versetzt und für 72 h bei 27°C inkubiert. Nach Kontrolle der GBF1 Expression durch SDS-PAGE wurden die Zellen geerntet, homogenisiert und GBF1 mittels Ni-Affinitätschromatographie aufgereinigt (s. 5.2.16 und 5.3.10).

Durchschnittlich wurden je Liter Suspensionskultur 10-20 mg GBF1 aufgereinigt. Im SDS-Gel ist die Bande für GBF1 mit dem erwarteten apparenten Molekulargewicht (MW) von 206,5 kDa deutlich erkennbar (Abbildung 6A). Zusätzlich wurde GBF1 im Western Blot mit GBF1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 6B). Degradations-

produkte von GBF1 mit einem apparenten Molekulargewicht von weniger als 206,5 kDa sind sowohl im infizierten Zelllysats als auch im Eluat nachweisbar.

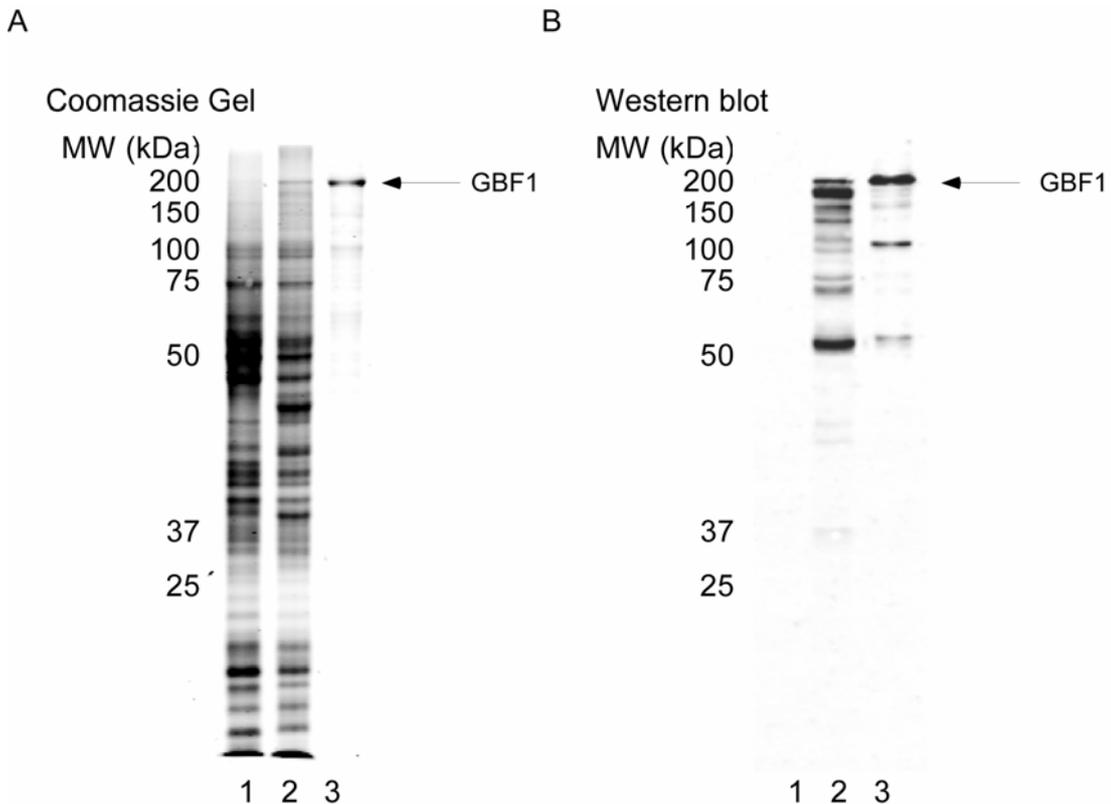


Abbildung 6: Expression und Aufreinigung von GBF1

Rekombinantes His₆-GBF1 (206,5 kDa) wurde in *Sf9*-Zellen exprimiert und über Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Proben von nicht-induzierten *Sf9*-Zellen (1), mit rekombinanten Baculoviren infizierten und induzierten *Sf9*-Zellen (2) und 3,5 µg Eluat der Nickel-Affinitätschromatographie (3). Coomassie gefärbtes 12%iges SDS-Gel (links) und Western Blot mit GBF1-spezifischen Antikörpern (rechts).

3.3 Generierung eines GBF1-spezifischen Antikörpers

Für die folgenden Experimente mit rekombinantem GBF1 war es nötig, einen gegen das native GBF1 Protein gerichteten Antikörper zu generieren, der in Koimmunpräzipitations-Experimenten (s. 5.3.12) und Western Blot Analysen (s. 5.3.3) verwendet werden konnte.

Die auf Peptiden basierende Antikörper-Generierung in Kaninchen wurde von der Firma Peptide Specialty Laboratories (Heidelberg) durchgeführt. Dabei wurden anhand der GBF1 Aminosäuresequenz zwei wahrscheinlich an der Oberfläche lokalisierte Antigene ausgewählt, die beiden entsprechenden Peptide synthetisiert und via HPLC aufgereinigt. Mit jeweils

beiden Peptiden wurden 2 Kaninchen immunisiert. Nach 70 Tagen wurden die Blutseren gewonnen und aus beiden über Affinitätsaufreinigung mit den entsprechenden an Sulfolink gebundenen Peptiden, jeweils beide GBF1-spezifischen Antikörper aufgereinigt. Die so erhaltenen Antikörper wurden mit #1.2 und #1.4 für Tier 1 bzw. mit #2.2 und #2.4 für Tier 2 bezeichnet.

Nun wurden sowohl beide Preimmun- (1:500 Verdünnung) als auch beide Immunsereen (1:1000 Verdünnung) zusammen mit jeweils 0,3 µg/ml der aufgereinigten GBF1 Antikörpern im Western Blot getestet.

Dazu wurde durch die Analyse von Zelllysaten unterschiedlicher Spezies (Mensch, Ratte, Maus und Meerschweinchen) zunächst die Spezifität überprüft (Abbildung 7). Als zusätzliche Kontrolle wurde rekombinantes ARNO (46 kDa) aufgetragen, welches wie GBF1 ein ArfGEF Protein mit einer hochkonservierten Sec7 Domäne ist. Im Anschluß wurde die untere Nachweisgrenze durch Titration definierter GBF1 Mengen bestimmt (Abbildung 8).

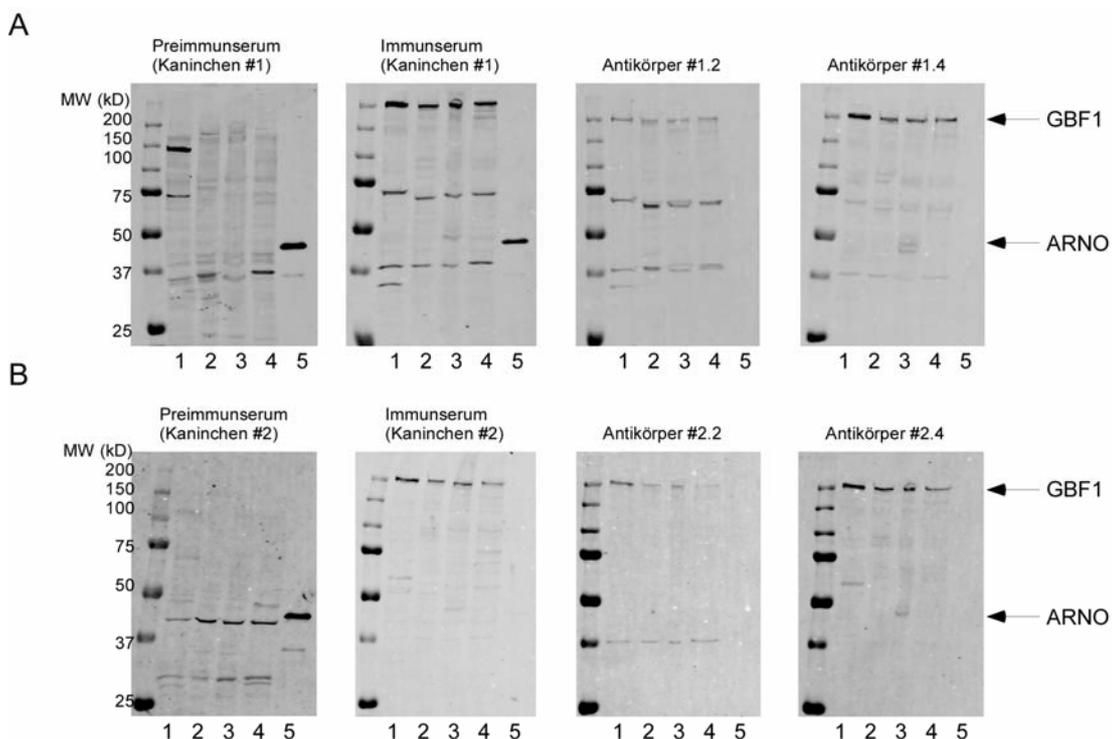


Abbildung 7: Charakterisierung GBF1-spezifischer Antikörper

Western Blot Analyse der Preimmun- und Immunsereen von Tier 1 (A) und Tier 2 (B) sowie der aufgereinigten GBF1 Antikörper #1.2, #1.4, #2.2 und #2.4. Je Spur wurden 25 µg Gesamtzelllysate aus HeLa- (Mensch, Spur 1), NRK- (Ratte, Spur 2), 3T3 NIH- (Maus, Spur 3) und CHO- (Meerschweinchen, Spur 4) Zellen verwendet. Als zusätzliche Negativkontrolle diente rekombinantes ARNO (150 ng, Spur 5).

Die Western Blot Dekoration mit beiden Preimmunseren führte weder in den unterschiedlichen Zelllysaten, noch bei der Titration mit rekombinantem GBF1 zu einer Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von GBF1 (Abbildung 7 und 8). Überraschenderweise wurde jedoch ARNO detektiert, was wahrscheinlich auf eine Kreuzreaktion zurückzuführen ist (Abbildung 7, Preimmunseren, Spur 5). Im Vergleich dazu ist GBF1 mit beiden Immunseren bei allen getesteten Spezies nachzuweisen, wobei Tier 1 zwar deutlich höhere Signale als Tier 2 (Immunseren, Spuren 1-4), zusätzlich aber eine Kreuzreaktivität mit ARNO aufweist (Immunseren, Spur 5). Diese Kreuzreaktion mit ARNO wurde bei den aufgereinigten Antikörpern aus Tier 1 jedoch nicht mehr beobachtet (Antikörper #1.2 und #1.4, Spur 5).

Alle vier über Affinitätsaufreinigung erhaltenen Antikörper erkennen GBF1 aus Mensch, Ratte, Maus und Meerschweinchen, wobei #1.2 im Vergleich die schwächsten und #1.4 zusammen mit #2.4 die stärksten GBF1-spezifischen Signale verursacht (Spuren 1-4). Bei den im SDS-Gel schneller migrierenden, im Western Blot ebenfalls detektierten Banden, handelt es sich wahrscheinlich um GBF1 Degradationsprodukte oder Kreuzreaktionen.

Bei der zu bestimmenden GBF1 Nachweisgrenze verhielten sich alle aufgereinigten Antikörper ähnlich, wobei mit den Antikörpern #1.2 und #2.2 noch 25 ng rekombinantes GBF1 nachgewiesen werden konnte, während mit #1.4 und #2.4 erst bei 50 ng GBF1 ein Signal zu erkennen war (Abbildung 8, Spuren 1 und 2).

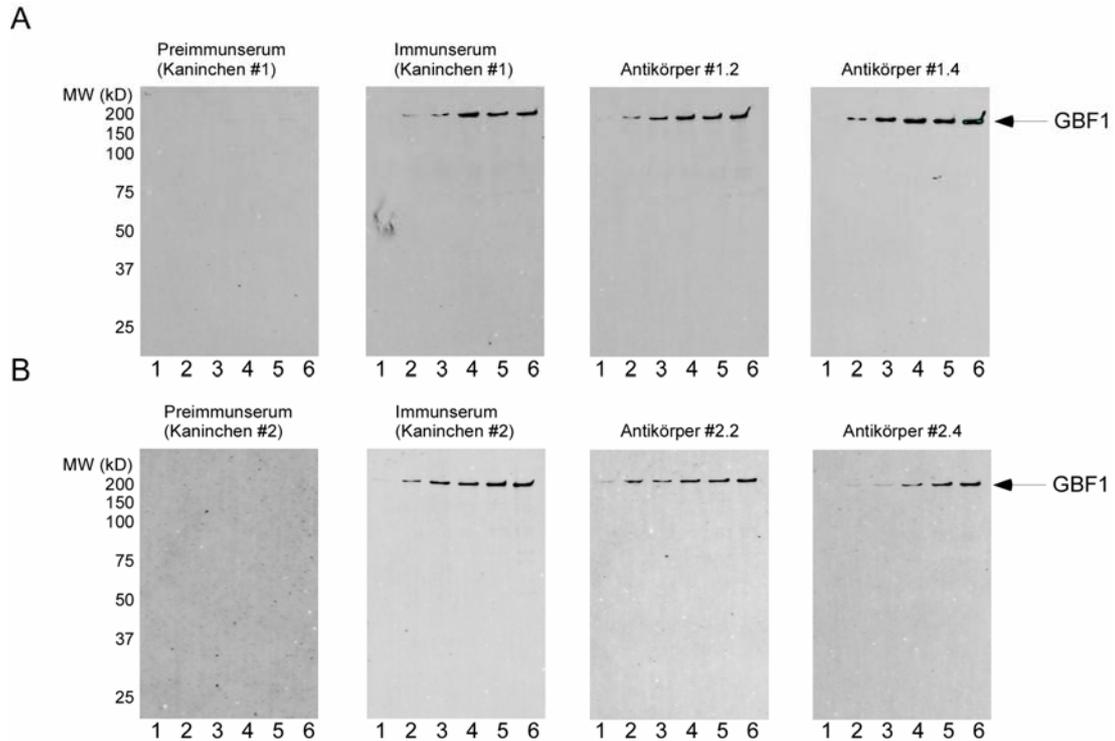


Abbildung 8: Charakterisierung GBF1-spezifischer Antikörper

Western Blot Analyse der Preimmun- und Immunseren von Tier 1 (A) und Tier 2 (B) sowie der aufgereinigten GBF1 Antikörper. Es wurden 25 ng (Spur 1), 50 ng (Spur 2), 75 ng (Spur 3), 100 ng (Spur 4), 125 ng (Spur 5) und 150 ng (Spur 6) rekombinantes GBF1 verwendet.

3.4 Quantifizierung von endogenem GBF1 in HeLa Zellen

Die unter 3.1 beschriebene Aufreinigung von GBF1 ermöglichte nun auch erstmals eine quantitative Bestimmung endogener GBF1 Mengen. Dafür wurden aus HeLa Zellen Gesamtzelllysate hergestellt und anschließend deren Proteingehalt bestimmt (s. 5.3.4). In daraus entnommenen Proben wurde nun endogenes GBF1 im Western Blot mit GBF1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 9). Dabei konnte die endogene GBF1 Menge anhand mitaufgetragener GBF1 Standardmengen (rekombinantes GBF1) verglichen und quantitativ bestimmt werden (s. 5.3.3).

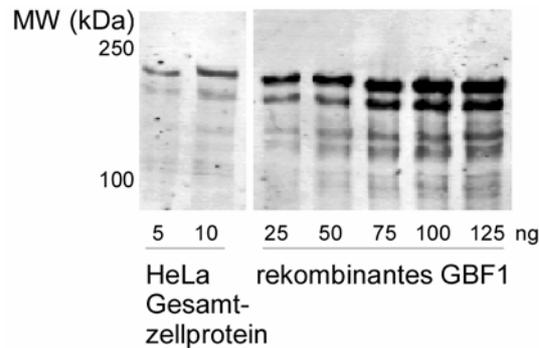


Abbildung 9: Quantitative Bestimmung endogener GBF1 Mengen

Es wurde ein 10%iges SDS-Gel mit 5 µg und 10 µg HeLa Gesamtzellprotein sowie 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng und 125 ng rekombinantes GBF1 beladen und anschließend durch Western Blot Analyse mit GBF1-spezifischen Antikörpern (BD Biosciences) untersucht.

Es wurde ein Wert von 0,88 +/- 0,13 µg GBF1 je Milligramm Gesamtzellprotein nachgewiesen, woraus sich 4,21 pmol GBF1 je Milligramm Gesamtzellprotein errechnen.

3.5 Rekrutierung von rekombinantes GBF1 an die Golgi-Membranen

GBF1 ist ein am *cis*-Golgi und an *vesicular-tubular-clusters* (VTC) lokalisierter Arf1 Nukleotidaustauschfaktor (Niu et al., 2005; Szul et al., 2007; Zhao et al., 2006; Zhao et al., 2002). Für die nun folgende Charakterisierung des rekombinantes GBF1 wurde daher zum einen geprüft, ob GBF1 in der Lage ist, *in vitro* an Golgi-Membranen zu binden, zum anderen seine Aktivität an Arf1 mit Tryptophan Fluoreszenz Messungen untersucht (s. 3.6).

Bei Rekrutierungs-Experimenten wurde GBF1 mit nicht Salzwaschenen Rattenleber Golgi-Membranen mit oder ohne myrArf1, bzw. mit oder ohne GDP/GTP γ S inkubiert und anschließend die Membranen mit den daran gebundenen Proteinen isoliert (s. 5.3.16). Dabei wurde ein Ansatz Golgi-Membranen alleine, also ohne rekombinantes GBF1 mitgeführt, um eventuell endogenes, noch Golgi-gebundenes GBF1 nachzuweisen (Abbildung 10).

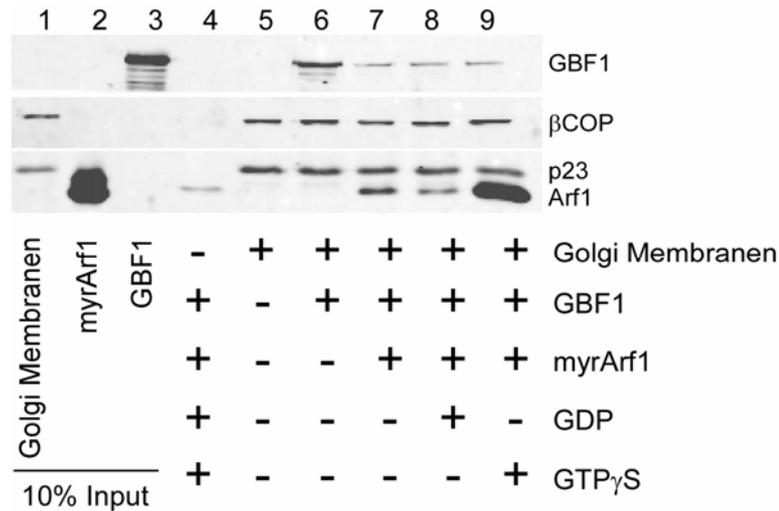


Abbildung 10: Rekrutierung von GBF1 an die Golgi-Membran

Nicht-salzgewaschene Golgi-Membranen (20 μ g) wurden mit 10 μ g GBF1 und, falls angegeben, mit 3 μ g myrArf1 sowie 125 μ M GDP oder GTP γ S inkubiert und der Golgi anschließend isoliert. Die Analyse erfolgte durch 12%ige SDS-PAGE und Western Blot mit Antikörpern gegen GBF1 (#1.4), β -COP (B1.2), p23 (#1402) und myrArf1 (Arf1-CT). Hierfür wurde jeweils ein Drittel der Ansätze verwendet.

Im Ansatz ohne exogenem GBF1 war hierbei kein GBF1 detektierbar (Spur 5). Die Menge an endogenem GBF1 ist daher in diesen Ansätzen vernachlässigbar. Werden diese Golgi-Membranen mit rekombinantem GBF1 inkubiert, so ist dieses anschließend in der isolierten Golgi Fraktion nachweisbar (Spur 6). Wird dem Ansatz myrArf1 zugefügt, so ist das GBF1 Signal am Golgi deutlich reduziert (Spur 7). Dabei ist die Anwesenheit von GDP oder GTP γ S irrelevant (Spuren 8 und 9). Es ist nicht auszuschließen, dass GBF1 unter physiologischen Bedingungen über myrArf1 an die Membran rekrutiert wird und dies hier durch einen Überschuss an nicht membrangebundenem Arf1 kompetitiert wurde.

Um zusätzlich zu kontrollieren, dass gleiche Mengen Golgi-Membranen im Ansatz eingesetzt wurden, schloß sich eine Western Blot Analyse auf das Golgi-lokalisierte Membranprotein p23 (unten) und Coatomer über β -COP (Mitte) an. Des weiteren konnte die Anwesenheit von myrArf1 und dessen GTP γ S-abhängige Rekrutierung an die Golgi-Membran mit Arf1-spezifischen Antikörpern gezeigt werden (unten).

3.6 GBF1 Aktivität

3.6.1 Expression und Aufreinigung von N Δ 17Arf1

Die Aktivität von GBF1 wurde in einem komplett löslichen System mit N Δ 17Arf1 und im liposomalen System mit myrArf1 gemessen (Abbildung 11). Bei N Δ 17Arf1 handelt es sich um eine um 17 Aminosäuren verkürzte Arf1 Variante, welcher N-terminal die amphipatische Helix sowie der Myristoyl-Rest zur festen Membranverankerung fehlen (Mossessova et al., 1998). Der Nukleotidaustausch von GDP zu GTP führt in myrArf1 zu einer Konformationsänderung, wodurch die amphipatische Helix und der Myristoylrest exponiert werden und somit die Anbindung von myrArf1-GTP an die Golgi-Membran bzw. an Liposomen stabilisieren (Antonny et al., 1997; Franco et al., 1995), (Abbildung 11A). Im Gegensatz dazu bleibt N Δ 17Arf1 auch nach der Beladung mit GTP in einem löslichen Zustand. Dadurch ist ein Nukleotidaustausch in einem komplett löslichen System ohne Membranen möglich (Abbildung 11B).

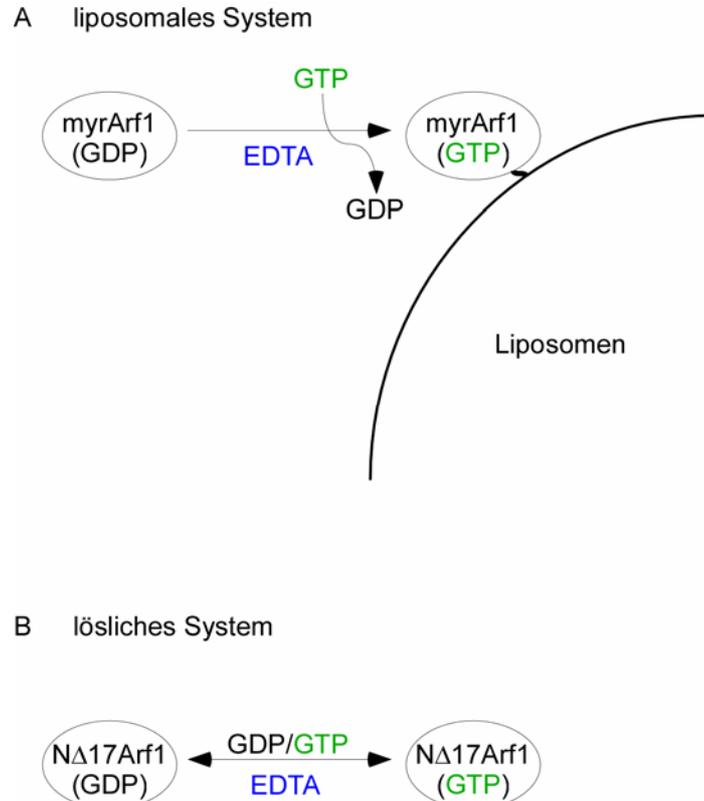


Abbildung 11: Nukleotidaustausch an Arf1 im lösliches und im liposomales System

Im liposomalen System bindet myrArf1 nach dem Nukleotidaustausch zu GTP fest an die Membran (A). Im löslichen System wird NΔ17Arf1, das sowohl im GDP als auch im GTP beladenen Zustand löslich ist, verwendet (B). Der Austausch kann in beiden Systemen mit EDTA durchgeführt werden.

MyrArf1 wurde in *E. coli* Zellen exprimiert, durch Ammoniumsulfat-präzipitation ankonzentriert und mit Hilfe von Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt (nicht gezeigt, s. 5.3.5). N-terminal His₆-getagtes NΔ17Arf1 wurde ebenfalls in *E. coli* Zellen exprimiert, jedoch erfolgte hierbei die Aufreinigung über Nickelaffinitätschromatographie (nicht gezeigt, s. 5.3.6). Für die Verwendung im GBF1 Aktivitätstest war eine definierte Beladung mit GDP beider Arf1 Varianten unumgänglich. Da lösliches myrArf1 bereits in der GDP-gebundenen Form vorliegt, konnte es direkt verwendet werden. Die Guanine-Nukleotidbeladung von aufgereinigtem NΔ17Arf1 hingegen war nicht definiert. Daher wurde durch EDTA und einen Überschuß an GDP der gesamte NΔ17Arf1 Pool quantitativ in die GDP-beladene Form überführt und anschließend überschüssiges, freies Nukleotid durch präparative Gelfiltration abgetrennt (s. 5.3.6, 5.3.8 und Abbildung 12).

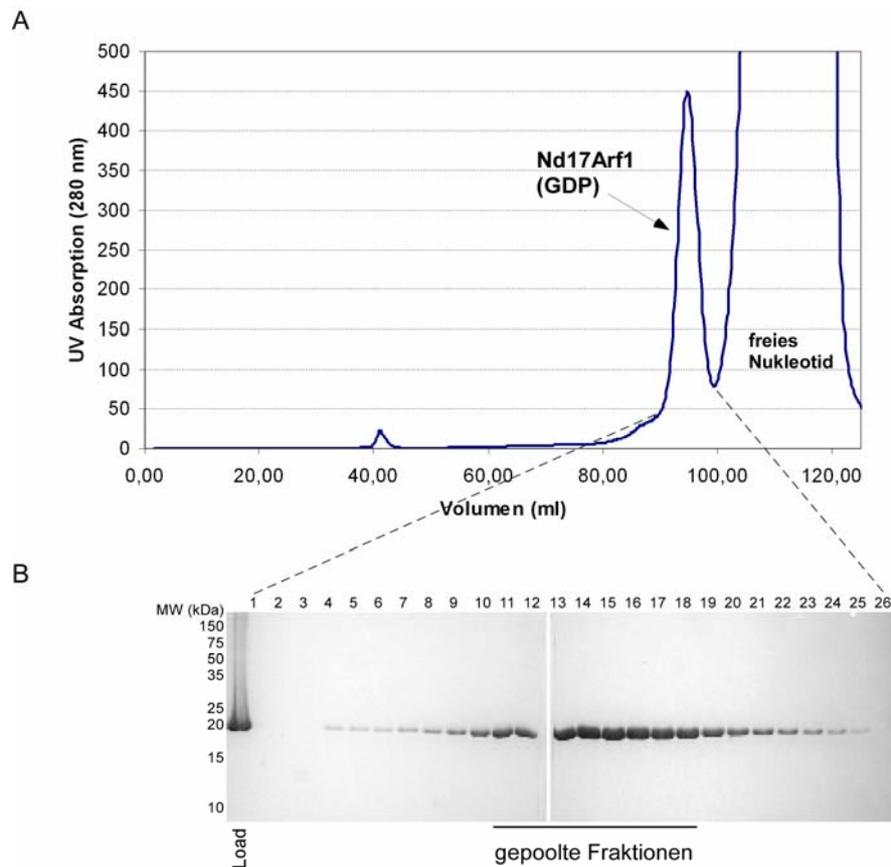


Abbildung 12: Gelfiltration von NΔ17Arf1-GDP

Die Gelfiltration von NΔ17Arf1 wurde am Ettan FPLC-System mit einer Sephacryl S-300 Säule durchgeführt. A: Im hier dargestellten Diagramm ist die UV Absorption bei 280 nm (0-500 mAU) gegen das Elutionsvolumen (0-120 ml) aufgetragen. Der entsprechende Peak für NΔ17Arf1-GDP (18,8 kDa) und der für freies Nukleotid (GDP und GTP) ist gekennzeichnet. B: Proben der gesammelten NΔ17Arf1-GDP Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE anhand eines 15%igem SDS-Gels und anschließender Coomassie Färbung analysiert. Die gekennzeichneten Fraktionen wurden anschließend in einem Pool (Spuren 10-18) vereint.

Proben aller bei der Gelfiltration gesammelten Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE untersucht (Abbildung 12B) und wiesen eine fast 100%ige Reinheit auf. Durchschnittlich wurden so aus 6 L *E. coli* Expressionskultur 5-6 mg GDP beladenes NΔ17Arf1 aufgereinigt.

3.6.2 NΔ17Arf1: Kontrolle des Nukleotidzustandes

Der Nukleotidzustand von NΔ17Arf1 wurde nach der Gelfiltration mit Tryptophan Fluoreszenz Messungen überprüft. Dabei macht man sich zu Nutzen, dass sich in Arf1-GDP die Tryptophane W66 und W78 räumlich sehr nahe sind, wodurch ein gegenseitiges Quenchen des Fluoreszenzsignales eintritt. Beim Nukleotidaustausch zu GTP kommt es zu einer Konformationsänderung in Arf1, wobei eine größere Distanz zwischen beiden Tryptophanen entsteht. Dadurch geht der Effekt der gegenseitigen Auslöschung verloren und ein Anstieg des Fluoreszenzsignals ist detektierbar (Amor et al., 1994; Bigay et al., 2003).

Bei den Messungen wurden Proben von NΔ17Arf1 direkt nach der Aufreinigung (also GDP/GTP Zustand) und NΔ17Arf1-GDP verwendet. Beide wurden mit EDTA zu GDP bzw. zu GTP ausgetauscht und miteinander verglichen. Wie in Abbildung 13A gezeigt, liegt NΔ17Arf1 nach der Aufreinigung zu einem großen Teil in der GTP-beladenen Form vor, welche zu GDP ausgetauscht werden kann (Abbildung 13A, blau). Dies ist bei NΔ17Arf1-GDP nicht mehr möglich (Abbildung 13B, blau). Parallel dazu erhöht sich das maximale Fluoreszenzplateau um 30-40%, welches die nun zusätzlich hinzugekommene NΔ17Arf1-GDP Menge widerspiegelt, die hier zu GTP zurückgetauscht wurde (schwarz).

Beide Beobachtungen sprechen für eine quantitative GDP Beladung von NΔ17Arf1, somit konnten solide Präparate für GBF1 Aktivitätsmessungen verwendet werden.

Bei allen weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurde ausschließlich diese GDP-beladene Form von NΔ17Arf1 eingesetzt.

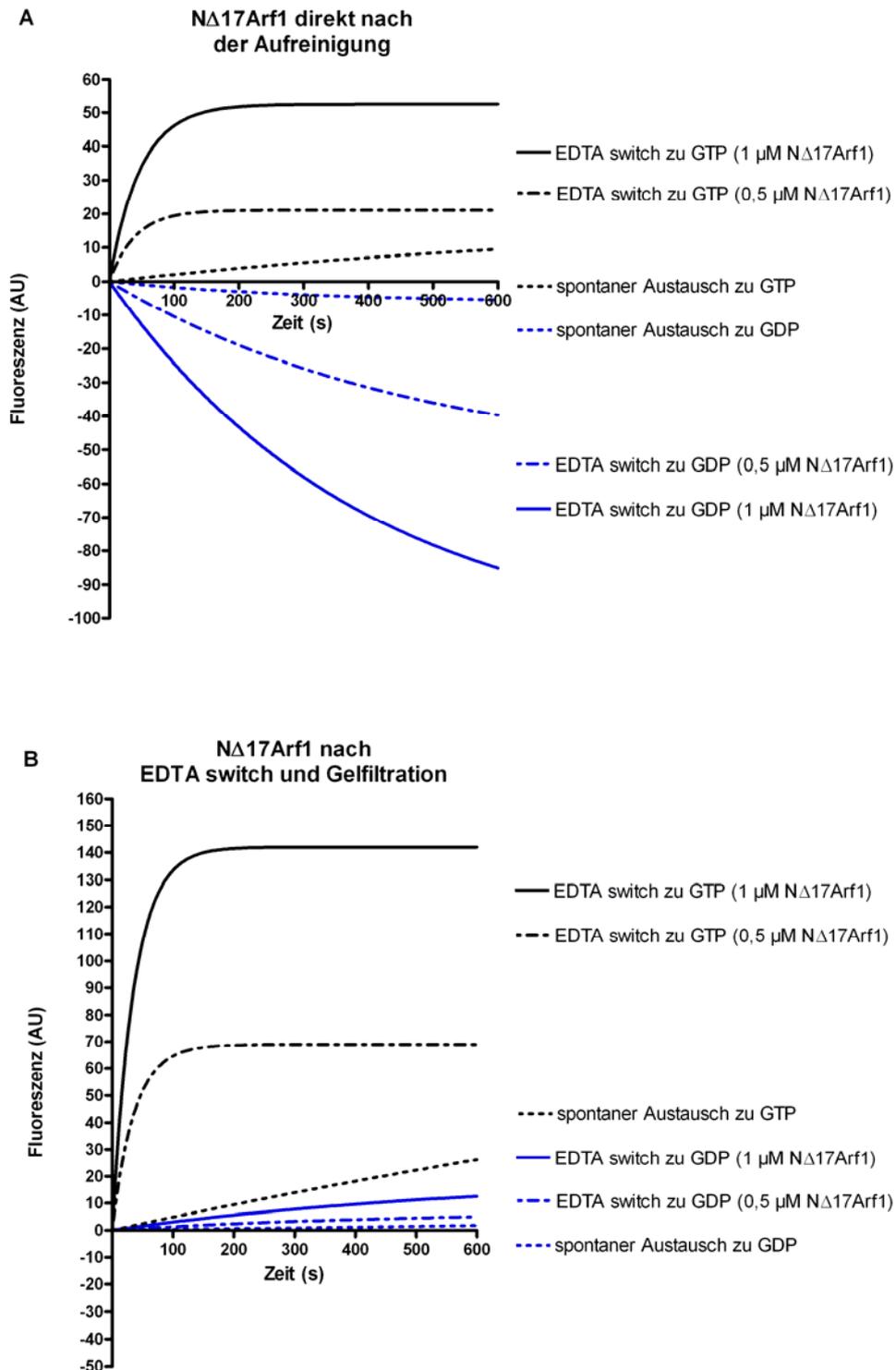


Abbildung 13: Tryptophan Fluoreszenz Messungen von $N\Delta 17Arf1$ vor und nach Nukleotidaustausch zu GDP

Proben von $N\Delta 17Arf1$ vor (A) und nach Nukleotidaustausch zu GDP (B). Es wurden jeweils 0,5 μ M und 1 μ M $N\Delta 17Arf1$ verwendet und der EDTA- *switch* nach GDP (blau) und GTP (schwarz) im Vergleich gemessen. Zusätzlich ist der spontane Austausch nach GDP und GTP (unterbrochene Linie, A und B) dargestellt.

3.6.3 GBF1 Aktivität

Die Nukleotidaustauschfähigkeit von GBF1 wurde im löslichen System an NΔ17Arf1 und im liposomalen System an myrArf1 mit Hilfe von Tryptophan Fluoreszenz Messungen getestet (Abbildung 14). Dabei wurden Liposomen verwendet, deren Lipidzusammensetzung der von Golgi-Membranen ähnelt, denen jedoch zusätzlich 5 mol% DOGS-Ni-NTA-Lipide zugesetzt wurden. So konnte GBF1 über seinen N-terminalen His₆-Tag an die Oberfläche der Liposomen rekrutiert werden.

In beiden Systemen wurde bei gleichbleibender Arf1 Konzentration der Nukleotidaustausch zu GTP mit unterschiedlichen GBF1 Konzentrationen gemessen. Der dabei beobachtete Anstieg des Fluoreszenzsignals von Arf1 beschreibt eine einphasige exponentielle Assoziationsfunktion, anhand derer die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden konnten:

$$F = F_{\infty} (1 - e^{-kt})$$

F = Fluoreszenzintensität

F_∞ = maximale Fluoreszenzintensität

k = Geschwindigkeitskonstante

t = Zeit

GBF1 war sowohl im löslichen als auch im liposomalen System aktiv (Abbildung 14, links). Die dabei ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des Nukleotidaustausches an Arf1 waren jeweils linear abhängig von der verwendeten GBF1 Konzentration (rechts).

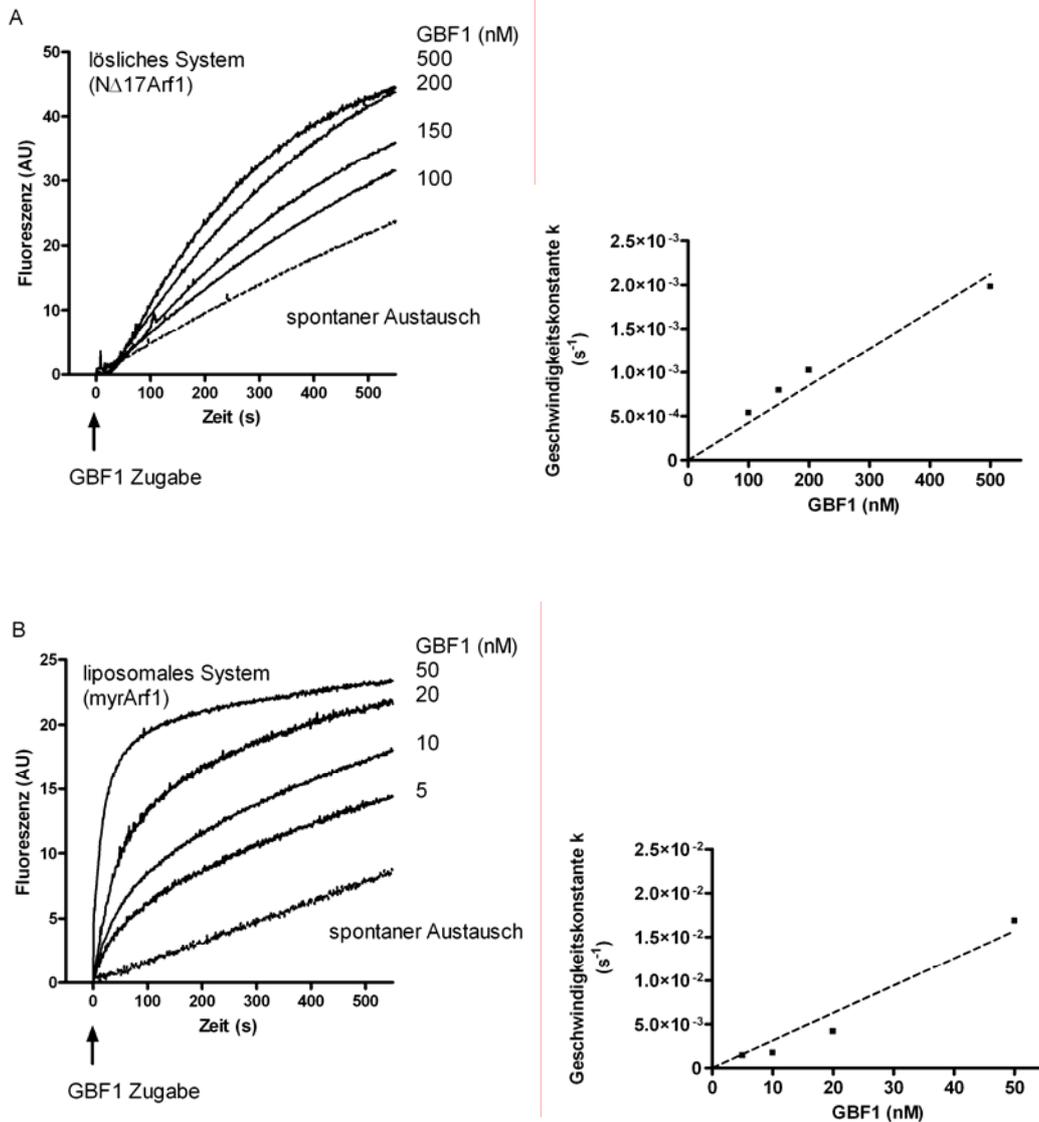


Abbildung 14: GBF1 Aktivitätsbestimmung im löslichen und liposomalen System

Tryptophan Fluoreszenz Messungen mit 0,5 μ M N Δ 17Arf1 im löslichen System (A) und mit 0,5 μ M myrArf1 im liposomalen System (B). Verwendete GBF1 Mengen sind in der Endkonzentration angegeben; die Zugabe erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k sind gegen die verwendeten GBF1 Konzentrationen aufgetragen (rechts).

Aus diesen Werten wurde für GBF1 eine spezifische Enzymaktivität von 0,9 U/g im löslichen System und 84,5 U/g für das liposomale System bestimmt. Im löslichen System mußte somit eine ca. 94fach höhere GBF1 Konzentration eingesetzt werden, um zum liposomalen System vergleichbare Aktivitäten zu erhalten.

A: Isotypen-spezifischer, rekombinanter Coatomer wurde über CM1 Antikörper an Protein A beads gekoppelt und mit einem 10fach molaren Überschuß an rekombinatem GBF1 inkubiert. Gebundenes GBF1 wurde im Western Blot mit GBF1-spezifischen Antikörpern (BD Biosciences, oben) detektiert. Zusätzlich wurde ein γ COP-spezifischer Antikörper (877, unten) verwendet.

B: Die Bindung von GBF1 an den γ 1 ζ 1 Coatomer Isotyp wurde auf 1 normalisiert und mit den anderen Coatomer Isotypen verglichen. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen.

GBF1 bindet unter diesen Bedingungen an Coatomer und zeigt dabei deutlich Präferenzen für die ζ 1-Coatomer Isotypen (γ 1 ζ 1 und γ 2 ζ 1). Bei gleicher gekoppelter Coatomer Menge werden im Vergleich zum am stärksten gebundenen Isotyp γ 1 ζ 1 von γ 1 ζ 2 nur 23% und von γ 2 ζ 2 nur 54% GBF1 gebunden (Abbildung 15B). Im Gegensatz dazu ist beim zweiten ζ 1-spezifischen Coatomer Isotyp γ 2 ζ 1 wieder eine Bindungseffizienz im 100% Bereich zu detektieren.

3.8 Direkte Interaktion von GBF1 mit Mitgliedern der p24 Proteinfamilie (Photokreuzvernetzung-Experimente)

In Photokreuzvernetzung-Experimenten (Gommel, 1999; Gommel, 2001) wurde eine Interaktion zwischen dem Plasmamembran-lokalisierten ArfGEF ARNO und dem im frühen sekretorischen Weg lokalisiertem p23 Protein gefunden. Dabei konnte die Interaktionsstelle in ARNO auf die katalytisch aktive Sec7 Domäne eingegrenzt werden, die den höchstkonservierten Bereich innerhalb aller Mitglieder der ArfGEF Proteinfamilie darstellt. Allerdings ist die *in vivo* Relevanz dieser Interaktion aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation beider Proteine fraglich. Da es sich im Gegensatz zu ARNO bei GBF1 um ein Golgi-lokalisiertes ArfGEF Protein handelt, wurde es nun ebenfalls in Photokreuzvernetzung-Experimenten mit der cytoplasmatischen Domäne von p23 eingesetzt.

Bei diesen Untersuchungen wurden gleiche Mengen Kontrollprotein, GBF1, ARNO und die Sec7 Domäne von ARNO mit dem cytoplasmatischen Teil von p23 inkubiert. Dabei handelt es sich um ein aus 11 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches synthetisch hergestellt wurde (s. 5.1.6). Diese p23 Sequenz enthält an Position -8 statt eines Phenylalanins ein photolabiles Derivat von Phenylalanin (F*, p23*-CT), welches bei UV Bestrahlung kovalente Bindungen mit räumlich nahe gelegenen Proteinen eingeht. Bei Ausbildung eines Photokreuzvernetzungsproduktes kann p23*-CT

anschließend im Western Blot auf Höhe der von ihm gebundenen Proteine mit spezifischen p23 Antikörper detektiert werden (s. 5.3.11).

Es konnten abhängig von der UV Bestrahlung spezifische Photoquervernetzungsprodukte für GBF1, ARNO und die Sec7 Domäne von ARNO nachgewiesen werden (Abbildung 16). Im Vergleich dazu wurde für alle willkürlich gewählten Kontrollproteine BSA, Phosphorylase b, Alkohol-Dehydrogenase sowie Myosin kein p23 Signal detektiert. Die cytoplasmatische Domäne von p23 interagiert also spezifisch mit GBF1, wobei die Interaktionsstelle wahrscheinlich im Bereich der konservierten Sec7 Domäne liegt.

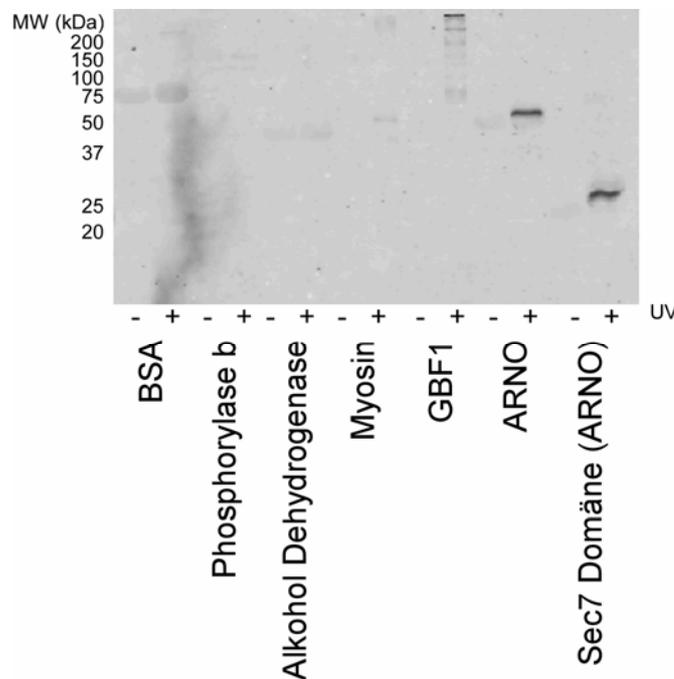


Abbildung 16: Spezifische Interaktion von GBF1 und p23

Je 2 μg GBF1, ARNO, Sec7 Domäne von ARNO, bzw. der Kontrollproteine BSA, Phosphorylase b, Alkohol Dehydrogenase und Myosin wurden mit 35 μM p23*-CT inkubiert und mit UV Licht bestrahlt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE mit einem 15%igem SDS-Gel und anschließender Western Blot Analyse mit einem p23-spezifischen Antikörper (#1402).

3.9 GBF1 interagiert mit dimeren Mitgliedern der p24 Familie

Neben p23 gehören p24, p25, p26 und p27 zur Familie der p24 Proteine, wobei für alle außer p26 neben monomeren, auch dimere Formen nachgewiesen worden sind (Jenne et al., 2002).

Um mögliche weitere Interaktionspartner von GBF1 zu identifizieren, wurde versucht, das spezifisch nachgewiesene Photokreuzvernetzungsprodukt von p23 und GBF1 mit monomeren und dimeren Mitgliedern der p24 Familie zu kompetitieren. Dabei wurden monomere und vorgeformte dimere Peptide analog den cytoplasmatischen Domänen von p23, p24, p25, p26 und p27 verwendet. Als Kontrolle diente ein Peptid der ER-lokalisierten Oligosaccharyltransferase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Wbp1) in monomerer und dimerer Form. Alle Dimere wurden über Disulfidbrücken ihrer N-terminale Cysteine hergestellt (s. 5.1.6).

Wurde p24 als vorgeformtes Dimer in den Photokreuzvernetzungsansatz titriert, war die Kreuzvernetzung bei einem 300fach molaren Überschuss komplett inhibiert (Abbildung 17A). Die Fähigkeit, die p23*-CT/GBF1 Interaktion zu kompetitieren, zeigten auch dimere p23, p25, p26 und p27. Wbp1 in monomerer und dimerer Form, sowie monomere Mitglieder der p24 Familie, zeigten keine Effekte (Abbildung 17B und 17C).

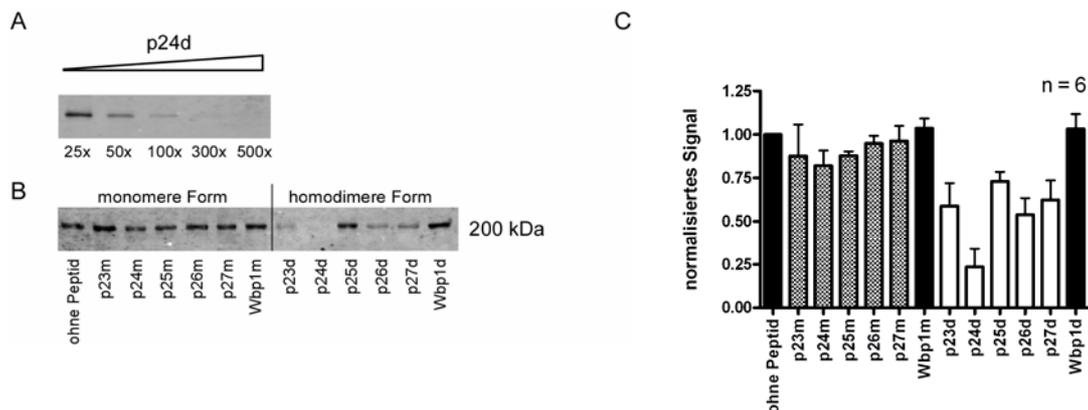


Abbildung 17: Konkurrenzexperimente mit dimeren p24 Peptiden

Bei Konkurrenzexperimenten wurde GBF1 mit den angegebenen Überschussmengen an Peptiden analog der cytoplasmatischen Domäne von p24 vorinkubiert und anschließend die Photokreuzvernetzungen wie unter 5.3.11 beschrieben durchgeführt (A). In B wurde das Experiment mit einem 300fach molaren Überschuss an monomerem oder dimerem p23, p24, p25, p26 und p27 durchgeführt. Als Kontrolle diente Wbp1 in monomerer und dimerer Form. Alle Ansätze wurden mittels SDS-PAGE (10%) und Western Blot mit Antikörpern gegen p23 (#1402) analysiert. Die Signalintensitäten der einzelnen Ansätze wurden zu den Werten von „ohne Peptid“ normalisiert und sind in C dargestellt. Fehlerbalken präsentieren Standardabweichungen von insgesamt 6 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

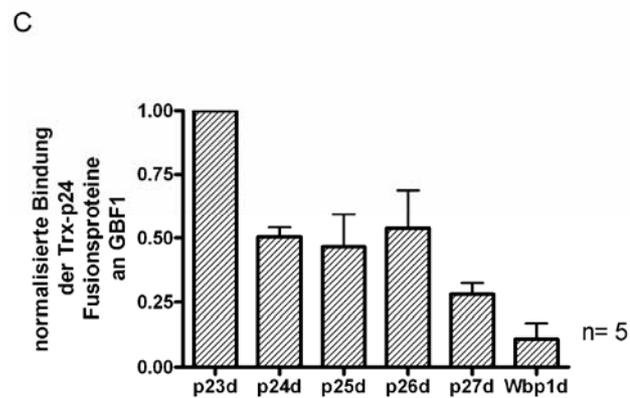
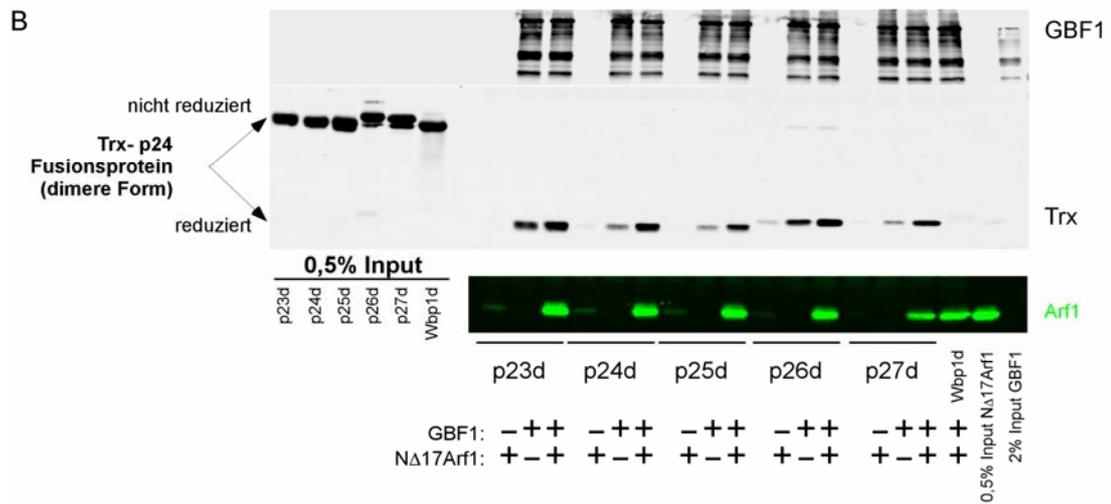
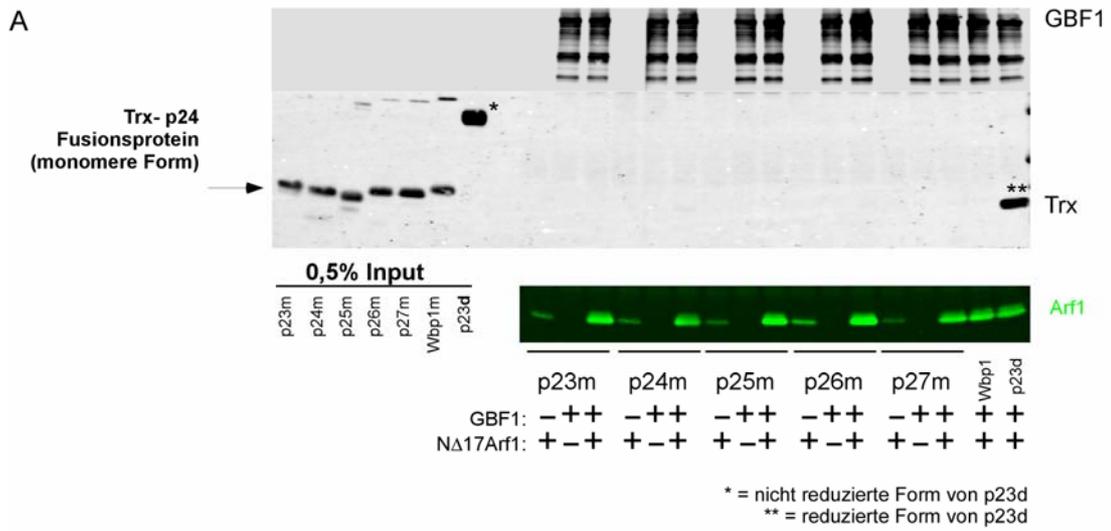
Dieses Ergebnis legt nahe, dass dimerisiertes p23*-CT mit GBF1 interagiert, da ausschließlich dimeres und nicht monomeres p23 die Ausbildung eines Photokreuzvernetzungsproduktes verhindert werden kann. Außerdem konnte dimeres p24, p25, p26 und p27 als GBF1 Interaktionspartner identifiziert werden, wie die statistische Auswertung

sechs voneinander unabhängig durchgeführter Experimente zeigt (s. Abbildung 17C). Im Gegensatz dazu sind monomere Formen auszuschließen.

3.10 GBF1, Arf1 und dimere Mitglieder der p24 Familie bilden trimere Komplexe

Zur weiteren Analyse der Interaktion von GBF1 mit Mitgliedern der p24 Familie wurden Koimmunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Dabei wurde GBF1 über den in Kapitel 3.3 beschriebenen Antikörper #1.4 an Protein A beads gekoppelt und mit Thioredoxin (Trx)-p24 Fusionsproteinen inkubiert, die C-terminal entweder monomere oder dimere cytoplasmatische Peptide der p24-Familie aufweisen (Bethune et al., 2006), (s. 5.3.7). An GBF1 gebundene Trx-p24 Fusionsproteine wurden anschließend im Western Blot mit Trx-spezifischen Antikörpern detektiert (Abbildung 18). Da für dimeres p23 und p24 eine Interaktion mit Arf1 beschrieben war (Gommel et al., 2001; Majoul et al., 2001) und Arf1 gleichzeitig Substrat von GBF1 ist (Liu et al., 2001; Szul et al., 2007), wurde hier auch geprüft, ob es zur Ausbildung von trimeren Komplexen kommt. Dafür wurde jedem Ansatz, äquimolar zur Menge an Trx-p24 Fusionsprotein, N Δ 17Arf1 (s. 3.6) zugefügt. Gebundenes N Δ 17Arf1 wurde im Western Blot mit spezifischen Arf1 Antikörpern nachgewiesen. Da die Trx-p24 Konstrukte und N Δ 17Arf1-GDP beide ein apparentes Molekulargewicht von ungefähr 20 kDa hatten, wurde der Trx Antikörper durch einen Alexa Fluor[®] 680 gekoppelten und der Arf1 Antikörper durch einen Alexa Fluor[®] 800 gekoppelten Sekundärantikörper detektiert.

Als Kontrolle dienten zum einen Protein A beads mit #1.4 Antikörper, jedoch ohne daran gekoppeltes GBF1, zum anderen Trx-Wbp1 Konstrukte in monomerer und dimerer Form.



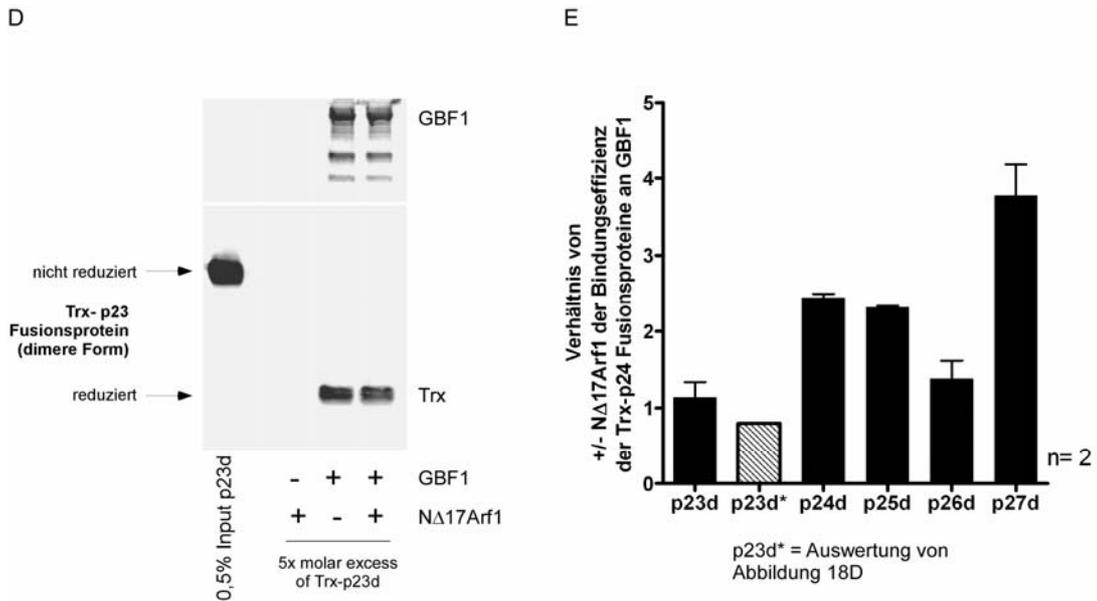


Abbildung 18: Koimmunpräzitations-Experimente von monomeren und dimeren Trx-p24 Fusionsproteinen und GBF1

Rekombinantes GBF1 (200 kDa) wurde über einen GBF1-spezifischen Antikörper (#1.4) an Protein A beads gekoppelt und mit einem 20x molaren Überschuss an monomeren (A) und dimeren (B) Trx-p24 Fusionsproteinen inkubiert. Als Negativkontrolle diente Trx-Wbp1 und Protein A beads mit GBF1 Antikörper, aber ohne GBF1. Alle Ansätze wurden mit und ohne NΔ17Arf1 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch 12%ige SDS-Gele und Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen GBF1 (BD, Biosciences) und Thioredoxin (Trx). Zusätzlich wurde gebundenes NΔ17Arf1 mit Arf1-spezifischen (Arf1-CT) Antikörpern detektiert (grün). In den Spuren sind jeweils 50% der Versuchsansätze aufgetragen. In A wurde dimeres p23 als positive Kontrolle verwendet. B: Dimere Trx-p24 Fusionsproteine (40 kDa, nicht reduziert) liegen nach der Elution als Monomere vor (20 kDa, reduziert).

C: Die Menge an GBF1 gebundenem dimeren Trx-p23 Fusionsprotein wurde auf 1 normalisiert und die der anderen p24 Mitglieder im Vergleich dazu dargestellt.

D: Immunpräzitations-Experiment von dimeren Trx-p23 Fusionsprotein mit GBF1 (Details siehe 18A und 18B). Trx-p23d wurde im 5x molaren Überschuss verwendet.

E: Bindungseffizienz der Trx-p24 Fusionsproteine an GBF1: Verhältnis mit NΔ17Arf1 zu ohne NΔ17Arf1.

Wie aus Abbildung 18B hervorgeht, wurde hier, wie beim zuvor durchgeführten Konkurrenzexperiment (s. 3.9), eine Interaktion zwischen GBF1 und dimeren p23, p24, p25, p26 und p27 nachgewiesen. Als stärkster GBF1 Bindungspartner zeigt sich p23. Am schwächsten bindet p27 (Abbildung 18C). Keine Interaktion konnte zwischen dem dimeren Kontrollprotein Trx-Wbp1 und GBF1 nachgewiesen werden, auch ist hier keine unspezifische Bindung an GBF1-freie Protein A beads zu beobachten. Die Anwesenheit von NΔ17Arf1 zeigte vor allem bei p27 starke Effekte, die zuvor sehr schwache Bindung an GBF1 wurde um das 4fache erhöht (Abbildung 18E). Ähnliches lässt sich bei p24 und p25 mit einer ungefähr 2,5fachen Steigerung beobachten. Keine NΔ17Arf1 Effekte sind bei p23 und

p26 zu sehen, allerdings war hier bereits ohne N Δ 17Arf1 eine starke Bindung zu beobachten, so dass hier vielleicht schon vorher eine Sättigung erreicht war. Dies konnte jedoch durch ein, unter denselben Bedingungen durchgeführtes Experiment, in welchem der 20x molare Überschuss von Trx-p23d auf 5x reduziert worden war, ausgeschlossen werden, da auch hier keine N Δ 17Arf1-abhängige Steigerung der Bindungseffizienz von Trx-p23d an GBF1 zu detektieren war (s. Abbildung 18D und 18E).

Das gleiche Experiment, wie in Abbildung 18B gezeigt, wurde mit den entsprechenden monomeren Trx-p24 Konstrukten durchgeführt (Abbildung 18A). Zusätzlich zu der bereits oben beschriebenen Negativkontrolle wurde dimeres Trx-p23 Konstrukt als positive Kontrolle eingesetzt. Wie aus Abbildung 19A ersichtlich, konnte keines der monomeren Trx-p24 Konstrukte an GBF1 binden. Dabei zeigte auch die Anwesenheit von N Δ 17Arf1 keinerlei Effekte. Wie erwartet konnte hier für die Positivkontrolle Trx-p23d eine Interaktion mit GBF1 nachgewiesen werden, wie die Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 20 kDa im Western Blot nach Dekoration mit einem Trx-Antikörper zeigt.

3.11 Die p24 Proteinfamilie beeinflusst den GBF1-vermittelten Nukleotid austausch an Arf1

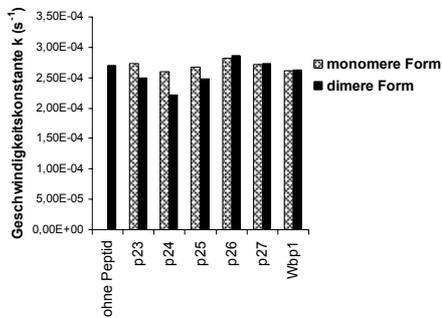
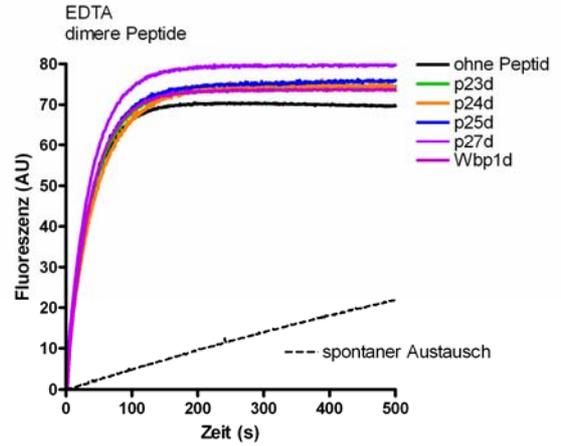
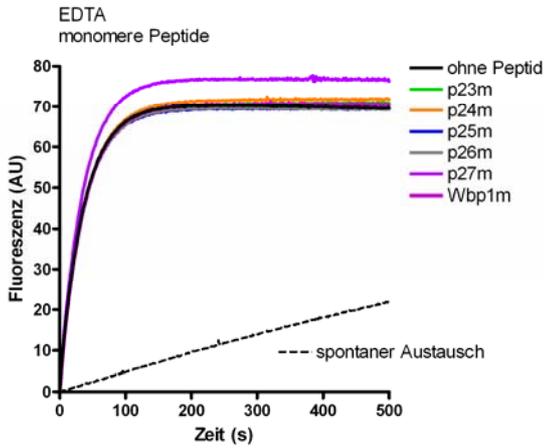
Auch Arf1 allein interagiert mit dimeren p23 bzw. p24 (Gommel et al., 2001; Majoul et al., 2001), eine Bindung an p25, p26 und p27 kann jedoch ausgeschlossen werden (Anderl, 2008). Durch das in Kapitel 3.10 beschriebene Koimmunpräzipitations-Experiment konnte ein trimere Komplex bestehend aus GBF1, Arf1 und allen dimeren p24 Familienmitgliedern nachgewiesen werden. Findet eine Regulation der Arf1 Aktivierung durch die p24 Familie statt? Um dies genauer zu untersuchen, wurden Effekte der p24 Proteine auf den Nukleotid austausch an Arf1 getestet. Zu diesem Zweck wurde zuerst ein nicht-enzymatischer Nukleotid austausch mit EDTA durchgeführt. Unter den gleichen Bedingungen wurde anschließend GBF1 für den enzymatischen Nukleotid austausch eingesetzt, um mögliche Effekte auf die katalytisch aktive Sec7 Domäne zu untersuchen. Beides, EDTA-*switch* und GBF1 Austausch, wurde im löslichen sowie im liposomalen System getestet.

Zusätzlich wurden jeweils monomere und dimere p24 Peptide verwendet (Abbildung 19).

Die Tryptophan Fluoreszenz Messungen wurden, wie unter 3.5.15 und 3.6.2 beschrieben, mit 0,5 μM N Δ 17Arf1 oder myrArf1 in der Gegenwart von 50 μM Peptid durchgeführt. Der Austausch wurde durch Zugabe von entweder 4 mM EDTA oder 20 nM GBF1 im löslichen bzw. 200 nM im liposomalen System gestartet. Jede Messung wurde mindestens zweimal durchgeführt und anschließend Mittelwertskurven gebildet. Aus diesen wurden letztendlich die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Austauschreaktionen ermittelt.

Wie aus Abbildung 19A ersichtlich, findet der EDTA-*switch* im löslichen System an N Δ 17Arf1 in der Gegenwart von monomeren und dimeren p24 Peptiden stets mit der gleichen Austauschgeschwindigkeit statt. Es sind also keine Peptid-spezifischen Effekte zu beobachten. Beim GBF1 katalysierten Austausch sind zwar Schwankungen der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten zu erkennen, jedoch liegen diese alle im Bereich der Negativkontrolle, „ohne Peptid“ und den für Wbp1 in monomerer und dimerer Form gemessenen Werten (Abbildung 19B). Allerdings konnte eine leichte Inhibierung der GBF1 Aktivität mit dimeren p24 detektiert werden.

A lösliches System (N Δ 17Arf1)



B lösliches System (N Δ 17Arf1)

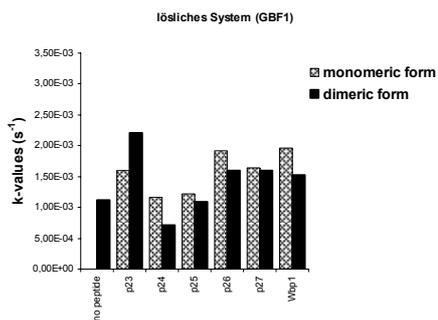
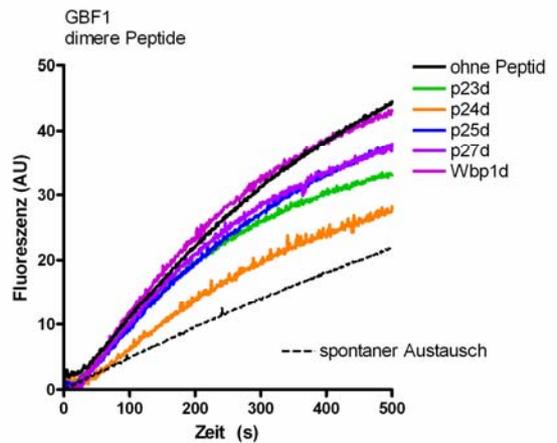
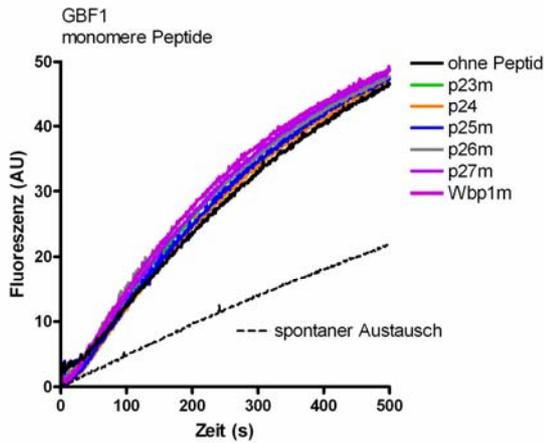


Abbildung 19: Nukleotidaustausch an NΔ17Arf1 in der Anwesenheit von Peptiden der p24 Familie im löslichen System

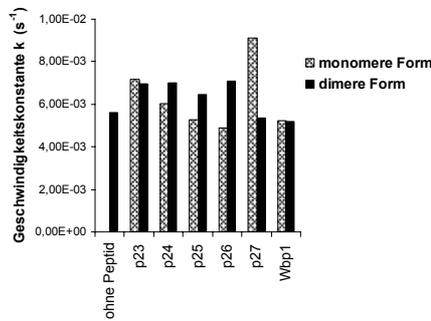
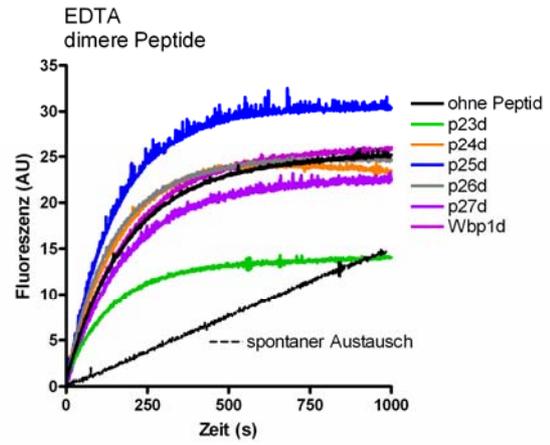
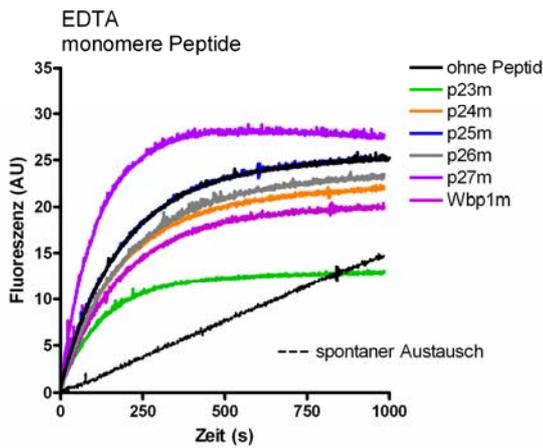
Tryptophan Fluoreszenz Messungen im löslichen System mit 0,5 μM NΔ17Arf1. Der Austausch wurde entweder mit EDTA (A) oder mit GBF1 durchgeführt (B). Monomere (links) und dimere (rechts) Formen der cytoplasmatischen Domäne der p24 Familie wurden in einer Endkonzentration von 50 μM verwendet. Im jeweils unteren Teil sind die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k für den EDTA-*switch* bzw. für den GBF1-vermittelten Austausch in Gegenwart von monomeren und dimeren Peptiden dargestellt.

Im liposomalen System zeigen sich beim EDTA-*switch* erneut weder bei monomeren noch bei dimeren p24 Peptiden Veränderungen (Abbildung 20A). Auch der GBF1-vermittelte Austausch wird durch monomeres p24, p26, p27 und Wbp1 nicht beeinflusst (Abbildung 20B).

Allerdings ergibt sich bei der Verwendung von dimeren p23, p24 und p27 eine signifikant kleinere Geschwindigkeitskonstante. Der GBF1-vermittelte Nukleotidaustausch an myrArf1 wird gehemmt, am stärksten durch dimeres p23 und p27, gefolgt von p24. Auch Messungen mit monomerem p23 deuten auf einen inhibierten GBF1 Austausch hin. Dieses Ergebnis ist jedoch insofern fraglich, da weder im Kompetitions- noch im Koimmunpräzipitations-Experiment (s. 3.9 und 3.10) eine Bindung an GBF1 detektiert wurde. Möglicherweise dimerisiert monomeres p23 während der Messzeit teilweise, und erlangt dadurch die Fähigkeit, den myrArf1/GBF1 Komplex zu binden und zeigt so einen dem Dimer gleichenden Effekt.

Weniger deutliche Effekte wurden mit p25 beobachtet. Messungen mit dimeren p26 Peptid konnten aufgrund starker Präzipitation der Liposomen nicht ausgewertet werden.

A liposomales System (myrArf1)



B liposomales System (myrArf1)

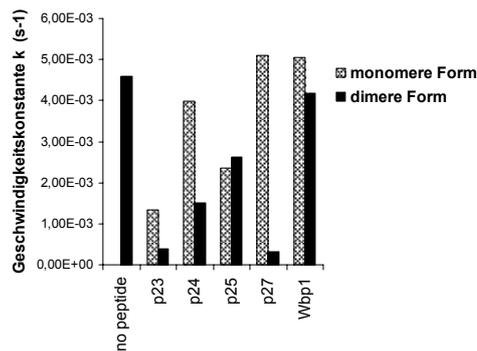
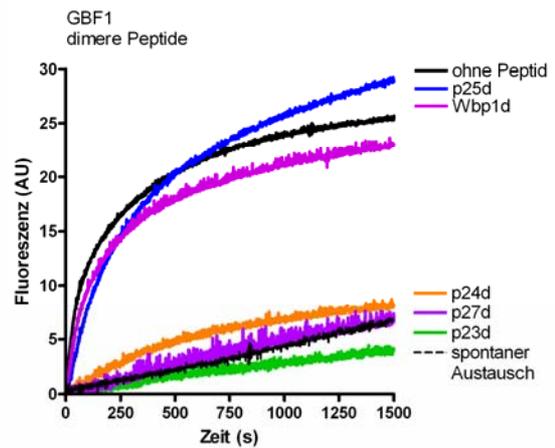
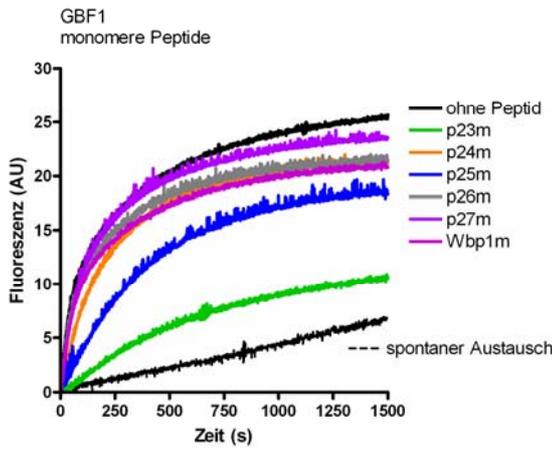


Abbildung 20: Aktivität des GBF1-vermittelten Nukleotidaustausches an ARF1 in der Gegenwart von cytoplasmatischen Peptiden der p24 Familie im liposomalen System

Tryptophan Fluoreszenz Messungen im liposomalen System mit 0,5 μM myrArf1. Der Austausch wurde entweder mit EDTA (A) oder mit GBF1 durchgeführt (B). Monomere (links) und dimere (rechts) Formen der cytoplasmatischen Domäne der p24 Familie wurden in einer Endkonzentration von 50 μM verwendet. Im Balkendiagramm sind die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k für den EDTA-switch bzw. für den GBF1-vermittelten Austausch dargestellt.

3.12 Quenching Effekte von p23

Bei den unter 3.11 beschriebenen Tryptophan Fluoreszenz Messungen im liposomalen System wurde bei den Ansätzen mit p23 ein auf ca. die Hälfte reduziertes, maximales Fluoreszenz-Plateau (YMAX) beobachtet (Abbildung 21). Der Effekt trat sowohl in den Messungen mit EDTA, als auch beim GBF1-Austausch auf.

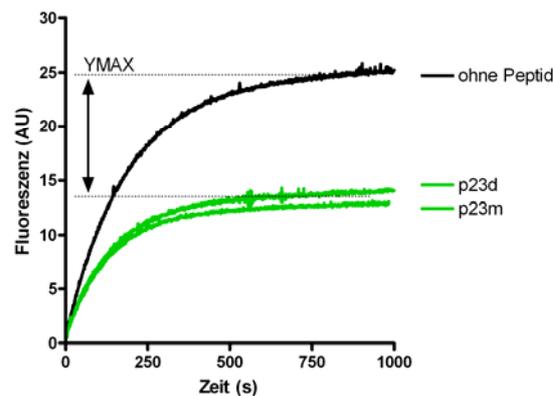


Abbildung 21: Erniedrigtes maximales Fluoreszenzplateau

Bei Tryptophan Fluoreszenz Messungen mit p23 (monomere und dimere Form, grün) ist im Vergleich zur Messung ohne Peptid (schwarz) ein auf ca. die Hälfte reduziertes maximales Fluoreszenzplateau (YMAX) zu detektieren.

Um zu testen, ob hier trotz gleichbleibender Geschwindigkeitskonstante eine geringere Menge myrArf1-GTP an die Liposomen gebunden hatte, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Liposomen wurden mit myrArf1, GTP und EDTA in der Gegenwart von monomeren oder dimeren p23 inkubiert und anschließend die Liposomen mit dem daran gebundenem myrArf1 durch Flotation isoliert (s.1.3.16). Proben aller Ansätze wurden durch SDS-PAGE und Western Blot Analyse mit Arf1-spezifischen Antikörpern untersucht und die Arf1 Mengen mit dem LICOR System quantitativ bestimmt (s. 5.3.3).

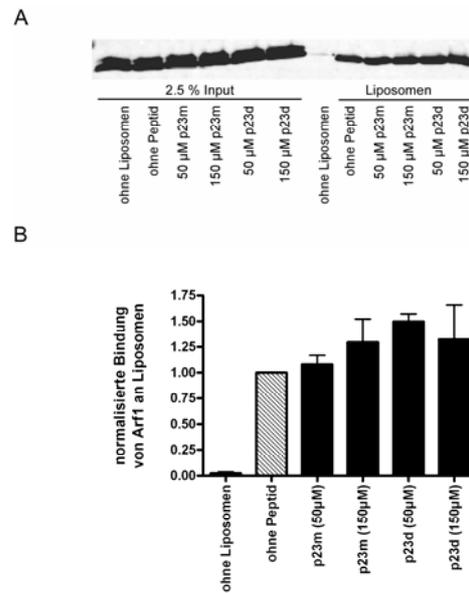


Abbildung 22: Bindung von myrArf1 an Liposomen in Gegenwart von monomerem und dimerem p23

Im liposomalen System wurde ein EDTA-switch von myrArf1 von GDP zu GTP in der Gegenwart von monomerem und dimerem p23 durchgeführt. Anschließend wurden die Liposomen isoliert und die daran gebundene myrArf1-GTP Menge durch Western Blot Analyse mit Arf1-spezifischen Antikörpern (Arf1-CT) analysiert (A). Das Balkendiagramm in B zeigt das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung.

Es wurde weder in der Gegenwart von monomerem noch von dimerem p23 eine reduzierte myrArf1 Menge an Liposomen detektiert (Abbildung 22). Daher kann davon ausgegangen werden, dass p23 bei den Tryptophan Fluoreszenz Messungen das gemessene Signal quencht, beim EDTA-switch jedoch die gleiche Menge myrArf mit unveränderter Geschwindigkeitskonstante umgesetzt wird. (Effekte beim GBF1-vermittelten Austausch: siehe 3.11 und Abbildung 20B).

3.13 Inhibition der COPI Vesikel Biogenese

Die Aktivitätsmessungen mit GBF1 (s. 3.11) weisen auf eine hemmende Funktion der dimeren Formen von p23, p24 oder p27 hin. Dadurch wird weniger myrArf1 aktiviert, welches Voraussetzung für die Coatomer Rekrutierung an die Golgi-Membran ist, was letztendlich zur Entstehung von COPI Vesikeln führt. Diese COPI Vesikelbiogenese kann auch *in vitro* an isolierten Golgi-Membranen mit myrArf, GTP und Coatomer durchgeführt werden (s. 5.3.18.2). Dabei wird kein rekombinantes ArfGEF zugefügt, da

vermutlich das endogene, noch Golgi-gebundene ArfGEF GBF1 für die Arf1 Aktivierung ausreichend ist.

Im nun folgenden Experiment wurde untersucht, ob die inhibierende Wirkung von dimeren p27 sich auch auf die COPI Vesikel Bildung auswirkt. Dafür wurde p27d in steigender Konzentration in die COPI Vesikel Präparation eintitriert (Abbildung 23, Spuren 10-12) und die Ausbeute an Vesikeln quantitativ anhand der Western Blot Signale bestimmt. Als Kontrolle wurde p25 (Spur 9) verwendet, welches als Dimer die gleiche Coatomerbindestellen wie p27 nutzt (Bethune et al., 2006), jedoch GBF1 weniger effektiv hemmt (s. 3.11).

p23 und p24 konnten in diesen Ansätzen nicht analysiert werden, da beide eine Konformationsänderung in Coatomer herbeiführen und diesen so während des Experiments präzipitieren würden (Langer et al., 2008; Reinhard et al., 1999).

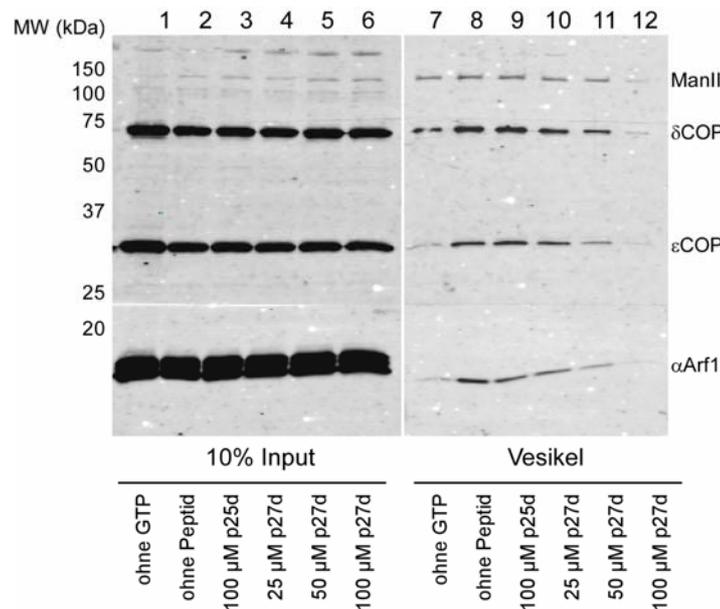


Abbildung 23: COPI-Vesikelbiogenese in der Gegenwart von dimerem p27

Rattenleber Golgi-Membranen, myrArf1, GTP und Coatomer wurden bei 37°C inkubiert, die entstandenen Vesikel durch Hochsalzbehandlung von den Membranen abgetrennt und durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Inputproben (Spuren 1-6) sowie Proben der einzelnen Vesikelfractionen (Spuren 7-12) wurden durch SDS-PAGE (12%iges SDS-Gel) und Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern für Mannosidase (ManII), δCOP (877), εCOP (Rab 2) sowie Arf1 (Arf1-CT) analysiert.

Wie durch die aufgetragenen Input-Proben (Spuren 1-6) gezeigt, wurden in jedem der sechs Ansätze die gleichen Mengen Golgi (ManII), Coatomer (δCOP und εCOP) sowie myrArf1 (Arf1) verwendet. Bei der Negativkontrolle, die ohne den Zusatz von GTP durchgeführt worden war (Spur 7), lassen

sich, wie erwartet, kaum Vesikel nachweisen. Im Ansatz der positiven Kontrolle „ohne Peptide“ (Spur 8) ist die Ausbeute an Vesikeln deutlich erhöht, gut erkennbar am deutlich stärkeren ϵ COP und Arf1 Signal. Diese Ausbeute an Vesikeln wird durch die Zugabe von p25d nicht signifikant verändert (Spur 9). Wird hingegen p27d eingesetzt, so ist deutlich eine von der Peptidkonzentration abhängige Inhibition der COPI Vesikelbiogenese nachzuweisen (Spuren 10-12). Sowohl das Coatomer- als auch das Arf1-Signal sinken bei steigender p27d Menge. Bei der höchsten verwendeten p27d Konzentration (Spur 12) konnte eine fast vollständige Inhibierung der COPI Vesikelbiogenese nachgewiesen werden.

3.14 Dimere p27 inhibiert auch die ArfGAP-Aktivität

Die inhibierende Wirkung von p27d auf die COPI Biogenese wurde durch ein Arf1 Rekrutierungs-Experiment genauer untersucht. Dabei wurden Rattenleber Golgi-Membranen mit myrArf1, GTP bzw. dem nicht hydrolysierbaren GTP γ S Analog inkubiert und anschließend sedimentiert. Nicht an den Golgi-gebundenes myrArf1-GDP verblieb im Überstand und war somit nicht an den Golgi-Membranen nachweisbar. Membrangebundenes myrArf1 wurde anschließend durch SDS-PAGE und Western Blot mit Hilfe von Arf1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 24).

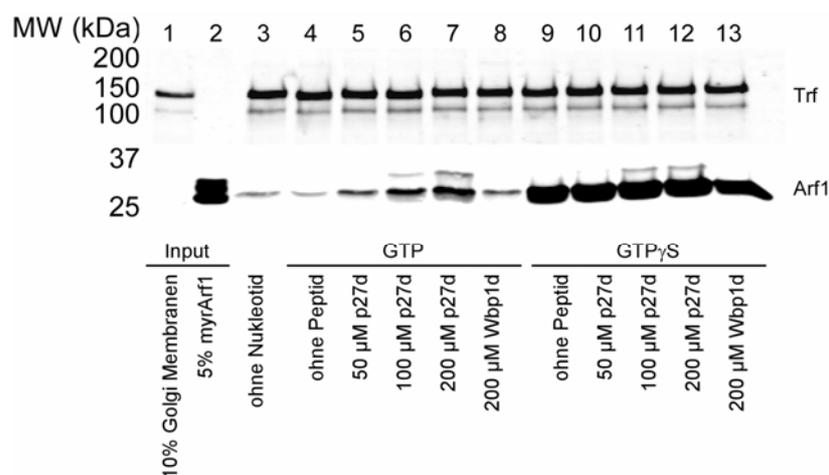


Abbildung 24: Die Rekrutierung von Arf1 an Golgi-Membranen in Gegenwart von p27d
Rattenleber Golgi-Membranen wurden mit myrArf1, GTP (4-8) oder GTP γ S (Spuren 9-13) in der Gegenwart von p27d (in Endkonzentrationen angegeben, Spuren 5-7 und 10-12) inkubiert. Als Negativkontrolle diente Wbp1d (Spuren 8 und 13). Membran-gebundenes Arf1 wurde anschließend zusammen mit den Golgi-Membranen isoliert und mit Hilfe von Western Blot Analyse mit Arf1-spezifischen Antikörpern (Arf1-CT) detektiert. Zusätzlich wurde ein

Transferrin-Rezeptor (Trf)-spezifischer Antikörper verwendet, um die Menge an Golgi-Membranen in jedem Ansatz zu bestimmen.

Eine quantitative Kontrolle der eingesetzten Golgi-Membranen erfolgte durch den im Western Blot spezifisch nachgewiesenen Transferrin-Rezeptor (Trf). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Nukleotid (GTP/GTP γ S, Spur 4), in welchem Arf1 nur sehr schwach am Golgi detektierbar war.

Im Vergleich dazu ist in allen Ansätzen mit GTP γ S (Spuren 9-13), unabhängig von der An- oder Abwesenheit von p27d, myrArf1 deutlich am Golgi nachweisbar. Eine Inhibierung der GBF1 Aktivität ist hier also nicht detektierbar.

Durch die Verwendung von GTP statt GTP γ S (Spuren 4-8) wurde zusätzlich die Aktivität Golgi-gebundener ArfGAPs (v.a. die von ArfGAP1) sichtbar gemacht. Diese hydrolysieren das an Arf1 gebundene GTP zu GDP, wodurch sich myrArf1-GDP von der Membran löst. Diese ArfGAP-Aktivität ist im Kontrollansatz „ohne Peptid (GTP)“ (Spur 4) indirekt durch ein reduziertes myrArf1 Signal sichtbar. Im Gegensatz dazu können die ArfGAPs in den Ansätzen mit GTP γ S (Spuren 9-13) kaum agieren, da dieses Nukleotid nur langsam hydrolysiert werden kann. So verbleibt einmal mit GTP γ S beladenes myrArf1 an der Golgi-Membran.

Überraschenderweise kann auch die GTP Hydrolyse-Aktivität der ArfGAPs durch dimeres p27 inhibiert werden (Spuren 5-7), was hier durch eine Erhöhung der membrangebundenen myrArf1-GTP Menge gezeigt werden kann. Dieser Effekt ist spezifisch für dimeres p27d, da die nachgewiesene Arf1 Menge sich zum einen mit steigender p27d Menge erhöht und zum anderen ein ähnlicher Effekt mit Wbp1 ausbleibt (Spur 8).

4 Diskussion

4.1 Expression und Aufreinigung großer ArfGEFs

Säugetiere exprimieren drei große, BFA-sensitive ArfGEFs: GBF1 (206 kDa) (Claude et al., 1999), BIG1 (209 kDa) und BIG2 (202 kD) (Morinaga et al., 1996). Alle drei Isoformen sind am Golgi lokalisiert, wo sie für den Nukleotidaustausch an Arf1 Proteinen der Klasse I und II verantwortlich sind (Casanova, 2007). In der hier vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, GBF1 als His₆-Fusionsprotein zu exprimieren und anschließend mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie aufzureinigen (s. 3.1). Das dabei erhaltene GBF1 ist enzymatisch aktiv und führt sowohl im löslichen als auch im liposomalen System den Nukleotidaustausch von GDP nach GTP an Arf1 durch (s. 3.6.3).

Neben GBF1 gelang auch die Expression von BIG2 im baculoviralen System. Auch hier erfolgt die Aufreinigung über einen, ebenfalls N-terminal lokalisierten, His₆-Tag (Togawa et al., 1999). Die Nukleotidaustauschfähigkeit des rekombinanten Proteins wurde hierbei anhand von Bindungs-Experimenten mit radioaktiv markiertem GTP gezeigt. Dabei wurde die enzymatische Aktivität von BIG2 an einem aus dem Gehirncytosol des Rindes aufgereinigtem Protein Mix aus Arf1 und Arf3 nachgewiesen, aber auch an rekombinantem, nicht-myristoyliertem Arf1, Arf5 und Arf6.

Eine gelungene Expression von BIG1 ist im Gegensatz dazu nicht beschrieben, jedoch ist es möglich, ein die Sec7 Domäne umfassendes Fragment aus *E. coli* Zellen in aktiver Form aufzureinigen (Zeeh et al., 2006) (s. 4.3).

4.2 GBF1: Bindung an die Golgi-Membran

Im Gegensatz zu BIG1 und BIG2, welche in späten Golgi Kompartimenten zu finden sind, ist GBF1 ein hauptsächlich am *cis*-Golgi und in *vesicular-tubular-clusters* (VTC) lokalisiertes ArfGEF (Zhao et al., 2006; Zhao et al., 2002; Zhao, 2006 #260). Zur näheren Charakterisierung des rekombinanten GBF1 wurde daher dessen Fähigkeit getestet, *in vitro* an isolierte Golgi-Membranen zu binden (s. 3.5). Hier war ein Membranrekrutierung von GBF1, trotz einer in der Literatur beschriebenen hohen Assoziations- und Dissoziationsrate,

deutlich nachweisbar (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005; Zhao et al., 2006). Die Zugabe von exogenem, freiem Arf1-GDP wirkte dieser Bindung allerdings entgegen, so dass deutlich weniger GBF1 an der Golgi-Membran nachgewiesen werden konnte. Es bedarf näherer Untersuchungen, um die genauen Mechanismen der GBF1 Assoziation mit der Golgi-Membran aufzuklären, jedoch ist aufgrund dieser Daten membrangebundenes Arf1-GDP als GBF1 Rezeptor nicht auszuschließen. Allerdings zeigen siRNA Experimente von Rab1b, dass auch dieses für die Membranassoziation von GBF1 verantwortlich sein könnte (Monetta et al., 2007). Interessanterweise verfügen alle großen ArfGEFs selbst über keine der bekannten Membran-Bindungsdomänen, wie vergleichsweise die Pleckstrin-Homologie Domäne der kleinen und mittelgroßen ArfGEFs (Shin and Nakayama, 2004). Stattdessen wurden verschiedene Membranproteine als Interaktionspartner identifiziert. Für die GBF1 Homologe der Hefe Gea1p und Gea2p wurde das Golgi-lokalisierte Membranprotein Gmh1p als Bindungspartner nachgewiesen. Allerdings wird die Membranrekrutierung von Gea1/2p bei dessen Depletion nur unwesentlich beeinflusst (Chantalat et al., 2003). Auch wurde für humanes GBF1 eine Interaktion mit dem Tether Protein p115 und für Gea2p eine Bindung an die Phosphatidylserin Flippase Drs2p gezeigt. Obwohl es sich bei beiden Interaktionspartnern um Membranproteine handelt, sind diese wiederum nicht ausschließlich für die Membranassoziation dieser ArfGEFs verantwortlich (Chantalat et al., 2004; Garcia-Mata and Sztul, 2003).

4.3 GBF1 katalysierter GDP/GTP Austausch an Arf1

Die Membranrekrutierung der ArfGEFs steht in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung der Arf GTPasen. Allerdings ist die Substratspezifität großer ArfGEF Proteine noch nicht vollständig geklärt, da *in vivo* und *in vitro* Analysen zu kontroversen Ergebnissen führten. So katalysiert GBF1 beispielsweise *in vitro* den GDP/GTP Austausch an Arf5 (Claude et al., 1999), wohingegen *in vivo* Arf1 und Arf4 als GBF1 Substrate identifiziert wurden (Niu et al., 2005; Szul et al., 2007, reviewed in Anders, 2008). Da im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von GBF1 im Zusammenhang mit der COPI-Vesikelbiogenese genauer untersucht wurde, beschränkten sich die Aktivitätsmessungen auf die kleine GTPase Arf1. Dabei konnte mit Hilfe von Tryptophan Fluoreszenz Messungen (Bigay et al., 2003) eine

Nukleotidaustausch-Aktivität von GBF1 sowohl im löslichen System mit $\Delta 17\text{Arf1}$, als auch im liposomalen System mit myrArf1 nachgewiesen werden (s. 3.6.3). Dabei wurden spezifische Austauschaktivitäten von $2,52 \times 10^5 \pm 0,75 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ für das liposomale System und $0,049 \times 10^5 \pm 0,006 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ für das lösliche System bestimmt (s. 3.6.3).

Im Vergleich dazu zeigt die Sec7 Domäne von BIG1 mit $0,95 \times 10^5 \pm 0,51 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ im löslichen System eine fast 20fach höhere Austauschaktivität an $\Delta 17\text{Arf1}$ (Zeeh et al., 2006); ist diese jedoch um den Faktor 2,65 niedriger, wenn man sie mit der spezifischen Austauschaktivität von GBF1 im liposomalen System vergleicht ($2,52 \times 10^5 \pm 0,75 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Diese wiederum ist in der gleichen Größenordnung wie die für ARNO im löslichen System bestimmte spezifische Austauschaktivität von $2,89 \times 10^5 \pm 1,20 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Zeeh et al., 2006).

Leider fehlen vergleichbare Werte für BIG1 als Gesamtprotein, aber auch für Aktivitätsmessungen von ARNO und BIG1 im liposomale System, welches der *in vivo* Situation deutlich näher kommt.

4.4 Interaktionspartner von GBF1

In vivo findet die katalytische Aktivität von GBF1 bei den initiierten Schritten der COPI-Vesikelbiogenese statt. Dabei wird inaktives Arf-GDP über p23 und p24 vom Cytosol an die Membran rekrutiert (Contreras et al., 2004; Gommel et al., 2001; Majoul et al., 2001). Dort findet der GBF1-vermittelte GDP/GTP Austausch statt und aktives Arf1-GTP bindet über seine C-terminale, amphiphatische Helix, sowie den nun exponierten Myristoyl-Schwanz fest an die Membran (Antonny et al., 1997; Franco et al., 1996). Dadurch wird gleichzeitig die Interaktion mit den p24 Proteinen aufgehoben und der sogenannte *priming complex* gebildet. Dieser rekrutiert über Arf1-GTP und die p24 Proteine Coatmer *en bloc* aus dem Cytosol an die Membran (Hara-Kuge et al., 1994).

p24 Proteine sind in allen Eukaryonten konserviert und treten von der Hefe bis zu Säugetieren auf. Sie zyklisieren zwischen den Organellen des frühen sekretorischen Transportweges (Dominguez et al., 1998; Emery et al., 2000; Fullekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999; Jenne et al., 2002; Nickel et al., 1997), wobei sie über ihre luminalen coiled-coil Domänen in der Lage sind, Homo- und Heterodimere zu bilden. Dem oligomeren Zustand der p24 Proteine wird dabei vor allem bei der COPI-Vesikelbiogenese eine

entscheidende Funktion zugeschrieben. So sind p23 und p24 nur in ihrer homodimeren, nicht jedoch in ihrer monomeren Form in der Lage, Arf1 und Coatomer an die Membran zu binden (Anderl, 2008; Bethune et al., 2006; Gommel et al., 2001; Reinhard et al., 1999).

Die Interaktion von homodimerem p23 und p24 mit Arf1-GDP, welches zusätzlich ein Substrat von GBF1 ist, konnte nun mit Hilfe des rekombinanten GBF1 genauer untersucht werden. Dabei wurde durch Photokreuzvernetzungs-Experimente mit dem cytoplasmatischen Schwanz von p23 (s. 3.8) eine direkte Interaktion mit GBF1 nachgewiesen. Zusätzlich durchgeführte Konkurrenzexperimente zeigten, dass die Interaktion von p23 mit GBF1 spezifisch für die homodimere Form von p23 ist. In weiteren Untersuchungen ließ sich nachweisen, dass neben dimerem p23 auch p24, p25, p26 und p27 als Interaktionspartner von GBF1 agieren. Dabei stellten auch hier die entsprechenden Homodimere die aktive Form dar, da nur über sie eine Interaktion mit GBF1 stattfand (s. 3.9). Diese Daten konnten durch Koimmunpräzipitations-Experimente mit Konstrukten aus an Thioredoxin fusionierten cytoplasmatischen Schwänzen der p24 Proteine bestätigt werden (s. 3.10, Ansätze ohne $\Delta 17\text{Arf1}$). Hierbei trat erneut keine Interaktion mit den monomeren Formen der p24 Proteine mit GBF1 auf. Allerdings bestätigte sich die im ersten Experiment (s. 3.9) beobachtete starke Präferenz für p24 nicht, vielmehr ist es hier dimeres p23, das die stärkste Affinität aufweist (s. 3.10).

Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen Interaktion von p23, p24, p25, p26 und p27 mit GBF1 und der im Gegensatz dazu auf p23 und p24 beschränkten Interaktion von Arf1-GDP wurden Koimmunpräzipitations-Experimente mit allen drei Komponenten durchgeführt (s. 3.10, Ansätze mit $\Delta 17\text{Arf1}$). Es wurde in allen Ansätzen die Bildung eines trimeren Komplexes bestehend aus GBF1, Arf1-GDP und dimeren p23, p24, p25, p26 oder p27 nachgewiesen. Zusätzlich wurde im Ansatz mit dimerem p27 eine starke Erhöhung der Bindungseffizienz beobachtet; weniger deutliche Interaktionen waren mit p24 und p25 zu detektieren (Abbildung 18E). Kein signifikanter Effekt war bei dimeren p23 zu detektieren, auch nicht bei Verwendung einer geringeren Konzentration, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass bereits ohne $\Delta 17\text{Arf1}$ -GDP maximale Bindekapazitäten erreicht wurden (Abbildung 18D und 18E).

Die hier beschriebenen Experimente zeigen, dass alle p24 Familienmitglieder in homodimerer Form mit GBF1 interagieren, obwohl gleichzeitig nur p23 und p24 in der Lage sind, Arf1-GDP an die Membran zu

rekrutieren (Gommel et al., 2001; Majoul et al., 2001). Dort können sich aus GBF1, Arf1-GDP und dimeren Mitgliedern der p24 Familie trimere Komplexe bilden. Daran sind auch p25, p26 und p27 beteiligt, für welche eine direkte Interaktion mit Arf1 allein, also ohne die Anwesenheit von GBF1, ausgeschlossen werden konnte. Interessanterweise sind gleichzeitig wiederum alle p24 Mitglieder in der Lage, mit Coatomer zu interagieren. Allerdings nehmen auch hier p23 und p24 wieder eine Sonderstellung ein, da sie in der Lage sind, durch ihre Bindung die Polymerisation von Coatomer zu induzieren (Bethune et al., 2006; Reinhard et al., 1999).

Darüberhinaus liegen durch *Yeast-two-Hybrid*- und *in vivo* Koimmunpräzipitations-Daten erste Hinweise auf eine direkte Interaktion von Coatomer und GBF1 vor (C. Jackson, 2007; unveröffentlichte Daten). Dabei konnte mit Hilfe von Deletionsmutanten die Interaktionsstelle in Coatomer auf die γ -Subdomäne eingegrenzt werden. Diese initiiierenden Studien konnten im Rahmen dieser Arbeit durch *in vitro* Interaktionsstudien von GBF1 und Coatomer bestätigt werden (s. 3.7). Dabei wurde, trotz einer in γ -COP gelegenen Interaktionsstelle, keine spezifische Präferenz von GBF1 für $\gamma 1$ bzw. $\gamma 2$ gefunden. Stattdessen zeigte sich eine höhere Bindungseffizienz an die $\zeta 1$ -Coatomer-Isotypen $\gamma 1\zeta 1$ und $\gamma 2\zeta 1$. Aufgrund der hier gezeigten Präferenz kann man vermuten, dass das vor allem im frühen Golgi-lokalisierte GBF1 für die $\zeta 1$ -spezifische COPI-Biogenese verantwortlich ist, wohingegen an anderer Stelle, durch die Aktivität eines anderen ArfGEFs, $\zeta 2$ -spezifische COPI-Vesikel entstehen.

Bei Quantifizierungen von HeLa-Gesamtzelllysaten wurden ungefähr 4,2 fmol GBF1 zu 10,5 fmol Coatomer je Mikrogramm Gesamtprotein nachgewiesen (s. 3.4 und C. Weimer, 2008; unveröffentlichte Daten), woraus sich eine Stöchiometrie von 1 : 2-3 für GBF1 zu Coatomer ergab. Allerdings wurden die dabei verwendeten Quantifizierungen mit dem *in vivo* vorkommenden „Coatomer-Mix“ aller vier Isotypen (Moelleken et al., 2007; Wegmann et al., 2004) durchgeführt und die $\zeta 1$ -Präferenz von GBF1 vernachlässigt. Weitere Experimente sind nötig, um bessere Einblicke in Stöchiometrie und Interaktionsstellen von Coatomer und GBF1 zu bekommen. Auch Effekte auf die katalytische Aktivität von GBF1 sind keineswegs auszuschließen.

In Modell (Abbildung 25A) sind die initialen Schritte der COPI-Vesikelbiogenese schematisch zusammengefaßt.

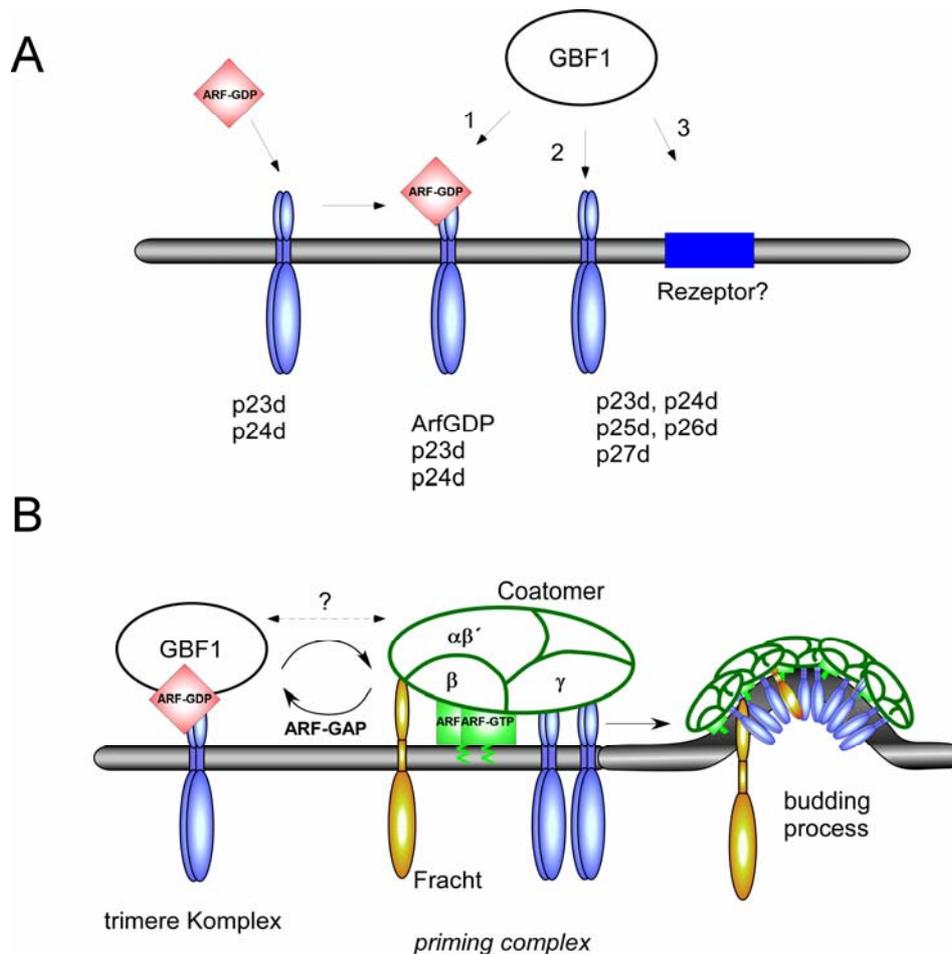


Abbildung 25: Erste Schritte der COPI-Vesikel Biogenese

A: Arf1-GDP wird über dimeres p23 und p24 an die Membran rekrutiert. GBF1 bindet entweder über den Arf1-GDP/p24 Komplex (1), über dimere p24 Mitglieder (2) oder über einen weiteren Rezeptor (3) an die Membran.

B: GBF1 bildet mit Arf1-GDP und dimeren Mitgliedern der p24 Familie trimere Komplexe aus. Auch eine Interaktion mit Coatomer ist möglich. Aufgrund der GBF1 Aktivität kommt es zur Ausbildung des *priming complexes* und schließlich zum *budding process*. Details siehe Text.

Dabei wird Arf1-GDP aus dem Cytosol direkt über dimeres p23 und p24 an die Membran rekrutiert. GBF1 könnte nun entweder direkt über Arf1-GDP (1) oder über dimere p24 Proteine (2) oder über weitere Interaktionspartner (3) an die Membran binden.

Dort bildet GBF1 zusammen mit Arf1-GDP und dimerisierten p24 Mitgliedern trimere Komplexe aus (Abbildung 25B). In diesem Zustand katalysiert GBF1 den GDP/GTP Austausch an Arf1. Dabei werden mit Hilfe der ArfGAP-Hydrolyse-Aktivität mehrere Zyklen der Arf Aktivierung und Inaktivierung durchlaufen, durch welche die lokale Konzentration von

Frachtmolekülen erhöht wird (Malsam et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000). Aufgrund der in der Literatur beschriebenen hohen „on and off“ Rate von GBF1 (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005; Zhao et al., 2006), verläßt GBF1 wahrscheinlich direkt nach jedem Arf1 Aktivierungsschritt die Membran. Dabei löst sich die GBF1 Bindung zu den p24 Proteinen, gleichzeitig trennt sich auch Arf1-GTP von ihnen. Mit Hilfe diese so frei gewordenen p24 Proteine kann nun die Rekrutierung von Coatomer stattfinden (*priming complex*).

GBF1 könnte die Membranbindung von Coatomer zusätzlich unterstützen, indem es diesen bindet, während es sich selbst im trimeren Komplex befindet. Dadurch wäre Coatomer bei Entstehung eines *priming complexes* bereits in lokaler Nähe. Gleichzeitig deutet die hier gezeigte Präferenz von GBF1 für ζ 1-Coatomer Isotypen auf eine Selektion von bestimmten Subpopulationen von COPI-Vesikeln hin (s. 3.7).

4.5 Regulation der GBF1 Aktivität

Die Interaktionsstelle der p24 Proteine in GBF1 läßt sich wahrscheinlich auf die katalytisch aktive Sec7 Domäne beschränken, da eine direkte Interaktion von photoaktivierbarem p23 mit der Sec7 Domäne von ARNO nachgewiesen werden konnte (s. 3.8).

Die Sec7 Domäne der ArfGEFs besteht aus 10 α Helices, welche eine hydrophobe Furche bilden. Diese bindet die *switch1* und 2 Region in Arf1, wobei ein Glutamatfinger in dessen aktives Zentrum inseriert wird. Durch diesen wird in GDP das β -Phosphat und das Magnesium-Ion sterisch und elektrostatisch abgestoßen und so der Nukleotidaustausch zu GTP katalysiert (Cherfils et al., 1998; Goldberg, 1998).

Diese katalytische Aktivität der Sec7 Domäne wird durch die p24 Proteine beeinflusst. Dabei wurde eine Inhibition des Nukleotidaustausches nur mit dimerem p23, p24 und p27 beobachtet (s. 3.11), was nur im liposomalen System signifikant nachweisbar war. GBF1-unabhängige, also rein Arf1 spezifische Reaktionen können ausgeschlossen werden, da ein EDTA-*switch* keinerlei Effekte verursachte (s. 3.11). Um die GBF1 Inhibition eingehender zu analysieren, wurden COPI-Vesikel *in vitro* mit Hilfe von Golgi-Membranen, Coatomer und myrArf1 in der An- und Abwesenheit von homodimeren p27 generiert (s. 3.13). Dabei konnte in Abhängigkeit der verwendeten p27 Konzentrationen eine sich verringernde Menge an COPI Vesikeln

nachgewiesen werden. Diese Daten lassen sich durch eine spezifische Inhibition endogener GBF1 Aktivität erklären und sind dadurch stimmig mit den Tryptophan Fluoreszenz Messungen von GBF1 und dimeren p27 im liposomalen System.

p23 und p24 abhängige Effekte konnten hierbei nicht getestet werden, da diese in der Lage sind, Coatomer bereits in Lösung zu präzipitieren (Reinhard et al., 1999).

Beim Arf1 Rekrutierungsexperiment mit GTP γ S in der Gegenwart von dimerem p27 wurde überraschenderweise keine reduzierte Arf1 Menge an der Golgi-Membran gefunden (s. 3.14). Diese widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse lassen sich durch die Anwesenheit anderer ArfGEFs erklären. Die verwendeten Golgi-Membranen werden aus Rattenlebern isoliert und enthalten Bestandteile des *cis*, *medial* und *trans*-Golgi. An ihnen könnten sich neben GBF1 noch weitere membrangebundene ArfGEF Proteine befinden. Als Beispiel können hier die am *trans*-Golgi lokalisierten ArfGEF Proteine BIG1 und BIG2 angeführt werden, welche *in vitro* und *in vivo* in der Lage sind, an Arf1 GDP zu GTP auszutauschen (Anders and Jurgens, 2008). Die BIG1/2 Aktivität könnte zur Aktivierung von Arf1 geführt haben und so die inhibierte GBF1 Aktivität überdecken. Dadurch wäre trotz einer Aktivierung von Arf1 die COPI Vesikelbiogenese inhibiert, da diese spezifisch für GBF1 ist und nicht durch andere ArfGEF Proteine ersetzt werden kann.

Wird im gleichen Experiment statt dem nicht hydrolysierbaren GTP γ S GTP verwendet, so läßt sich die Aktivität membrangebundener ArfGAPs in der Gegenwart von homodimeren p27 analysieren. Während in den Kontrollen „ohne Peptid“ und mit Wbp1 membrangebundenes Arf1-GTP hydrolysiert wird, findet dies nicht in der Gegenwart von p27 statt (s. 3.14). Da in diesen Experimenten kein Coatomer verwendet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich vor allem um die Hydrolyseaktivität von ArfGAP1 handelt, welches im Gegensatz zu ArfGAP2/3 eine von Coatomer unabhängige Aktivität aufweist (Weimer et al, 2008). Neben GBF1 wäre somit auch ArfGAP1 durch dimeres p27 inhibierbar, wodurch sich die erhöhte Arf1-GTP Mengen an der Golgi-Membran erklärt (s. 3.14).

Auch frühere Daten weisen auf eine Regulation der ArfGAP Aktivität durch die p24 Familie hin. So zeigten Experimente von Goldberg et al., dass die cytoplasmatische Domäne von p24 β 1 (p24) in der Lage ist, die ArfGAP1-vermittelte GTP-Hydrolyse an N Δ 17Arf1 zu inhibieren. In dem dabei postulierten Modell wurde davon ausgegangen, dass die Aktivität von ArfGAP1 von Coatomer um bis zu Faktor 1000 stimuliert wird (Goldberg,

2000). Bindet p24 an Coatomer, so kommt es zur Konformationsänderung, wobei die ArfGAP1-stimulierende Wirkung aufgehoben wird.

Allerdings stellten darauffolgende Experimente den Einfluß von Coatomer auf die ArfGAP1 Aktivität in Frage, da bei Messungen im liposomalen System mit Phospholipid-Vesikeln und myristoyliertem Arf1 keinerlei Coatomer-stimulierende Effekte die ArfGAP1-Hydrolyseaktivität betreffend beobachtet werden konnten (Szafer et al., 2000).

Doch trotz dieser Unabhängigkeit von Coatomer wies Lanoix für p24 β 1 (p24) eine hemmende Wirkung auf ArfGAP1 nach (Lanoix et al., 2001). In diesen Studien wurde die Hydrolyse-Aktivität sowohl am Golgi, als auch an Liposomen gemessen und der inhibierende Effekt von p24 in beiden Systemen nachgewiesen. Auch für p23 wurde eine reduzierte Aktivität gezeigt, wenn auch weniger ausgeprägt und nur für das liposomale System. Im Gegensatz dazu hatte p25 keinerlei signifikanten Effekt. Messungen mit weiteren Mitgliedern der p24 Familie sind nicht veröffentlicht, wobei in *pull down*-Experimenten neben einer direkten Interaktion von p23 und p24 auch eine Bindung von p26 und p27 an ArfGAP1 nachgewiesen wurde (Lanoix et al., 2001).

In Abbildung 26 ist eine schematische Darstellung der hier diskutierten Daten gezeigt.

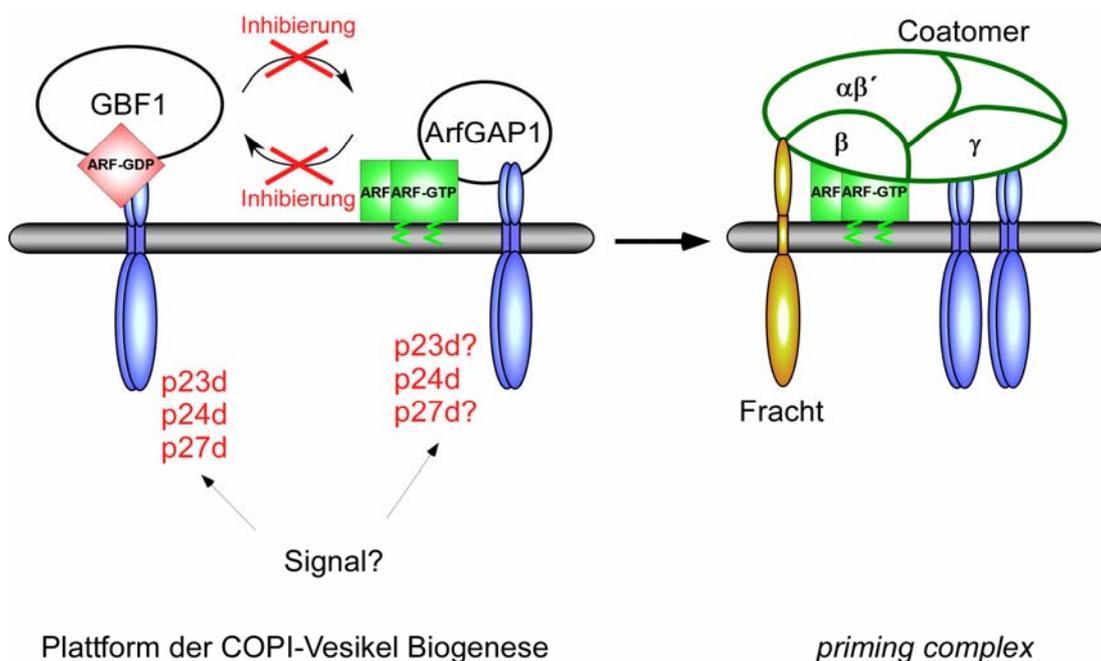


Abbildung 26: Modell zur Plattform der COPI-Vesikel Biogenese

Sowohl GBF1 als auch ArfGAP1 werden durch die cytoplasmatischen Domänen von p23d, p24d und p27d inhibiert. Ein bisher unbekanntes Signal führt zur Auflösung der Inhibition und der GBF1/GAP1-Zyklus läuft ab (links). Coatomer wird über Arf1-GTP und dimeres p23

und p24 aus dem Cytosol an die Membran rekrutiert (*priming complex*), wo er die Frachtmoleküle aufnimmt (rechts).

Dabei greifen die p24 Proteine p23, p24 und p27 an zwei Stellen in den ArfGEF/ArfGAP-Zyklus ein. Einerseits wird der GBF1-vermittelte GDP/GTP Austausch, andererseits die Hydrolyse von an Arf1 gebundenem GTP durch ArfGAP1 inhibiert. Diese doppelte Inhibition könnte ein lokales Ankonzentrieren aller beteiligten Komponenten auf einer Art Plattform ermöglichen und gleichzeitig ein Zeitfenster z.B. für Frachtaufnahme öffnen. Ist diese in ausreichender Menge auf der Plattform vorhanden, wäre ein gleichzeitiges Auflösen beider Blockaden möglich und der Aktivierungs-/Inaktivierungs-Zyklus von Arf1 beginnt. Erst durch diesen werden nun die bereits lokal in hoher Konzentration vorliegenden Frachtmoleküle sukzessive in die COPI-Vesikel *budding zone* gebracht.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, GBF1 aufzureinigen und genauer zu charakterisieren. Darüberhinaus konnten ζ 1-enthaltende Coatomer-Isotypen und dimere Mitglieder der p24 Familie als Interaktionspartner identifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivität von GBF1 nur durch dimeres p23, p24 und p27 inhibiert wird. Wodurch diese Hemmung wieder aufgelöst wird und ob dabei die Ausbildung von heterodimeren oder tetrameren p24 Komplexen eine Rolle spielt, werden zukünftige Experimente zeigen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham-Biotech (Freiburg), BioRad (München), Calbiochem (Bad Soden, Taunus), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Quiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

5.1.2 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in den Kapiteln der entsprechenden Methoden aufgeführt.

5.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS: 1,47 mM KH_2PO_4 ; 4,29 mM Na_2HPO_4 ; 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl, pH 7,4

PBS-T: PBS mit Zusatz von 0,05% (v/v) Tween 20.

Die Puffer wurden mit entionisiertem MilliporeTM-Wasser hergestellt, entgast oder sterilfiltriert.

Weitere Puffer sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

5.1.4 Antibiotika

| Antibiotikum | finale Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) | eingesetzt bei |
|--------------|--|----------------|
| Ampicillin | 100 | <i>E. coli</i> |
| Gentamycin | 10 | <i>E. coli</i> |
| Kanamycin | 50 | <i>E. coli</i> |

| | | |
|---|--|----------------|
| Tetracyclin | 10 | <i>E. coli</i> |
| Zeocin | 25 | <i>E. coli</i> |
| Antibiotikum-Antimykotikum-Mix (Invitrogen) | 100 Streptomycin 0,25 Amphotericin B 100 U/ml Penicillin | Sf9-Zellen |

5.1.5 Nährmedien

Für die Vermehrung von Bakterien wurden folgende Kulturmedien (s. Tabelle) verwendet. Diese wurden mit entmineralisiertem Wasser hergestellt und anschließend autoklaviert.

| Bezeichnung | Zusammensetzung | Verwendung |
|---|---|--|
| LB-Medium/LB-Niedrigsalz-Medium (Luria-Bertani) | 1% (w/v) Bacto-Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl bzw. 0.5% (w/v) im LB-Niedrigsalz-Medium | Vermehrung von DH5 α und TOP10 Zellen; LB-Niedrigsalz-Medium bei Verwendung von Zeocin |
| LB-Agar/LB-Niedrigsalz-Agar | LB bzw. LB-Niedrigsalz-Medium + 1,5% (w/v) Bacto-Agar | s.o. |
| SOC-Medium | 2% (w/v) Bacto-Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 0,05%(w/v) NaCl 0,25% (w/v) 1 M KCl In H ₂ O gelöst und autoklaviert + 1% (v/v) MgCl ₂ + 2% (v/v) Glukose | Vermehrung von transformierten <i>E. coli</i> Zellen |

5.1.6 Peptide

| Bezeichnung | Sequenz | Molekularmasse (Da) |
|-------------|------------------------------|---------------------|
| p23m | LRFFKAKKLIE | 1712,03 |
| p24m | LKRFFEVRRVV | 1610,94 |
| p25m | HLKSFFEAKKLV | 1445,83 |
| p26m | LLKSFFTEKRPISRAVHS | 2115,2 |
| p27m | LLKSFFDKRTTTTRVGS | 2043,11 |
| Wbp1m | SSVGKKLETFKKTN | 1669,9 |
| p23d | (CLRFFKAKKLIE) ₂ | 3300,64 |
| p24d | (CLKRFFEVRRVV) ₂ | 3100,96 |
| p25d | (CHLKSFFEAKKLV) ₂ | 3097,6 |

| | | |
|---------|------------------------------------|---------|
| p26d | (CLLKSFFTEKRPISRAVHS) ₂ | 4436,4 |
| p27d | (CLLKSFFDKRTTTTRVGS) ₂ | 4292,0 |
| Wbp1d | (SSVGKKLETFFKKTN) ₂ | 3338,98 |
| p23*-CT | YLRRFF*KAKKLIE | 1820,0 |

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von Dr. Pipkorn (DKFZ, Heidelberg) oder von Dr. Rackwitz (Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg) durch automatisierte Fmoc-Festphasensynthese synthetisiert. Zur Herstellung der dimeren Peptide wurde N-terminal ein zusätzliches Cystein eingefügt, so dass sich unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zwei Peptide oxidativ (in 10% DMSO) zu einem Dimer verbinden. Alle Peptide wurden anschließend mittels HPLC gereinigt und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) auf ihre Reinheit hin untersucht. Die Peptide wurden in trockenem Zustand bei -20°C gelagert.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein photolabiles Peptidanalogen der cytoplasmatischen Domäne von p23 (p23*-CT, s. Tabelle) verwendet, indem ein Phenylalanin durch ein photolabiles Derivat von Phenylalanin (L-4'-(3-trifluormethyl-3*H*-diazirin-3-yl) phenylalanin, Tmd-F, F*) ausgetauscht wurde. Bei UV-Belichtung ($\lambda = 365$ nm) von p23*-CT bildet sich ein reaktives Carben am benzyliständigen Kohlenstoff des Tmd-F, welches in der Lage ist, ein interagierendes Protein kovalent zu binden. Tmd-F stammt von der Firma Photo probes (Schweiz), die Peptidsynthese von p23*-CT wurde von Dr. Rackwitz durch automatisierte Fmoc-Festphasensynthese durchgeführt (Gommel et al., 2001; Harter and Wieland, 1998).

5.1.7 Primärantikörper

| Epitop | Bezeichnung | Spezie (Isotyp) | Verdünnung (WB) |
|----------------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Arf1 (CT-Peptid) | Arf-CT | Kaninchen | 1:5000 |
| p23 | Henriette | Kaninchen | 1:10 000 |
| p23 | #1402 | Kaninchen | 1:1000 |
| His ₆ (Covance) | Histidin | Maus | 1.1000 |
| α -COP (CT-Peptid) | Nr. 1409 B | Kaninchen | 1:2000 |
| β -COP | B1.2 | Kaninchen | 1:2000 |
| β' -COP | Nr. 899 | Kaninchen | 1:10 000 |
| δ -COP | Nr. 877 | Kaninchen | 1:1000 |
| ε -COP | Rab2 | Kaninchen | 1:1000 |
| γ 1-COP | g1.2 | Meerschweinchen | 1:10 000 |
| γ 2-COP | g2.2 | Meerschweinchen | 1:10 000 |
| γ 1/ γ 2-COP | γ R | Kaninchen | 1:10 000 |

| | | | |
|-----------------------|-----------|-----------|---------------|
| ζ 1-COP | R468 | Kaninchen | 1:5000 |
| ζ 2-COP | R442 | Kaninchen | 1:5000-10 000 |
| GBF1 (BD Biosciences) | GBF1 (BD) | Maus | 1:1000 |
| GBF (diese Arbeit) | #1.2 | Kaninchen | 1:2500 |
| GBF (diese Arbeit) | #1.4 | Kaninchen | 1:5000 |
| GBF (diese Arbeit) | #2.2 | Kaninchen | 1:5000 |
| GBF (diese Arbeit) | #2.4 | Kaninchen | 1:2500 |

5.1.8 Sekundärantikörper

| Bezeichnung | gekoppelt an | Quelle | Verdünnung |
|---------------------------|------------------------------|------------|------------|
| Ziege α -Maus | Alexa Fluor [®] 680 | Invitrogen | 1:5000 |
| Ziege α -Kaninchen | Alexa Fluor [®] 680 | Invitrogen | 1:5000 |
| Ziege α -Kaninchen | Alexa Fluor [®] 800 | Invitrogen | 1:5000 |

Die Sekundärantikörper wurden in PBS-T mit 0,01-0,02% SDS und 1% BSA verdünnt.

5.1.9 Protein-, Molekulargewichts- und Gelfiltrationstandards

| Precision-Prestained [™] - Marker (BioRad) | BMW-Marker (PeqLab) | Gelfiltrationsstandard (BioRad) |
|--|---------------------------------|------------------------------------|
| Molekulargewicht (kDa) | Molekulargewicht (kDa) | Molekulargewicht (kDa) |
| 250 | 200 (Myosin) | 670 (Thyroglobulin) |
| 150 | 116,3 (β -Galaktosidase) | 158 (γ -Globulin) |
| 100 | 97,4 (Phosphorylase b) | 44 (Ovalbumin) |
| 75 | 66,2 (Rinderserumalbumin) | 17 (Myoglobin) |
| 50 | 45 (Ovalbumin) | 1,35 (Vitamin B12) |
| 37 | 31 (Carboanhydrase) | |
| 25 | 21,5 (Trypsin-Inhibitor) | |
| 20 | 14,4 (Lysozym) | |
| 15 | 6,5 (Aprotinin) | |
| 10 | | |

5.1.10 DNA-Größenstandards

| 100 bp DNA-Leiter (in bp) | 1 kb DNA-Leiter (in kb) |
|------------------------------|----------------------------|
| 1517 | 10 |
| 1200 | 8 |
| 1000 | 6 |
| 900 | 5 |
| 800 | 4 |
| 700 | 3 |
| 600 | 2 |
| 517 | 1,5 |
| 400 | 1 |
| 300 | 0,5 |
| 200 | |
| 100 | |

5.1.11 Plasmide

| Vektor | Quelle | Wirtszelle | Selektion | Funktion |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| pcDNA/TO/myc-His TM A + GBF1 | E. Sztul | <i>E. coli</i> | Zeocin | cDNA für GBF1 (human) |
| pFastBac TM HT B | Invitrogen | DH10Bac TM <i>E. coli</i> | Ampicillin, Gentamycin | Rekombinantes Donor-Plasmid |
| pFastBacNNX | pFastBac TM HT B | DH10Bac TM <i>E. coli</i> | Ampicillin, Gentamycin | NotI, NheI, XhoI Restriktionsschnittstelle |
| pFastBacNNX4kb | pFastBacNNX (diese Arbeit) | DH10Bac TM <i>E. coli</i> | Ampicillin, Gentamycin | enthält 4 kb GBF1-Fragment |
| BacIIIa | pFastBacNNX4kb (diese Arbeit) | DH10Bac TM <i>E. coli</i> | Ampicillin, Gentamycin | enthält GBF1-Gen (4 kb + 2 kb) |
| BacIIIa_mut | pFastBacNNX4kb (diese Arbeit) | DH10Bac TM <i>E. coli</i> | Ampicillin, Gentamycin | enthält GBF1mut E794K |
| MultiBac Bacmid+ BacIIIa | MultiBac Bacmid (PD Dr. Imre Berger) | DH10 MultiBac | Ampicillin, Gentamycin, Tetracyclin, Kanamycin | Tn7-Integration (GBF1) |
| MultiBac Bacmid+ BacIIIa_mut | MultiBac Bacmid (PD Dr. Imre Berger) | DH10 MultiBac | Ampicillin, Gentamycin, Tetracyclin, Kanamycin | Tn7-Integration (GBF1mut E794K) |
| pRSF-Duet-NMT/hARF#2 | J. Béthune | <i>E. coli</i> | Kanamycin | Prokaryontische, simultane Expression |

| | | | | |
|---|-------------------------------------|----------------|------------|---|
| | | | | von Arf1 und NMT |
| pET15b NΔ17Arf1 | J. Goldberg | <i>E. coli</i> | Ampicillin | Prokaryontische Expression von NΔ17Arf1 |
| pET-32-Trx- cytoplasmic tail p24 family (monomere und dimere) | Dr. J. Béthune und M. Geiling | <i>E. coli</i> | Ampicillin | Prokaryontische Expression von monomeren und dimeren Thioiredoxin- p24 Fusionsproteinen |

5.1.12 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) bezogen.

Hybridisierungsprimer:

| Bezeichnung | Sequenz (5'-3') | Funktion |
|---------------|--|-----------------------------------|
| Bac_FW-primer | cat ggg agg gcg gcc gcg aga gag agc tag cga gag aga c | Modifikation von pFastBac™HT B |
| Bac_RV2 | tcg agt ctc tct cgc tag ctc tct ctc gcg gcc gcc ctc c | Modifikation von pFastBac™HT B |

Sequenzierungsprimer:

| Bezeichnung | Sequenz | Template |
|-------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| pcDNA4/TO/myc-His FW | ccg gga ccg atc cag cc | pcDNA/TO/myc-His™ A + GBF1 |
| pcDNA/TO/myc-His RV | atc ctc ttc tga gat gag | pcDNA/TO/myc-His™ A + GBF1 |
| GBF1-1 | gaa gaa ccc aag aac tat gtg ggg ga | GBF1_human |
| GBF1-2 | ctt ccc tgc atc cgc gag ctc ttc cg | GBF1_human |
| GBF1-3 | gaa gct agc aat act gag aga ac | GBF1_human |
| GBF1-4 | aat gtt cgt aaa cag aat gca ccc a | GBF1_human |
| GBF1-RV | gcc cgg cct gcc atg gtc agt gta ga | GBF1_human |
| GBF1-6 | gct gct ctg cag gcc aca gcc agg g | GBF1_human |
| GBF1-7 | gtc atc cag gac ccc atg ccc atg ga | GBF1_human |
| GBF1-6/7 | gaa ggc gtg cct gcc agc tac cat a | GBF1_human |

5.1.13 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *E. coli* Bakterienstämme DH5 α , TOP10, Origami 2 und BL21 Star verwendet. Der Bakterienstamm DH10 MultiBac stammt von PD Dr. Imre Berger.

5.1.14 Zelllinien

Es wurde ausschließlich die Insektenzelllinie S9 (*Spodoptera frugipeda*, Invitrogen) verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 27°C in einem Inkubator der Firma Memmert (Schabach) bzw. in einem Schüttler der Firma Kühner (Birsfelden, Schweiz). Zellkulturmedien und Antibiotikum-Antimykotikum-Mix wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe), fötales Kälberserum von PANTM (Aidenbach) bezogen. Waschschriffe wurden mit PBS durchgeführt; das Ablösen der Zellen erfolgte mit 2 mM EDTA in PBS.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch am Nanodrop ND-1000 Spectralphotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA). Die DNA-Reinheit wurde durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm überprüft.

5.2.2 Ethanolpräzipitation von DNA

Zur DNA-Lösung wurde das 0,1fache Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gegeben und der Ansatz danach mit dem 2-3fachen Volumen eiskaltem, 100%igem Ethanol versetzt. Nach dem Mischen wurde die Probe bei -80°C inkubiert und anschließend für 10 min mit 13 000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf, Tischzentrifuge). Zur weiteren Verwendung wurde die DNA in 10 μ l H₂O aufgenommen.

5.2.3 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die Reinigung von DNA-Fragmenten, sowie die Restriktionsverdauanalysen wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Fragmentgröße wurden dafür 0,8-2%ige (w/v) Agarose-Gele in 1xTAE-Puffer unter Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei 200 V verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit der entsprechenden Menge 5x DNA-Probenpuffer vorbereitet. Unter UV-Licht bei einer Anregungswellenlänge von 260 nm wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden visualisiert. Die Aufreinigung präparativer DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des *Gel Extraction® Kits* von Macherey Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

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

DNA-Probenpuffer (5x): 50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 4 M Harnstoff, 25% (w/v) Saccharose; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 100 mM EDTA

5.2.4 Umpufferung von DNA-Fragmenten

Die Einstellung bestimmter Salzkonzentrationen wurde über das *Nucleo-Spin® Extract-Kit* (Macherey Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte je nach DNA-Menge in 20-50 µl H₂O.

5.2.5 PCR-Screening

Das PCR-Screening diente zur schnellen Erkennung positiver Rekombinanten nach einer Klonierung. Das Ergebnis einer Ligation konnte hierbei direkt, unter Verwendung eines rekombinanten *E. coli* Einzelklons analysiert werden, ohne vorher die darin enthaltene Plasmid-DNA zu isolieren.

Die einzeln gepickten Bakterienkolonien wurden hierfür mit 25 µl PCR-Master-Mix (Taq-Polymerase und die für die das zu ligierende Fragment spezifischen Primern) gemischt und anschließend die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben mittels

Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Bei einer erfolgreichen Ligation wurde eine Bande mit der Größe des ligierten und in der PCR amplifizierten Fragments detektiert.

Temperaturprogramm der Polymerase-Kettenreaktion:

| Zyklenanzahl | Dauer (min) | Temperatur (°C) |
|--------------|----------------|-----------------|
| 1 | 10 | 95 |
| 25 | 0,5 | 95 |
| | 1 | 60 |
| | primerabhängig | 72 |
| 1 | 7 | 72 |
| 1 | ∞ | 4 |

Zusammensetzung des PCR-Master-Mixes (1x):

| Komponente | Volumen (µl) |
|------------------------------|--------------|
| Taq-Puffer (10x) | 2,5 |
| MgCl ₂ (10x) | 2,5 |
| Primer_forward (100 pmol/µl) | 3 |
| Primer_reverse (100 pmol/µl) | 3 |
| dNTPs (10 mM) | 0,5 |
| Taq-Polymerase | 0,5 |
| H ₂ O | 13 |
| Gesamtvolumen | 25 |

5.2.6 Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung wurde das *Plasmid DNA Purification Kit* von Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Das Volumen der Vorkultur war abhängig vom verwendeten Plasmid (*low-* oder *high-copy*) und betrug 5-10 ml. Eluiert wurde mit 35 µl H₂O.

Für die Isolierung größerer DNA-Mengen bis zu 100 µg wurde das *QIAfilter™ Plasmid Midi Kit* (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei betrug das Kulturvolumen 25-100 ml in Abhängigkeit der Plasmideigenschaften. Die so isolierte und gereinigte Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

5.2.7 Restriktionsverdau

Die für den Restriktionsverdau spezifischen Enzyme sind in den entsprechenden Abschnitten angegeben und wurden alle von der Firma New England Biolabs (New England, USA) bezogen.

Die gewünschte DNA-Menge wurde mit dem entsprechenden Puffer und, falls nötig, mit BSA-Lösung versetzt, so dass beide Komponenten im Endvolumen des Restriktionsansatzes 1x konzentriert vorlagen. Es wurden 0,5-10 Enzymeinheiten pro μg DNA verwendet, wobei das zugegebene Enzymvolumen höchstens 10% des Reaktionsvolumens ausmachte, um unspezifische Aktivität zu vermeiden. Die Reaktionsansätze wurden bei der für das jeweilige Enzym angegebene Optimaltemperatur inkubiert, wobei die Dauer zwischen 1 h (analytische Zwecke) und 2-14 h (präparative Zwecke) variierte.

5.2.8 Ligation

Für Ligationsansätze wurde das TaKaRaTM-Ligationskit (Otsu, Japan) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die molaren Verhältnisse von Vektor- und Insert-DNA lagen zwischen 1:3 und 1:10. Der Ansatz wurde mit der entsprechenden Menge Ligations-Mix versetzt und anschließend über Nacht bei 16°C inkubiert. Temperaturzyklische Ligationen mit einer Dauer von 12-16 h wurden mit Hilfe einer PCR-Maschine (PeqLab, Erlangen) durchgeführt, wobei ein zyklischer Wechsel zwischen 10°C und 30°C für jeweils 30 s erfolgte (Lund et al., 1996).

5.2.9 Herstellung elektrokompetenter DH10MultiBac-Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter DH10MultiBac-Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum versetzt und mit 1-5 ml Übernachtskultur angeimpft. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,7. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen sedimentiert (4000 rpm, 15 min, 4°C (Sorvall, SLC-4000)). Das so erhaltene Pellet wurde in 500 ml eiskalter, steriler 10%iger Glycerol-Lösung resuspendiert und die Zellen erneut 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Einer Resuspension des Pellets in 250 ml

10%iger Glycerol-Lösung folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt, dem sich eine wiederholte Resuspension des Pellets in 10 ml 10%iger Glycerol-Lösung anschloss. Einem letzten Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4000 rpm folgte die Resuspension in 1 ml 10%igem Glycerol. Die nun elektrokompenten DH10MultiBac-Zellen wurden aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.10 DNA-Transformation

Die Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli*-Stämme hatte die Amplifikation der DNA (DH5 α und TOP10), die Rekombination und Transposition von Plasmid-DNA in Bacmid-DNA (DH10MultiBac-Zellen) oder die Proteinexpression zum Ziel (BL21 Star).

Dafür wurden 50 μ l der kompetenten Bakterien-Stämme mit 1-4 μ l des Ligationsansatzes und im Falle der Re-Transformation mit 0,1-1 μ g Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 sec bei 37°C (DH5 α) bzw. 30 sec bei 42°C (BL21 Star) oder für 45 sec bei 42°C (TOP10). Nach einer 2 minütigen Inkubation auf Eis, wurden 250 μ l SOC-Medium ohne Antibiotika zugegeben und die Zellen 1 h bei 37°C im Thermoblock geschüttelt. Zuletzt wurde der Ansatz auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und diese bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.2.11 DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer sind in Abschnitt 5.1.12 aufgelistet.

5.2.12 Herstellung rekombinanten MultiBac-Bacmids

Mit Hilfe der generierten Transfervektor-Konstrukte (pFastBacTMHT B) folgte als nächster Schritt deren Transformation in elektrokompente *E. coli* DH10Multi Bac-Zellen, in denen die Rekombination der MultiBac-DNA erfolgte. Über Tn7-Transposition wurde das Gen des pFastBacTMHT B-

Vektors in das MultiBac-Bacmid integriert. Hierbei stellte ein Tn7-Helferplasmid die Transpositionsproteine zur Verfügung, die direkt an der Rekombination beteiligt sind. Eine *miniatt*-Tn7-Sequenz im Bacmid zur Aufnahme des Tn7 Elements vom pFastBacTMHT B Vektor ist innerhalb des LacZ α -Gens lokalisiert, das wiederum eine Blau/Weiß Selektion der Kolonien ermöglichte. In Anwesenheit des lichtempfindlichen Substrats BluoGal und des Induktors IPTG wachsen bei intaktem LacZ α -Gen blaue Kolonien, im Gegensatz dazu entstehen bei erfolgreicher Transposition weiße Kolonien, da das LacZ α -Gen unterbrochen wurde.

Für die Herstellung rekombinanter MultiBac-Bacmide wurden 20-80 μ l elektrokompente Zellen mit 100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser Pulse Controller (BioRad, München) mit 2,0 kV, 200 Ω und 25 μ F durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz in Falcon-Röhrchen überführt, mit 1,5 ml SOC-Medium versetzt und für 20 h bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde der Ansatz komplett auf LB-Agar Platten (BluoGal (100 μ g/ml), IPTG (40 μ g/ml), Kanamycin, Gentamycin, Ampicillin, Tetracyclin (s.5.1.4)) ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

| Bezeichnung | Selektion |
|-------------|--------------------------------|
| IPTG | Induktor (Blau/Weiß-Selektion) |
| BluoGal | Substart (Blau/Weiß-Selektion) |
| Kanamycin | Bacmid |
| Gentamycin | pFastBac TM HT B |
| Ampicillin | Bacmid; Genom DH10 Zellen |
| Tetracyclin | Tn7 Helferplasmid |

5.2.13 Bacmidisolierung

Zur Bacmidisolierung wurde das *PureLinkTM HiPure Plasmid DNA Purification Kit* (Invitrogen, Carlsbad) nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierte Bacmid-DNA zuletzt in 25 μ l H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

5.2.14 Kultivieren von Insektenzellen

Für die rekombinante Proteinexpression wurde die Sf9-Zelllinie verwendet. Diese wurde bei 27°C sowohl adhärent (Monolayer-Kulturen) als auch in Suspension kultiviert. Unter diesen Bedingungen sind Verdoppelungszeiten von 22 h typisch.

5.2.15 Lipo-Transfektion von Sf9-Zellen, Virusamplifikation und Überexpression von Proteinen

Die Herstellung rekombinanter, infektiöser Baculoviren erfolgte durch Transfektion rekombinanter, isolierter Bacmid-DNA in Sf9-Zellen mit Hilfe des Reagens Cellfectin® (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Der so erhaltene Primärvirus wurde durch Infektion von Sf9-Zellen in Suspensionskulturen zur weiteren Virusamplifikation eingesetzt.

Die Expression der Proteine fand bei einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Suspensionskulturen statt und wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels SDS-PAGE (s. 5.3.1) und Western Blot (s. 5.3.3) kontrolliert.

5.2.16 Herstellung von Sf9-Zellhomogenaten

Die Sf9-Zellen der Expressionskulturen wurden in einer Heraeus Megafuge 1.0 (1500 g, 5 min, 4°C) abzentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (1500 g, 5 min, 4°C). Die so erhaltenen Zellpellets wurden schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden die Zellpellets im Wasserbad aufgetaut, in Lysepuffer mit Proteaseinhibitor (50 mM HEPES; pH 7,4; 300 mM KCl; 20 mM Imidazol) resuspendiert und mit 5-7 Passagen durch einen Hochdruck-Zellhomogenisator EmulsiFlex C5 (Avestin, Mannheim) bei einem Druck von 10 000-15 000 psi aufgeschlossen. Das so erhaltene Zellysate wurde dann bei 4°C und 20 000 g für 20 min (Sorvall, SS-34 Rotor) zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen, Zellkerne und grobe Zelltrümmer abzutrennen. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand für 1 h mit 100 000 g bei 4°C (Beckman, 50.2 Ti Rotor) ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde erneut verworfen und der Überstand für die weitere Proteinaufreinigung verwendet (s. 5.3.9 und 5.3.10).

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden SDS-denaturierte Proteine in Abhängigkeit von ihrer Masse unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen getrennt (Laemmli, 1970). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür das *Mini-Protean*[®]-3-System der Firma BioRad (München) verwendet. Die dabei eingesetzten Trenngelle bestanden aus 7,5-15% Acrylamid, das Sammelgel aus 4% Acrylamid. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V gestartet und diese nach Erreichen des Trenngels auf 200 V erhöht. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit der entsprechenden Menge 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert.

| Sammelgel | H ₂ O (ml) | 1,5 M Tris, pH 6,8 (ml) | 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (ml) | 10% APS (µl) | 10% SDS (µl) | TEMED (µl) |
|-----------|--------------------------|-------------------------------|--|--------------------|--------------------|---------------|
| 4% | 1,5 | 0,625 | 0,325 | 25 | 25 | 5 |

| Trenngel | H ₂ O (ml) | 1,5 M Tris, pH 8,8 (ml) | 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) (ml) | 10% APS (µl) | 10% SDS (µl) | TEMED (µl) |
|----------|--------------------------|-------------------------------|--|--------------------|--------------------|---------------|
| 7,5% | 2,43 | 1,25 | 1,25 | 50 | 50 | 5 |
| 10% | 2,02 | 1,25 | 1,65 | 50 | 50 | 5 |
| 12% | 1,67 | 1,25 | 2,0 | 50 | 50 | 5 |
| 15% | 1,18 | 1,25 | 2,5 | 50 | 50 | 5 |

| 1x SDS-Laufpuffer | 4x SDS-Probenpuffer |
|------------------------|-----------------------------|
| 25 mM Tris-HCl, pH 8,3 | 187,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 |
| 250 mM Glycin | 6%(w/v) SDS |
| 0,1% (v/v) SDS | 15% (v/v) β-Mercaptoethanol |
| | 30% (v/v) Glycerin |
| | 0,0675% Bromphenolblau |

5.3.2 Anfärbung von Proteinen

Zur Darstellung der Proteinverteilung wurden die Gele 20-30 min bei Raumtemperatur (RT) in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend bis zum gewünschten Kontrast ebenfalls bei Raumtemperatur entfärbt.

| Coomassie-Färbelösung | Entfärbelösung |
|---------------------------------|-----------------------|
| 40% Ethanol (v/v) | 20% Ethanol (v/v) |
| 10% Essigsäure (v/v) | 5% Essigsäure (v/v) |
| 0,25% Coomassie Blue R250 (w/v) | |

5.3.3 Western Blot (WB)

Der Western Blot dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörper. Der Proteinnachweis erfolgt durch Immunreaktion von Antikörper und Antigen (Protein) und anschließender Detektion durch Fluoreszenz (s.5.1.8). Dazu werden die Proteine erst mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt und anschließend im Nass-Blot Verfahren auf eine Immobilon-P-PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) transferiert.

Für den Proteintransfer wurde das Nass-Blot Verfahren mit Hilfe des *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell System* (Biorad) entsprechend Herstellerangaben durchgeführt. Die Immobilon-P-PVDF-Membran (kurz: PVDF-Membran) wurde dafür in Methanol konditioniert und anschließend in 1x Blot-Puffer (s. Tabelle) getränkt. Der Transfer auf die PVDF-Membran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h. Wurde als Proteingrößen-Standard der BMW-Marker verwendet, so wurde die PVDF-Membran anschließend kurz in Ponceau-S Lösung inkubiert, anschließend mit H₂O entfärbt, bis der gewünschte Kontrast erreicht war und die BMW-Markerbanden markiert. Zuletzt wurde die Ponceau-Färbung der PVDF-Membran mit H₂O völlig entfernt.

| 1x Blot-Puffer | Ponceau-S Lösung |
|-----------------------|-------------------------|
| 25 mM Tris | 0,05% (w/v) Ponceau-Rot |
| 200 mM Glycin | 4% (w/v) TCA |
| 25% Methanol (v/v) | |

Für die nun folgende Immunreaktion mit spezifischen Antikörpern wurde die PVDF-Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS (s. 1.1.3) blockiert. Anschließend

wurde die PVDF-Membran 10 min mit PBS-T gewaschen und dann 1 h mit den spezifischen Primärantikörpern inkubiert. Diese wurden wie unter 5.1.7 angegeben mit 1% BSA in PBS-T verdünnt und bei -20°C gelagert. Die Membran wurde 3x für jeweils 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend 30 min mit der Verdünnung des entsprechenden Sekundärantikörpers inkubiert (s. 5.1.8). Nach 3 weiteren Waschschrritten mit PBS-T für je 5 min wurde die PVDF-Membran zuletzt für 10 min in PBS inkubiert. Die Detektion des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers wurde mit Hilfe des *Odyssey® Infrared Imaging Systems* (LI-COR® Biosciences, Bad Homburg) mit Hilfe der *Application Software Version 2.1* durchgeführt.

5.3.4 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) mit Bradford-Reagenz der Firma BioRad (München) entsprechend Herstellerangaben durchgeführt. Die zu untersuchende Probe wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl gebracht und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Anschließend wurden die Proben gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Eichgerade wurden BSA-Proben mit Konzentrationen von 0 bis 25 µg/ml verwendet. Die Absorption wurde bei 620 nm im *ELISA-Microplate Reader* (Rosys Anthos, Salzburg) gemessen.

5.3.5 Präparation von humanem, myristoyliertem Arf1

E. coli BL21 Star Zellen wurden mit dem Konstrukt pRSF-Duet-NMT/hARF#2 (s. 5.1.11) transformiert und auf LB-Agar Platten mit Kanamycin ausplattiert. Eine Vorkultur mit 1 L NZCYM-Medium (Sigma-Aldrich®, Deisenhofen) wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Mit jeweils 330 ml Vorkultur wurden anschließend 6x 2 L NZCYM-Medium angeimpft und dieses bei 27°C und 200 rpm (New Brunswick Scientific, innova™ 4330) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert.

Nun erfolgte die Zugabe von 10 ml Myristinsäurelösung (37°C) pro Liter Medium und 5 Minuten später die Induktion der Proteinexpression durch IPTG Zugabe (0,3 mM Endkonzentration). Nach 4 h, bei einer OD₆₀₀ von etwa 1,8, wurden die Zellen bei 4000 rpm für 20 min pelletiert (Sorvall, SLC-6000 Rotor). Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets einmal mit PBS

gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden die Bakterienpellets im Wasserbad aufgetaut, in 50 ml Aufschlusspuffer A resuspendiert und mit 5-7 Passagen durch den *EmulsiFlex C5* homogenisiert. Zur Abtrennung der Membranen wurde das Homogenat mit 20 000 g für 20 min bei 4°C (Sorvall, SS-34 Rotor) zentrifugiert und anschließend der Überstand für 1 h bei 100 000 g ultrazentrifugiert (Beckman, 50.2 Ti Rotor). Der nun klare Überstand wurde mit Puffer B auf genau 200 ml aufgefüllt, das Pellet verworfen.

Für die nun folgende Ammoniumsulfatpräzipitation (ASP) wurde unter leichtem Rühren auf Eis innerhalb von 45 min langsam eine Ammoniumsulfatkonzentration von 35% eingestellt. Für den 200 ml Ansatz wurden dafür genau 38,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fein pulverisiert und die erste Hälfte innerhalb der ersten 15 min, die zweite Hälfte innerhalb der nächsten 30 min zugegeben. Anschließend wurde für eine weitere Stunde auf Eis gerührt und das Präzipitat für 20 min bei 8000 g abzentrifugiert (Sorvall, SLC-1500 Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5-10 ml Puffer C resuspendiert. Die Leitfähigkeit wurde mit Hilfe von PD-10 Säulen (GE Healthcare, München) auf unter 2 mS/cm gebracht. Dazu wurden die PD-10 Säulen nach Herstellerangaben mit PD10 Puffer D equilibriert und pro Säule 2,5 ml resuspendiertes ASP-Pellet geladen. Die Elution erfolgte mit jeweils 3,5 ml PD-10 Puffer D. Je 7 ml Eluat wurden anschließend mit 3 ml H_2O verdünnt.

Eine 5 ml HiTRAP-DEAE-FF Säule (Amersham/GE Healthcare, München) wurde mit 15 ml Equilibrierungspuffer E, 25 ml PD-10 Puffer D, 25 ml Elutionspuffer F und gefolgt von 25 ml PD-10 Puffer D bei einer Flussrate von 0,5 ml/min equilibriert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Leitfähigkeit stabil unter 2 mS/cm lag und sich ein pH Wert von 8,0 einstellte. Das Eluat wurde mit 0,5 ml/min auf die Säule geladen, wobei pro Durchlauf nie mehr als 10 ml verwendet wurden, um ein Überladen der Säule zu verhindern. Nicht gebundenes Protein wurde mit 3-5 Säulenvolumen PD-10 Puffer D von der Säule gewaschen bis die Absorption bei 280 nm wieder den Basiswert erreicht hatte. Gebundenes Protein wurde durch einen linearen Gradienten von 100% PD-10 Puffer D zu 100% Puffer F in 50 ml bei einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert und Fraktionen von 500 μl gesammelt. Pro Fraktion wurden 5 μl durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft und die entsprechenden Fraktionen vereint. Aliquots von

30-50 µg myristoyliertem Arf1 wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

| | |
|---|---|
| Aufschlusspuffer A | Puffer B |
| 50 mM Tris-HCl, pH 8 bei 4°C 1 mM DTT 1 mM MgCl ₂ 1 mM PMSF 0,4 µg/ml Pepstatin A 1/ 50 ml Proteaseinhibitor Tablette (Roche) | 50 mM Tris-HCl, pH 8 bei 4°C 1 mM DTT 1 mM MgCl ₂ |
| PD-10 Puffer D | Equilibrierungspuffer E |
| 10 mM Tris-HCl, pH 8 bei 4°C 1 mM DTT 1 mM MgCl ₂ | 250 mM Tris-HCl, pH 8 bei 4°C 1 mM DTT 1 mM MgCl ₂ |
| Elutionspuffer F | |
| 10 mM Tris-HCl, pH 8 bei 4°C 1 mM DTT 1 mM MgCl ₂ 1 M KCl | |

5.3.6 Aufreinigung von NΔ17Arf1-GDP

E. coli BL21-Star Zellen wurden mit dem Konstrukt pET15b NΔ17Arf1 (s. 5.1.11) transformiert und auf LB-Agar Platten mit Kanamycin ausplattiert. 5 ml Vorkulturen LB-Medium mit Ampicillin wurde mit Einzelkolonien beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit jeweils 4 ml Vorkultur wurden dann 3x 2 L LB-Medium angeimpft und diese bei 37°C und 200 rpm (New Brunswick Scientific, innova™ 4330) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression mit IPTG (0,1 mM Endkonzentration) induziert. Nach einer 4stündigen Inkubation bei 37°C, wurden die Zellen bei 4000 rpm und 4°C für 20 min pelletiert (Sorvall, SLC-6000 Rotor), mit PBS gewaschen und erneut für 20 min bei 4000 rpm (Heraeus, 2704 Rotor) sedimentiert. Die Bakterienpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Bakterienpellets wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 36 ml Lyse-Puffer (s.u.) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte am

EmulsiFlex C5 Homogenisator mit 5-10 Passagen bei 10 000 psi. Anschließend wurde das Homogenat mit 20 000 g für 20 min bei 4°C (Sorvall, SS-34 Rotor) zentrifugiert. Nun folgte ein Ultrazentrifugationsschritt für 1 h bei 100 000 g und 4°C (Beckman, 50.2 Ti Rotor).

Währenddessen wurden 2,3 ml *Nickel-SepharoseTM High performance* (GE Healthcare, Uppsala, kurz: Ni-Sepharose) 5 min bei 500 rpm pelletiert (Heraeus, 2704 Rotor) und anschließend 3x mit je 50 ml Wasch-Puffer gewaschen. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde nun mit der Ni-Sepharose für 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz langsam in ein 5 ml Einmalsäulchen (BioRad, München) überführt, wobei sich die Ni-Sepharose zusammen mit dem gebundenen N Δ 17Arf1 vom Durchlauf abtrennte. Mit je 50 ml Wasch-Puffer wurden die Ni-Sepharose nun 2x gewaschen und das gebundene N Δ 17Arf1 schließlich mit 4 ml Elutionspuffer eluiert. Die Qualität der N Δ 17Arf1 Aufreinigung wurde anhand von SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bestimmt (s.5.3.1 und 5.3.2). Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde eine quantitative Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (s. 5.3.4).

Da N Δ 17Arf1 sowohl in der GDP- als auch in GTP-gebundener Form löslich ist, wurde im Anschluss an die Proteinaufreinigung ein EDTA-*switch* zu GDP durchgeführt. Dafür wurde N Δ 17Arf1 mit einem 200x molaren Überschuss an GDP in Gegenwart von 10 mM EDTA für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Gelfiltration wurde anschließend freies Nukleotid von N Δ 17Arf1-GDP abgetrennt (s. 5.3.9).

| Lyse-Puffer | Wasch-Puffer |
|---|---------------------|
| 50 mM HEPES; pH 7,4 | 50 mM HEPES; pH 7,4 |
| 300 mM KCl | 300 mM KCl |
| 30 mM Imidazol | 50 mM Imidazol |
| 1 mM DTT | 1 mM DTT |
| 1/50 ml Protease-Inhibitor Tablette (Roche) | |
| Elutions-Puffer | |
| 50 mM HEPES; pH 7,4 | |
| 300 mM KCl | |
| 250 mM Imidazol | |

5.3.7 Aufreinigung von monomeren und dimeren Thioredoxin-p24 Fusionsproteinen (Trx- p24 Fusionsproteine)

Für die monomeren Trx-p24 Konstrukte wurde der *E. coli* Bakterienstamm BL21 Star, für die dimeren Trx-p24 Konstrukte der Stamm Origami2 mit dem entsprechendem pET-32-Trx-cytoplasmic tail p24 family Plasmid (s. 5.1.11) transformiert. Mit den gewachsenen Einzelkolonien wurden 5 ml LB-Vorkulturen angeimpft und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Proteinexpression, der Zellaufschluss und die eigentliche Proteinaufreinigung mit Hilfe von Ni-Sepharose wurden wie unter 5.3.6 beschrieben durchgeführt.

Sofort nach der Proteinaufreinigung wurden monomere Trx-p24 Fusionsproteine unter Verwendung von PD-10 Säulen nach Herstellerangaben in 50 mM HEPES; pH 7,4; 300 mM NaCl; 90 mM KCl; 2 mM EDTA und 10% (w/v) Glycerol umgepuffert. Dimere Trx-p24 Fusionsproteine wurden mit Hilfe einer präparativen Gelfiltration (s. 5.3.8) von monomeren, also nicht dimerisierten Fusionsproteinen, abgetrennt.

5.3.8 Gelfiltration von N Δ 17Arf1 und dimeren Trx-p24 Fusionsproteinen

Die Gelfiltration wurde mit dem Ettan LC FPLC-System unter Verwendung einer *Hi Load 16/26 Superdex 75 prep grade* (dimere Trx-p24 Fusionsproteine) oder einer Sephacryl S-300 Säule (N Δ 17Arf1), (GE Healthcare, München) durchgeführt. Die Säule wurde mit Gelfiltrationspuffer (s.u.) äquilibriert und anhand eines Gelfiltrationsstandards (s. 5.1.9) kalibriert. Dann wurde die Probe auf die Säule geladen und die Proteine bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt. Zum Zeitpunkt der Elution wurden 300 μ l Fraktionen gesammelt und diese anschließend gelelektrophoretisch untersucht. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint und eine quantitative Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (s. 5.3.4) durchgeführt. Aliquots geeigneter Größe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

| Gelfiltrationspuffer (bei Trx-p24 Fusionsproteine) | Gelfiltrationspuffer (bei NΔ17Arf1) |
|--|---|
| 50 mM HEPES; pH 7,4 300 mM NaCl 90 mM KCl 2 mM EDTA 10% (w/v) Glycerol | 50 mM HEPES; pH 7,4 150 mM KCl 2 mM MgCl ₂ |

5.3.9 Aufreinigung von rekombinantem Coatomer

Ungefähr $2,5 \times 10^6$ infizierte Sf9-Zellen wurden zur Herstellung von Sf9-Zellhomogenaten verwendet (s. 5.2.16). Parallel dazu wurden 3 ml Ni-Sepharose 5 min bei 500 rpm pelletiert (Heraeus, 2704 Rotor) und anschließend 3x mit je 50 ml Wasch-Puffer gewaschen. Der klare Proteinüberstand (s. 1.2.16) wurde nun mit der Ni-Sepharose für 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 3 min bei 1100 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus, 2704 Rotor). Der Überstand wurde verworfen und die Ni-Sepharose mit dem über His₆-Tag gebundenem Protein 3x mit 5fachem Volumen Waschpuffer gewaschen. Dabei wurde jeweils für 3 min bei 1100 rpm und 4°C zentrifugiert. Schließlich wurden die Ni-Sepharose in 5 ml Einmalsäulchen überführt und der daran gebundene, rekombinante Coatomer durch Zugabe von 2-8 ml Elutionspuffer eluiert. Es wurden Fraktionen von je 500 µl gesammelt und diese mit Hilfe von SDS-PAGE analysiert (s. 5.3.1). Fraktionen, die anhand der Gele den größten Reinheitsgrad aufwiesen, wurden in einem Pool vereint und unter Verwendung von PD-10 Säulen entsprechend Herstellerangaben in PD-10 Puffer umgepuffert. Aliquots von maximal 100 µl Volumen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

| Lysepuffer | Wasch und Elutionspuffer | PD-10 Puffer |
|--|--|--|
| 50 mM HEPES; pH 7,4 300 mM NaCl 20 mM Imidazol 1 mM DTT 1/50 ml Protease-Inhibitor Tablette (Roche) | 50 mM HEPES; pH 7,4 300 mM NaCl 20 mM; 250 mM Imidazol 1 mM DTT | 50 mM HEPES; pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM DTT |

5.3.10 Aufreinigung von rekombinantem GBF1

Ungefähr 5×10^6 infizierte Sf9-Zellen wurden in 50 ml Lysepuffer aufgenommen und davon, wie unter s. 5.2.16 beschrieben, Zellhomogenate hergestellt. Parallel dazu wurden 4,5 ml Ni-Agarose (Quiagen) für 5 min bei 500 rpm pelletiert (Heraeus, 2704 Rotor) und 3x mit je 50 ml Wasch-Puffer gewaschen. Die Ni-Agarose wurde zusammen mit dem Überstand der letzten Zentrifugation (s. 5.2.16) für mindestens 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht-gebundenes Protein wurde von der Ni-Agarose durch Zentrifugation (5 min, 500 rpm, 4°C (Heraeus, 2704 Rotor)) abgetrennt und verworfen. Im Anschluss daran wurde die Ni-Agarose mit dem über His₆-Tag gebundenen Protein 2x mit 50 ml Waschpuffer für 3 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert, jeweils gefolgt von einem 5minütigen Zentrifugationsschritt mit 500 rpm bei 4°C (Heraeus, 2704 Rotor). Zur Elution von GBF1 wurden 5 ml Elutionspuffer zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Schließlich wurde dieser in ein 5 ml Einmalsäulchen überführt und 500 µl Fraktionen gesammelt. Proben dieser Fraktionen wurden auf 10%igen SDS-Gelen analysiert und solche, die den größten Reinheitsgrad aufwiesen in einem Pool vereint. Unter Verwendung von PD-10 Säulen nach Herstellerangaben wurde GBF1 anschließend in PD-10 Puffer umgepuffert. Danach wurden Aliquots von maximal 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

| Lysepuffer | Wasch- und Elutionspuffer | PD-10 Puffer |
|--|---------------------------|---------------------|
| 25 mM HEPES; pH 7,4 | 25 mM HEPES; pH 7,4 | 25 mM HEPES; pH 7,4 |
| 150 mM KCl | 150 mM KCl | 150 mM KCl |
| 10 mM Imidazol | 20 mM; 250 mM Imidazol | 1 mM DTT |
| 1 mM DTT | 1 mM DTT | |
| 1/50 ml Protease-Inhibitor Tablette (Roche) | | |

5.3.11 Photokreuzvernetzungs- und Kompetitions-Experimente

In einem typischen Photokreuzvernetzungs-Versuch wurden jeweils 2 µg GBF1, ARNO, die Sec7 Domäne von ARNO oder Kontrollproteine mit dem

photolabilen Peptid p23-CT* (35 μM Endkonzentration) in HKM_2 in einem Gesamtvolumen von 20 μl für 30 min bei 25°C inkubiert.

Bei Kompletions-Experimenten wurde 1 μM GBF1 15 min bei 25°C mit monomeren oder dimeren Peptidanaloga der cytoplasmatischen Domäne der p24- und Kontrollproteine in der angegebenen Konzentration vorinkubiert. Die Photoaktivierung erfolgte auf Eis für 2 min, mit einer Belichtung bei 365 nm, einer Entfernung zur Strahlungsquelle von 12 cm und einer Bestrahlungsintensität von ca. 4,6 W/cm^2 . Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit p23-spezifischen Antikörpern (#1402, s. 5.1.7) analysiert. Die Quantifizierung der Western Blot Signale wurde am *Odyssey[®] Infrared Imaging Systems* durchgeführt.

HKM_2 : 150 mM KCl; 25 mM HEPES pH 7,4; 2 mM MgCl_2

5.3.12 Immunpräzipitations-Experimente: GBF1 und Trx-p24 Fusionsproteine

Alle in diesem Experiment verwendeten Proteine wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung für 15 min bei 45 000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert (Beckman, TLA-45 Rotor) und die Proteinkonzentration danach erneut kontrolliert (s. 5.3.4).

Für jeden Immunpräzipitations (IP)-Ansatz wurden 25 μg GBF1 1.4 Antikörper (s. 5.1.7) mit 20 μl einer mit IP-Puffer äquilibrierten, sedimentierten 1:1-Mischung aus Protein A beads und CL4B-Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit jeweils 500 μl CoIP-Puffer, jeweils gefolgt von einer Zentrifugation bei 500 rpm für 3 min (Eppendorf, Tischzentrifuge).

Pro IP-Ansatz wurden nun 25 μg rekombinantes GBF1 zugegeben, mit CoIP-Puffer auf insgesamt 200 μl Volumen aufgefüllt und für 1 - 1,5 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch dreimaliges Waschen mit je 500 μl CoIP-Puffer entfernt (500 rpm, 3 min (Eppendorf, Tischzentrifuge)).

Nun wurden Trx-p24 Fusionsproteine und $\text{N}\Delta 17\text{Arf1}$ in der angegebenen Konzentration zugegeben, das Gesamtvolumen wieder auf 200 μl gebracht und die Ansätze eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch 3 Waschschrte mit je 500 μl CoIP-Puffer und einem Waschschrte mit CoIP-Puffer (ohne Ov, KCl, NP-40) entfernt.

Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 20 µl 2x Propenpuffer und 5minütiges Erhitzen auf 95°C eluiert. Die Proben wurden anschließend via SDS-PAGE und Western Blot mit Thioredoxin, Arf1 und GBF1-spezifischen Antikörpern (s. 5.1.7) analysiert.

| CoIP-Puffer | CoIP-Puffer (ohne Ov, KCl, NP-40) |
|------------------------|-----------------------------------|
| 25 mM Tris-HCl; pH 7,4 | 25 mM Tris-HCl; pH 7,4 |
| 150 mM KCl | 1 mM EDTA |
| 1 mM EDTA | |
| 0,5% NP-40 | |
| 2 mg/ml Ovalbumin | |

5.3.13 Immunpräzipitations-Experimente: GBF1 und Coatomer-Isotypen

Die Immunpräzipitations-Experimente von GBF1 und CM-Isotypen wurden wie unter 5.3.12 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden hier je IP-Ansatz 20 µl 1:1-Mischung aus Protein A beads und CL4B-Sepharose mit 25 µg CM1 Antikörper (J. E. Rothman) und 25 µg rekombinantes Coatomer inkubiert.

Anschließend wurde rekombinantes GBF1 im 10x molaren Überschuss zugegeben und der Gesamtansatz mit CoIP-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Nun wurde für 1-1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elution erfolgte in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer und Erhitzen (5 min, 95°C). Alle Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE mit 7,5%igen Gelen und Western Blots mit GBF1- und Coatomer-Isotypen spezifischen Antikörpern analysiert.

CoIP-Puffer: 25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM KCl; 1 mM EDTA; 0,5% NP-40; 0,5% (w/v) BSA

5.3.14 Herstellung von Golgi-like Liposomen

Die in dieser Arbeit verwendeten Lipide stammen alle von *Avanti Polar Lipids* (Anabaster, Alabama, USA). Für die Herstellung des Golgi-like Mixes (Bigay et al., 2003) wurden die entsprechenden Volumina der Lipid-Komponenten gemischt und das Gemisch anschließend mit Chloroform auf 4 ml

Gesamtvolumen gebracht, so dass eine Endkonzentration von 3 mM vorlag. Der Lipid-Mix wurde mit Argon überschichtet und bei -20°C gelagert.

Für die Herstellung von *Golgi-like* Liposomen wurde die gewünschte Menge *Golgi-like* Lipid-Mix in einem Spitzkolben mit Chloroform verdünnt und anschließend das Chloroform am Rotationsverdampfer (Laborola 4001, Heidolph Instruments) komplett mit 50 mPa, 90 rpm bei 37°C verdampft. Nach einer weiteren Inkubation von 15-30 min, bei 90 rpm und 50 mPa wurde der getrocknete Lipidfilm in HKM₂-Puffer (s. 5.3.11) resuspendiert. Zur Generierung unilamellarer Liposomen wurden 10 Zyklen Schockgefrieren im Trockeneis/Ethanol Bad und anschließendem schnellen Erwärmen im 37°C Wasserbad durchgeführt. Danach wurde die Liposomen-Lösung 21 mal durch einen Extruder mit 100 nm Filtern (Avestin Europe GmbH) gepresst, um Liposomen definierter Größe herzustellen. Die Liposomengröße wurde schließlich durch DLS-Messung überprüft.

| Bezeichnung | mol% | MW (Da) | Stocklösung (mg/ml) |
|---------------------------------------|------|------------|------------------------|
| PC (<i>liver</i>) | 50 | 786,12 | 20 |
| PE (<i>liver, bovine</i>) | 19 | 768,06 | 25 |
| PS (<i>brain, porcine</i>) | 5 | 812,05 | 10 |
| PI (<i>liver, bovine</i>) | 10 | 909,12 | 10 |
| Cholesterin (<i>brain, porcine</i>) | 16 | 386,66 | 10 |
| +/- DOGS-Ni-NTA | 5 | 1057,02 | 10 |
| +/- Rhodaminlipid | 1 | 1249,65 | 1 |

5.3.15 Tryptophan Fluoreszenz Messungen

In Arf1-GDP liegen sich die Tryptophane W66 und W78 räumlich sehr nahe, wodurch ein gegenseitiges Quenchen des Fluoreszenzsignals eintritt (Ex 297,5 nm und Em bei 340 nm). Beim Nukleotidaustausch zu GTP kommt es zu einer Konformationsänderung in Arf1, wobei eine größere Distanz zwischen den beiden Tryptophanen entsteht. Dadurch geht der Effekt der gegenseitigen Auslöschung verloren und ein Anstieg des Fluoreszenzsignals ist detektierbar (Amor et al., 1994).

Alle Tryptophan Fluoreszenz Messungen wurden am Fluorometer der Firma Jasco durchgeführt. Dabei wurde eine Quarzküvette verwendet und der Ansatz unter ständigem Rühren mit 300-400 rpm bei konstant 37°C inkubiert. Alle Lösungen wurden bei geschlossenem Proberaum in einer

Hamilton-Spitze zugegeben, wobei mit einem Endvolumen von 600 μl gearbeitet wurde. Bei Messungen im komplett löslichen System (ohne Liposomen) wurde N Δ 17Arf1-GDP in einer Endkonzentration von 0,5 μM mit 100 μM GTP inkubiert. Der Austausch wurde entweder mit 4 mM EDTA oder 200 nM GBF1 gestartet. Die Messdauer betrug 1000 sec.

Im liposomalen System wurden zusätzlich 200 μM Liposomen \pm 5 mol% DOGS-Ni-NTA und wenn nicht anders angegeben 20 nM GBF1 verwendet. Hier betrug die Messdauer 1500 sec.

Monomere oder Dimere Peptide wurden in der Endkonzentration von 50 μM zugegeben.

5.3.16 Bindung an Golgi-Membranen/ Bindung an Liposomen

Alle in diesem Experiment verwendeten Proteine wurden unmittelbar vor Verwendung 15 min bei 45 000 rpm und 4°C ultrazentrifugiert (Beckman, TLA45 Rotor).

Bindung an Golgi-Membranen

Nicht Salz-gewaschener Rattenleber-Golgi (10-20 μg) wurde mit myrArf1 (2,5-3 μg), GBF1 (5-10 μg) und GDP, GTP oder GTP γ S (je 125 μM) in einem Gesamtvolumen von 200 μl für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In SW55-Röhrchen (Beckman, USA) wurden 300 μl 20% Saccharose (w/v) vorgelegt und diese anschließend mit jeweils einem Versuchsansatz überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12 000 rpm, für 20 min bei 4°C (Beckman, SW55 Rotor). Der Überstand wurde komplett abgenommen und verworfen, das Golgi-Pellet mit den daran gebundenen Proteinen in 20 μl HK-Puffer (25 mM HEPES pH 7,4; 150 mM KCl) resuspendiert und mit 5 μl 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach Erhitzen der Proben (95°C, 5 min) wurden alle Ansätze durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Bindung an Liposomen

In einem Gesamtansatz von 200 μl wurden Rhodamin-Liposomen (0,2 mM; s. 1.3.14) mit myrArf1 (0,25 μM), GTP γ S (125 μM), EDTA (4 mM) und p23 Peptid (50 mM und 150 μM) für 20 min im 37°C Wasserbad inkubiert. Durch Hinzufügen von 120 μl 75%iger Saccharose wurden die Ansätze dann auf

eine Endkonzentration von 30% Saccharose eingestellt und anschließend in SW55-Röhrchen (Beckman, USA) überführt. Dort wurden sie mit 200 µl 25%iger Saccharose und 50 µl HKM₂ (s. 1.3.14) überschichtet und bei 45 000 rpm, für 1 h bei 4°C (Beckman, SW55 Rotor) zentrifugiert. Die flotierten Liposomen wurden nun von oben abgenommen (ca. 100 µl) und durch SDS-PAGE und Western Blot weiter untersucht. Dabei wurde eine quantitative Bestimmung der abgenommenen Liposomenmenge am *SPECTRAMax GEMINI XS ROM* (Rhodamin: Ex 544 nm und Em bei 590 nm) durchgeführt.

5.3.17 Präparative Methoden

5.3.17.1 Isolierung von Golgi aus Rattenleber

Die Isolierung von Golgi aus Ratte erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Hui et al., 1998). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Sechs männliche Wistar Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g wurden für sechs Stunden auf Hunger gesetzt. Anschließend wurden die Tiere mit Diethylether narkotisiert, durch zervikale Dislokation getötet und die Leber entnommen. Diese wurde nun zweimal mit Puffer A gewaschen, mit einer Schere zerkleinert und erneut in Puffer A gewaschen. Der Puffer wurde durch Verbandsmull möglichst quantitativ abfiltriert und die Leberstückchen auf einem Stahlsieb (d = 150 µm) mit leichtem Druck zerrieben. Das Homogenat wurde dabei mit 25 ml Homogenisierungspuffer gemischt. Je 13 ml davon wurden auf Gradienten von 7,5 ml 38% Saccharose und 13 ml 26,5% Saccharose gesetzt und anschließend 3 ml 9% Saccharose überschichtet. Nach einer 1stündigen Zentrifugation bei 100 000 g (Beckman, SW-28 Rotor) wurde der Golgi in der Interphase bei 26,5% Saccharose abgenommen. Diese so gewonnene Interphase wurde mit Puffer B auf 9-10% Saccharose eingestellt und anschließend je ¼ über einen zweiten Gradienten mit der Zusammensetzung geschichtet: 500 µl 38%; 150 µl 26,5% und 750 µl 12%. Nun wurde für 20 min bei 6000 g zentrifugiert (Beckman, SW41 Rotor) und die weiße Schicht aus Golgi mit einer Konzentration von 5-7 mg/ml in der Interphase zwischen 26,5% und 12% abgenommen. Der so isolierte Golgi wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

| Homogenisierungspuffer (pH 6,7) | Puffer A (pH 6,7) | Puffer B (pH 6,7) |
|--|--|--|
| 0,1 M Kaliumphosphatpuffer 0,5 M Saccharose 5 mM MgCl ₂ 1 mM PMSF 4 µg/ml Pepstatin A 1/50 ml Protease-Inhibitor Tablette (Roche) | 0,1 M Kaliumphosphatpuffer 0,5 M Saccharose 5 mM MgCl ₂ | 0,1 M Kaliumphosphatpuffer 5 mM MgCl ₂ |

9%, 12%, 26,5%, 38% Saccharoselösung (pH 6,7): 0,1 M Kaliumphosphatpuffer; 0,25 M; 0,36 M; 0,86 M; 1,3 M Saccharose; 5 mM MgCl₂

5.3.17.2 Vesikel Präparation

Die *in vitro* Generierung von COPI-Vesikeln erfolgte nach einem Protokoll von R. Beck (Beck, under review 2008).

Hierfür wurden 800 µg isolierte Golgi-Membranen mit KCl versetzt, so dass dieses in einer Endkonzentration von 500 mM vorlag und anschließend der Gesamtansatz mit 1x VP-Puffer auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurden jeweils 500 µl Ansatz in einem TLA-45 Reaktionsgefäß (Beckman) überführt und mit 150 µl 17%iger und 100 µl 23%iger Saccharose unterschichtet. Nun wurden die Ansätze für 20 min bei 15 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman, TLS-55 Rotor), der Überstand abgenommen und das Pellet in 350 µl 23%iger Saccharose resuspendiert.

Dieser so Salz-gewaschene Golgi wurde mit myrArf und Coatomer in Gegenwart von GTP (Gesamtansatz s. unten) für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Reaktion durch 10minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Die Salzkonzentration wurde nun durch Zugabe von KCL auf 250 mM erhöht, um die entstandenen Vesikel von den Membranen abzulösen. Die Ansätze wurden anschließend 5 min bei 13 000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert und die Überstände in SW55-Röhrchen (Beckman, USA) überführt. Nun wurden diese mit 50 µl 37,5%iger, und 10 µl 50%iger Saccharose unterschichtet und anschließend 50 min bei 32 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman, SW55 Rotor). Direkt über der 50%igen Saccharose-Schicht wurden nun Vesikel-Fractionen (je 10 µl) vorsichtig abgenommen und mit 5 µl 4x Probenpuffer versetzt. Abschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

| Komponente | Volumen (μl) |
|---|------------------------------------|
| 10x Assaybuffer (250 mM HEPES; pH 7,0; 25 mM MgAc) | 25 |
| DTT (0,1 M) | 0,6 |
| Sucrose (2 M) | 10,7 |
| KCl (3 M) | 8,3 |
| Coatomer-Isotypen-Mix | 25 μ g |
| Golgi-Membranen | 125 μ g |
| myrArf1 | 10 μ g |
| GTP (10 mM) | 2,5 |
| H ₂ O | ad 250 |

6 Literaturverzeichnis

- Abeijon, C., and C.B. Hirschberg. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 17:32-6.
- Alvarez, C., R. Garcia-Mata, E. Brandon, and E. Sztul. 2003. COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 14:2116-27.
- Amor, J.C., D.H. Harrison, R.A. Kahn, and D. Ringe. 1994. Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature.* 372:704-8.
- Anderl, F. 2008. Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionen der kleinen GTPase Arf1 während der COPI Vesikel-Biogenese. *Dissertation.*
- Anders, N., and G. Jurgens. 2008. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci.*
- Antony, B., S. Beraud-Dufour, P. Chardin, and M. Chabre. 1997. N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry.* 36:4675-84.
- Aoe, T., E. Cukierman, A. Lee, D. Cassel, P.J. Peters, and V.W. Hsu. 1997. The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *EMBO J.* 16:7305-16.
- Bannykh, S.I., and W.E. Balch. 1998. Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments. *Histochem Cell Biol.* 109:463-75.
- Barlowe, C., C. d'Enfert, and R. Schekman. 1993. Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 268:873-9.
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M.F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 77:895-907.
- Barlowe, C., and R. Schekman. 1993. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature.* 365:347-9.
- Beck, R., Adolf, F., Weimer, C., Bruegger, B., Wieland, F. under review 2008. ArfGAP1 activity and COPI vesicle biogenesis.
- Beck, R., Z. Sun, F. Adolf, C. Rutz, J. Bassler, K. Wild, I. Sinning, E. Hurt, B. Brugger, J. Bethune, and F. Wieland. 2008. Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:11731-6.
- Beraud-Dufour, S., S. Robineau, P. Chardin, S. Paris, M. Chabre, J. Cherfils, and B. Antony. 1998. A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J.* 17:3651-9.

- Bethune, J., M. Kol, J. Hoffmann, I. Reckmann, B. Brugger, and F. Wieland. 2006. Coatamer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Mol Cell Biol.* 26:8011-21.
- Bigay, J., J.F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, and B. Antonny. 2005. ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *Embo J.* 24:2244-53.
- Bigay, J., P. Gounon, S. Robineau, and B. Antonny. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature.* 426:563-6.
- Blagitko, N., U. Schulz, A.A. Schinzel, H.H. Ropers, and V.M. Kalscheuer. 1999. gamma2-COP, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome. *Hum Mol Genet.* 8:2387-96.
- Blobel, G., and B. Dobberstein. 1975a. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol.* 67:835-51.
- Blobel, G., and B. Dobberstein. 1975b. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol.* 67:852-62.
- Blobel, G., and V.R. Potter. 1967a. Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. I. Distribution as related to total cellular RNA. *J Mol Biol.* 26:279-92.
- Blobel, G., and V.R. Potter. 1967b. Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. II. Interaction of ribosomes and membranes. *J Mol Biol.* 26:293-301.
- Boehm, M., and J.S. Bonifacino. 2001. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell.* 12:2907-20.
- Bremser, M., W. Nickel, M. Schweikert, M. Ravazzola, M. Amherdt, C.A. Hughes, T.H. Sollner, J.E. Rothman, and F.T. Wieland. 1999. Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell.* 96:495-506.
- Casanova, J.E. 2007. Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic.* 8:1476-85.
- Chantalat, S., R. Courbeyrette, F. Senic-Matuglia, C.L. Jackson, B. Goud, and A. Peyroche. 2003. A novel Golgi membrane protein is a partner of the ARF exchange factors Gea1p and Gea2p. *Mol Biol Cell.* 14:2357-71.
- Chantalat, S., S.K. Park, Z. Hua, K. Liu, R. Gobin, A. Peyroche, A. Rambourg, T.R. Graham, and C.L. Jackson. 2004. The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 117:711-22.
- Chardin, P., S. Paris, B. Antonny, S. Robineau, S. Beraud-Dufour, C.L. Jackson, and M. Chabre. 1996. A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature.* 384:481-4.
- Cherfils, J., J. Menetrey, M. Mathieu, G. Le Bras, S. Robineau, S. Beraud-Dufour, B. Antonny, and P. Chardin. 1998. Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature.* 392:101-5.

- Claude, A., B.P. Zhao, C.E. Kuziemy, S. Dahan, S.J. Berger, J.P. Yan, A.D. Arnold, E.M. Sullivan, and P. Melancon. 1999. GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol.* 146:71-84.
- Cohen, L.A., A. Honda, P. Varnai, F.D. Brown, T. Balla, and J.G. Donaldson. 2007. Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell.* 18:2244-53.
- Contreras, I., E. Ortiz-Zapater, and F. Aniento. 2004. Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant ARF1 and coatomer. *Plant J.* 38:685-98.
- Cosson, P., and F. Letourneur. 1994. Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science.* 263:1629-31.
- Cox, R., R.J. Mason-Gamer, C.L. Jackson, and N. Segev. 2004. Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers. *Mol Biol Cell.* 15:1487-505.
- Cukierman, E., I. Huber, M. Rotman, and D. Cassel. 1995. The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science.* 270:1999-2002.
- Cullen, P.J., and P. Chardin. 2000. Membrane targeting: what a difference a G makes. *Curr Biol.* 10:R876-8.
- D'Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:347-58.
- Deshaies, R.J., S.L. Sanders, D.A. Feldheim, and R. Schekman. 1991. Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature.* 349:806-8.
- Deshaies, R.J., and R. Schekman. 1989. SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 109:2653-64.
- Dominguez, M., K. Dejgaard, J. Fullekrug, S. Dahan, A. Fazel, J.P. Paccaud, D.Y. Thomas, J.J. Bergeron, and T. Nilsson. 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., D. Finazzi, and R.D. Klausner. 1992. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature.* 360:350-2.
- Donaldson, J.G., and C.L. Jackson. 2000. Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol.* 12:475-82.
- Emery, G., M. Rojo, and J. Gruenberg. 2000. Coupled transport of p24 family members. *J Cell Sci.* 113 (Pt 13):2507-16.
- Fath, S., J.D. Mancias, X. Bi, and J. Goldberg. 2007. Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell.* 129:1325-36.
- Fiedler, K., M. Veit, M.A. Stamnes, and J.E. Rothman. 1996. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science.* 273:1396-9.
- Franco, M., P. Chardin, M. Chabre, and S. Paris. 1995. Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem.* 270:1337-41.

- Franco, M., P. Chardin, M. Chabre, and S. Paris. 1996. Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. *J Biol Chem.* 271:1573-8.
- Frank, S., S. Upender, S.H. Hansen, and J.E. Casanova. 1998. ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J Biol Chem.* 273:23-7.
- Friedlander, R., E. Jarosch, J. Urban, C. Volkwein, and T. Sommer. 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2:379-84.
- Frigerio, G., N. Grimsey, M. Dale, I. Majoul, and R. Duden. 2007. Two human ARFGAPs associated with COP-I-coated vesicles. *Traffic.* 8:1644-55.
- Fullekrug, J., T. Sukanuma, B.L. Tang, W. Hong, B. Storrie, and T. Nilsson. 1999. Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members. *Mol Biol Cell.* 10:1939-55.
- Futatsumori, M., K. Kasai, H. Takatsu, H.W. Shin, and K. Nakayama. 2000. Identification and characterization of novel isoforms of COP I subunits. *J Biochem.* 128:793-801.
- Garcia-Mata, R., and E. Sztul. 2003. The membrane-tethering protein p115 interacts with GBF1, an ARF guanine-nucleotide-exchange factor. *EMBO Rep.* 4:320-5.
- Garcia-Mata, R., T. Szul, C. Alvarez, and E. Sztul. 2003. ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol Biol Cell.* 14:2250-61.
- Gething, M.J., and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* 355:33-45.
- Glick, B.S., and V. Malhotra. 1998. The curious status of the Golgi apparatus. *Cell.* 95:883-9.
- 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. 1999. Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell.* 96:893-902.
- Goldberg, J. 2000. Decoding of sorting signals by coatamer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell.* 100:671-9.
- Gommel, D. 1999. Molekulare Mechanismen bei der Bildung von COPI-Vesikeln. *Dissertation.*
- Gommel, D. 2001. Molekulare Mechanismen bei der Bildung von COPI-Vesikeln. *Dissertation.*
- Gommel, D., L. Orci, E.M. Emig, M.J. Hannah, M. Ravazzola, W. Nickel, J.B. Helms, F.T. Wieland, and K. Sohn. 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.* 447:179-85.
- Gommel, D.U., A.R. Memon, A. Heiss, F. Lottspeich, J. Pfannstiel, J. Lechner, C. Reinhard, J.B. Helms, W. Nickel, and F.T. Wieland. 2001.

- Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J.* 20:6751-60.
- Haass, C., and P.M. Kloetzel. 1989. The Drosophila proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development. *Exp Cell Res.* 180:243-52.
- Hara-Kuge, S., O. Kuge, L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, F.T. Wieland, and J.E. Rothman. 1994. En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J Cell Biol.* 124:883-92.
- Harter, C., and F.T. Wieland. 1998. A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11649-54.
- Hauri, H.P., F. Kappeler, H. Andersson, and C. Appenzeller. 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci.* 113 (Pt 4):587-96.
- Hershko, A., A. Ciechanover, and I.A. Rose. 1979. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:3107-10.
- Honda, A., O.S. Al-Awar, J.C. Hay, and J.G. Donaldson. 2005. Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE. *J Cell Biol.* 168:1039-51.
- Hui, K.S., M. Saito, and M. Hui. 1998. A novel neuron-specific aminopeptidase in rat brain synaptosomes. Its identification, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 273:31053-60.
- Islam, A., X. Shen, T. Hiroi, J. Moss, M. Vaughan, and S.J. Levine. 2007. The brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, BIG2, regulates the constitutive release of TNFR1 exosome-like vesicles. *J Biol Chem.* 282:9591-9.
- Jackson, C.L., and J.E. Casanova. 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol.* 10:60-7.
- Jackson, T.R., B.G. Kearns, and A.B. Theibert. 2000. Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling. *Trends Biochem Sci.* 25:489-95.
- Jenne, N., K. Frey, B. Brugger, and F.T. Wieland. 2002. Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* 277:46504-11.
- Kawamoto, K., Y. Yoshida, H. Tamaki, S. Torii, C. Shinotsuka, S. Yamashina, and K. Nakayama. 2002. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic.* 3:483-95.
- Langer, J.D., C.M. Roth, J. Bethune, E.H. Stoops, B. Brugger, D.P. Herten, and F.T. Wieland. 2008. A conformational change in the alpha-subunit of coatamer induced by ligand binding to gamma-COP revealed by single-pair FRET. *Traffic.* 9:597-607.
- Lanoix, J., J. Ouwendijk, A. Stark, E. Szafer, D. Cassel, K. Dejgaard, M. Weiss, and T. Nilsson. 2001. Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *In J Cell Biol.* Vol. 155. 1199-212.
- Lefrancois, S., and P.J. McCormick. 2007. The Arf GEF GBF1 is required for GGA recruitment to Golgi membranes. *Traffic.* 8:1440-51.

- Letourneur, F., E.C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S.D. Emr, H. Riezman, and P. Cosson. 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*. 79:1199-207.
- Liu, X., C. Zhang, G. Xing, Q. Chen, and F. He. 2001. Functional characterization of novel human ARFGAP3. *FEBS Lett.* 490:79-83.
- Lowe, M., and T.E. Kreis. 1995. In vitro assembly and disassembly of coatomer. *J Biol Chem.* 270:31364-71.
- Lund, A.H., M. Duch, and F.S. Pedersen. 1996. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res.* 24:800-1.
- Majoul, I., K. Sohn, F.T. Wieland, R. Pepperkok, M. Pizza, J. Hillemann, and H.D. Soling. 1998. KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J Cell Biol.* 143:601-12.
- Majoul, I., M. Straub, S.W. Hell, R. Duden, and H.D. Soling. 2001. KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell.* 1:139-53.
- Malsam, J., D. Gommel, F.T. Wieland, and W. Nickel. 1999. A role for ADP ribosylation factor in the control of cargo uptake during COPI-coated vesicle biogenesis. *FEBS Lett.* 462:267-72.
- Manolea, F., A. Claude, J. Chun, J. Rosas, and P. Melancon. 2008. Distinct functions for Arf guanine nucleotide exchange factors at the Golgi complex: GBF1 and BIGs are required for assembly and maintenance of the Golgi stack and trans-Golgi network, respectively. *Mol Biol Cell.* 19:523-35.
- Mansour, S.J., J. Skaug, X.H. Zhao, J. Giordano, S.W. Scherer, and P. Melancon. 1999. p200 ARF-GEP1: a Golgi-localized guanine nucleotide exchange protein whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7968-73.
- Martinez-Menarguez, J.A., H.J. Geuze, J.W. Slot, and J. Klumperman. 1999. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell.* 98:81-90.
- Matlack, K.E., B. Misselwitz, K. Plath, and T.A. Rapoport. 1999. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell.* 97:553-64.
- Matsuoka, K., L. Orci, M. Amherdt, S.Y. Bednarek, S. Hamamoto, R. Schekman, and T. Yeung. 1998. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell.* 93:263-75.
- Mesmin, B., G. Drin, S. Levi, M. Rawet, D. Cassel, J. Bigay, and B. Antonny. 2007. Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry.* 46:1779-90.
- Moelleken, J., J. Malsam, M.J. Betts, A. Movafeghi, I. Reckmann, I. Meissner, A. Hellwig, R.B. Russell, T. Sollner, B. Brugger, and F.T. Wieland. 2007. Differential localization of coatomer complex isoforms within the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:4425-30.

- Monetta, P., I. Slavin, N. Romero, and C. Alvarez. 2007. Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell*. 18:2400-10.
- Morinaga, N., S.C. Tsai, J. Moss, and M. Vaughan. 1996. Isolation of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP ribosylation factor (ARF) 1 and ARF3 that contains a Sec7-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:12856-60.
- Mossessova, E., R.A. Corpina, and J. Goldberg. 2003. Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Mol Cell*. 12:1403-11.
- Mossessova, E., J.M. Gulbis, and J. Goldberg. 1998. Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human arno and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell*. 92:415-23.
- Mouratou, B., F. Schaeffer, I. Guilvout, D. Tello-Manigne, A.P. Pugsley, P.M. Alzari, and F. Pecorari. 2007. Remodeling a DNA-binding protein as a specific in vivo inhibitor of bacterial secretin PulD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:17983-8.
- Munro, S., and H.R. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 48:899-907.
- Nickel, W., J. Malsam, K. Gorgas, M. Ravazzola, N. Jenne, J.B. Helms, and F.T. Wieland. 1998. Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J Cell Sci*. 111 (Pt 20):3081-90.
- Nickel, W., K. Sohn, C. Bunning, and F.T. Wieland. 1997. p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:11393-8.
- Nickel, W., and F.T. Wieland. 1998. Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem Cell Biol*. 109:477-86.
- Niu, T.K., A.C. Pfeifer, J. Lippincott-Schwartz, and C.L. Jackson. 2005. Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell*. 16:1213-22.
- Orci, L., B.S. Glick, and J.E. Rothman. 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*. 46:171-84.
- Ostermann, J., L. Orci, K. Tani, M. Amherdt, M. Ravazzola, Z. Elazar, and J.E. Rothman. 1993. Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell*. 75:1015-25.
- Paleotti, O., E. Macia, F. Luton, S. Klein, M. Partisani, P. Chardin, T. Kirchhausen, and M. Franco. 2005. The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem*. 280:21661-6.
- Pearse, B.M. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol*. 97:93-8.
- Pepperkok, R., J.A. Whitney, M. Gomez, and T.E. Kreis. 2000. COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J Cell Sci*. 113 (Pt 1):135-44.
- Peyroche, A., B. Antonny, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, and C.L. Jackson. 1999. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-

- Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell*. 3:275-85.
- Peyroche, A., S. Paris, and C.L. Jackson. 1996. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature*. 384:479-81.
- Plath, K., W. Mothes, B.M. Wilkinson, C.J. Stirling, and T.A. Rapoport. 1998. Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*. 94:795-807.
- Plempner, R.K., and D.H. Wolf. 1999. Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol Biol Rep*. 26:125-30.
- Ramaen, O., A. Joubert, P. Simister, N. Belgareh-Touze, M.C. Olivares-Sanchez, J.C. Zeeh, S. Chantalat, M.P. Golinelli-Cohen, C.L. Jackson, V. Biou, and J. Cherfils. 2007. Interactions between conserved domains within homodimers in the BIG1, BIG2, and GBF1 Arf guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*. 282:28834-42.
- Reinhard, C., C. Harter, M. Bremser, B. Brugger, K. Sohn, J.B. Helms, and F. Wieland. 1999. Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:1224-8.
- Reinhard, C., M. Schweikert, F.T. Wieland, and W. Nickel. 2003. Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8253-7.
- Renault, L., B. Guibert, and J. Cherfils. 2003. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature*. 426:525-30.
- Robineau, S., M. Chabre, and B. Antony. 2000. Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:9913-8.
- Rothman, J.E., and F.T. Wieland. 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272:227-34.
- Santy, L.C., and J.E. Casanova. 2001. Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *J Cell Biol*. 154:599-610.
- Sata, M., J. Moss, and M. Vaughan. 1999. Structural basis for the inhibitory effect of brefeldin A on guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:2752-7.
- Scales, S.J., R. Pepperkok, and T.E. Kreis. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell*. 90:1137-48.
- Schimmoller, F., B. Singer-Kruger, S. Schroder, U. Kruger, C. Barlowe, and H. Riezman. 1995. The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J*. 14:1329-39.
- Shen, X., K.F. Xu, Q. Fan, G. Pacheco-Rodriguez, J. Moss, and M. Vaughan. 2006. Association of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (BIG2) with recycling endosomes during transferrin uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:2635-40.

- Shin, H.W., and K. Nakayama. 2004. Guanine nucleotide-exchange factors for arf GTPases: their diverse functions in membrane traffic. *J Biochem.* 136:761-7.
- Shinotsuka, C., S. Waguri, M. Wakasugi, Y. Uchiyama, and K. Nakayama. 2002. Dominant-negative mutant of BIG2, an ARF-guanine nucleotide exchange factor, specifically affects membrane trafficking from the trans-Golgi network through inhibiting membrane association of AP-1 and GGA coat proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 294:254-60.
- Sohn, K., L. Orci, M. Ravazzola, M. Amherdt, M. Bremser, F. Lottspeich, K. Fiedler, J.B. Helms, and F.T. Wieland. 1996. A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol.* 135:1239-48.
- Sollner, T., S.W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J.E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 362:318-24.
- Sonnichsen, B., R. Watson, H. Clausen, T. Misteli, and G. Warren. 1996. Sorting by COP I-coated vesicles under interphase and mitotic conditions. *J Cell Biol.* 134:1411-25.
- Sun, Z., F. Anderl, K. Frohlich, L. Zhao, S. Hanke, B. Brugger, F. Wieland, and J. Bethune. 2007. Multiple and stepwise interactions between coatomer and ADP-ribosylation factor-1 (Arf1)-GTP. *Traffic.* 8:582-93.
- Suokas, M., O. Lampela, A.H. Juffer, R. Myllyla, and S. Kellokumpu. 2003. Retrieval-independent localization of lysyl hydroxylase in the endoplasmic reticulum via a peptide fold in its iron-binding domain. *Biochem J.* 370:913-20.
- Szafer, E., E. Pick, M. Rotman, S. Zuck, I. Huber, and D. Cassel. 2000. Role of coatomer and phospholipids in GTPase-activating protein-dependent hydrolysis of GTP by ADP-ribosylation factor-1. *J Biol Chem.* 275:23615-9.
- Szul, T., R. Garcia-Mata, E. Brandon, S. Shestopal, C. Alvarez, and E. Sztul. 2005. Dissection of membrane dynamics of the ARF-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic.* 6:374-85.
- Szul, T., R. Grabski, S. Lyons, Y. Morohashi, S. Shestopal, M. Lowe, and E. Sztul. 2007. Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *J Cell Sci.* 120:3929-40.
- Tanigawa, G., L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, J.B. Helms, and J.E. Rothman. 1993. Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol.* 123:1365-71.
- Togawa, A., N. Morinaga, M. Ogasawara, J. Moss, and M. Vaughan. 1999. Purification and cloning of a brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem.* 274:12308-15.
- Tooze, S.A., G.J. Martens, and W.B. Huttner. 2001. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* 11:116-22.
- Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman, and P. Walter. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential

- coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101:249-58.
- Tsuchiya, M., S.R. Price, S.C. Tsai, J. Moss, and M. Vaughan. 1991. Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J Biol Chem*. 266:2772-7.
- Walter, P., and G. Blobel. 1981a. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol*. 91:557-61.
- Walter, P., and G. Blobel. 1981b. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 91:551-6.
- Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 91:545-50.
- Wegmann, D., P. Hess, C. Baier, F.T. Wieland, and C. Reinhard. 2004. Novel isotypic gamma/zeta subunits reveal three coatomer complexes in mammals. *Mol Cell Biol*. 24:1070-80.
- Weimer, C., R. Beck, P. Eckert, I. Reckmann, J. Moelleken, B. Brugger, and F. Wieland. 2008. Differential roles of ArfGAP1, ArfGAP2, and ArfGAP3 in COPI trafficking. *J Cell Biol*. 183:725-35.
- Wieland, F., and C. Harter. 1999. Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Curr Opin Cell Biol*. 11:440-6.
- Wild, K., M. Halic, I. Sinning, and R. Beckmann. 2004. SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol*. 11:1049-53.
- Yoshihisa, T., C. Barlowe, and R. Schekman. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*. 259:1466-8.
- Zeeh, J.C., M. Zeghouf, C. Grauffel, B. Guibert, E. Martin, A. Dejaegere, and J. Cherfils. 2006. Dual specificity of the interfacial inhibitor brefeldin A for arf proteins and sec7 domains. *J Biol Chem*. 281:11805-14.
- Zhao, L., J.B. Helms, B. Brugger, C. Harter, B. Martoglio, R. Graf, J. Brunner, and F.T. Wieland. 1997. Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4418-23.
- Zhao, L., J.B. Helms, J. Brunner, and F.T. Wieland. 1999. GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatomer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem*. 274:14198-203.
- Zhao, X., A. Claude, J. Chun, D.J. Shields, J.F. Presley, and P. Melancon. 2006. GBF1, a cis-Golgi and VTCs-localized ARF-GEF, is implicated in ER-to-Golgi protein traffic. *J Cell Sci*. 119:3743-53.
- Zhao, X., T.K. Lasell, and P. Melancon. 2002. Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic. *Mol Biol Cell*. 13:119-33.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADP: Adenosin-5`-diphosphat, **AP:** Adaptor-Protein Komplex, **ALPS:** *ArfGAP1 lipid-packing sensor*, **APS:** Ammoniumperoxodisulfat, **Arf1:** *ADP ribosylation factor 1*, **ARNO:** *Arf nucleotide binding site opener*, **ASP:** Ammoniumsulfat-Präzipitation, **ATP:** Adenosin-5`-triphosphat, **BFA:** Brefeldin A, **bp:** Basenpaar, **BMW:** *broad molecular weight*, **BRAG:** *Brefeldin-resistant Arf GEF*, **BSA:** bovines Serumalbumin, **CCV:** *Clathrin coated vesicle*, **CGN:** *cis-Golgi Netzwerk*, **CHO:** *Chinese hamster ovary cells*, **Coatomer:** *coat protomer*, **COP:** *coat Protein*, **Da:** Dalton, **DCB:** *dimerization and cyclophilin binding Domäne*, **DEAE:** Diethylaminoethyl, **DNA:** Desoxyribonukleinsäure, **DMSO:** Dimethylsulfoxid, **dNTP:** Desoxynucleotid-Triphosphat, **DTT:** Dithiothreitol, ***E. coli:*** *Escherichia coli*, **EDTA:** Ethylendiamin-tetraacetat, **EFA6:** *exchange factor for Arf6*, **ER:** Endoplasmatisches Retikulum, **ERAD:** *ER-associated degradation*, **ERGIC:** *ER-Golgi-intermediate-compartment*, **FBX8:** *F-box only protein 8*, **FMOC:** Fluorenylmethoxycarbonyl, **FPLC:** *fast protein liquid chromatography*, **FKS:** fötales Kälberserum, **g:** Gramm, **FRET:** *Fluorescence resonance energy transfer*, **GAP:** *GTPase-activating protein*, **GBF1:** *Golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1* oder *Golgi BFA-resistant factor 1*, **GDP:** Guanosine-5`-diphosphat, **GEF:** *guanosine nucleotide exchange factor*, **GGA:** *Golgi-localized γ -ear-containing, ADP ribosylation factor (Arf-) binding proteins*, **GGA1:** *Golgi associated, gamma adaptin homologous, Arf interacting protein 1*, **GTP:** Guanosin-5`-triphosphat, **GTP γ S:** Guanosin-5`-3-O-(thio)triphosphat, **h:** Stunde, **HDS:** *Homology downstream of Sec7*, **HeLa:** Henrietta Lacks Zellen, **HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure, **HPLC:** *high performance liquid chromatography*, **HUS-Box:** *Homology upstream of Sec7*, **IF:** Immunfluoreszenz, **IP:** Immunpräzipitation, **IPTG:** Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid, **kDa:** Kilodalton, **LB-Medium:** Luria-Bertani-Medium, **KCl:** Kaliumchlorid, **M:** molar, **ManII:** Mannosidase II, **MALDI:** *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*, **MCS:** *multiple cloning site*, **min:** Minuten, **MW:** Molekulargewicht, **NTP:** Nukleotid-Triphosphat, **OD:** optische Dichte, **PAGE:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese, **PBS:** *phosphate buffered saline*, **PCR:** *Polymerase chain reaction*, **PDP:** Protein-Disulfid-Isomerase, **PH:** *pleckstrin homology*, **PMSF:** Phenylmethylsulfonylfluorid, **RNA:** Ribonukleinsäure, **RNAi:** *RNA interference*, **rpm:** Umdrehungen pro Minute, **RT:** Raumtemperatur, **s:** Sekunde, **SDS:** Natriumdodecylsulfat, **Sf9:** *Spodoptera*

frugiperda, **SNARE**: soluble NSF attachment protein receptor, **SR**: SRP-Rezeptor, **SPR**: Surface plasmon spectroscopy, **SRP**: signal recognition particle, **T**: Temperatur in °C, **TCA**: Trichloressigsäure, **TEMED**: N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin, **TGN**: *trans*-Golgi Netzwerk, **Tmd-F**: L-4'-(3-trifluormethyl-3*H*-diazirin-3-yl), **TMED**: *transmembrane emp24 protein transport domain containing*, **TOF**: *Time Of Flight*, **Tris**: Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, **Tween 20**: Polyoxyethylensorbitan-monolaureat, **Triton X-100**: Octylphenolpoly(ethylen-glycolether), **Trx**: Thioredoxin, **U**: *unit* (Enzymeinheit), **UPR**: *unfolded protein response*, **VTC**: *vesicular-tubular-cluster*, **v/v**: Volumenverhältnis, **w/v**: Gewicht/Volumen-Verhältnis (100 g/ml), **w/w**: Gewichtsverhältnis, **WB**: Western blot, **xg**: Erdbeschleunigung

Einbuchstabencode der Aminosäuren:

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

Einbuchstabencode der Nukleinsäuren:

A: Adenosin, **G**: Guanosin, **C**: Cystein, **T**: Thymidin

8 Danksagung

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

Meinem Lehrer und Doktorvater Herrn Professor Dr. Felix Wieland für die Vergabe eines sehr interessanten Themas, die Freiheit in der Gestaltung meiner Arbeit, sowie für die jederzeit gewährte wissenschaftliche Unterstützung und Anregung.

Herrn Professor Dr. Michael Brunner für die Bereitschaft die Arbeit zu begutachten.

Herrn Professor Dr. Thomas Söllner und Herrn Professor Dr. Michael Brunner für die Übernahme des TAC-Komitees.

Dr. Britta Brügger und Dr. Oliver Schmidt für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Matthijs Kol und Dr. Julien Béthune für die äußerst nette und kompetente Betreuung zu Beginn dieser Arbeit.

Ingeborg Reckmann und Priska Eckert für die hervorragende Zusammenarbeit und zuverlässige technische Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Juanming Xu und Evelyn Bauer für die technische Unterstützung bei den Photokreuzvernetzungs-Experimenten.

Meinen beiden Kollegen Carolin Weimer und Rainer Beck für die tolle Zusammenarbeit und die stets konstruktiven Diskussionen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wieland für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die große Hilfsbereitschaft und schöne Zeit auch außerhalb des Labors, die mir immer in Erinnerung bleiben wird.

Meinen Eltern und meiner Familie die mich aus der Ferne immer unterstützt hat.

Ich danke Dir, Reinald, für Deine immerwährende, liebevolle Unterstützung.
Dir ist diese Arbeit gewidmet.

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift