

INAUGURAL–DISSERTATION

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

Vorgelegt von
M.Sc. Simone Röhling

Tag der mündlichen Prüfung

.....

Interaktionen der kleinen GTPase Arf1 mit Coatomer

Gutachter: Prof. Dr. Felix Wieland
Prof. Dr. Thomas Söllner

Meiner Familie

Zusammenfassung

COPI-Vesikel sind für den retrograden Transport von Proteinen und Lipiden vom Golgi-Apparat zurück zum ER und für den bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparates verantwortlich. Die kleine GTPase Arf1 und der heptamere Proteinkomplex Coatomer sind wesentliche Bestandteile der Proteinhülle.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lokalisation von Arf1 innerhalb der COPI-Hülle und die Interaktion mit Coatomer näher analysiert. Hierzu wurde ein System verwendet, welches es ermöglicht, die photolabile Aminosäure p-Benzoyl-L-phenylalanin (Bp) an eine definierte Stelle innerhalb eines Proteins einzubauen. Es wurden Arf1-Derivate generiert, bei welchen an zwei unterschiedlichen Stellen jeweils ein Bp eingebaut wurde. Diese Proteine wurden an Golgi-Membranen und an synthetisch hergestellte Liposomen rekrutiert und nach der Zugabe von Coatomer wurde das Bp durch Bestrahlung mit UV-Licht aktiviert. Somit wurde Arf1 kovalent mit möglichen Bindungspartnern, die sich in einer Umgebung von 3 Å befinden, verknüpft. Arf1 I46Bp Y167Bp zeigte eine gleichzeitige GTP-abhängige Interaktion mit den beiden Coatomer-Untereinheiten β - und δ -COP. Die genaue Interaktionsstelle innerhalb von Coatomer konnte nicht ermittelt werden. Anhand von strukturellen Homologien zu dem Clathrin Adaptor-Komplex AP-2 jedoch wird vermutet, dass Arf1 an β - und δ -COP, die aus dem gleichen Coatomer-Komplex stammen, bindet.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Arf1 I49Bp E98Bp nicht nur, wie bereits bekannt war, über die switch I Region (I49) mit γ -COP interagiert, sondern dass auch die „Rückseite“ (E98Bp) von Arf1 eine Bindung mit β -COP eingeht. In diesem Fall handelt es sich um Untereinheiten aus zwei verschiedenen Coatomer-Komplexen, da die Proteine innerhalb eines Komplexes einen zu großen Abstand zueinander aufweisen, als dass Arf1 mit beiden gleichzeitig interagieren kann. Es konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Arf1 zwei unterschiedliche Coatomer-Komplexe über die Untereinheiten γ - und β -COP miteinander verbrücken kann.

Neben den Untersuchungen zur Interaktion von Arf1 mit Coatomer wurde im Rahmen dieser Arbeit Chaetomium Arf1 kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Dieses thermostabile Protein zeigte in verschiedenen Funktionalitätstests die gleiche Aktivität wie humanes Arf1. Somit kann es für weitere Untersuchungen, wie beispielsweise Ansätze zur Kristallisation von Vollängen-Arf1 im Komplex mit Coatomer eingesetzt werden.

Abstract

COPI vesicles mediate retrograde transport of proteins and lipids from the Golgi apparatus back to the ER and bidirectional transport within the Golgi. The small GTPase Arf1 and the heptameric protein complex coatamer are main components of the coat.

In the present study, the localization of Arf1 within the vesicle coat and its interactions with coatamer were analyzed. To this end, a system was used that allows incorporation of the photolabile amino acid p-Benzoyl-L-phenylalanine (Bp) at defined positions within a protein. Here, Arf1 derivatives were used with two Bp-side-chains incorporated at two different sites. These proteins were recruited to Golgi membranes and liposomes and after addition of coatamer, Bp was activated through irradiation with UV light. As a consequence, Arf1 will covalently link to binding partners in a proximity of 3 Å or less. Arf1 I46Bp Y167Bp show simultaneous and GTP dependent binding to the two coatamer subunits β - and δ -COP. The exact interaction site within the coatamer complex could not be determined. But on the basis of structural homology between coatamer and the Clathrin adaptor complex AP-2 it is concluded that Arf1 binds to β - and δ -COP within the same coatamer complex.

Furthermore, it is shown that Arf1 I49Bp E98Bp not only interacts via the switch I region (I49) with γ -COP, as had been shown before, but also that its backside (E98Bp) binds to β -COP. Since these two subunits within one complex are too far away from each other to both bind one Arf1 molecule, it is concluded that Arf1 I49Bp E98Bp interacts with γ -COP and β -COP from two different complexes. Hence, it was demonstrated for the first time that Arf1 bridges two different coatamer complexes.

In addition to investigating interactions of Arf1 with coatamer, Chaetomium Arf1 was cloned, expressed and purified. The functionality of this thermo-stabile protein was tested in different assays, and it exhibited an activity very similar to human Arf1. Thus, Chaetomium Arf1 can be used for further analyses as e.g. crystallization trials of full length Arf1 in complex with coatamer or subcomplexes thereof.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
1. Einleitung	1
1.1 Der sekretorische Weg.....	1
1.2 Vesikulärer Transport:	4
Die drei unterschiedlichen Klassen an Transportvesikel	4
1.2.1 Clathrin-Vesikel	4
1.2.2 COPII-Vesikel.....	5
1.2.3 COPI-Vesikel.....	6
1.3 Mechanismen der COPI-Vesikelbildung	7
1.3.1 Das heptamere Hüllprotein Coatomer.....	7
1.3.2 Die Familie der p24 Proteine.....	8
1.3.3 ArfGEFs und ArfGAPs	8
1.3.4 Arf (<i>ADP-ribosylation factor</i>)	9
1.3.5 Struktur von Arf1.....	10
1.3.6 Biogenese der COPI-Vesikel.....	12
1.4 Struktur von COPI-Vesikel.....	14
2. Ergebnisse	16
2.1 Eine neue Expressionsmethode zur Verbesserung der	
Arf1-Myristoylierung	18
2.2 Interaktionen zwischen Arf1 und Coatomer	21
2.2.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung	
photolabiler Arf1-Derivate.....	21
2.2.2 Photolabile Arf1-Derivate binden GTP-abhängig an	
Golgi-Membranen.....	25
2.2.3 Arf1 interagiert gleichzeitig mit β -COP und δ -COP.....	27
2.2.4 Massenspektrometrische Analyse der Crosslinkprodukte	30
2.2.6 Photocrosslink mit N Δ 17 Arf1 I46Bp Y167Bp.....	32

2.2.7 Experimente zur Dimerisierung von Arf1	36
2.2.8 Arf1 interagiert gleichzeitig mit β -COP und mit γ -COP	38
2.3 Herstellung eines thermophilen Arf1-Proteins:	
<i>Chaetomium thermophilum</i> Arf1	42
2.3.1 Klonierung von Arf1 aus <i>Chaetomium thermophilum</i>	43
2.3.2 Expression und Aufreinigung von <i>Chaetomium</i> Arf1	44
2.3.3 Gewinnung von Antikörpern gegen <i>Chaetomium</i> Arf1	45
2.3.4 Funktionalitätstests von <i>Chaetomium</i> Arf1	46
3. Diskussion	51
3.1 Verbesserung der Arf1-Myristoylierung	51
3.2 Interaktionen zwischen Arf1 und Coatomer	52
3.2.1 Expression und Aufreinigung photolabiler Arf1-Derivate	52
3.2.2 Arf1 interagiert mit β -COP und δ -COP	53
3.2.3 Dimerisierung von Arf1	56
3.2.4 Arf1 interagiert mit γ -COP und β -COP	57
3.3 Herstellung von <i>Chaetomium thermophilum</i> Arf1	60
4. Material und Methoden	62
4.1 Material	62
4.1.1 Chemikalien	62
4.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen	62
4.1.3 Bakterienstämme	63
4.1.4 Nährmedien und Medienzusätze für Bakterienkulturen	64
4.1.4 Eukaryotische Zelllinien und Nährmedium	64
4.1.5 Antikörper	64
4.1.6 Vektoren	65
4.1.7 Synthetische Oligonukleotide	66
4.1.8 Enzyme und Kits	68
4.1.9 Geräte	68

4.1.10 Computersoftware	69
4.2 Molekularbiologische Methoden.....	70
4.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	70
4.2.2 DNA Restriktion und Ligation.....	71
4.2.3 DNA Transformation.....	71
4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	71
4.2.5 Isolation von Plasmid-DNA.....	72
4.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	72
4.2.7 Ortsspezifische Mutagenese	73
4.2.8 Bestimmung der DNA Konzentration.....	74
4.2.9 Sequenzierung der DNA.....	74
4.3 Biochemische Methoden.....	74
4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	74
4.3.2 Western Blot.....	75
4.3.3 Coomassie Brilliant Blau-Färbung	76
4.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford	76
4.3.5 Herstellung von Golgi- <i>like</i> Liposomen	76
4.3.6 Expression der Vollängen photolabilen Arf1-Derivate.....	77
4.3.7 Aufreinigung der Vollängen photolabilen Arf1-Derivate	78
4.3.8 Photocrosslink mit Vollängen Arf1-Derivaten.....	78
4.3.9 Expression der photolabilen N Δ 17Arf1-Derivate	79
4.3.10 Aufreinigung der photolabilen N Δ 17Arf1-Derivate.....	80
4.3.11 Photocrosslink mit N Δ 17Arf1-Derivaten	81
4.3.12 Expression und Aufreinigung von humanem Arf1 und Chaetomium Arf1.....	81
4.3.13 Membranbindungsstudien an Liposomen.....	82
4.3.14 COPI-Vesikelpräparation.....	82
4.3.15 <i>Static light scattering</i>	83

4.3.16 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Coatomer.....	83
4.3.17 Isolation von Golgi-Membranen aus Rattenleber.....	84
4.4 Massenspektrometrie.....	85
4.5 Elektronenmikroskopische Methoden	86
4.5.1 Negativkontrastierung.....	86
4.5.2 Epon-Einbettung.....	86
5. Anhang	87
5.1 Literaturverzeichnis.....	87
5.2 Abkürzungsverzeichnis	99
5.3 Publikationsverzeichnis.....	102
5.4 Danksagung	103

1. Einleitung

1.1 Der sekretorische Weg

Innerhalb einer eukaryotischen Zelle laufen verschiedene Stoffwechselprozesse gleichzeitig ab. Um dies zu gewährleisten, bildet ein komplexes Endomembransystem eine Vielzahl strukturell und funktionell unterschiedliche Kompartimente, welche als Organellen bezeichnet werden. Hierzu gehören der Nukleus, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen, Endosomen und Chloroplasten in Pflanzenzellen. Verschiedene Zusammensetzungen von Proteinen und Lipiden verleihen den Organellen ihre charakteristische Eigenschaften (Munro, 2004). Zur Aufrechterhaltung der Organisation und Funktion einer eukaryotischen Zelle ist die zielgerichtete Verteilung neu synthetisierter Proteine und Lipide zu ihrem Bestimmungsort essentiell. Während die meisten Proteine an freien cytosolischen Ribosomen synthetisiert werden, folgen sekretorische Proteine und Membranproteine einem speziellen Transportweg. Dieser sekretorische Weg wurde erstmals in exokrinen Zellen der Bauchspeicheldrüse beschrieben (Caro und Palade, 1964) und beinhaltet als Hauptorganellen das ER und den Golgi-Apparat (Jamieson und Palade, 1966). Er kann in vier verschiedene Schritte unterteilt werden: ER-Import und Qualitätskontrolle, Transport aus dem ER zum Golgi-Apparat, intra-Golgi Transport mit Rückführung ER-residenter Proteine und post-Golgi Transport. Der Transport der Proteine innerhalb des sekretorischen Weges erfolgt über vesikuläre Strukturen (Palade, 1975) (Abbildung 1).

Der erste Schritt bei der Synthese sekretorischer Proteine ist die Translokation der Proteine in das Lumen des ER. Dies kann durch drei verschiedene Wege erfolgen. Entweder ko-translational durch SRP, post-translational, oder über den GET-Weg bei *tail anchored* (TA)-Membranproteinen (GET = *guided entry of tail anchored proteins*). Bei der ko-translationalen Insertion sorgt eine spezifische Signalsequenz, bestehend aus 6-12 hydrophoben Aminosäuren am N-Terminus der Proteine (Gierasch, 1989) dafür, dass die Ribosomen, an denen sie gebildet werden, an die ER-Membran dirigiert werden (Blobel und Dobberstein, 1975a; Blobel und Dobberstein, 1975b).

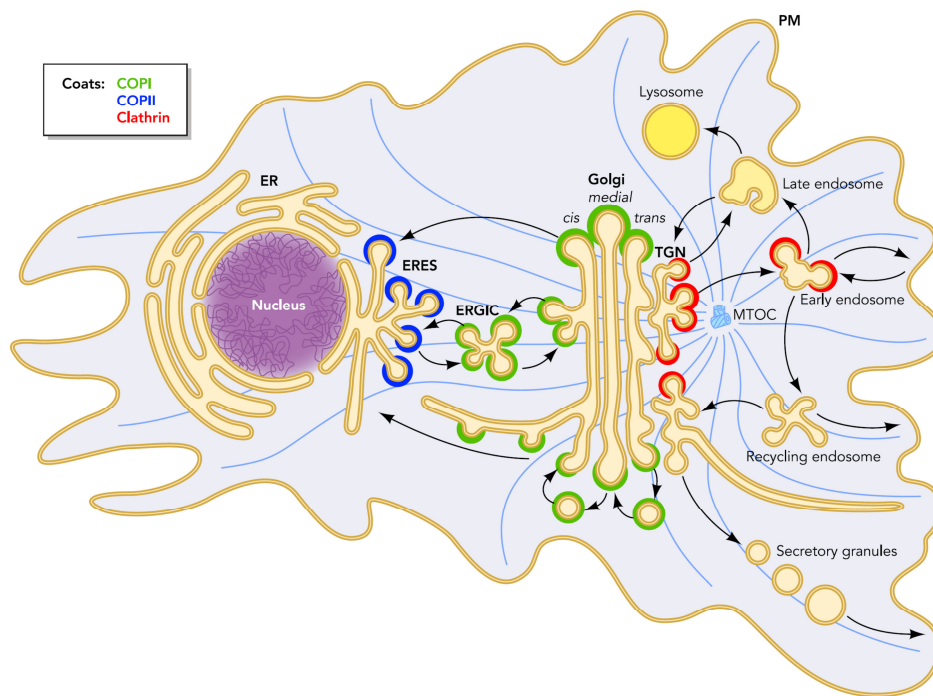


Abbildung 1.1: Überblick des intrazellulären Transportweges. Schematischer Überblick über die Organellen und die Transportrouten des sekretorischen und endosomalen/lysosomalen Weges. Die unterschiedlichen Transportvesikel sind in den folgenden Farben dargestellt: COPII in blau, COPI in rot und Clathrin in gelb. Die Abbildung wurde von Szul und Sztul, 2011 übernommen.

Die Bindung des Signalerkennungspartikels (*signal recognition particle*, SRP) an die Signalsequenz und an das translatierende Ribosom führt zu einem Arrest der Proteinbiosynthese und dem Transport zur ER-Membran (Walter und Blobel, 1981a; Walter und Blobel, 1981b; Walter et al., 1981). Der Komplex aus Ribosom, Polypeptidkette und SRP (*ribosome-nascent chain-SRP complex*, RNC-SRP complex) bindet GTP-abhängig an ein integrales Transmembranprotein in der ER-Membran, den SRP Rezeptor (SR) (Gilmore et al., 1982a; Gilmore et al., 1982b). Nach der Interaktion mit dem Rezeptor löst sich das SRP von der Signalsequenz und die Polypeptidkette wird durch einen so genannten Translokator, das Sec61 Translocon, in das Lumen des ER eingeschleust, oder falls es sich um ein Transmembranprotein handelt, in die ER-Membran eingebaut (Deshaies und Schekman, 1989). GTP-Hydrolyse sorgt für das Auseinanderfallen des SRP-SR-Komplexes, so dass der SRP im Anschluss wieder eine neue Signalerkennungssequenz binden kann (Connolly et al., 1991; Miller und Walter, 1993).

Die post-translationale Insertion sekretorischer Proteine wird von cytosolischen Hsp70 ATPasen gesteuert (Chirico et al., 1988). Diese binden an die naszierende Polypeptidkette, halten sie in einem partiell ungefalteten Zustand und transportieren sie zur Membran. Dort erfolgt zunächst die Bindung an den Sec63 Komplex und anschließend, wie beim ko-translationalen Transport, die Translokation durch das Sec61 Translocon (Panzner et al., 1995).

Eine andere Art von Proteinen, die TA-Proteine, besitzen am C-Terminus eine Transmembrandomäne (TMD) und werden ebenfalls post-translational in die ER-Membran integriert (Stefanovic und Hegde, 2007). Bei diesem so genannten GET-Weg bindet die ATPase Asna1/TRC40 (Get3 in Hefezellen) an die TMD der Proteine und rekrutiert diese an die ER-Membran, wo sie durch den Proteinkomplex Get1/2 in die Membran inseriert werden (Favaloro et al., 2008) (Schuldiner et al., 2005) (Stefanovic und Hegde, 2007).

Im ER-Lumen angelangt durchlaufen die Proteine verschiedene post-translationale Modifikationen, wie beispielsweise das Abspalten der N-terminalen Signalsequenz, Glykosylierung, das Anhängen von GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-Ankern, Prolin-Hydroxylierung und die Bildung von Disulfidbrücken. Außerdem sorgen zwei unabhängige Systeme: das UPR (*unfolded protein response*) und ERAD (*ER-associated degradation*), für die Retranslokation fehlgefalteter Proteine zurück in das Cytosol. Dort werden sie ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (zusammengefasst in (Braakman und Bulleid, 2011)).

Nachdem die sekretorischen Proteine die Modifikationen und die Qualitätskontrolle im ER durchlaufen haben, werden sie mittels Transportvesikeln, den COPII-Vesikeln (*coat protein complex*, COP), aus dem ER exportiert (Barlowe et al., 1994). Ziel dieser Vesikel ist die Weitergabe der Fracht an das ER-Golgi intermediäre Kompartiment (*ER-Golgi intermediate compartment*, ERGIC). Hierbei handelt es sich um ein komplexes Membransystem, welches zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat lokalisiert ist. Es ist durch die Anwesenheit des intrazellulären Lektins ERGIC52 (Hauri et al., 2000) und der GTPase Rab2 definiert (Chavrier et al., 1990). Da sich in diesem Kompartiment neben Markerproteinen von COPII- auch solche von COPI-Vesikeln nachweisen lassen, wird das ERGIC als Schnittstelle zwischen COPII und COPI vermitteltem Transport betrachtet (Scales et al., 1997). COPI-Vesikel sorgen für den Rücktransport von Proteinen zum ER (retrograder Transport) (Letourneur et al., 1994; Majoul et al., 1998).

Der Golgi-Apparat ist das zentrale Kompartiment innerhalb des sekretorischen Weges. Auf ihrem Weg durch den Golgi-Apparat werden die Proteine modifiziert. Dies wird durch so genannte Zisternen, einen Stapel aus 4 bis 6 Membransäckchen mit unterschiedlicher Protein- und Lipidzusammensetzung gewährleistet. Sekretorische Proteine erreichen den Golgi am *cis*-Golgi Netzwerk (CGN). Von hier aus gelangen sie über die medialen Zisternen zum *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) (Rothman und Wieland, 1996). Dort werden sie schließlich im Hinblick auf ihren Bestimmungsort hauptsächlich in Clathrin-Vesikel (clathrin coated, CCV) aufgenommen und zu den Lysosomen oder Endosomen und zur Plasmamembran transportiert.

1.2 Vesikulärer Transport:

Die drei unterschiedlichen Klassen an Transportvesikel

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, sind für den intrazellulären Transport drei verschiedene Klassen von Transportvesikeln beteiligt: Clathrin-Vesikel, COPII-Vesikel und COPI-Vesikel. Allen Vesikelarten ist gemein, dass sie durch Knospung aus der Membran der Donororganelle entstehen und am Bestimmungsort mit der Membran der Zielorganelle fusionieren. Ihr Durchmesser beträgt ca. 60-100 nm. Details werden im Folgenden näher erläutert.

1.2.1 Clathrin-Vesikel

Clathrin-Vesikel sind für den Transport von Proteinen und Lipiden von der Plasmamembran und dem TGN zu den Endosomen verantwortlich. Sie wurden erstmals 1964 bei Studien an unreifen Eizellen entdeckt (Roth und Porter, 1964). Fünf Jahre später wurden die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Struktur dieser Vesikel gemacht (Kanaseki und Kadota, 1969). Durch biochemische Methoden konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil aus einem Protein mit einem Molekulargewicht von 180-190 kDa besteht. Dieses Protein wurde als Clathrin bezeichnet (Pearse, 1976). Später stellte sich heraus, dass das komplette Hüllprotein Clathrin ein Heterodimer, bestehend aus einer 190 kDa schweren Kette und einer 25 kDa leichten Polypeptidkette, darstellt (Kirchhausen et al., 1983; Ungewickell, 1983).

Jeweils drei dieser Ketten sind an einer zentralen Stelle miteinander verbunden und bilden eine Triskelion-Struktur aus (Kirchhausen und Harrison, 1981; Ungewickell und Branton, 1981). Durch die Polymerisation mehrerer Triskelen entsteht eine käfigartige Struktur mit einer intrinsischen Krümmung (Crowther und Pearse, 1981) (zusammengefasst in (Kirchhausen, 2000)). Neben der äußeren Clathrinhülle besitzen die Vesikel auch eine innere Schicht. Diese besteht aus Clathrin-Adaptoren. Sie haben die Aufgabe, die Frachtmoleküle zu erkennen und zu rekrutieren und Clathrin mit Proteinen und Phospholipiden in der Membran zu verbinden. Die Rekrutierung der Adaptoren an die Membran erfolgt entweder durch aktivierte kleine GTPasen der Arf/Ar1/Sar Familie oder durch Phosphatidylinositol-Phospholipide (PIPs). Insgesamt gibt es ca. 20 verschiedene Arten von Clathrin-Adaptoren, die in ihrer Größe zwischen 300 und ca. 3000 Aminosäuren variieren. Sie werden im Hinblick auf ihre Bindungsmotive in verschiedene Klassen unterteilt (zusammengefasst in (Owen et al., 2004)). Die am besten bekannten Clathrin-Adaptoren sind die AP-Komplexe (Adaptor Protein) AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4. Es handelt sich hierbei um ca. 300 kDa schwere Heterotetramere, bestehend aus zwei großen Ketten, (γ 1 und β 1 bei AP-1, α und β 2 bei AP-2, δ und β 3 bei AP-3, ϵ und β 4 bei AP-4), einer mittleren Kette (μ 1, μ 2, μ 3 und μ 4) und einer leichten Kette (σ 1, σ 2, σ 3 und σ 4) (zusammengefasst in (Kirchhausen, 1999)). Die Adaptor-Komplexe AP-1 (Keen et al., 1987), AP-3 (Dell'Angelica et al., 1997) und AP-4 (Dell'Angelica et al., 1999) sind für den Transport vom TGN zu den Endosomen oder Lysosomen verantwortlich und AP-2 vermittelt die Endocytose an der Plasmamembran (Ahle et al., 1988).

1.2.2 COPII-Vesikel

COPII-Vesikel sind am anterograden Transport von Frachtmolekülen vom ER in Richtung Golgi-Apparat beteiligt (Barlowe et al., 1994). Sie wurden erstmals bei Experimenten mit Membranen des rauen ER aus Hefezellen entdeckt. Hefezellen mit einer Mutation in den COPII-Proteinen zeigen eine Akkumulation von Sekretionsproteinen im rauen ER (Baker et al., 1988; Novick et al., 1980). COPII-Hüllproteine und Frachtmoleküle werden an bestimmte Stellen innerhalb des ER, welche als ER *exit sites* (ERES) oder transitional ER (tER) bezeichnet werden, rekrutiert (Bannykh et al., 1996; Budnik und Stephens, 2009). COPII-Vesikel

bestehen im Wesentlichen aus den fünf Proteinen Sar1, Sec23, Sec24, Sec31 und Sec13 (Barlowe et al., 1994; Matsuoka et al., 1998). Die Rekrutierung beginnt mit der Aktivierung der kleinen GTPase Sar1 durch den Austausch von GDP zu GTP (Nakano und Muramatsu, 1989). Dieser Vorgang wird durch den am ER lokalisierten Nukleotidaustauschfaktor Sec12 katalysiert (Barlowe und Schekman, 1993; Nakano et al., 1988). Durch die Bindung von GTP kommt es innerhalb von Sar1 zu einer Konformationsänderung und zur Exposition einer N-terminalen amphipathischen Helix, welche in die Membran inseriert wird (Lee et al., 2005). Anschließend rekrutiert das gebundene Sar1 zunächst den heterodimeren Sec23/24 Komplex an die Membran (Hicke et al., 1992). Sec23 fungiert als GTPase aktivierendes Protein (GAP) und katalysiert die GTP Hydrolyse von Sar1 (Yoshihisa et al., 1993), während Sec24 für die Bindung der Frachtmoleküle verantwortlich ist (Aridor et al., 1998). Zuletzt bindet der Sec13/31 Komplex, ein Heterotetramer bestehend aus zwei Sec13 und zwei Sec31 Untereinheiten (Matsuoka et al., 1998; Stagg et al., 2006) (zusammengefasst in (Hughes und Stephens, 2008)). Durch die Polymerisation des Sec13/31 Komplexes kommt es zur Bildung einer Vesikelknospe und schließlich zur Abschnürung mit Fracht beladener COPII-Vesikel (Bi et al., 2007).

1.2.3 COPI-Vesikel

COPI-Vesikel sorgen für den retrograden Transport von Proteinen vom Golgi-Apparat zurück zum ER (Cosson und Letourneur, 1994; Letourneur et al., 1994). Zudem sind sie für den bidirektionalen (Orci et al., 1997) Transport innerhalb des Golgi-Apparates verantwortlich (Ostermann et al., 1993). COPI-Vesikel wurden bei Studien des intra-Golgi-Transports mit isolierten Golgi-Membranen von Säugerzellen entdeckt (Malhotra et al., 1989). Dabei wurden Golgi-Membranen mit Cytosol und GTPγS inkubiert und die entstandenen Vesikel durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierdurch konnten die Proteine, welche an der Bildung der Proteinhülle beteiligt sind, identifiziert werden. Dabei handelt es sich um den etwa 550 kDa schweren Proteinkomplex Coatomer (von *Coat protomer*) (Waters et al., 1991) und die kleine etwa 20 kDa große GTPase Arf1 (Serafini et al., 1991). COPI-Vesikel können in vitro entweder aus Golgi-Membranen (Ostermann et al., 1993) oder aus synthetisierten Liposomen generiert werden (Spang et al., 1998). Einzelheiten zur Bildung von

COPI-Vesikeln und die einzelnen Komponenten werden im Folgenden detailliert beschrieben.

1.3 Mechanismen der COPI-Vesikelbildung

1.3.1 Das heptamere Hüllprotein Coatomer

Der ca. 550 kDa große Proteinkomplex Coatomer besteht aus den sieben Untereinheiten α -COP (140 kDa), β -COP (107 kDa), β' -COP (104 kDa), γ -COP (97 kDa), δ -COP (57 kDa), ϵ -COP (35 kDa) und ζ -COP (24/20 kDa). Er kann in zwei Subkomplexe unterteilt werden, die *in vitro* bei hoher Salzkonzentrationen dissoziieren: Ein trimerer Komplex, bestehend aus α -, β' - und ϵ -COP und ein tetramerer Komplex, zusammengesetzt aus γ -, δ -, β - und ζ -COP (Eugster et al., 2000; Lowe und Kreis, 1995; Pavel et al., 1998; Waters et al., 1991). Strukturelle Analysen zeigen Homologien des trimeren Komplexes zu Sec13/31 der COPII-Vesikel und zu Clathrin und werden somit als äußere Hülle der COPI-Vesikel angesehen (Lee und Goldberg, 2010). Der tetramere Komplex weist Ähnlichkeiten zu den AP-Komplexen aus dem Clathrin-System auf, weshalb dieser die innere Hülle darstellt.

Die Untereinheiten γ - und ζ -COP existieren in je zwei Isoformen (γ_1 , γ_2 und ζ_1 , ζ_2). Somit gibt es vier verschiedene Isotypen von COPI-Vesikeln ($\gamma_1\zeta_1$, $\gamma_1\zeta_2$, $\gamma_2\zeta_1$ und $\gamma_2\zeta_2$). Die Isoformen γ_1 und γ_2 weisen eine Ähnlichkeit von 80 % auf, während sich die beiden ζ -Isoformen durch zusätzliche 30 Aminosäuren am N-Terminus von ζ_2 unterscheiden (Futatsumori et al., 2000; Wegmann et al., 2004). Die Isotypen zeigen unterschiedliche Verteilungen am Golgi. So sind 70 % der Vesikel mit γ_1 und 80 % mit ζ_2 am *cis*-Golgi lokalisiert, während 60 % der Vesikel mit γ_2 am *trans*-Golgi nachgewiesen werden können. Der Isotyp $\gamma_1\zeta_1$ kommt mit 50 % am häufigsten vor, gefolgt von 30 % $\gamma_2\zeta_1$ und 20 % $\gamma_1\zeta_2$. $\gamma_2\zeta_2$ stellt mit 5 % den geringsten Anteil dar (Moelleken et al., 2007). Diese unterschiedliche Verteilung der einzelnen Isotypen legt nahe, dass sie unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle aufweisen. Noch ist jedoch unklar, ob ihnen bestimmte Transportrouten oder eine unterschiedliche Zusammensetzung der Frachtmoleküle zugeordnet werden können.

1.3.2 Die Familie der p24 Proteine

Die Mitglieder der p24 Proteinfamilie sind ca. 24 kDa große Typ I Transmembranproteine. In Säugerzellen wurden die sechs Mitglieder p23, p24, p25, p26, p27 und tp24 identifiziert (Dominguez et al., 1998). Sie bestehen aus einer 21 kDa großen luminalen Domäne, die durch einen Transmembranabschnitt mit einer kurzen, cytoplasmatischen Domäne verbunden ist. Am N-Terminus befindet sich eine GOLD (*Golgi dynamics*) Domäne und eine *coiled coil* Region, welche für die Oligomerisierung der Proteine verantwortlich ist (Ciufo und Boyd, 2000). Der ca. 13-20 Aminosäuren kurze C-Terminus besitzt ein Di-Phenylalanin und ein Di-basisches Motiv, welche die Bindung von COPI- und COPII-Hüllproteinen ermöglichen (Bethune et al., 2006; Sohn et al., 1996). p24 Proteine befinden sich in COPI- und COPII-Vesikeln und sind am ER, ERGIC und *cis*-Golgi lokalisiert (zusammengefasst in (Strating und Martens, 2009)). In ihrer dimeren Form binden sie Arf1-GDP, was als einer der ersten Schritte der COPI-Vesikelbiogenese angesehen werden kann (Gommel et al., 2001).

1.3.3 ArfGEFs und ArfGAPs

Kleine GTPasen benötigen zum Nukleotidaustausch und zur Hydrolyse von GTP akzessorische Proteine. Diese sind zum einen die GTP-Austauschfaktoren (*GTP exchange factors*, GEFs) und zum anderen die GTPase aktivierende Proteine (GAPs).

Bei Säugern sind 15 ArfGEFs bekannt, die sich nach ihrer Struktur in 5 verschiedene Klassen unterteilen lassen: *Golgi Brefeldin A (BFA)-resistant factor 1/ BFA-inhibited GEF* (GBF1/BIG), *Arf nucleotide binding site opener* (ARNO/Cytohesin), *exchange factor for Arf6* (EFA6), *Brefeldin-resistant Arf GEF* (BRAG) und *F-box only protein 8* (FBX8) (zusammengefasst in (Casanova, 2007)). Obwohl sie sich in ihrer Sequenz sehr unterscheiden, sind alle ArfGEFs durch eine zentrale 200 Aminosäuren lange katalytische Domäne charakterisiert, welche nach dem Hefe sec7p Protein als Sec7 Domäne bezeichnet wird. Diese Domäne reicht aus, um GDP zu GTP auszutauschen (Chardin et al., 1996). Sie verfügt über einen konservierten Glutamatrest an der Spitze eines hydrophoben Loops, welcher in die Nukleotidbindetasche der GTPase inseriert wird (Beraud-Dufour et al., 1998; Cherfils et al., 1998). Dort kommt es zur elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem

Glutamatrest und dem β -Phosphat des GDP, welches daraufhin aus der Bindetasche verdrängt wird. Der Nukleotidaustausch kann durch BFA, eine aus dem Pilz *Penicillium brefeldianum* isolierte Substanz, inhibiert werden (Donaldson et al., 1992b).

Von der Familie der ArfGAPs sind bisher ca. 30 Mitglieder bekannt. Alle besitzen eine katalytische Domäne mit einer Länge von 70 Aminosäuren, welche ein Zinkfingermotiv mit der Sequenz CXXCX(16-17)CXXC beinhaltet. Zusätzlich verfügen alle ArfGAPs über ein konserviertes Arginin, welches für die GAP Aktivität von entscheidender Bedeutung ist (Cukierman et al., 1995). Am COPI vermittelten Transport von Proteinen in Säugerzellen sind die drei Golgi-lokalisierten ArfGAPs ArfGAP1, ArfGAP2 und ArfGAP3 beteiligt (Cukierman et al., 1995; Frigerio et al., 2007). ArfGAP1 verfügt über zwei ALPS (*ArfGAP1 Lipid Packing Sensor*) Motive, die durch Ausbildung einer amphipathischen Helix an gekrümmte Membranen binden (Bigay et al., 2005). Dabei wird die Aktivität durch die Stärke der Membrankrümmung reguliert. Je stärker die Membran gekrümmt ist, desto besser kann ArfGAP1 binden (Bigay et al., 2003). Die beiden Proteine ArfGAP2 und 3 besitzen kein ALPS Motiv und binden daher nicht direkt an Membranen, sondern interagieren direkt mit Coatomer (Frigerio et al., 2007; Weimer et al., 2008). Dies legt die Vermutung nahe, dass ArfGAP1 eher eine Rolle bei der Aktivierung/Inaktivierung von Arf1 spielt, während ArfGAP2 und 3 durch direkte Interaktion mit Coatomer beim Ablösen der Hüllproteine beteiligt sind (Popoff et al., 2011).

1.3.4 Arf (ADP-ribosylation factor)

Arf gehört zu der Superfamilie der Ras Proteine. Neben der kleinen GTPase Arf gehören zu dieser Familie auch Arl (*Arf-like*) Proteine, Arp (*Arf-related proteins*) und Sar (*Secretion-associated und Ras-related*) Proteine. Ursprünglich wurde Arf als Kofaktor bei der ADP-Ribosylierung von Cholera Toxin entdeckt und erhielt somit seinen Namen (Kahn und Gilman, 1986). Erst später konnte gezeigt werden, dass Arf eine wesentliche Rolle beim vesikulären Proteintransport einnimmt und am Golgi-Apparat lokalisiert ist (Stearns et al., 1990). Alle Arf-Proteine werden am N-Terminus am zweiten Glycinrest myristoyliert, eine Modifikation, welche für die Rekrutierung an die Membran wichtig ist. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz werden sie in 3 Klassen unterteilt (Tsuchiya et al., 1991). Die erste Klasse umfasst die Proteine Arf1,

Arf2 und Arf3. Sie bestehen aus 181 Aminosäuren und haben eine Ähnlichkeit von 96 %. Ihre Hauptaufgabe ist die Rekrutierung verschiedener Hüllproteine innerhalb des sekretorischen Weges. Zudem aktivieren sie Lipid-modifizierende Enzyme wie die Phospholipase D. Zur zweiten Klasse gehören Arf4 und Arf5. Ihre Funktion und Lokalisation sind weitgehend unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass Arf5 eine Rolle im Golgi Transport spielt und Hüllproteine zum TGN rekrutiert. Arf6 gehört als einziges Protein zur dritten Klasse. Es ist an der Plasmamembran und an Endosomen lokalisiert und spielt bei der Endozytose eine Rolle. Außerdem reguliert es die Aktinpolymerisation an der Plasmamembran (Donaldson, 2003) (zusammengefasst in (D'Souza-Schorey und Chavrier, 2006; Donaldson und Honda, 2005)). Arf6 besteht aus nur 175 Aminosäuren. Die am besten untersuchten Arf-Proteine sind Arf1 und Arf6.

1.3.5 Struktur von Arf1

Wie alle GTP-bindenden Proteine kommt Arf1 in zwei unterschiedlichen Konformationen vor. In der GDP-gebunden Form befindet sich Arf1 als lösliches, inaktives Protein im Cytosol, während die aktive GTP-gebundene Form stabil in Membranen verankert ist. Alle kleine GTPasen weisen eine konservierte Domäne auf, die G-Domäne. Hierbei handelt es sich um sechs β -Faltblätter und fünf α -Helices, die aus den fünf konservierten Bereichen G1-G5 (von G *binding*) bestehen (zusammengefasst in (Wittinghofer und Vetter, 2011)). Der Austausch von GDP zu GTP ist durch Konformationsänderungen in den so genannten switch I (SWI) und switch II (SWII) Regionen charakterisiert, welche das γ -Phosphat des GTP binden. Im Gegensatz zu den anderen Proteinen der Ras Familie verfügt Arf1 über zwei zusätzliche Bereiche, die während des Nukleotidaustausches ihre Konformation ändern. Dies ist zum einen eine am N-Terminus (Aminosäuren 2-17) lokalisierte amphipathische Helix, die am zweiten Glycinrest myristoyliert wird (Antonny et al., 1997) und zum anderen eine *interswitch* Region, die sich zwischen SWI (Aminosäuren 40-51) und SWII (Aminosäuren 68-81) befindet (Abbildung 1.2) (Amor et al., 1994). Im GDP-gebundenen Zustand bildet diese Interswitch Region eine Tasche in welcher die N-terminale Helix akkommodiert ist (zusammengefasst in (Pasqualato et al., 2002)). Durch die Bindung von GTP verschiebt sich die Interswitch Region um zwei Aminosäuren nach oben und es kommt zur Konformationsänderung

der SW-Regionen. Als Folge wird die amphipathische myristoylierte Helix ausgeklappt (Goldberg, 1998), welche anschließend in die Membran inseriert wird. Die Orientierung der Helix und die Position des Myristoylrests an der Membran konnte noch nicht ausreichend geklärt werden. Das Problem bei der Analyse ist, dass myristoyliertes Arf1-GTP nicht löslich ist und daher nur schwer für die Strukturauflösung verwendet werden kann. Alle bisherigen Strukturanalysen wurden entweder mit Arf1-GDP oder mit einer um 17 Aminosäuren verkürzten Form von Arf1 (Arf1N Δ 17) durchgeführt. Bisher wurde jedoch angenommen, dass die amphipathische Helix parallel zur Membran orientiert ist (Antonny et al., 1997) und der Myristoylanker waagrecht inseriert wird (Harroun et al., 2005). Im Gegensatz hierzu zeigten NMR Studien von Arf1-GTP an Bizellen, dass der Myristoylanker parallel zur Helix auf der Membran liegt (Liu et al., 2010).

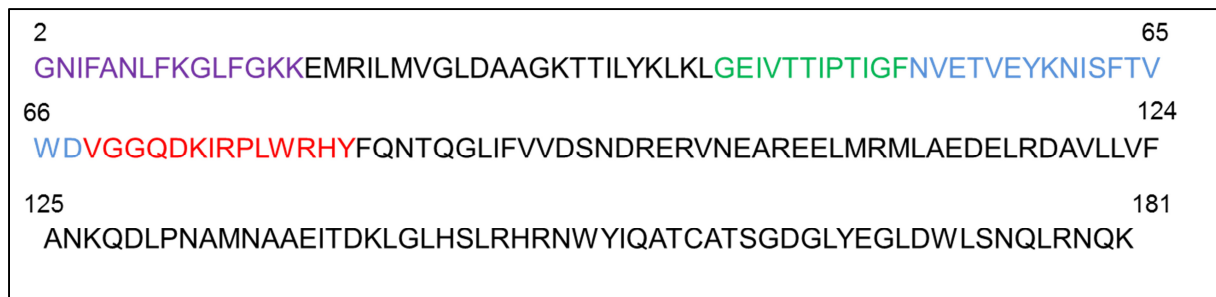


Abbildung 1.2: Primärstruktur von Arf1. Die N-terminale Helix ist violett dargestellt. Die Switch 1 Region in grün, Interswitch in blau und Switch II in rot. Die Abbildung wurde nach (Nie et al., 2003) modifiziert.

1.3.6 Biogenese der COPI-Vesikel

Die Bildung von COPI-Vesikeln kann in mehrere Schritte unterteilt werden (Abbildung 1.3): Rekrutierung der Hüllproteine, Aufnahme der Frachtmoleküle, Knospung, Abschnürung und Entfernen der Hüllproteine (*uncoating*).

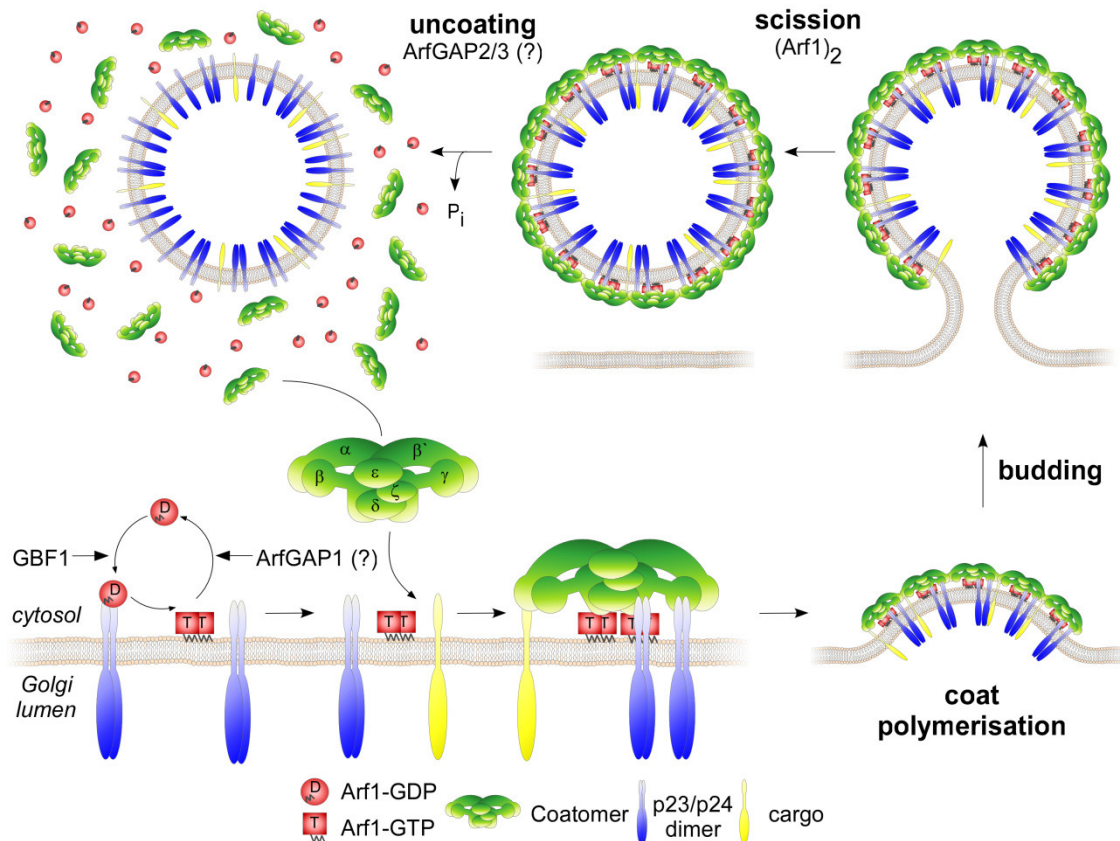


Abbildung 1.3: Mechanismen der COPI Vesikelbildung.

Erläuterungen siehe Text. Die Abbildung wurde von Popoff et al., 2011 übernommen

Der erste Schritt ist die Rekrutierung der kleinen GTPase Arf1 an die Membran. Arf1 liegt in einem löslichen, GDP-gebundenen Zustand im Cytosol vor. Es konnte gezeigt werden, dass Arf1-GDP mit der C-terminalen Seite an Dimere der p24 Proteinfamilie bindet und diese somit als Arf1-Rezeptoren dienen (Contreras et al., 2004; Gommel et al., 2001; Majoul et al., 2001). Als weiterer Arf1-Rezeptor am *cis*-Golgi wurde das v-SNARE Membrin identifiziert (Honda et al., 2005). Nach der Rekrutierung von Arf1 an die Membran, kommt es zur Dimerisierung des Proteins. Ein Vorgang, der für die spätere Abschnürung von COPI-Vesikel essentiell ist (Beck et al., 2011; Beck et al., 2008). Außerdem erfolgt der Austausch von GDP zu GTP, welcher durch einen GTP-Austauschfaktor katalysiert wird. Bei der Aktivierung von Arf1 dient hauptsächlich das

am *cis*-Golgi und ERGIC lokalisierte Protein GBF1 als Austauschfaktor (Claude et al., 1999; Niu et al., 2005; Zhao et al., 2002). Durch die Bindung von GTP erfährt Arf1 eine Konformationsänderung (siehe Abschnitt 1.3.5) und es kommt zum Ausklappen eines N-terminalen Myristoylankers und einer amphipathischen Helix. Diese wird in die Membran inseriert und sorgt somit für eine stabile Verankerung (Antonny et al., 1997; Franco et al., 1996). Im Folgenden wird der heptamere Komplex Coatomer aus dem Cytosol rekrutiert. Im Unterschied zu Clathrin- und COPII-Vesikeln geschieht dies *en bloc* und nicht schrittweise (Hara-Kuge et al., 1994). Durch Photocrosslink Studien konnte gezeigt werden, dass Coatomer an unterschiedlichen Stellen mit Arf1 interagiert: mit der Trunk Domäne von β - und γ -COP, mit β' -COP und mit der Longin Domäne von δ -COP (Sun et al., 2007; Zhao et al., 1997; Zhao et al., 1999). Durch *Yeast-two-Hybrid* Analysen wurde außerdem eine Interaktion mit ϵ -COP nachgewiesen (Eugster et al., 2000). Es binden insgesamt ca. drei bis vier Arf1 Moleküle an einen Coatomer Komplex (Beck et al., 2009; Serafini et al., 1991). Neben Interaktionen mit Arf1 konnte auch eine direkte Interaktion von γ -COP mit der cytoplasmatischen Domäne der p24 Familie festgestellt werden, welche zu einer weiteren Stabilisierung an der Membran führt (Harter et al., 1996). Diese Interaktion führt schließlich zu einer Konformationsänderung innerhalb des Coatomer-Komplexes (Langer et al., 2008) (Bethune et al., 2006) und in Folge davon zu dessen Polymerisation (Reinhard et al., 1999), was zur Krümmung der Membran führt. Die Aufnahme von Frachtmolekülen in COPI-Vesikel erfolgt über Interaktionen mit Coatomer. Dabei binden Proteine mit einem Di-Lysin Motiv an unterschiedliche Stellen innerhalb des Komplexes. So wurde gezeigt, dass Proteine mit der Sequenz KKXX an die WD-40 Domäne von α -COP binden und solche mit KXKXX an β' -COP (Eugster et al., 2000; Eugster et al., 2004). Nach der Aufnahme der Frachtmoleküle müssen die gebildeten COPI-Knospen von der Membran abgeschnürt werden. Dies geschieht durch dimerisiertes, aktiviertes Arf1 (Beck et al., 2011) und ist unabhängig von der Hydrolyse von GTP (Adolf et al., 2013). Der letzte Schritt ist die Fusion der Vesikel mit der Zielmembran. Voraussetzung hierfür ist das Entfernen der Proteinhülle. Dies geschieht durch die Hydrolyse von GTP durch Arf1 (Reinhard et al., 2003; Tanigawa et al., 1993). Die Stimulation hierfür liefert ArfGAP1 (Cukierman et al., 1995). Die spezifische Fusion der Vesikel mit der Zielmembran wird durch komplementäre SNARE Proteine (*soluble NSF attachment protein receptors*) gesteuert (McNew et al., 2000). Dabei werden die SNAREs in der Membran der

Vesikel als vSNAREs bezeichnet und solche in der Zielmembran als tSNAREs (Sollner et al., 1993).

1.4 Struktur von COPI-Vesikel

COPI-Vesikel weisen ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften zu den Clathrin-Vesikeln auf. In beiden Systemen ist Arf für die Rekrutierung der Hüllproteine verantwortlich. So rekrutiert Arf1 den Coatomer-Komplex (Donaldson et al., 1992a), sowie die Adaptor-Komplexe AP-1 (Traub et al., 1993), AP-3 (Ooi et al., 1998) und AP-4 (Boehm et al., 2001). AP-2 wird über PIP₂ (Jackson et al., 2010) oder Arf6 an die Membran rekrutiert (Paleotti et al., 2005).

Die Struktur des tetrameren Coatomer-Subkomplexes ist der des Adaptor-Komplexes sehr ähnlich. Die beiden großen Untereinheiten β - und γ -COP bestehen genau wie die großen Untereinheiten der AP-Komplexe aus einer *Appendage* und einer *Trunk* Domäne, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind (Duden et al., 1991). Die kleineren Untereinheiten δ - und ζ -COP ähneln den σ - und μ -Untereinheiten (Cosson et al., 1996). Da der Coatomer-Komplex aus insgesamt sieben Untereinheiten zusammengesetzt ist, war es bisher nicht möglich, die Struktur des gesamten Komplexes zu lösen. Es gibt daher nur Strukturanalysen einzelner Domänen von den verschiedenen Untereinheiten. Erst kürzlich wurde die Struktur von γ/ζ -COP im Komplex mit Arf1-GTP gelöst (Yu et al., 2012). Diese zeigt eine deutliche Homologie zu den α/σ -Untereinheiten des AP-2. γ -COP bildet ein α -Solenoid in dessen Tasche ζ -COP sitzt. Die Interaktion mit Arf1 erfolgt über hydrophobe Kontakte mit γ -COP. Obwohl die Struktur von β/δ -COP noch nicht gelöst wurde, nimmt man an, dass das Heterodimer der β 2-AP2 Untereinheit ähnelt. Biochemische Studien zeigen eine zweite Arf1-GTP Bindungsstelle an β -COP. Als Folge wird ein Model vorgeschlagen, bei dem membrangebundenes Arf1 den Coatomer-Komplex durch eine bivalente Interaktion mit den γ/ζ und β/δ Heterodimeren an die Membran rekrutiert (Yu et al., 2012) (zusammengefasst in (Jackson et al., 2012). Die Bindung von Arf1 an β - und γ -COP bestätigen die bereits früher durch Photo-Crosslink Studien beschriebenen Interaktionen (Sun et al., 2007; Zhao et al., 1997). Weitere strukturelle Analysen von Coatomer gibt es zu einzelnen Bereichen des trimeren Subkomplexes. So konnte sowohl ein Fragment von α/β' -COP (Lee und Goldberg, 2010) als auch eines von α/ϵ -COP kristallisiert werden

(Hsia und Hoelz, 2010; Lee und Goldberg, 2010). Neben Kristallstrukturen tragen auch elektronenmikroskopische Studien zur Aufklärung der Coatomer-Struktur bei. Dies sind zum einen Einzelpartikel-Elektronenmikroskopie von Coatomer aus Hefe (Yip und Walz, 2011) und zum anderen Kryo-Elektronentomographie an isolierten COPI-Vesikeln (Faini et al., 2012a).

Da es, wie bereits erwähnt, noch nicht gelungen ist, die vollständige Struktur von Coatomer zu entschlüsseln, konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden, wie genau die Hülle von COPI-Vesikeln aussieht und wie die einzelnen Untereinheiten miteinander interagieren. Ebenso ist nicht bekannt, wie genau Arf1 mit den verschiedenen Coatomer-Untereinheiten interagiert und wo dessen genaue Position auf einem COPI-Vesikel lokalisiert ist.

2. Ergebnisse

Die kleine GTPase Arf1 und der heptamere Coatomer-Komplex spielen bei der Biogenese von COPI-Vesikeln eine entscheidende Rolle. Beide Proteine sind Bestandteile der Proteinhülle eines COPI-Vesikels. Nach der Rekrutierung der inaktiven GDP-gebundenen Form von Arf1 an die Golgi-Membran wird das Protein durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert und inseriert seine myristoylierte amphiphile Helix in die Membran. Neben dieser stabilen Verankerung kommt es zur Dimerisierung der kleinen GTPase (Beck et al., 2008). Im Anschluss wird der cytosolische Coatomer-Komplex an die Membran rekrutiert und interagiert zum einen mit Proteinen der p24 Familie und zum anderen mit Arf1. Direkte Interaktionen zwischen Arf1 und Coatomer konnten bereits durch verschiedene Crosslinkstudien beschrieben werden (Eugster et al., 2000; Sun et al., 2007; Zhao et al., 1997; Zhao et al., 1999). So ist bekannt, dass Arf1 Interaktionen mit ϵ -COP, β -COP, β' -COP, δ -COP und γ -COP eingehen kann. Wie genau jedoch Arf1 mit Coatomer bei der Bildung von COPI-Vesikeln interagiert und wo Arf1 bezogen auf den Coatomerkomplex lokalisiert ist, ist noch nicht bekannt. Abbildung 2.1 zeigt mögliche Modelle zur Interaktion von Arf1 mit Coatomer. So ist es beispielsweise möglich, dass ein dimeres Arf1-Molekül unterhalb des Coatomer-Komplexes oder jeweils an den Seiten von Coatomer lokalisiert ist und somit zwei Coatomer-Komplexe über ein Arf1-Dimer miteinander verbrückt werden (Abb. 2.1 (A)). Es ist zwar bekannt, dass Arf1 an der Membran dimerisiert, ein Prozess, welcher für die Abschnürung freier COPI-Vesikel von Bedeutung ist (Beck et al., 2011), jedoch ist nicht eindeutig gezeigt, dass Arf1 als Dimer auch in freien Vesikeln vorhanden ist. Somit könnte auch das Modell in Abb. 2.1 B zutreffen, bei welchem Interaktionen zwischen einem einzelnen Arf1-Molekül und Coatomer dargestellt sind. Es könnten jedoch auch sowohl Arf1-Dimere als auch Arf1-Monomere als Bestandteil eines COPI-Vesikels in Frage kommen.

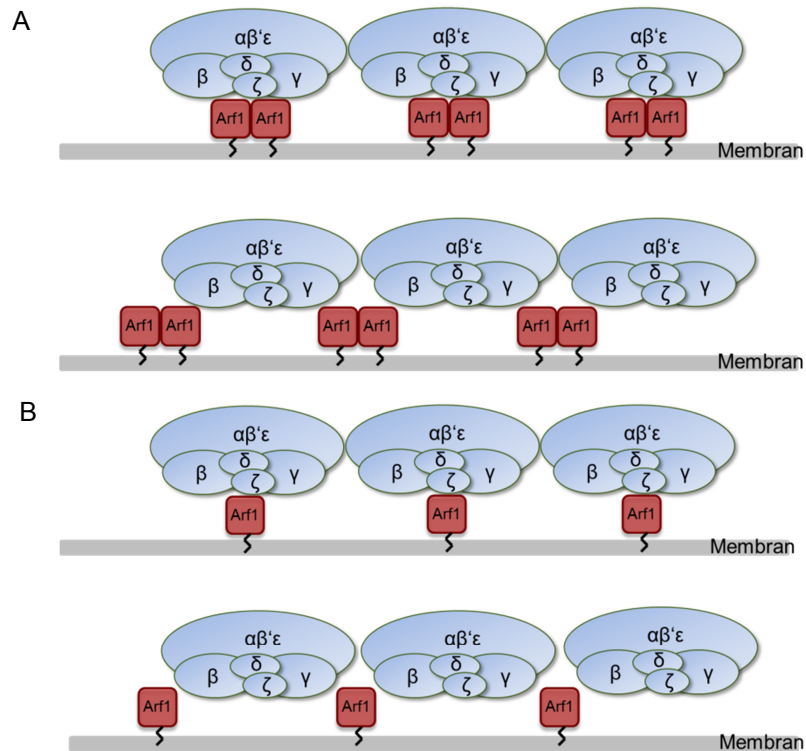


Abb. 2.1: Modell über verschiedene mögliche Interaktionen zwischen Arf1 und dem Coatomer-Komplex.

(A) Mögliche Interaktionen zwischen Arf1-Dimer und Coatomer, (B) Mögliche Interaktionen zwischen einem Arf1-Monomer und Coatomer. Rot: Arf1, blau: Coatomer.

Welches der genannten Modelle zutrifft, ist die Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe von photolabilen Arf1-Derivaten sollen Interaktionen zwischen Arf1 und Coatomer genauer untersucht und die Lokalisation von Arf1 innerhalb der COPI-Hülle näher analysiert werden. Da nur myristoyliertes Arf1 stabil an die Membran binden kann, soll zunächst eine Methode entwickelt werden, um die Myristoylierungseffizienz von Arf1 zu verbessern. Als zweiter Teil der Arbeit soll eine thermophile Arf1-Protein Spezies generiert werden, welche in späteren Studien eingesetzt werden kann.

2.1 Eine neue Expressionsmethode zur Verbesserung der

Arf1-Myristoylierung

Wie bereits erwähnt, ist für die Bindung und stabile Verankerung von Arf1 an die Membran die N-terminale Myristoylierung der amphiphilen Helix essentiell. Diese Myristoylierung wird kotranslational durch eine N-Myristoyltransferase (NMT) gewährleistet, welche dem System hinzugefügtes Myristat irreversibel an einen N-terminalen Glycinrest überträgt. Voraussetzung hierbei ist die Abspaltung des N-terminalen Methionins, ein Vorgang, welcher durch die Anwesenheit einer Methion Aminopeptidase (MetAP) katalysiert wird. Die Expression von Arf1 erfolgte in Bakterien. Diese wiederum verfügen nicht über eine NMT, weshalb die Koexpression dieses Enzyms nötig ist. Zwar verfügen Bakterien über etliche endogene Aminopeptidasen, jedoch zeigten im Jahr 2002 Richard Kahn und Kollegen, dass die Koexpression einer zusätzlichen Aminopeptidase zur NMT die Effizienz der Myristoylierung erhöht (Van Valkenburgh und Kahn, 2002). Sie klonierten ein Expressionsplasmid, welches neben der NMT auch die cDNA für die MetAP enthält. Dieses Plasmid trägt den Namen pHV738 (Abb. 2.2 A). Die Expression der NMT wird durch die Zugabe von IPTG induziert, die Expression der MetAP erfolgt durch einen eigenen Promoter. 2005 beschrieben Paul Randazzo und Kollegen eine weitere Methode zur Expression von myristoyliertem Arf1. Sie benutzten Plasmide, welche die Expression von Arf1 und NMT mit zwei verschiedenen Promotoren und Induktoren erlauben. Das pMON5840 Plasmid, welches für Arf1 codiert, besitzt einen recA Promoter, die Induktion der Expression erfolgt durch die Zugabe von Nalidixinsäure. Die Expression der NMT wird durch die Gabe von IPTG gesteuert. Somit kann zunächst die Expression von NMT durch IPTG in Gang gesetzt werden und anschließend die von Arf1. Dies erlaubt eine bessere Myristoylierungseffizienz, da bei der Bildung von Arf1 bereits NMT vorhanden ist, welche das Myristat auf Arf1 übertragen kann.

Bisher wurde ein einziges Plasmid verwendet, welches sowohl für die NMT als auch für Arf1 codiert. Beide Proteine werden zeitgleich durch Induktion mittels IPTG exprimiert. Die Myristoylierungseffizienz betrug mit diesem System meist um die 40 %. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden zuvor beschriebenen Methoden zur Verbesserung der Arf1-Myristoylierung kombiniert. Hierzu wurde die cDNA von Arf1

aus dem Plasmid pRSF-Duet1 mittels PCR und den Primern Arf1 NcoI for und Arf1 HindIII rev amplifiziert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend in die Schnittstellen NcoI und HindIII in den pMON5840 Vektor ligiert (Abb. 2.2 B). Das Plasmid pHV738, welches für die NMT und die MetAP kodiert, wurde von Richard Kahn zur Verfügung gestellt.

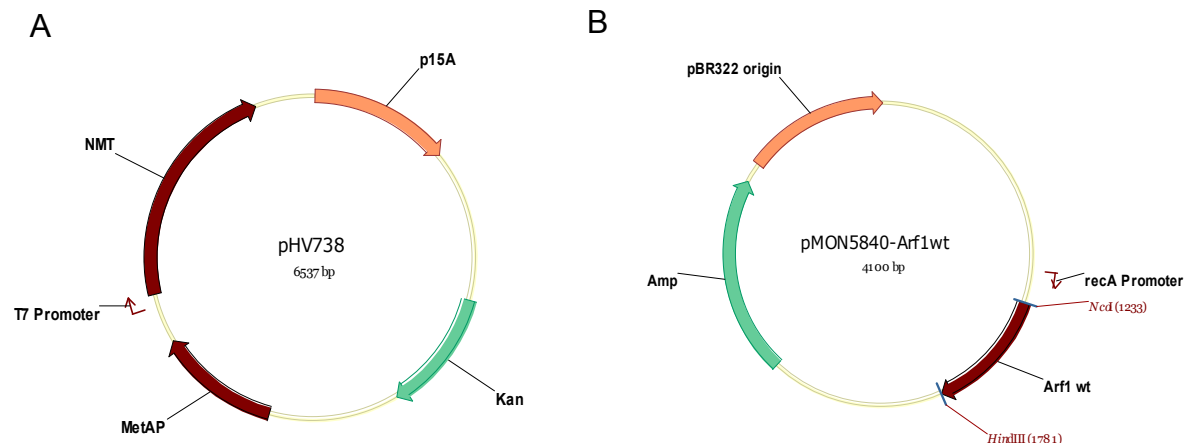


Abb. 2.2: Plasmide für die Expression von Arf1. (A) Das Plasmid pHV738 kodiert für die N-Myristoyltransferase (NMT) und die Methionin Aminopeptidase (MetAP). Die Expression wird im Falle der NMT über einen T7 Promoter kontrolliert, die MetAP verfügt über ihren eigenen endogenen Promoter. (B) Das Plasmid pMON5840 kodiert für Arf1, die Expression wird durch einen recA Promoter kontrolliert. Kan: Kanamycin Resistenz, Amp: Ampicillin Resistenz, p15A und pBR322: Replikationsursprung.

Die beiden Plasmide wurden in BL21 *E.coli* Bakterien kotransformiert. Anschließend wurden die Bakterien in entsprechendem LB-Medium kultiviert und zunächst die Expression der NMT durch Zugabe von IPTG induziert. Nach einer Stunde erfolgte durch Zugabe von Nalidixinsäure die Expression von Arf1. Detaillierte Schritte werden in Abschnitt 4.3.12 beschrieben. Zur Analyse wurde jeweils vor und nach der Induktion eine Probe genommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden mittels Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Abb. 2.3 zeigt das Ergebnis einer Testexpression von mehreren Klonen.

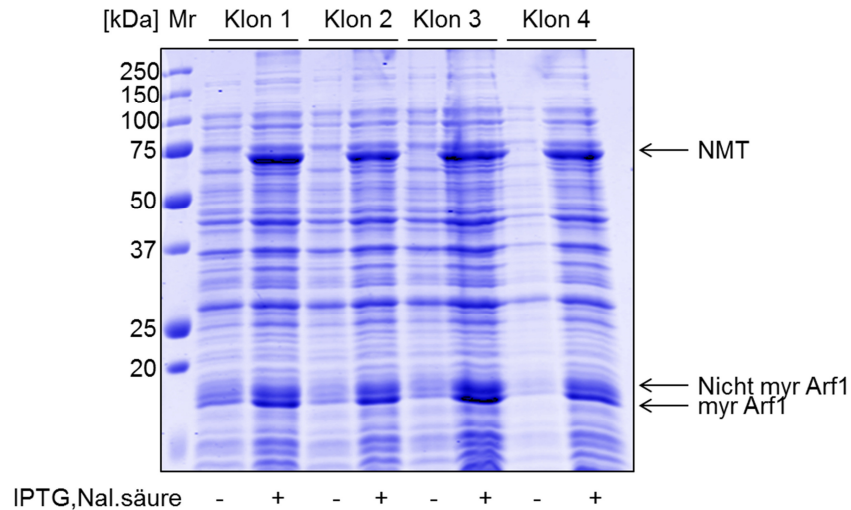


Abb. 2.3: Expression von Arf1. Bakterien, welche mit den beiden Plasmiden pHV738 und pMON5840-Arf1 transformiert wurden, wurden in entsprechendem LB-Medium kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG und Nalidixinsäure induziert. Zur Überprüfung der Expression wurde jeweils eine Probe der Bakterienkultur auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend mittels Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

Bei allen vier Klonen konnte durch Zugabe von IPTG und Nalidixinsäure die Expression von NMT und Arf1 induziert werden. Die Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa entspricht der NMT und die beiden Banden bei 18 kDa sind zum einen die nicht myristoylierte Form und zum anderen die myristoylierte Form von Arf1. Die Effizienz der Myristoylierung beträgt in allen Fällen ungefähr 60-70 %. Die Ausbeute an myristoyliertem Arf1 ist somit signifikant größer als dies mit den alten Plasmiden der Fall war (40%). Die Aufreinigung von Arf1 erfolgte wie in Abschnitt 4.3.12 beschrieben.

2.2 Interaktionen zwischen Arf1 und Coatomer

2.2.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung

photolabiler Arf1-Derivate

Für die Herstellung photolabiler Proteine wurde ein System verwendet, welches von Peter G. Schultz und Kollegen im Jahre 2002 entwickelt wurde und die Inkorporation photolabiler Aminosäuren *in vivo* in *E.coli* Zellen ermöglicht (Chin et al., 2002). Der Vorteil im Vergleich zur Herstellung von photolabilen Proteinen in einem *in vitro* Translationssystem ist die größere Ausbeute an Protein. Benötigt wird hierfür eine orthogonale tRNA, welche nicht von endogenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erkannt wird und das photolabile Aminosäurederivat an die Stelle eines „amber“ Stopcodons (UAG) in die Proteinsequenz einbaut. Ebenso muss dem System eine orthogonale tRNA-Synthetase zugefügt werden, welche für die Aminoacylierung der orthogonalen tRNA sorgt. Als photolabiles Aminosäurederivat wurde p-Benzoyl-L-phenylalanin (Bp) verwendet (Abb. 2.4). Bp wird durch die Bestrahlung mit UV-Licht radikalisiert und bindet kovalent Bindungspartner, die sich in einer Umgebung von 3 Å befinden.

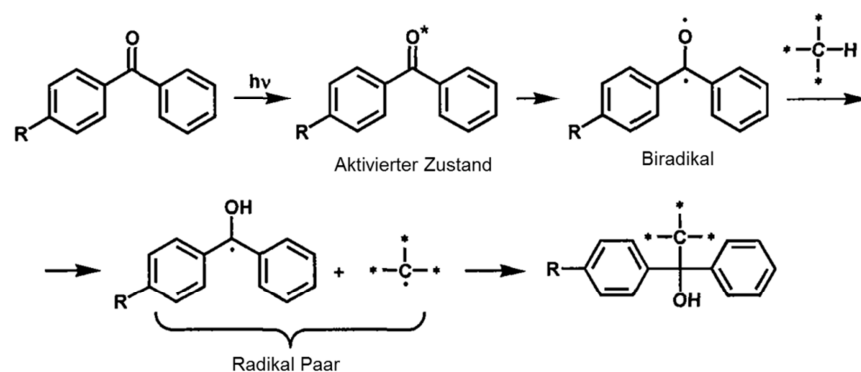


Abb. 2.4: Reaktionsmechanismus von Benzophenon. Benzophenon ist der reaktive Rest des photolabilen Aminosäurederivats p-Benzoyl-L-phenylalanin. Nach Aktivierung durch UV-Licht bildet sich ein freies Radikal, welches mit C-H-Bindungen von Proteinen innerhalb von 3 Å eine kovalente Bindung eingehen kann. Die Abbildung wurde aus (Levy et al., 2012) übernommen.

Mit diesem System konnte bereits Dr. Zhe Sun Interaktionen zwischen Arf1 und definierten Coatomer-Untereinheiten nachweisen (Sun et al., 2007). Sie konnte zeigen, dass Arf1 I46Bp mit β- und β'-COP, Arf1 I49Bp mit γ-COP und Arf1 Y167Bp

mit δ -COP interagiert. Um die Frage zu beantworten, wo genau Arf1 im Hinblick auf Coatomer lokalisiert ist und ob es sich um ein oder zwei Arf1-Moleküle handelt, wurden Arf1-Derivate hergestellt, die an zwei Positionen innerhalb eines Moleküls eine photolabile Aminosäure aufweisen. Dazu wurden die bereits bekannten Positionen innerhalb von Arf1 gewählt. Hierfür mussten zunächst neue Expressionsplasmide hergestellt werden, da mittlerweile von Peter G. Schultz und Kollegen ein neues, verbessertes System der orthogonalen tRNA/tRNA Synthetase entwickelt wurde (Young et al., 2010). In Abb. 2.5 A ist der Vektor pEVOL dargestellt, der zum einen die tRNA kodiert und zum anderen zwei Kopien der tRNA Synthetase (aaRS) beinhaltet. Als Expressionsvektor für die photolabilen Proteine wurde der pET-Duet1 Vektor verwendet, der zwei Multiple Klonierungsstellen, MCS1 und MCS2, besitzt. In die MCS1 wurde über die Restriktionsstellen NcoI und BamHI die N-Myristoyltransferase aus der Hefe (yNMT) eingefügt, welche für die Myristoylierung von Arf1 notwendig ist. Damit im nächsten Schritt die Sequenz für Arf1 in die MCS2 kloniert werden konnte, musste zunächst die NdeI Restriktionsstelle innerhalb der NMT-Sequenz durch Mutagenese entfernt werden. Die Sequenz für Arf1 wurde aus einem anderen Vektor mittels PCR und den Primern Arf1-FKBP NdeI for und Arf1 cys BamHI rev amplifiziert, mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut, und anschließend in die Schnittstellen NdeI und BglII der MCS2 ligiert. Die amber Stopcodons an den Positionen I46, I49 und Y167 wurden mittels Mutagenese PCR und den in Abschnitt 2.1.7 aufgelisteten Mutagenese Primern eingeführt. Da das Stopcodon der yNMT ebenfalls ein TAG Stopcodon war, musste dies noch in TAA mutagenisiert werden, um den Einbau eines Bp an dieser Position zu verhindern. Auf diese Weise entstanden drei verschiedene Plasmide, die für doppel-photolabile Arf1-Varianten kodieren: Arf1 I46Bp I49Bp, Arf1 I46Bp Y167Bp und Arf1 I49Bp Y167Bp (Abb. 2.5 B). Um die Effizienz der Myristoylierung von Arf1 zu verbessern (siehe hierzu Abschnitt 2.1), wurde ein zweites Expressionsplasmid hergestellt, welches die cDNA für eine Methionin Aminopeptidase (MetAP) enthält (Abb. 2.5 C). Hierzu wurde der Vektor pRSF-Duet1 verwendet. Die MetAP wurde über die Schnittstelle AatII aus dem Donorplasmid pHV738 herausgeschnitten und in die entsprechende Schnittstelle in pRSF-Duet1 ligiert.

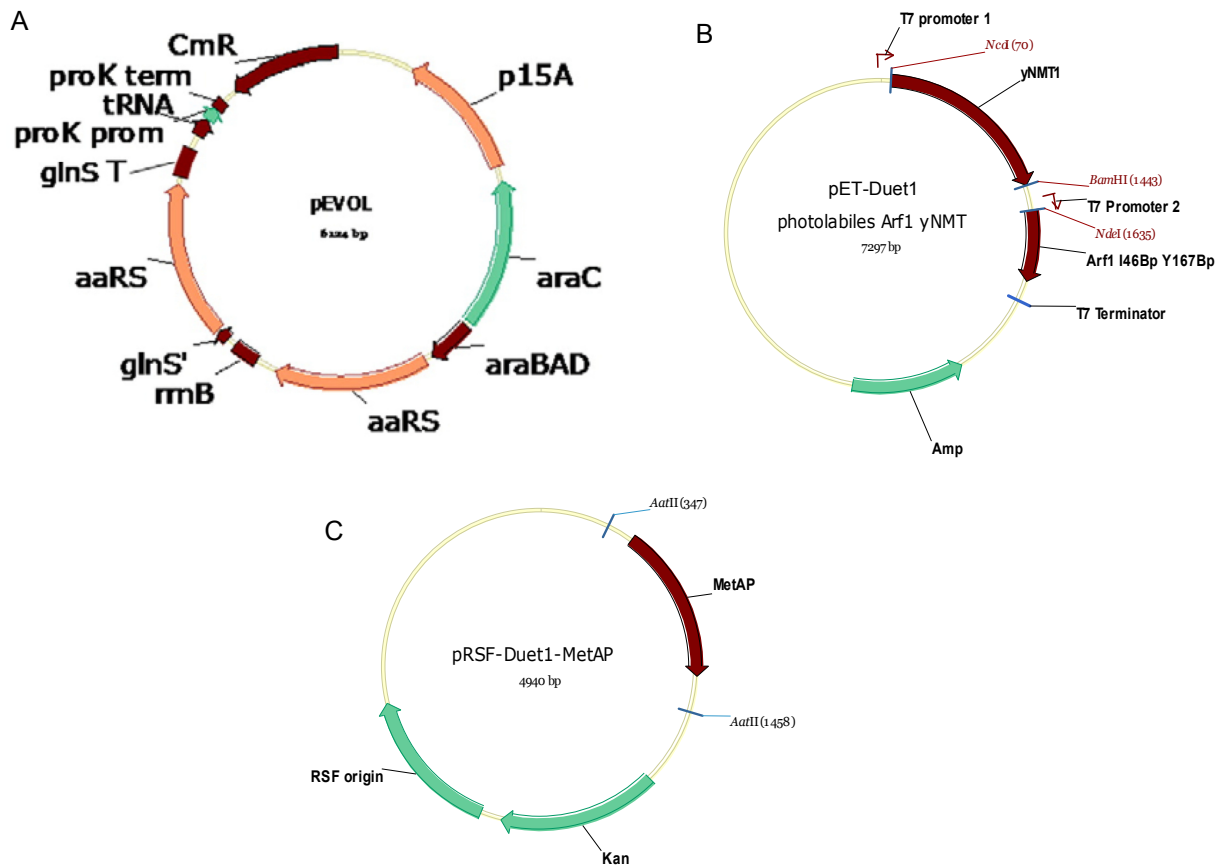


Abb. 2.5: Plasmidkarten der verwendeten Expressionsvektoren. (A) pEVOL Vektor kodiert für die tRNA und zwei Kopien der tRNA Synthetase (aaRS). Die Plasmidkarte wurde aus Young et al., 2010 übernommen. (B) Der pET-Duet Vektor kodiert für die N-Myristoyltransferase (yNMT) und die photolabilen Arf1-Derivate, hier dargestellt für Arf1 I46Bp Y167Bp. Die NMT wurde über die Schnittstellen NcoI und BamHI und Arf1 über NdeI und BglII kloniert. Die amber Stopcodons (UAG) wurden durch Mutagenes PCR eingeführt. (C) pRSF-Duet kodiert für die Methionin-Aminopeptidase, ein Protein, welches die Myristoylierungseffizienz verbessert. Es wurde über die Schnittstelle AatII in den Vektor kloniert. Amp: Ampicillin-Resistenz, Kan: Kanamycin-Resistenz.

Für die Expression der photolabilen Arf1-Derivate mussten alle drei Vektoren in BL21 *E.coli* Bakterien transformiert werden. Hierzu wurde zunächst das pEVOL Plasmid in die Bakterien transformiert und diese anschließend kompetent gemacht (siehe Abschnitt 4.2.1). Die beiden anderen Vektoren wurden anschließend in die pEVOL kompetenten Bakterien kotransformiert. Die Bakterien wurden in geeignetem Medium kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG und Arabinose induziert. Nach 22 h wurden die Zellen zentrifugiert und lysiert. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Ein Beispiel ist in Abb. 2.6 gezeigt. Die Expression von photolabilem Arf1 erfolgte nur in Anwesenheit von Bp und nach Zugabe von IPTG und Arabinose (Spur 3). Die Doppelbande repräsentiert die nicht

myristylierte und die myristoylierte Form von Arf1. Die Expression der NMT ist von der Anwesenheit von Bp unabhängig, daher ist die Proteinbande auch in Spur 2 zu erkennen.

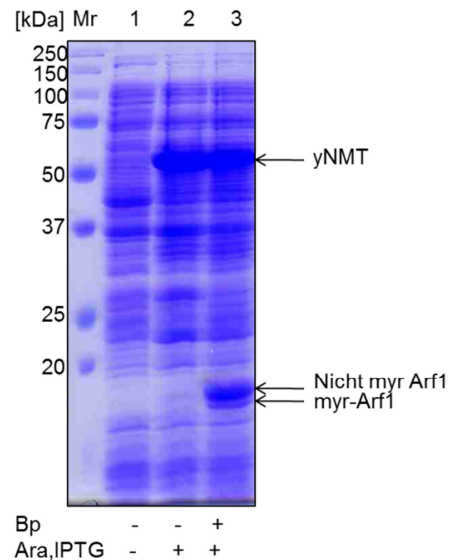


Abb. 2.6: Expression von photolabilem Arf1. Die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Bakterien wurden in LB-Medium mit bzw. ohne Bp kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG und Arabinose induziert. Die Expression wurde anhand eines 15 % SDS-Gels mit anschließender Coomassie Brilliant Blau Färbung überprüft.

Für die Aufreinigung wurden jeweils 5 ml Bakterienlysat auf eine Superdex 200 26/60 Säule geladen und eine Gelfiltration durchgeführt. Die Qualität der einzelnen Fraktionen wurde anhand eines SDS-Gels und Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 2.7). Fraktionen innerhalb der gestrichelten Linien wurden vereinigt und ankonzentriert.

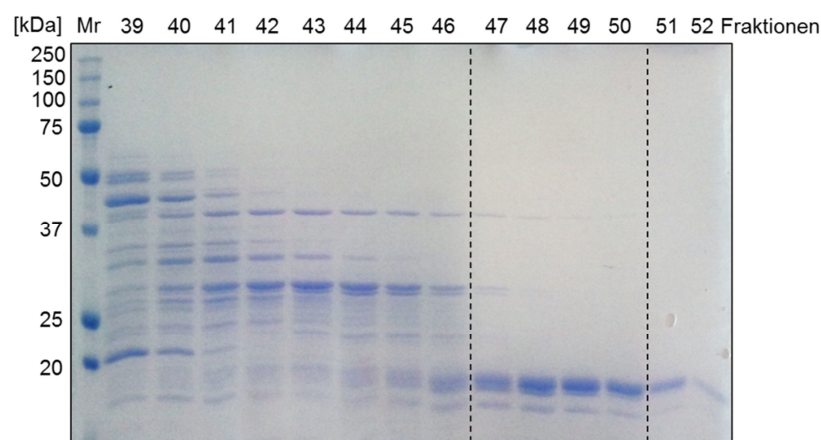
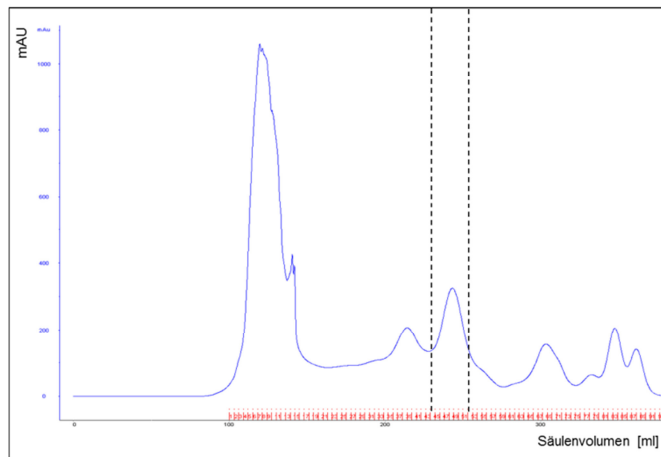


Abb. 2.7: Aufreinigung photolabiler Arf1-Derivate. (A) Elutionsprofil der Gelfiltration. Hierzu wurden 5 ml gereinigtes Bakterienlysat auf eine Superdex 200 26/60 Säule aufgetragen. Blau: UV bei 280 nm, rot: Fraktionen. (B) Einzelne Fraktionen wurden auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Die Fraktionen innerhalb der gestrichelten Linien wurden ankonzentriert und vereinigt.

2.2.2 Photolabile Arf1-Derivate binden GTP-abhängig an

Golgi-Membranen

Um die Funktionalität der aufgereinigten Arf1-Derivate zu überprüfen, wurde die GTP-abhängige Anbindung an Golgi-Membranen getestet. Arf1 ist nur in der GTP-gebundenen Form aktiv und inseriert seine amphiphile, myristoylierte Helix in die Membran, welches eine stabile Verankerung bewirkt. Für die Bindungsstudien an Golgi-Membranen wurde jeweils Arf1-Derivat zusammen mit Golgi-Membranen entweder mit oder ohne GTPγS für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz durch ein Sucrosekissen zentrifugiert und das Pellet mittels

SDS-PAGE und Western Blot mit dem Arf1 CT Antikörper analysiert (Abb. 2.8). Als Kontrolle diente Wildtyp Arf1 ohne photolabile Aminosäure. In allen Fällen ist eine Anbindung von Arf1 an Golgi-Membranen nur nach Zugabe von GTP zu erkennen (Abb. 2.8 Spur 4, 8 und 12). Somit werden die Arf1-Derivate wie der Wildtyp durch GTP aktiviert und binden dadurch an Golgi-Membranen.

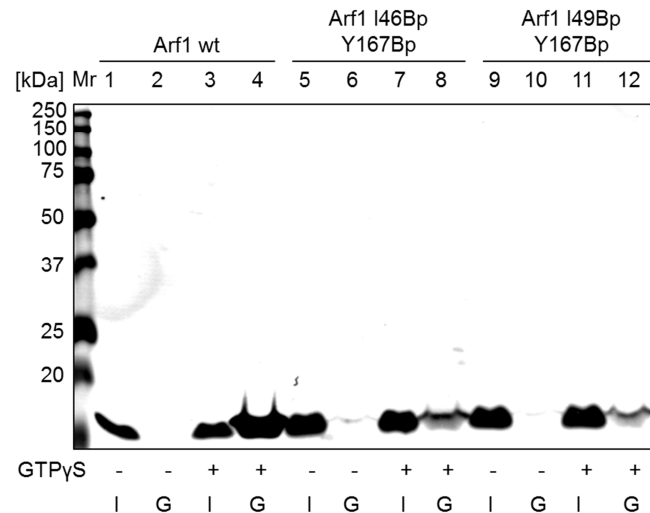
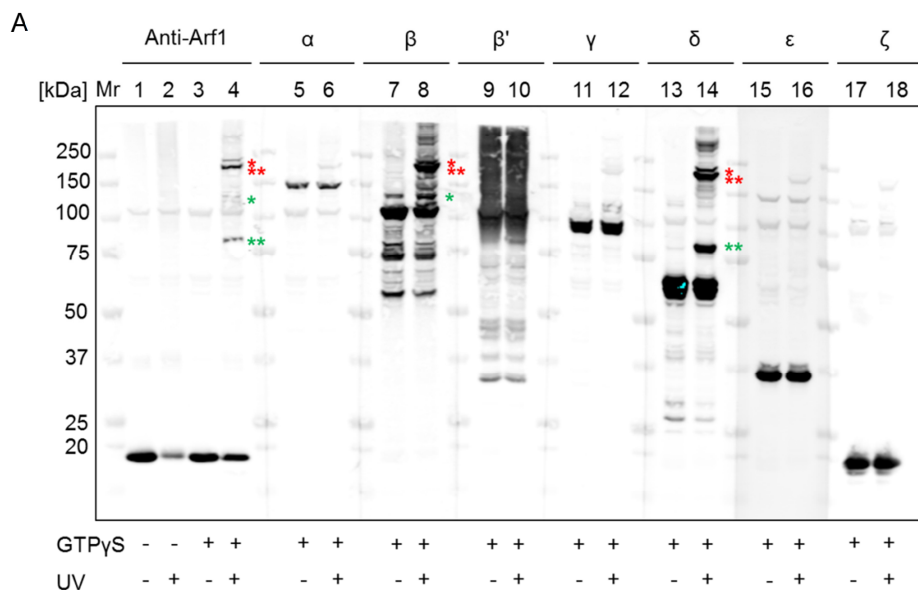


Abb. 2.8: GTP-abhängige Anbindung der Arf1-Derivate an Golgi-Membranen. Photolabile Arf1-Derivate wurden zusammen mit Golgi-Membranen entweder mit oder ohne GTPγS bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze durch ein Sucrosekissen zentrifugiert und das Pellet mit SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und mittels Western Blot mit einem Arf1 spezifischem Antikörper detektiert.

2.2.3 Arf1 interagiert gleichzeitig mit β -COP und δ -COP

Wie bereits schon von Dr. Zhe Sun gezeigt, führt die Aktivierung von Bp durch UV-Licht an der Membran zu einem GTP-abhängigen Crosslink zwischen den photolabilen Arf1-Einzelmutanten und Coatomer. Um die Interaktionen der photolabilen Doppelmутanten zu analysieren, wurden diese im Folgenden zusammen mit Golgi-Membranen und Coatomer entweder mit oder ohne GTP γ S inkubiert. Nach Zentrifugation durch ein Sucrosekissen wurden die Membranen in Reaktionspuffer aufgenommen und mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Die Analyse der Membranen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Zur Detektion wurden Antikörper gegen Arf1-CT und alle sieben Coatomer-Untereinheiten verwendet. Abb. 2.9 A zeigt das Ergebnis für Arf1 I46Bp Y167Bp. Spur 4 zeigt drei deutliche Crosslinkbanden: eine mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa und zwei mit einem Molekulargewicht von 180-200 kDa. Die 80 kDa Bande ist sowohl mit dem Arf1-Antikörper als auch mit dem δ -COP Antikörper nachweisbar (Spur 4 und 14 ******). Hierbei handelt es sich um die bereits beobachtete Interaktion von Arf1 mit δ -COP (Sun et al., 2007). Die beiden Banden bei 180-200 kDa erscheinen sowohl mit dem β -COP (Spur 8 *****, ******) als auch mit dem δ -COP Antikörper (Spur 14 *****, ******). Die Crosslinkbanden sind in allen Fällen UV- und GTP γ S-abhängig. Da dieses Crosslinkprodukt mit drei verschiedenen Antikörpern nachweisbar ist, handelt es sich hierbei um eine neue noch nicht beschriebene, gleichzeitige Interaktion von Arf1 mit den Coatomer-Untereinheiten β -COP und δ -COP.



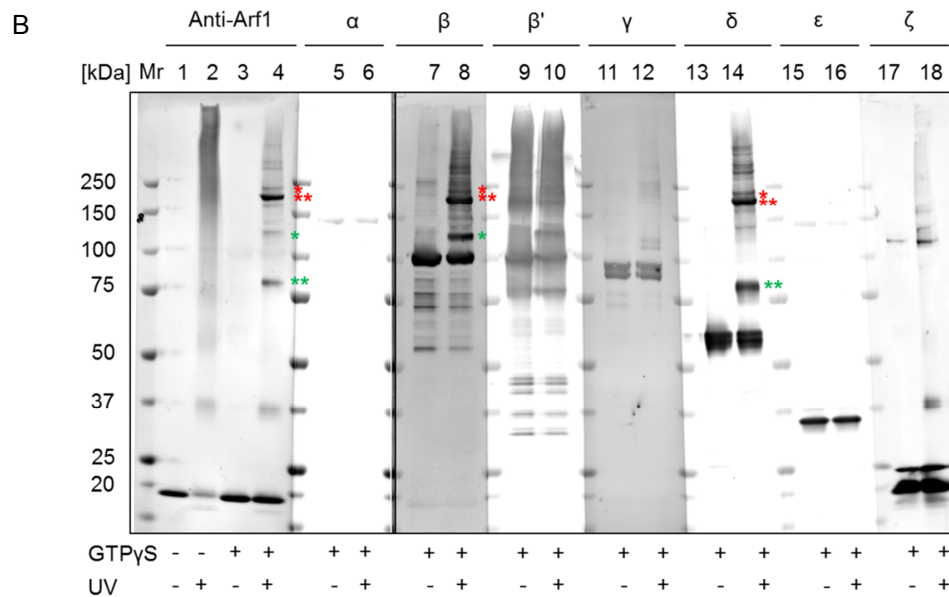


Abb. 2.9: Interaktionen zwischen Arf1 I46Bp Y167Bp und Coatomer. Photolabile Arf1-Derivate wurden zusammen mit Golgi-Membranen (A) oder Liposomen (B) und Coatomer entweder mit oder ohne GTP γ S bei 37 °C inkubiert. Die Membranen wurden durch ein Sucrosekissen zentrifugiert und anschließend mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Die Proben wurden durch ein 4-12 % Bis-Tris Gradientengel separiert und mittels Western Blot und entsprechenden Antikörpern gegen Arf1 und die verschiedenen Untereinheiten des Coatomer analysiert.

Um zu untersuchen, ob die Crosslinkprodukte von Golgi-Proteinen abhängig sind, wurden als Membranen auch synthetisch hergestellte Liposomen verwendet (Abb. 2.9 B). Die Ergebnisse sind in beiden Fällen vergleichbar. Auch im liposomalen Ansatz sind die Crosslinkbande bei 80 kDa als auch die beiden Banden bei einem Molekulargewicht von 180-200 kDa detektierbar (Abb. 2.9 B, Spur 4, 8 und 14).

Im Falle von Arf1 I49Bp Y167Bp sind genau wie mit Arf1 I46Bp Y167Bp eine Crosslinkbande bei 80 kDa und eine bei ca. 180 kDa zu erkennen (Abb. 2.10, Spuren 4, 8, 12 und 14 * und **). Die 80 kDa Bande stellt erneut die Interaktion zwischen Arf1 und δ -COP dar (Spur 4 und 14 **). Zusätzlich ist eine UV-abhängige Bande bei 120 kDa erkennbar, welche sowohl mit dem Arf1- als auch mit γ -COP-Antikörper nachweisbar ist (Spur 4 und 12 *). Hierbei handelt es sich ebenfalls um die bereits von Zhe Sun identifizierte Interaktion von Arf1 mit γ -COP. Die Crosslinkbande mit einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa zeigt die zuvor beobachtete Interaktion zwischen Arf1, β -COP und δ -COP (Abb.2.10 Spur 4, 8 und 14 *), da Arf1 I49Bp neben γ -COP auch in geringerem Ausmaß mit β -COP interagieren kann.

Untersuchungen mit photolabilem Arf1 I46Bp I49Bp zeigten nur die bereits durch Einzelmarkierung identifizierten Crosslinkbanden. Es konnten keine neuen Interaktionen, die auf einen trimeren Komplex schließen lassen, nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt).

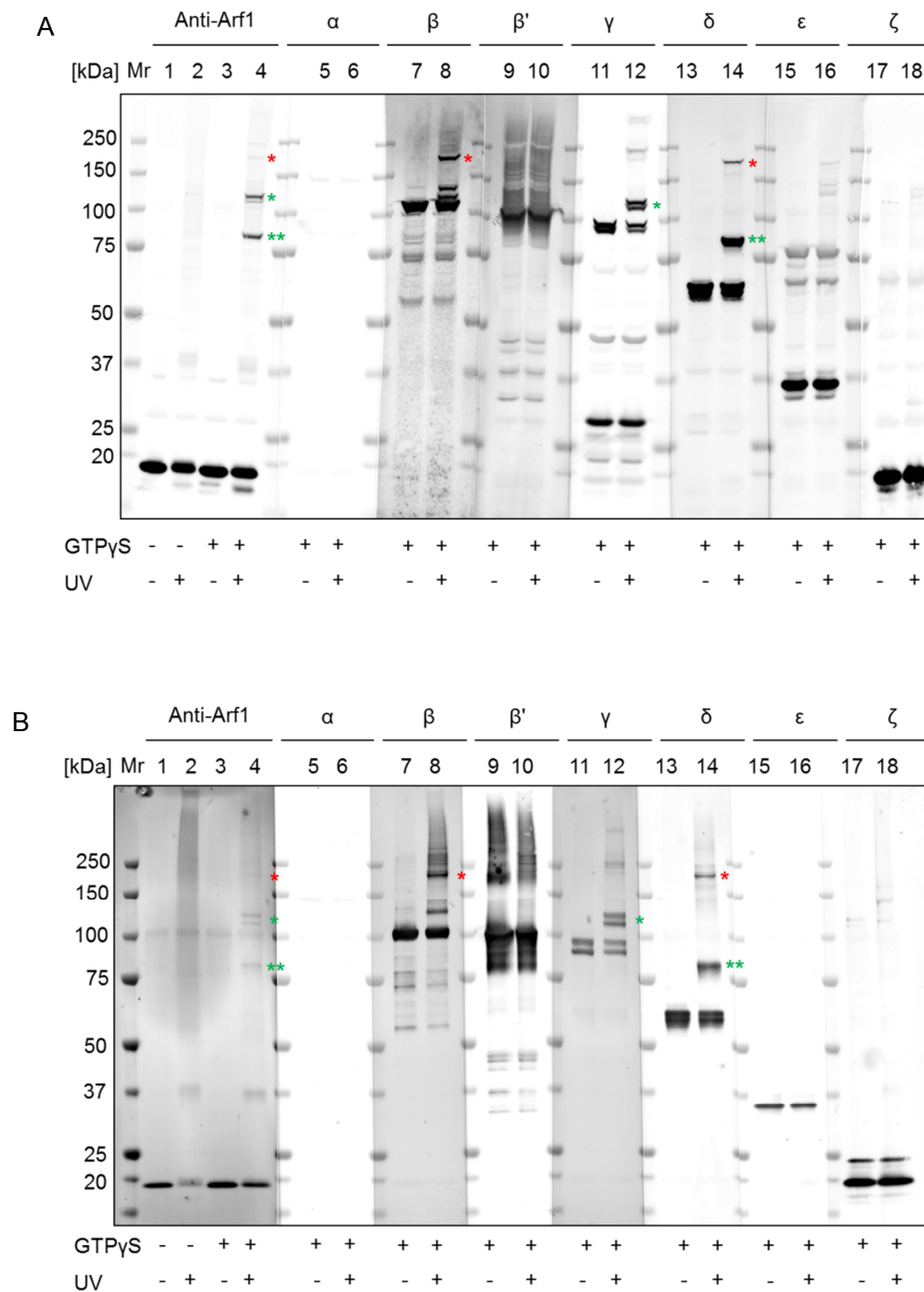


Abb. 2.10: Interaktionen zwischen Arf1 I49Bp Y167Bp und Coatomer. Photolabile Arf1-Derivate wurden zusammen mit Golgi-Membranen (A) oder Liposomen (B) und Coatomer entweder mit oder ohne GTP γ S bei 37 °C inkubiert. Die Membranen wurden durch ein Sucrosekissen zentrifugiert und anschließend mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Die Proben wurden durch ein 4-12 % Bis-Tris Gradientengel separiert und mittels Western Blot und entsprechenden Antikörpern gegen Arf1 und den verschiedenen Coatomer-Untereinheiten analysiert.

2.2.4 Massenspektrometrische Analyse der Crosslinkprodukte

Um die in Abschnitt 2.2.3 neu beschriebenen Interaktionen zwischen Arf1, β -COP und δ -COP mit einer unabhängigen Methode weiter zu untersuchen, wurden die kreuzvernetzten Proben mittels Massenspektrometrie analysiert. Da zur Identifizierung eine möglichst geringe und definierte Menge an einzelnen Proteinen von Vorteil ist, wurden in diesem Fall für die Anbindung an Membranen Liposomen verwendet. Die Arf1-Derivate wurden mit Coatomer, Liposomen und GTP γ S inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen durch ein Sucrosekissen zentrifugiert und das Pellet in Reaktionspuffer mit UV bei einer Wellenlänge von 366 nm angeregt. Zur Analyse wurden die Proben auf ein SDS-Gel geladen und mittels kolloidalem Coomassie gefärbt (Abb. 2.11). Die weiteren Schritte erfolgten am Zentrum für Molekularbiologie der Universität Heidelberg in der Arbeitsgruppe von Thomas Ruppert. Hier wurden die einzelnen Proteinbanden ausgeschnitten, die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend mittels Trypsin verdaut. Nach Inaktivierung des Trypsins wurden die Proteine extrahiert und im Anschluss per Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) in einem Orbitrap Massenspektrometer analysiert.

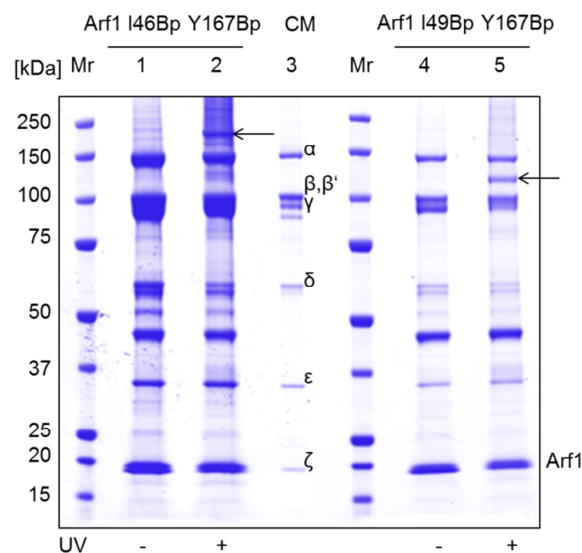


Abb. 2.11: Coomassie Gel für die massenspektrometrische Untersuchung der Crosslinkbanden. Arf1 I46Bp Y167Bp und Arf1 I49Bp Y167Bp wurden zusammen mit Liposomen, Coatomer und GTP γ S bei 37 °C inkubiert. Die Membranen wurden durch ein Sucrosekissen abzentrifugiert und anschließend mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Zur Analyse wurden die Proben auf ein 4-12 % Gradientengel aufgetragen und mit kolloidalem Coomassie über Nacht gefärbt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels LC-MS an einem Orbitrap Massenspektrometer.

Es wurden jeweils die Banden, welche mit einem Pfeil markiert sind, auf ihren Peptidgehalt hin untersucht. Die Stöchiometrie der gefundenen Proteine wurde anhand des iBAQ-Wertes (*intensity-based absolute quantification*) bestimmt. Dieser Wert ermöglicht es, unterschiedliche Proteine innerhalb einer Probe gegeneinander zu quantifizieren (Schwanhauser et al., 2011; Smits et al., 2013). Hierbei werden die Intensitäten aller identifizierten Peptide eines Proteins addiert und danach durch die Anzahl der Peptide geteilt, die theoretisch nach tryptischem Verdau detektierbar wären. In Spur 2 konnten Arf1, β -COP und δ -COP mit der höchsten Intensität nachgewiesen werden (Tab. 2.1 A). Der iBAQ-Wert der drei Proteine ist sehr ähnlich, weshalb von einer 1:1:1 Stöchiometrie der Proteine Arf1, β -COP und δ -COP ausgegangen werden kann. In Spur 5 waren hauptsächlich Arf1 und γ -COP detektierbar (Tab. 2.1 B). Auch hier ergab der iBAQ-Wert eine Stöchiometrie von 1:1. Somit wurden anhand der Massenspektrometrie die Ergebnisse der Western Blot Analysen bestätigt.

A

Protein IDs	Proteinname	Mol. gewicht [kDa]	Sequenzlänge	Sequenzabdeckung [%]	iBAQ
F8WHL2	Coatomer subunit alpha	139,41	1233	54,7	27354000
O55029	Coatomer subunit beta	102,45	905	52,9	14751000
O89079	Coatomer subunit epsilon	34,567	308	64,6	7528700
P61924	Coatomer subunit zeta-1	20,198	177	25,4	4502000
P84078	ADP-ribosylation factor 1	20,697	181	52,5	125780000
Q5XJY5	Coatomer subunit delta	57,229	511	55,8	110320000
Q9JIF7	Coatomer subunit beta	107,06	953	63,8	127300000
Q9QZE5	Coatomer subunit gamma-1	97,512	874	69,6	40720000

B

Protein IDs	Proteinname	Mol. gewicht [kDa]	Sequenzlänge	Sequenzabdeckung [%]	iBAQ
P61924	Coatomer subunit zeta-1	20,198	177	16,9	1383000
Q9QZE5	Coatomer subunit gamma-1	97,512	874	79,3	113680000
O89079	Coatomer subunit epsilon	34,567	308	49,7	562410
Q5XJY5	Coatomer subunit delta	57,229	511	33,9	2769700
O55029	Coatomer subunit beta	102,45	905	34,1	1499100
Q9JIF7	Coatomer subunit beta	107,06	953	51,3	9499500
F8WHL2	Coatomer subunit alpha	139,41	1233	37	1981000
P84078	ADP-ribosylation factor 1	20,697	181	52,5	111540000

Tab. 2.1 Auswertung der massenspektrometrischen Analyse. Die Crosslinkbanden wurden mittels LC-MS an einem Orbitrap-Massenspektrometer analysiert. Zur Bestimmung der Stöchiometrie der Proteine wurde die iBAQ-Methode herangezogen. Hierbei werden die Intensitäten aller identifizierten Peptide eines Proteins addiert und danach durch die Anzahl aller theoretisch detektierbaren Peptide des Proteins dividiert.

2.2.6 Photocrosslink mit N Δ 17 Arf1 I46Bp Y167Bp

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Interaktionen zwischen Arf1, β -COP und δ -COP auch im löslichen Zustand vorhanden sind. Da Vollängen Arf1-GTP jedoch nur an der Membran aktiv ist, und in Lösung sofort ausfällt, musste eine verkürzte Form von Arf1 I46Bp Y167Bp generiert werden: N Δ 17 Arf1 I46Bp Y167Bp. Als Expressionsplasmid wurde das bereits existierende Plasmid pETM-11-N Δ 17 Arf1 verwendet. Die Stopcodons wurden auch hier mittels Mutagenese PCR und den entsprechenden Primern eingefügt. Zusätzlich wurde eine Mutation entweder an Position 71 oder an Position 31 eingefügt. Die Mutation Q71L erzeugt eine „on“ (konstitutiv aktive) Mutante, welche nicht GTP hydrolysieren kann. Im umgekehrten Fall handelt es sich bei Arf1 T31N um eine inaktive Arf1-Mutante (Dascher und Balch, 1994). Die beiden Proteine werden im Folgenden als N Δ 17 Arf1 Q71L I46Bp Y167Bp und N Δ 17 Arf1 T31N I46Bp Y167Bp bezeichnet.

Für die Expression der Proteine wurde das Expressionsplasmid in die in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen pEVOL kompetenten Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden in geeignetem LB-Medium in Anwesenheit von Bp kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG und Arabinose induziert (Abb. 2.12 A). Nach der Induktion zeigt sich eine deutliche Bande bei etwa 20 kDa. Da die verkürzte Form von Arf1 nicht myristoyliert wird, ist im Vergleich zu Vollängen Arf1 nur eine Bande erkennbar (Abb. 2.12 A). Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über einen N-terminalen His-tag. Hierzu wurde das Zelllysate an Nickel Sepharose Beads gebunden. Nach zwei Waschschritten wurde das Protein durch die Zugabe von Imidazol von den Beads eluiert. Um das überschüssige Imidazol zu entfernen wurde anschließend eine Gelfiltration mit PD-10 Säulen durchgeführt (Abb. 2.12 B).

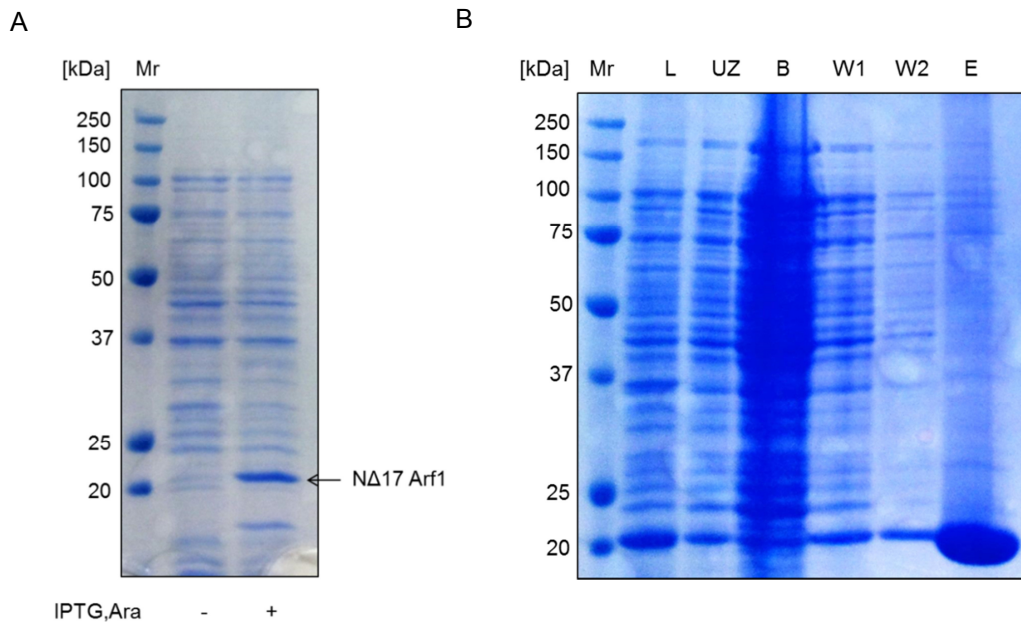


Abb. 2.12: Expression und Aufreinigung von NΔ17 Arf1 I46Bp Y167Bp. (A) Zur Expression von NΔ17 Arf1 I46Bp Y167Bp wurden die entsprechenden Plasmide in Bakterien transformiert und in LB-Medium kultiviert. Die Induktion erfolgte mittels IPTG und Arabinose. Zur Überprüfung der Expression wurden die Proben auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und die Banden anschließend mittels Coomassie Brilliant Blau angefärbt. (B) Die Aufreinigung erfolgte über einen N-terminalen His-tag mittels Nickel Sepharose Beads. Das überschüssige Imidazol wurde durch Gelfiltration abgetrennt. Von jedem Schritt wurden Proben auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Lysat (L), Überstand nach 100000 x g Ultrazentrifugation (UZ), Beads (B), Waschschrift 1 und 2 (W1 und W2), Elution nach PD-10 (E).

Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Proteine in Photocrosslinkstudien mit Coatomer eingesetzt. Hierzu wurde jeweils das photolabile NΔ17 Arf1 zusammen mit Coatomer in geeignetem Puffer inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Die Proben wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE separiert. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern. Abbildung 2.13 A zeigt das Ergebnis für NΔ17 Arf1 Q71L I46Bp Y167Bp. Wie beim Volllängen-Arf1 dieser photolabilen Variante ist eine UV-abhängige Crosslinkbande bei einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa zu erkennen, welche mit den drei Antikörpern anti-Arf1, anti-β-COP und anti-δ-COP detektiert werden kann (Spur 2, 6 und 12 *). Zwar ist die UV-abhängige Bande auf der Höhe von 180 kDa in Spur 2 sehr schwach, aber sie ist auf gleicher Höhe wie die Bande in Spur 6 und 12. Im Falle von NΔ17 Arf1 T31N I46Bp Y167Bp ist keine UV-abhängige hochmolekulare Bande zu erkennen (Abb. 2.13 B, Spur 2, 6 und 12).

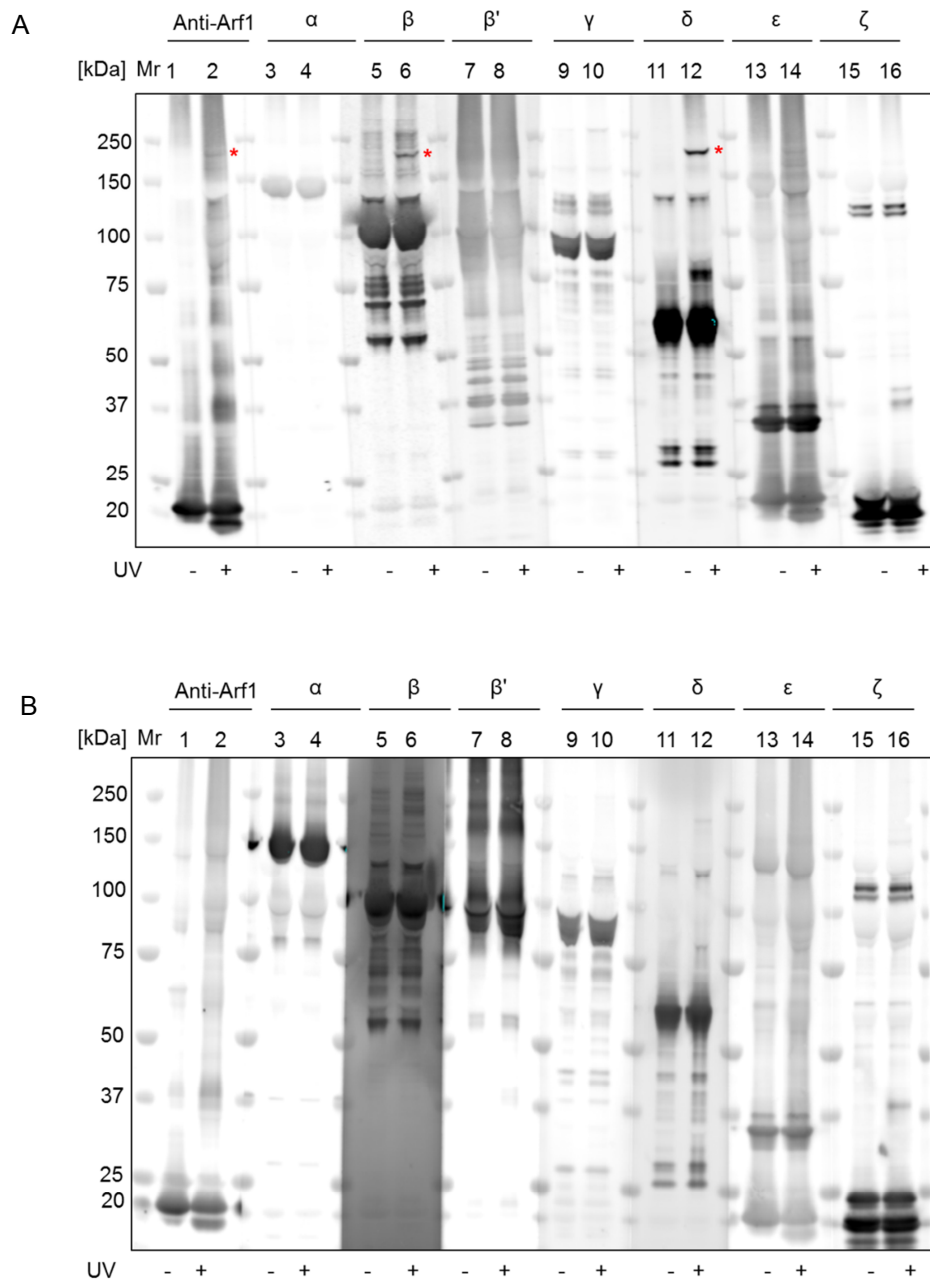


Abb. 2.13: Interaktionen zwischen N Δ 17 Arf1 I46Bp Y167Bp. Die beiden Arf1 Derivate N Δ 17 Arf1 Q71L I46Bp Y167Bp (A) und N Δ 17 Arf1 T31N I46Bp Y167Bp (B) wurden zusammen mit Coatomer in geeignetem Puffer bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (4-12% Bis-Tris Gradientengel) und Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern gegen Arf1 und die 7 Coatomer-Untereinheiten.

2.2.7 Experimente zur Dimerisierung von Arf1

Jonathan Goldberg und Kollegen veröffentlichten im Jahre 2012 eine Kristallstruktur von Arf1 im Komplex mit γ - und ζ -COP. Basierend auf dieser Struktur konnten sie durch pulldown Experimente zeigen, dass Arf1 in gleicher Weise mit γ -COP und β -COP interagiert (Yu et al., 2012). Ebenfalls ist bekannt, dass Arf1 nach der Aktivierung an der Membran dimerisiert. Durch Studien mit einem homobifunktionellen Crosslinker wurde bereits im Jahre 2008 ein Arf1-Dimer-Interface beschrieben (Beck et al., 2008). Dieses Dimer-Interface und die von Yu et al. veröffentlichte Kristallstruktur wurden im Folgenden verwendet, um zusammen mit Dr. Klemens Wild von der Arbeitsgruppe Sinning ein Modell für die Interaktion eines Arf1-Dimers mit Coatomer zu erstellen. Werden jeweils drei Arf1-Dimere und drei Coatomer-Komplexe zusammen platziert, so entsteht wie in Abbildung 2.15 A gezeigt eine geschlossene COPI-Ringstruktur. Das rote Dreieck markiert eine Triade, welche sich aus drei Coatomer-Komplexen zusammensetzt. Eine solche Coatomer-Triade konnte bereits durch Kryo-Elektronentomografie als Bestandteil von COPI-Vesikeln nachgewiesen werden (Abb. 2.15 B) (Faini et al., 2012b).

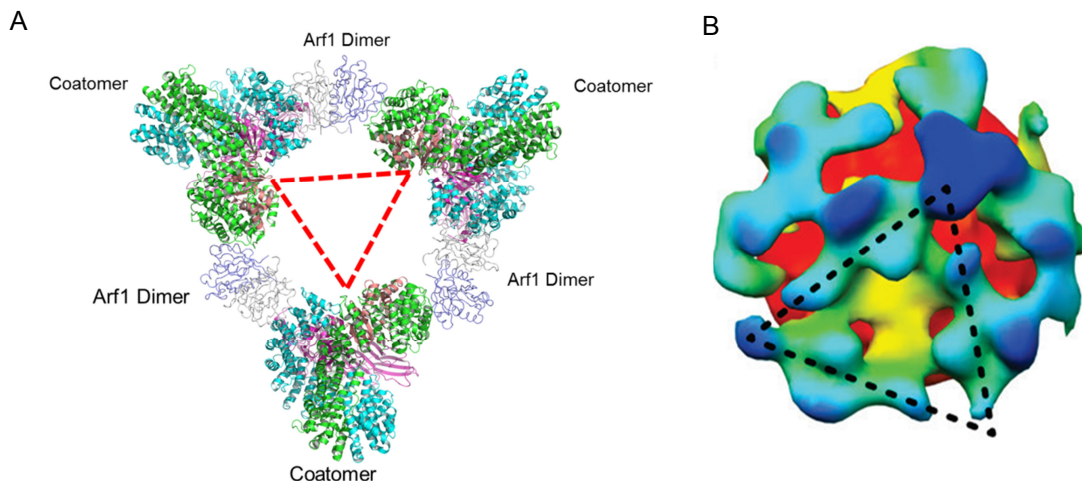


Abb. 2.15: COPI-Vesikel: Modell und Struktur. (A) Modell einer COPI-Ringstruktur, zusammengesetzt aus jeweils 3 Arf1-Dimeren und drei Coatomer-Komplexen. Das Arf1-Dimer-Interface wurde von Beck et al., 2008 übernommen und die Struktur von Coatomer aus Yu et al., 2012. (B) Cryo Elektronentomografie eines COPI-Vesikels aus Faini et al., 2012. Die Farben gelb bis blau zeigen die Entfernung des Coatomerkomplexes von der Membran (rot) aus gesehen. Die Dreiecke markieren jeweils drei Coatomer-Komplexe, eine sogenannte Triade.

Um das Modell der Interaktion eines Arf1-Dimers mit Coatomer biochemisch zu prüfen, wurden im Folgenden neue Arf1-Proteine generiert, bei welchen die photolabile Aminosäure im Arf1-Dimer-Interface liegt. Somit entsteht ein kovalent gebundenes Arf1-Dimer, welches durch eine zweite photolabile Aminosäure innerhalb des Arf1-Moleküls an Coatomer gebunden werden kann. Die gewählten Aminosäuren sind in Abb. 2.16 in grün dargestellt. Hierzu gehören Y35, E41, Y58, Y59 und E168. Y35 liegt zwar nicht direkt im Interface, eine Mutation zu Alanin jedoch verhinderte die Dimerbildung (Beck et al., 2008). In rot sind diejenigen Aminosäuren dargestellt, die die bereits bekannten Interaktionen mit Coatomer zeigen.

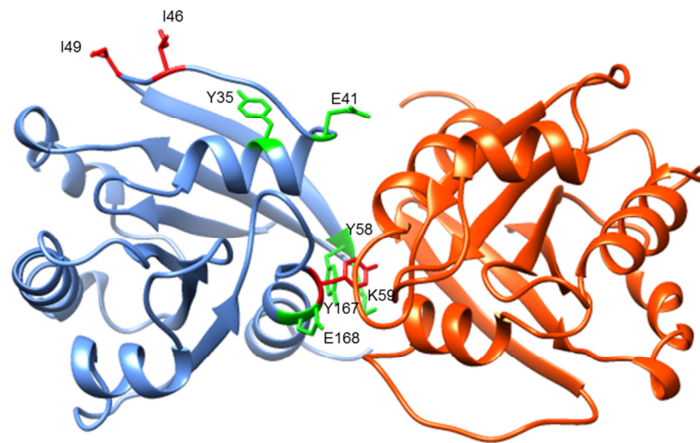


Abb. 2.16: Arf1-Dimer Modell. Das Modell wurde von Beck et al., 2008 übernommen. In blau und orange sind jeweils die Arf1 Moleküle dargestellt. Grün: Aminosäuren, an deren Position Bp eingebaut wurde, Rot: Aminosäuren, welche die bereits bekannten Interaktionen mit Coatomer eingehen.

Die photolabilen Arf1-Proteine wurden wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.1) mit den entsprechenden Primern generiert und in Photocrosslinkstudien eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Bei keinem der photolabilen Arf1-Proteine konnte eine UV-abhängige Dimerbildung beobachtet werden. Im Fall von Arf1 Y35Bp konnte ein UV-abhängiges Crosslinkprodukt mit einem Molekulargewicht zwischen 100 und 140 kDa beobachtet werden (Abb. 2.17 Spur 6, Pfeil). Dieses Crosslinkprodukt stellte sich als eine Interaktion zwischen Arf1 und γ -COP heraus, die bisher noch nicht beschrieben wurde (Spur 8, Pfeil).

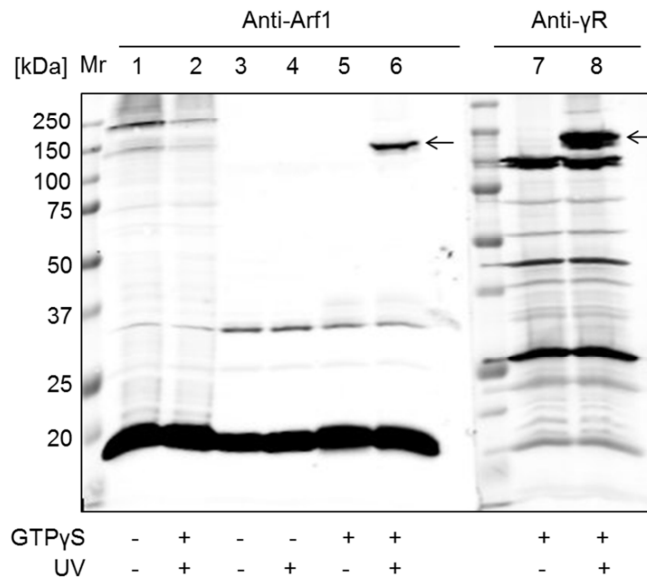


Abb. 2.17: Interaktion zwischen Arf1 Y35Bp und Coatomer. Arf1 Y35Bp wurde zusammen mit Golgi-Membranen und Coatomer entweder mit oder ohne GTPγS bei 37 °C inkubiert. Gebundenes Material wurde durch ein Sucrosekissen zentrifugiert und anschließend mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Die Proben wurden auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot mit Arf1 bzw. γ-COP Antikörpern analysiert. In Spur 1 und 2 ist jeweils der Input aufgetragen.

2.2.8 Arf1 interagiert gleichzeitig mit β-COP und mit γ-COP

Während die Experimente zum Arf1-Dimer durchgeführt wurden, veröffentlichten James Hurley und Kollegen eine Kristallstruktur von Arf1 im Komplex mit dem Clathrin Adapter AP-1 (Ren et al., 2013). In diesem Kristall kann ein Arf1 Molekül zwei AP-1 Moleküle verbrücken, indem es an zwei verschiedenen Positionen mit AP-1 interagiert. Die Switch I und II Region von Arf1 binden an die β1-Untereinheit des einen AP-1 und die „Rückseite“ von Arf1 interagiert mit der γ-Untereinheit des zweiten AP-1 Komplexes (Abb. 2.18). Es konnte in dieser Arbeit jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich bei diesem Kontakt um ein Kristallartefakt handelt, oder ob eine physiologisch relevante Interaktion vorliegt. AP-1 und Coatomer weisen eine gewisse Homologie zueinander auf. Da eine Interaktion der „Rückseite“ von Arf1 mit Coatomer bisher noch nicht beschrieben wurde und wir mit den Crosslinkexperimenten über einen biochemischen Ansatz verfügen, um diese Frage zu klären, sollte dies im Folgenden näher analysiert werden.

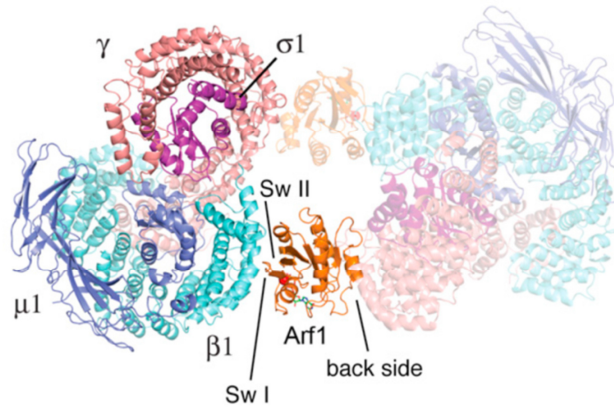


Abb. 2.18: Kristallstruktur des AP-1:Arf1 Komplexes (aus Ren et al., 2012). Arf1 interagiert über die Switch I und II Region mit der β 1-Untereinheit des einen AP-1 Komplexes und mit der „Rückseite“ mit der γ -Untereinheit eines zweiten AP-1 Komplexes.

Hierzu wurden erneut photolabile Arf1-Derivate hergestellt, bei welchen jeweils eine photolabile Aminosäure an Position I49 und eine zweite an der „Rückseite“ von Arf1 eingebaut wurde. Da bereits beobachtet wurde, dass I49 mit γ -COP interagiert, sollte durch die zweite photolabile Aminosäure eine potentielle Verbrückung zweier Coatomer-Komplexe durch Arf1 untersucht werden. Die ausgewählten Positionen, an deren Stelle Bp eingebaut wurden, sind in Abb. 2.19 gezeigt. Hierzu zählen R97, E98, P131, E138, D141, W153, Q156.

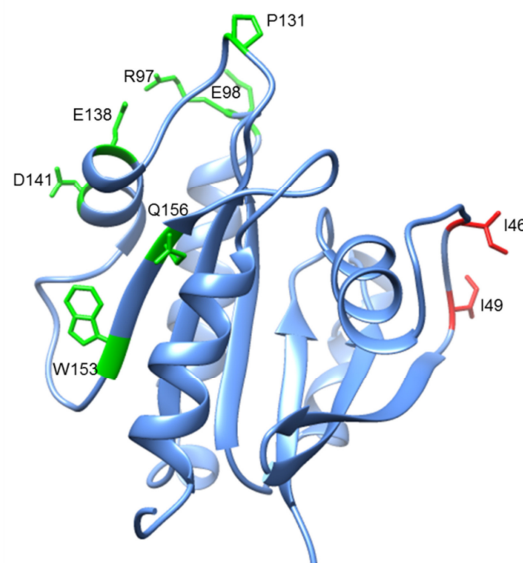


Abb. 2.19: Positionen für den Einbau photolabiler Aminosäuren in Arf1. Grün: Positionen auf der „Rückseite“ von Arf1, an deren Stelle p-Benzoyl-L-phenylalanin eingebaut wurde. Rot: Die bereits bekannten Stellen I46 und I49, die sich in der Switch I und II Region befinden.

Unter allen getesteten Arf1-Derivaten zeigte nur Arf1 I49Bp E98Bp eine UV-abhängige Bande bei einem Molekulargewicht von über 200 kDa (Abb. 2.20, Spur 11 *). Diese Crosslinkbande ist sowohl mit dem Arf1 Antikörper als auch mit den beiden Antikörpern gegen β - und γ -COP nachweisbar (vergleiche hierzu Abb. 2.20 Spur 11, 14 und 17 *). Als Kontrolle dienten jeweils Arf1-Derivate mit nur einer photolabilen Aminosäure entweder an Position 49 oder an Position 98. Abbildung 2.20 Spur 10 und 13 * zeigt eine deutliche Interaktion von Arf1 E98Bp mit β -COP, während Arf1 I49Bp wie bereits zuvor beobachtet mit β -COP und mit γ -COP interagiert (Spur 12, 15 und 18 **).

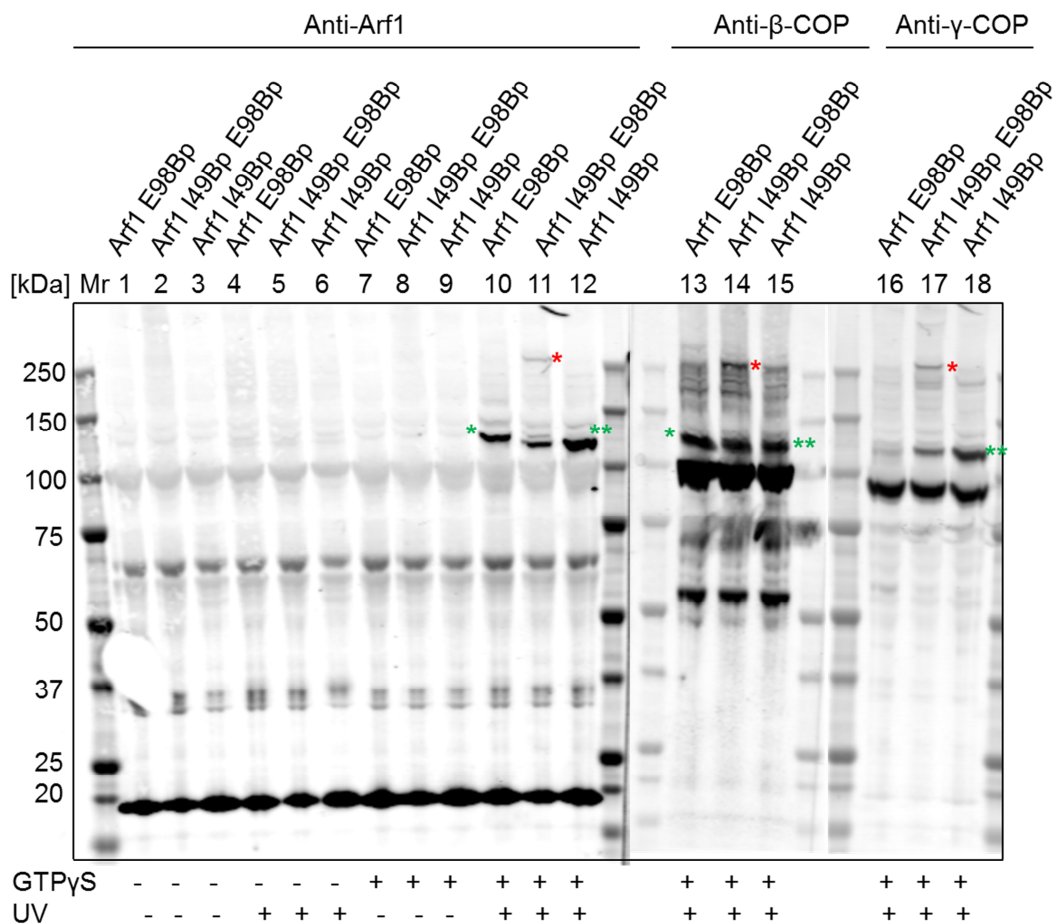


Abb. 2.20: Interaktionen zwischen Arf1 I49Bp E98Bp und Coatomer. Photolabile Arf1-Derivate wurden zusammen mit Golgi-Membranen und Coatomer entweder mit oder ohne GTP γ S bei 37 °C inkubiert. Die Membranen wurden durch ein Sucrosekissen zentrifugiert und anschließend mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm bestrahlt. Die Proben wurden durch ein 4-12 % Bis-Tris Gradientengel separiert und mittels Western Blot und entsprechenden Antikörpern gegen Arf1 und den Coatomer-Untereinheiten β -COP und γ -COP analysiert.

Zusammenfassend konnten durch die Herstellung photolabiler Arf1-Derivate zuvor unbekannte Interaktionen zwischen Arf1 und dem Coatomer-Komplex nachgewiesen werden. Es war bisher nicht bekannt, dass ein Arf1 Molekül mit den Coatomer-Untereinheiten β - und δ -COP gleichzeitig interagieren kann. Außerdem wurde erstmals eine Interaktion zwischen der „Rückseite“ von Arf1 und β -COP beschrieben.

2.3 Herstellung eines thermophilen Arf1-Proteins:

Chaetomium thermophilum Arf1

Chaetomium thermophilum ist ein Pilz, welcher Temperaturen bis zu 60 °C toleriert. Solche Temperaturen erfordern äußerst hitzestabile Proteine, welche für biochemische Zwecke genutzt werden können, um z.B. stabilere Proteinstrukturen für die Kristallographie zu erzeugen. 2011 gelang es Forschern der Arbeitsgruppe von Prof. Ed Hurt und Dr. Peer Bork das gesamte Genom des Organismus *Chaetomium thermophilum* zu sequenzieren (Amlacher et al., 2011).

Wie bereits erwähnt, konnten Kristallstrukturen des heptameren Coatomer-Komplexes bisher nur von einzelnen Domänen gewonnen werden. Dies könnte daran liegen, dass die Proteine aus Maus, Rind oder Hefe nicht stabil genug sind, um die Auflösung der Struktur des gesamten Komplexes zu ermöglichen. Der Fragestellung der Strukturauflösung von Coatomer geht Patrick Aderhold im Rahmen seiner Doktorarbeit nach. Hierfür benutzt er rekombinantes *Chaetomium* Coatomer. Um Interaktionen zwischen dem Coatomer-Komplex und der kleinen GTPase Arf1 entweder durch Röntgenstrukturanalyse oder durch Elektronenmikroskopie besser analysieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit *Chaetomium thermophilum* Arf1 kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Die Funktionalität des Proteins wurde anschließend in verschiedenen Ansätzen getestet.

Abb. 2.21 zeigt die Aminosäuresequenz von humanem Arf1 im Vergleich zu *Chaetomium* Arf1. Die beiden Proteine sind zu 81 % identisch und weisen zu 90 % Aminosäure-Ähnlichkeiten auf. Die amphiphile Helix ist bei *Chaetomium* Arf1 drei Aminosäuren länger als bei humanem Arf1.

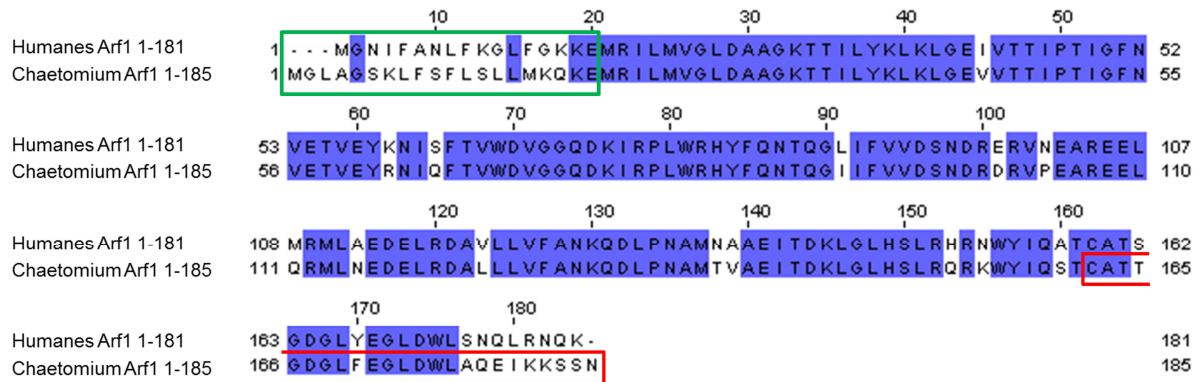


Abb. 2.21: Aminosäuresequenz von humanem Arf1 und Chaetomium Arf1 im Vergleich. Identische Aminosäuren sind blau markiert. Grüne Box: amphiphile Helix, rote Box: Peptid für Antikörperproduktion.

2.3.1 Klonierung von Arf1 aus *Chaetomium thermophilum*

Die cDNA für Chaetomium Arf1 wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von John Briggs am EMBL synthetisiert und mittels PCR und den Primern Cht Arf1-NcoI und Cht Arf1-Hind III amplifiziert. Das PCR Produkt wurde anschließend mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pMON5840 ligiert. Eine Plasmidkarte ist in Abb. 2.22 dargestellt.

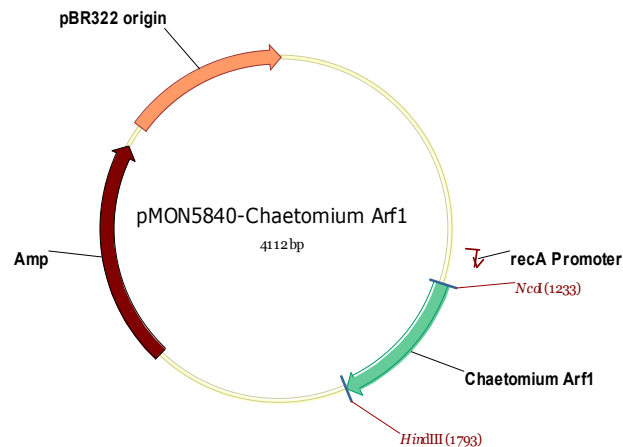


Abb. 2.22: Plasmidkarte des Expressionsvektors für *Chaetomium thermophilum* Arf1. Die Sequenz für Chaetomium Arf1 wurde durch die angegebenen Schnittstellen in den Expressionsvektor pMON5840 kloniert. Amp: Ampicillin-Resistenzgen, pBR322 origin: Replikationsursprung, recA Promoter: Promoter für die Expression des Gens.

2.3.2 Expression und Aufreinigung von *Chaetomium* Arf1

Für die Expression von *Chaetomium* Arf1 wurde das Expressionsplasmid zusammen mit dem Plasmid pHV738 (Erläuterungen hierzu siehe Abschnitt 2.1) in BL21 *E.coli* Zellen kotransformiert. Eine Kolonie wurde in einer Flüssigkultur angeimpft und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG und Nalidixinsäure induziert. Die Expression wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Für die Expression wurden zwei verschiedene Klone getestet. Wie in Abbildung 2.23 gezeigt, ist nur nach Zugabe von IPTG und Nalidixinsäure eine prominente Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa zu erkennen. Diese Bande entspricht dem Molekulargewicht nach exprimiertem *Chaetomium* Arf1. Die Bande bei einem Molekulargewicht von 75 kDa entspricht der N-Myristoyltransferase.

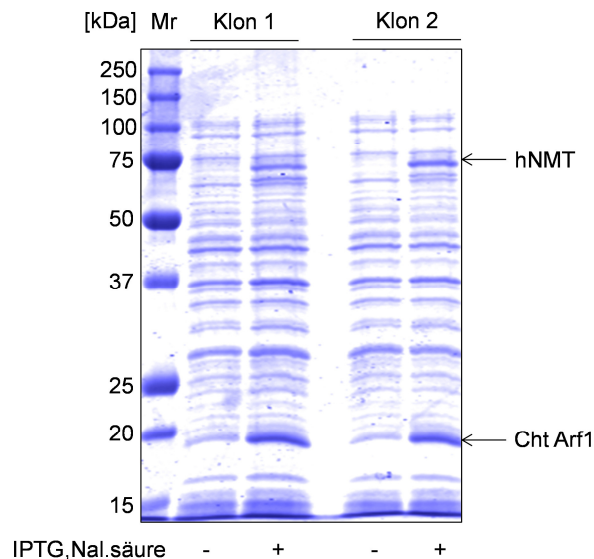


Abb. 2.23: Expression von *Chaetomium* Arf1. Mit den entsprechenden Plasmiden transformierte *E. coli* Zellen wurden in LB-Medium kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG und Nalidixinsäure induziert. Zur Überprüfung der Expression wurde eine Probe der Bakterienkultur auf ein 12 % SDS-Gel geladen. Durch Coomassie Brilliant Blau-Färbung wurden die Proteine sichtbar gemacht.

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte durch Gelfiltration mit einer Superdex 200 26/60 Säule. Zur Überprüfung der Qualität wurden einzelne Fraktionen mittels SDS-PAGE separiert und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Abbildung 2.24 zeigt ein Elutionsprofil der Gelfiltration (A) sowie die SDS-Gel Analyse der einzelnen Fraktionen (B). Die Fraktionen innerhalb der gestrichelten Linien wurden vereinigt, ankonzentriert und für anschließende Versuche verwendet.

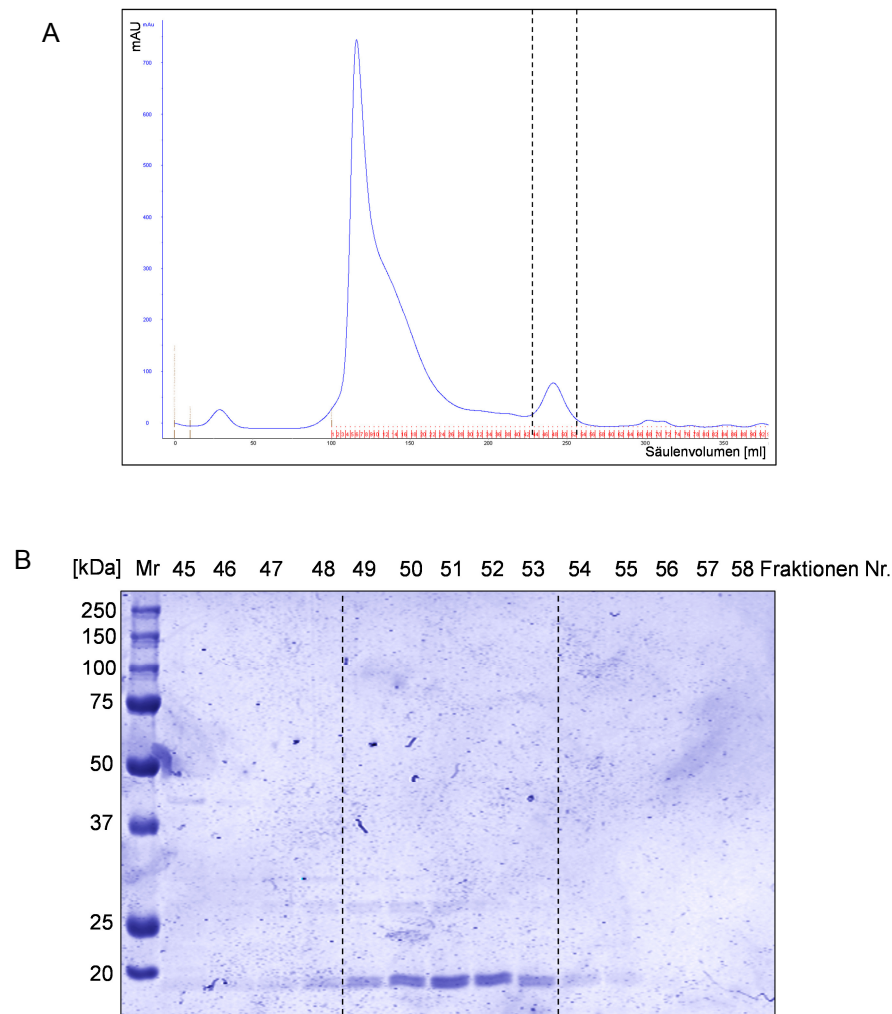


Abb. 2.24: Gelfiltration von *Chaetomium Arf1*. (A) Elutionsprofil der Gelfiltration mittels Superdex 200 26/60. In blau ist die UV Absorption bei 280 nm dargestellt, in rot die einzelnen Fraktionen. (B) Einzelne Fraktionen wurden auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Die Fraktionen innerhalb der gestrichelten Linien wurden vereinigt.

2.3.3 Gewinnung von Antikörpern gegen *Chaetomium Arf1*

Zum Nachweis von *Chaetomium Arf1* wurde ein spezifischer Antikörper benötigt. Der in unserem Laboratorium verfügbare Antikörper gegen humanes Arf1 konnte nicht verwendet werden, da er das *Chaetomium* Protein nicht erkannte. So wurde, genau wie im Falle von humanem Arf1 für die Immunisierung ein C-terminales Peptid ausgewählt (siehe rote Box in Abb. 2.21). Die Immunisierung von zwei Kaninchen wurde von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH in Heidelberg durchgeführt. Die Spezifität der Serumproben wurde anschließend mittels Western

Blot überprüft. Hierzu wurde Bakterienlysat einer *Chaetomium* Arf1 Expression, aufgereinigtes *Chaetomium* Arf1 und humanes Arf1 mittels SDS-PAGE separiert und auf eine Membran transferiert. Zur Detektion wurde Präimmunsrum und das finale Immunsrum verwendet. Wie in Abbildung 2.25 zu sehen ist, konnte eine spezifische Arf1 Proteinbande nur durch das finale Immunsrum detektiert werden. In der Spur mit dem Bakterienlysat ist nur eine Bande auf gleicher Höhe wie aufgereinigtes Arf1 zu erkennen. Erstaunlicherweise detektiert der *Chaetomium* Arf1 Antikörper auch humanes Arf1, welches im umgekehrten Fall nicht möglich war. Dadurch kann der neu generierte Antikörper für beide Arf1-Spezies eingesetzt werden.

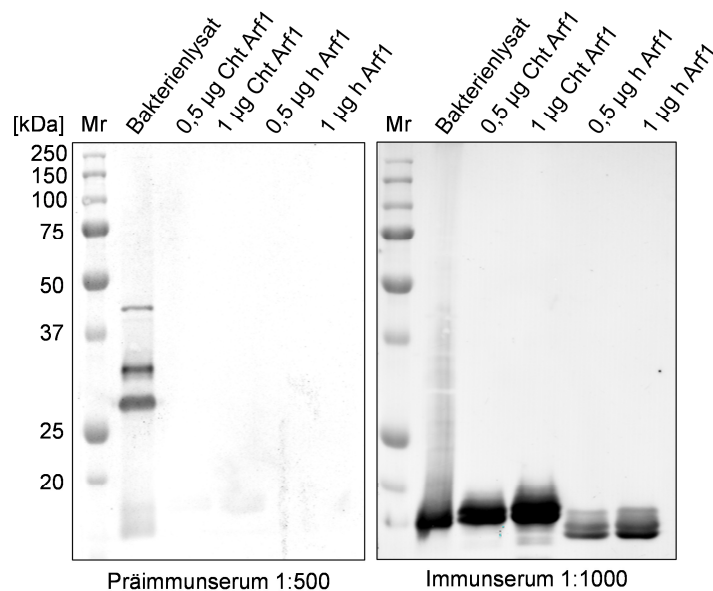


Abb. 2.25: Spezifität des hergestellten *Chaetomium* Arf1-Antikörpers. Bakterienlysat aus einer *Chaetomium* Arf1 Expression, sowie aufgereinigtes *Chaetomium* und humanes Arf1 wurden auf einem 12 % SDS-Gel separiert und anschließend mittels Western Blot auf eine Membran transferiert. Eine Hälfte wurde mit Präimmunsrum in einer Verdünnung von 1:500 und die andere Hälfte mit dem finalen Immunsrum in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Als Zweitantikörper wurde der Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor® 680 Antikörper verwendet.

2.3.4 Funktionalitätstests von *Chaetomium* Arf1

Nach erfolgter Aufreinigung wurde die Funktionalität von *Chaetomium* Arf1 überprüft. Zunächst wurde die GTP-abhängige Anbindung des Proteins an synthetisch hergestellte *Golgi-like* Liposomen getestet. Hierzu wurde das Protein zusammen mit Liposomen entweder mit oder ohne GTP γ S bei 37 °C inkubiert. Der Austausch mit GTP γ S erfolgte durch die Zugabe von EDTA. Durch eine

Dichtegradientenzentrifugation wurde anschließend membrangebundenes Material von freien Proteinen getrennt. Die Membranfraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern wurden die membrangebundenen Proteine analysiert. Als Vergleich der Effizienz wurde humanes Arf1 verwendet.

Wie in Abbildung 2.26 zu sehen ist, zeigt Chaetomium Arf1 genau wie humanes Arf1 eine GTP-abhängige Bindung an Membranen. Somit ist Chaetomium Arf1, zumindest was die Membranbindung angeht, funktionell.

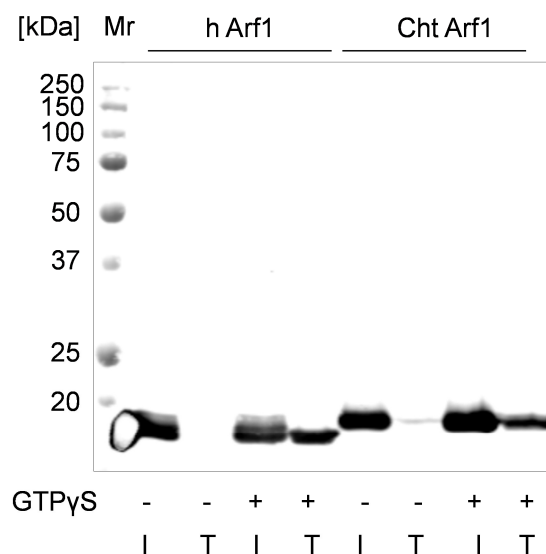


Abb. 2.26: Bindung von Chaetomium Arf1 an Membranen. Arf1 wurde zusammen mit Liposomen entweder mit oder ohne GTPγS für 15 min bei 37 °C inkubiert. Membrangebundenes Material wurde durch Dichtegradientenzentrifugation von ungebundenen Proteinen getrennt. 2 % des Inputs (I) und 10 % der membrangebundenen Topfraktion (T) wurden auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und mittels Western Blot und Arf1 spezifischem Antikörper (anti-Cht-Arf1 CT) analysiert.

Im nächsten Schritt wurde Chaetomium Arf1 für die *in vitro* Rekonstitution von COPI-Vesikeln eingesetzt und die Effizienz der Vesikelbildung mit der von humanem Arf1 verglichen. Als Donormembranen wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet: isolierte Golgi-Membranen und synthetisch hergestellte Liposomen. Die Proteine wurden zusammen mit den Membranen und Coatomer entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit von GTPγS inkubiert. Nach einer Erhöhung der Salzkonzentration wurden die Vesikel von der Donormembran getrennt und durch eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Die isolierten Vesikel wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern gegen eine Coatomer-Untereinheit und gegen Arf1 analysiert. Abbildung

2.27 zeigt das Ergebnis sowohl für Golgi-Membranen (A) als auch für Liposomen (B). Mit beiden Membransystemen konnte eine GTP-abhängige Proteinbande für Arf1 als auch für γ -COP detektiert werden, was für eine erfolgreiche Bildung und Abschnürung freier COPI-Vesikel spricht. Im Vergleich zu humanem Arf1 zeigt Chaetomium Arf1 keinen wesentlichen Unterschied in der Effizienz der Vesikelbildung.

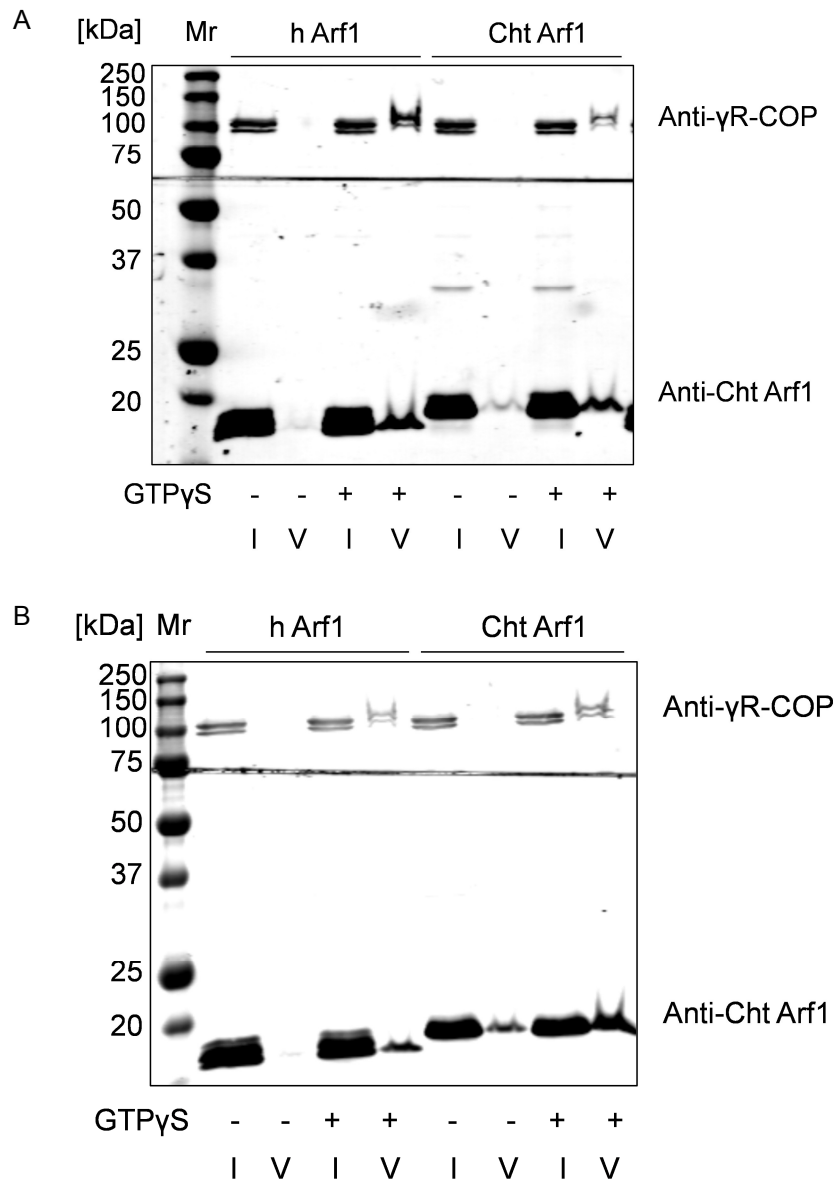


Abb. 2.27: In vitro Rekonstitution freier COPI-Vesikel. Arf1 wurde entweder mit Golgi-Membranen (A) oder Liposomen (B) und Coatomer mit und ohne GTP γ S für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation wurden die freien COPI-Vesikel von überschüssigem Material getrennt und angereichert. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot durch spezifische Antikörper (anti- γ R-COP und anti-Cht Arf1 CT). Hierzu wurden 1 % des Inputs (I) und jeweils 50 % der Vesikelfraktion (V) auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen.

Zusätzlich zum Western Blot wurde die Morphologie der COPI-Vesikel elektronenmikroskopisch durch Epon-Einbettung analysiert. Hierzu wurden Gesamtansätze und nicht nur isolierte COPI-Vesikel verwendet. Wie in Abbildung 2.28 zu sehen ist, und wie die Western Blot Analyse bereits gezeigt hat, ist die Anwesenheit von GTP für die Bildung von COPI-Vesikeln erforderlich. Die mit Chaetomium Arf1 generierten Vesikel unterscheiden sich nur unwesentlich in Größe und Form von denjenigen, die humanes Arf1 enthalten.

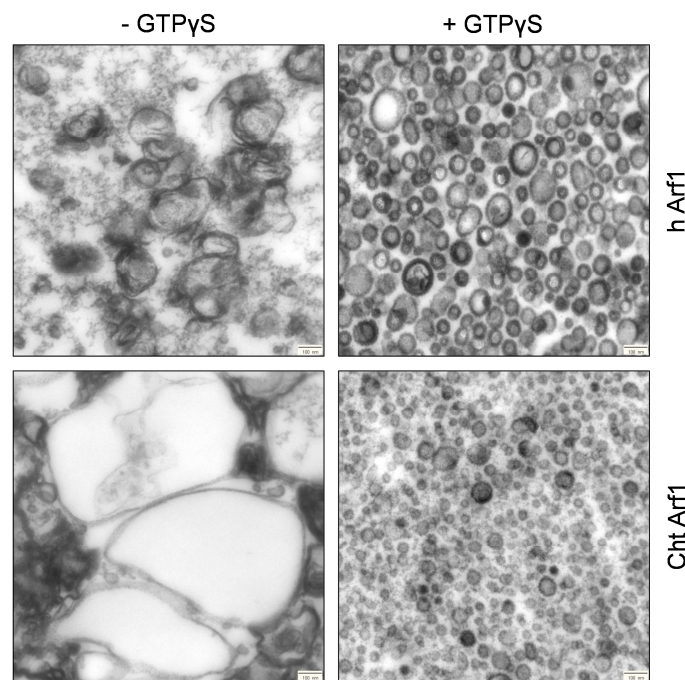


Abb. 2.28: Epon Einbettung von COPI-Vesikeln. Arf1 wurde zusammen mit Liposomen und Coatomer mit oder ohne GTP γ S für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Austausch zu GTP erfolgte durch die Zugabe von ARNO. Anschließend wurden die Proteine mittels Glutaraldehyd fixiert und die Membranen zentrifugiert. Der gesamte Ansatz wurde mit Epon eingebettet. Die Analyse erfolgte mit einem EM10CR Transmissions-Elektronenmikroskop. Maßstab: 100 nm

Zum Abschluss der Funktionalitätstests von Chaetomium Arf1 wurde die Rekrutierung von Coatomer und die GTP-Hydrolyse durch ArfGAP mittels *Static light scattering* analysiert. Diese Methode basiert auf der Messung der Streuung von Licht (Antonny et al., 2005). Liposomen, welche kein Protein gebunden haben streuen Licht weniger stark als solche, die Protein gebunden haben. Somit kann die Arf1-abhängige Rekrutierung des Coatomer-Komplexes an die Membran durch die Zunahme der Lichtstreuung gemessen werden. Durch die Zugabe von ArfGAP wird die GTP-Hydrolyse von Arf1 katalysiert, ein Prozess, welcher das Lösen der

Proteinhülle von der Membran als Folge hat. Somit wird nach Zugabe von ArfGAP eine Abnahme der Lichtstreuung beobachtet.

Zur Analyse wurde Arf1 zusammen mit Liposomen, Coatomer und EDTA in einem Spektralfluorimeter inkubiert. Die Rekrutierung an die Membran wurde durch Zugabe von GTP aktiviert. Abbildung 2.29 zeigt die Zunahme der Fluoreszenz nach Aktivierung von Arf1 sowohl im Falle von humanem Arf1 (rot) als auch bei Chaetomium Arf1 (blau). Nach Zugabe einer katalytischen Menge von ArfGAP2 sinkt die Fluoreszenz in beiden Fällen rapide ab, was den Prozess der Ablösung der Proteinhülle darstellt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung und die GTP-Hydrolyse von Chaetomium Arf1 keine Unterschiede im Vergleich zu humanem Arf1 aufweist.

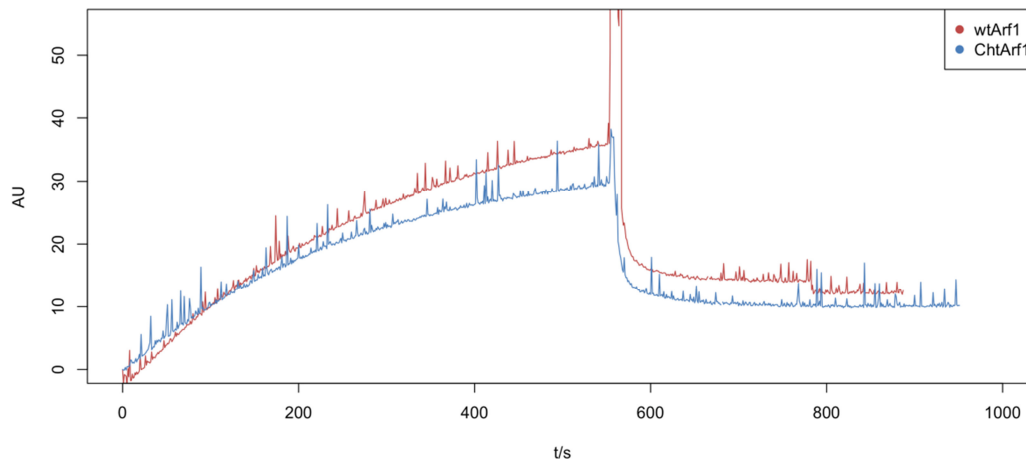


Abb. 2.29: Rekrutierung von Coatomer und GTP-Hydrolyse von Arf1 gemessen mittels *Static light scattering*. 400 nm große Liposomen wurden zusammen mit Arf1, Coatomer, EDTA und GTP in einem Spektralfluorimeter bei 37 °C inkubiert. Die Lichtstreuung wurde bei 340 nm gemessen. Durch die Zugabe von ArfGAP2 nach 600 sec wurde das Ablösen der Proteinhülle katalysiert. Rot: Kurve für humanes Arf1, blau: Kurve für Chaetomium Arf1.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieses Teils der Arbeit eine neue Arf1-Protein Spezies kloniert, exprimiert und aufgereinigt werden. Das thermophile Chaetomium Arf1 weist die gleiche Eigenschaft und Funktionalität wie das humane Arf1 auf und kann somit in Zukunft in verschiedene Analysen eingesetzt werden.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden spezifische Interaktionen zwischen der kleinen GTPase Arf1 und dem heptameren Proteinkomplex Coatomer analysiert. Hierfür wurde zunächst eine neue Expressionsmethode entwickelt, um die Myristoylierungseffizienz von Arf1 zu verbessern. Zuletzt wurde ein hitzestabiles Arf1-Protein aus dem Pilz *Chaetomium thermophilum* kloniert, exprimiert und auf dessen Funktionalität hin untersucht.

3.1 Verbesserung der Arf1-Myristoylierung

Damit sich Arf1 stabil in der Membran verankern kann, ist die N-terminale Myristoylierung maßgebend, welche eine N-Myristoyltransferase (NMT) gewährleistet. Wird Arf1 in einem bakteriellen System exprimiert, muss diese koexprimiert werden, da Bakterien nicht über ein solches Enzym verfügen. Da nicht das gesamte exprimierte Protein myristoyliert wird, kommt aufgereinigtes Arf1 auch immer in der nicht myristoylierten Form vor. Für *in vitro* Untersuchungen zur Biogenese von COPI-Vesikeln wird nur das myristoylierte Arf1 benötigt, weshalb dieses in ausreichender Menge exprimiert werden muss. Bisher war die Sequenz von Arf1 und der NMT auf einem einzigen Plasmid kodiert, welches dann in Bakterien transformiert wurde. Die Expression beider Proteine erfolgte gleichzeitig unter Zugabe von IPTG. Im Jahr 2005 wurde eine Methode veröffentlicht, bei welcher die Expression der beiden Proteine durch unterschiedliche Induktoren gesteuert werden kann (Ha et al., 2005). Es zeigte sich, dass hierdurch schon deutlich mehr myristoyliertes Arf1 entsteht. Da die NMT vor Arf1 exprimiert wird, ist schon genug NMT vorhanden um das Myristat auf Arf1 zu übertragen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Expression eines dritten Proteins, der Methionin Aminopeptidase (MetAP), welche das N-terminale Methion abspaltet, ebenso die Myristoylierung verbessert werden kann (Van Valkenburgh und Kahn, 2002). Durch Kombination dieser beiden Systeme ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, den Grad der Myristoylierung deutlich zu verbessern. Bei einer vorherigen, maximal 40 %-igen Myristoylierungseffizienz betrug diese nun bis zu 70 % (Abb. 2.2).

3.2 Interaktionen zwischen Arf1 und Coatomer

3.2.1 Expression und Aufreinigung photolabiler Arf1-Derivate

Durch einen GDP-GTP Austausch wird Arf1 an der Membran aktiviert. Im Folgenden rekrutiert die aktivierte GTPase Coatomer aus dem Cytosol. Es kommt zu einer Konformationsänderung innerhalb des Coatomer-Komplexes und zu dessen Polymerisierung an der Membran (Langer et al., 2008; Reinhard et al., 1999). Arf1 bindet dabei über multiple Interaktionen an unterschiedliche Coatomer-Untereinheiten (Sun et al., 2007; Zhao et al., 1997). Arf1 dimerisiert an der Membran in Abhängigkeit von GTP. Diese Dimerisierung begünstigt eine positive Membrankrümmung und ist für die Abschnürung der COPI-Vesikel essentiell (Beck et al., 2011; Beck et al., 2008). Die spezifische Lokalisierung von Arf1 innerhalb eines COPI-Vesikels konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Um dies zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Interaktionen von photolabilen Arf1-Derivaten mit Coatomer analysiert. Hierzu wurde ein System verwendet, welches es ermöglicht, eine photolabile Aminosäure anstelle einer Wildtyp-Aminosäure innerhalb eines Proteins während der Expression einzubauen. Als photolabile Aminosäure wurde p-Benzoyl-L-phenylalanin (Bp) verwendet. Nach dessen Aktivierung durch UV-Licht reagiert Bp bevorzugt mit CH-Bindungen, die sich im Umkreis von 3 Å zur photolabilen Aminosäure befinden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die genaue Position der Bindungsstelle innerhalb des Proteins ermittelt werden kann. Im Gegensatz zur Verwendung von chemischen Crosslinkern wird bei diesem System keine funktionelle chemische Gruppe bevorzugt. Ein weiterer Vorteil ist die Gewinnung von rekombinantem, photolabilem Protein im mg-Bereich.

Die Expression der photolabilen Arf1-Derivate erfolgte nur in Anwesenheit von Arabinose und Bp. Im Vergleich hierzu wurde die NMT sowohl ohne als auch mit Bp gleichermaßen exprimiert, da hier kein Stopcodon zum Einbau von Bp zur Verfügung stand (Abb. 2.6). Mittels Gelfiltration konnten die photolabilen Arf1-Derivate aus dem Bakterienlysat aufgereinigt werden. *E.coli* Bakterien verfügen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz über amber Stopcodons (Povolotskaya et al., 2012), daher konnte nahezu ausgeschlossen werden, dass photolabile Bakterienproteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von Arf1, mitaufgereinigt wurden. Zunächst wurde die Funktionalität der Arf1-Derivate durch Membranbindungsstudien an Liposomen überprüft. Arf1-Derivate binden, wie auch Wildtyp Arf1, nur in

Anwesenheit von GTP an die Membran (Abb. 2.8). Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass Arf1 nukleotidabhängig an die Membran bindet, womit zwei verschiedene Arf1 Populationen an der Golgi-Membran existieren (Helms et al., 1993). Arf1-GDP bindet zunächst transient an dimere p24 Proteine und wird dann durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert.

3.2.2 Arf1 interagiert mit β -COP und δ -COP

Für die Analyse der Interaktionen von Arf1 mit Coatomer wurden photolabile Arf1-Derivate verwendet, welche an zwei Positionen Bp beinhalteten. Arf1 I46Bp Y167Bp kann sowohl mit β -COP als auch mit δ -COP interagieren. Hierbei handelt es sich um bereits von Dr. Zhe Sun gezeigte Interaktionen (Sun et al., 2007). Zwei neue Crosslink-Produkte mit einem Molekulargewicht zwischen 180 und 200 kDa zeigten eine gleichzeitige Interaktion von Arf1 mit den beiden Coatomer-Untereinheiten β - und δ -COP (Abb. 2.9, Abb. 3.2). Das Ergebnis ist sowohl mit Golgi-Membranen als auch mit synthetisch hergestellten Liposomen reproduzierbar (Vergleiche Abb. 2.9 A und 2.9 B). Durch die Verwendung von Liposomen konnte ein Einfluss von Golgi-Proteinen auf die Interaktion ausgeschlossen werden. Im Western Blot sind im Vergleich zum Coomassie-angefärbten SDS-Gel zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 180-200 kDa erkennbar (Vergleiche Abb. 2.9 A, Spur 4 und Abb. 2.11, Spur 2). Die obere Bande konnte mit allen drei Antikörpern nur sehr schwach angefärbt werden und ist im Coomassie-Gel nicht erkennbar. Anhand des Molekulargewichts könnte es sich bei der oberen Bande um zwei Arf1-Moleküle handeln, die über eine photolabile Aminosäure zu einem Dimer verknüpft wurden. In diesem Dimer würde eines dieser Arf1-Moleküle über das zweite Bp mit β -COP beziehungsweise mit δ -COP interagieren. Somit würde ein Komplex mit einer Größe von ca. 200 kDa entstehen, bei dem ein Arf1-Dimer die beiden Coatomer Untereinheiten β -COP und δ -COP verbrückt. Die untere Bande, welche auch im Coomassie-Gel deutlich zu erkennen ist, weist ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa auf. Hierbei könnte es sich um die Interaktion zwischen einem Arf1-Monomer und den beiden Coatomer-Untereinheiten handeln (Abb. 3.2 A). Diese Vermutung konnte durch die MS-Untersuchungen bekräftigt werden. Um die Störung der MS-Analysen durch andere Proteine, wie beispielsweise Golgi-Proteine, so gering wie möglich zu halten, wurde für diese Experimente nur das liposomale System verwendet. Die

Daten zeigen, dass in der Bande bei 180 kDa die drei Proteine Arf1, β -COP und δ -COP am häufigsten vertreten sind und eine Stöchiometrie von 1:1:1 aufweisen (Tab. 2.1). Die iBAQ-Methode, welche hier zur Analyse der Stöchiometrie herangezogen wurde, ist eine labelfreie Methode zur absoluten Quantifizierung von Proteinen (Smits et al., 2013). Um ein genaues Ergebnis zu erreichen, müssen die zu analysierenden Proteine in hoher Konzentration vorliegen. In diesem Fall ist eine deutliche mit Coomassie färbbare Bande zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass eine ausreichend hohe Konzentration an Protein zur Verfügung stand.

Die Photocrosslink-Studien mit dem Arf1-Derivat Arf1 I49Bp Y167Bp zeigten keine neue Interaktion zwischen Arf1 und Coatomer. Hier wurde nur die bereits von Zhe Sun gezeigte Interaktion mit γ -COP bestätigt (Abb. 2.10). Da Arf1 I49Bp nicht nur mit γ -COP interagiert, sondern auch in geringer Form eine Affinität zu β -COP aufweist, ist im Western Blot bei 180 kDa auch der bereits identifizierte trimere Komplex aus Arf1, β -COP und δ -COP nachweisbar. Im Falle von Arf1 I46Bp I49Bp wurden keine eindeutigen Ergebnisse erzielt. Da hier die photolabilen Aminosäuren sehr eng beieinander liegen, kann es durchaus sein, dass diese miteinander reagiert haben und dadurch eine Interaktion mit Coatomer nicht zustande gekommen ist.

Die identifizierten Interaktionen von Arf1 mit β -COP und δ -COP wurden auch im löslichen Zustand untersucht. Da Vollängen Arf1 im GTP-gebundenen Zustand jedoch nur in Anwesenheit von Membranen aktiv ist und im löslichen Zustand präzipitiert, wurde hierfür die um den N-Terminus verkürzte Variante N Δ 17 Arf1 I46Bp Y167Bp verwendet. Um den GTP-gebundenen Zustand nachzuahmen, wurde die Arf1 Q71L Mutante verwendet. Bei Arf1 T31N handelt es sich um die inaktive GDP-gebundene Form. Beide Arf1-Derivate wurden über einen His-Tag mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Fall von Arf1 Q71L I46Bp Y167Bp wurden in Lösung die gleichen Interaktionen wie mit Vollängen Arf1 nachgewiesen. Die T31N Mutante zeigte keinerlei Interaktionen (Abb. 2.14). Dies zeigt, dass Arf1 nur in der aktiven, GTP-gebundenen Form mit Coatomer interagieren kann. Durch die Bindung von GTP erfährt Arf1 eine Konformationsänderung. Dabei verschiebt sich die interswitch Region zwischen switch I und switch II und es kommt zur Exposition der amphiphilen Helix. Hierdurch wird auch die Konformation der beiden switch Regionen verändert. I46 und I49 liegen innerhalb der switch I Region, weshalb diese beiden Aminosäuren nach der Konformationsänderung für die Interaktion mit

Coatomer sterisch verfügbar wären. Position 167 befindet sich am C-Terminus von Arf1, eine Region, welche keine Veränderung nach Bindung von GTP erfährt. Diese Region interagiert mit δ -COP. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass zum einen die switch I Region von Arf1 mit den Trunk-Domänen von β - und γ -COP und zum anderen der C-Terminus mit der N-terminalen Longin Domäne von δ -COP interagiert (Sun et al., 2007). Diese Arbeit zeigt auch, dass N Δ 17 Arf1 in Lösung unabhängig von dessen Nukleotidzustand an GST-getaggtes δ -COP binden kann. Dies führte zu der Annahme, dass Arf1 an der Membran zunächst an die Untereinheiten β - und γ -COP bindet. Hierdurch erfährt Coatomer eine Konformationsänderung und die Bindungsstelle für δ -COP wird frei.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Arf1-Molekül gleichzeitig über die switch I Region mit β -COP und mit dem C-Terminus mit δ -COP interagiert. Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob die Untereinheiten aus dem gleichen oder aus zwei unterschiedlichen Coatomer-Komplexen stammen. Leider gibt es noch keine ausreichenden strukturellen Kenntnisse über den gesamten Coatomer-Komplex. Sequenzanalysen und die erst kürzlich veröffentlichte strukturelle Analyse des γ/ζ Subkomplexes von COPI weisen jedoch auf Homologien zwischen dem tetrameren Coatomer-Subkomplex β , γ , δ , ζ und dem AP2-Komplex α , β_2 , σ_2 und μ_2 hin (Yu et al., 2012). In der 2002 veröffentlichten Struktur des AP2-Kernkomplexes, sitzen jeweils die kleine Untereinheit σ_2 und der N-Terminus von μ_2 in der Beuge der beiden großen Untereinheiten α und β_2 . Jedes Paar bildet ein Heterodimer und zusammen bilden sie ein Plateau, auf dessen Oberseite in der geschlossenen Konformation der C-Terminus von μ_2 lokalisiert ist (Abb. 3.1 A) (Collins et al., 2002). Nach der Bindung an die Membran über Phosphatidylinositole kommt es zu einer Konformationsänderung. Dabei bewegt sich der C-Terminus von μ_2 an die Außenseite von β_2 (Abb. 3.1 B) (Jackson et al., 2010). Dies wird als offene Konformation bezeichnet, da nun die Bindungsstellen für Frachtmoleküle zugänglich geworden sind. Überträgt man diese Struktur nun auf den Coatomer-Komplex, lässt sich schließen, dass der N-Terminus von δ -COP (entsprechend N- μ_2) sehr nahe an β -COP (entsprechend β_2) lokalisiert ist und dieser nur in der offenen Konformation zugänglich ist. Es ist daher durchaus möglich, dass ein und dasselbe Arf1-Molekül zur gleichen Zeit mit δ - und β -COP innerhalb des gleichen Coatomer-Komplexes interagieren kann.

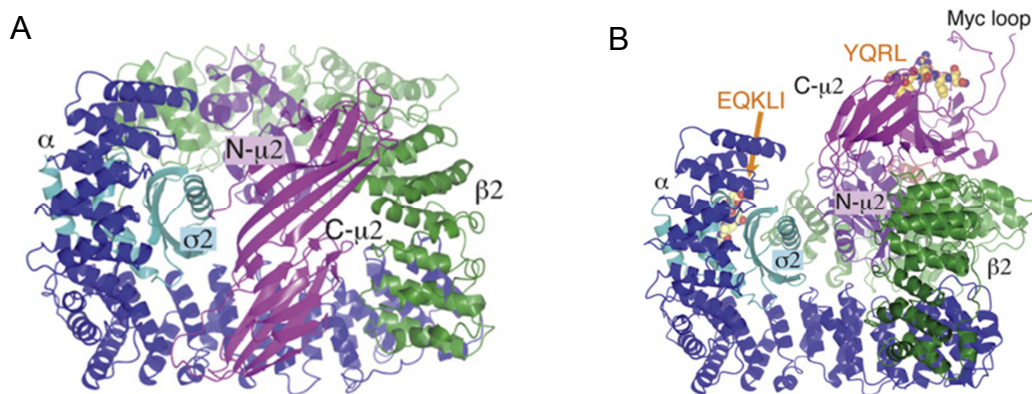


Abb. 3.1: Struktur des AP2-Kernkomplexes. (A) Geschlossene Form des AP2-Kerns. Die kleine Untereinheit $\sigma 2$ (türkis) und der N-Terminus von $\mu 2$ (lila) liegen jeweils in der Beuge der großen Untereinheiten $\beta 2$ (grün) und α (blau). Zusammen bilden sie eine Art Plateau. In der Mitte liegt der C-Terminus von $\mu 2$ (magenta). (B) Offene Form von AP2. Der C-Terminus von $\mu 2$ liegt nun nicht mehr in der Mitte des Komplexes, sondern an der äußeren Seite von $\beta 2$. Die Abbildung wurde von Jackson et al., 2010 übernommen.

3.2.3 Dimerisierung von Arf1

Arf1 dimerisiert nach dessen Aktivierung an der Membran. Diese Dimerisierung ist Voraussetzung für das Abschnüren der COPI-Vesikel von der Donormembran (Beck et al., 2011; Beck et al., 2008). Eine Arf1-Mutante, bei welcher Tyrosin 35 durch Alanin ersetzt wurde kann nicht mehr dimerisieren. Zwar ist sie in der Lage Coatomer zu rekrutieren, es kommt jedoch nicht zur Abschnürung der COPI-Vesikel. Stattdessen verbleiben gebildete Vesikel an der Donormembran und es bilden sich Rosetten-ähnliche Strukturen aus. Da diese Mutation die Dimerisierung von Arf1 verhindert, wird angenommen, dass die Aminosäure im Dimer-Interface liegt. Aufgrund dieser Beobachtung und anhand von tryptischer Proteolyse mit nachfolgender massenspektrometrischer Untersuchungen, wurde das Modell eines in der Donormembran vorkommenden, für die COPI-Vesikelbiogenese essentiellen, Arf1-Dimer Modell erstellt. Um den Mechanismus näher zu untersuchen, wie ein Arf1-Dimer mit Coatomer interagiert, wurden in der vorliegenden Arbeit anhand des postulierten Dimer-Modells Positionen in dessen Interface bestimmt, an deren Stelle ein Bp platziert wurde, um zwei Arf1-Moleküle nach Aktivierung der photolabilen Aminosäure kovalent miteinander zu verknüpfen. Im nächsten Schritt könnte

anschließend durch ein zweites Bp die Interaktion mit Coatomer untersucht werden. Leider konnte bei keinem photolabilen Arf1-Derivat eine Dimerisierung an der Membran beobachtet werden. Dies könnte daran liegen, dass die photolabile Aminosäure die Bildung eines Dimers sterisch behindert. Interessanterweise konnte innerhalb dieses Experimentes eine Interaktion von Arf1 Y35Bp mit γ -COP nachgewiesen werden (Abb. 2.17 und Abb. 3.2 B). Das Tyrosin 35 ist in gleicher Richtung orientiert wie die Aminosäuren Isoleucin 46 und 49, welche beide mit Coatomer interagieren. Somit scheint Tyrosin 35 eine Rolle bei der Dimerisierung von Arf1 als auch bei der Interaktion mit Coatomer zu spielen. Wenn diese Position mit γ -COP interagiert, ist es sterisch nicht möglich, dass auf der gleichen Seite mit einem zweiten Arf1, ein Dimer gebildet werden kann. Dies führt zu der Annahme, dass COPI-Vesikel möglicherweise sowohl Arf1-Dimere als auch Arf1-Monomeren enthalten. Da die Dimerisierung entscheidend für die Abschnürung von COPI-Vesikeln ist, könnte spekuliert werden, dass nur während des Heranreifens eines Vesikels bis hin zu dessen Abschnürung Arf1-Dimere transient mit Coatomer interagieren. Nach erfolgter Trennung des Vesikels blieben die Dimere dann auf der Donormembran zurück. Um diese Vermutung zu bestätigen, sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig. Ein möglicher Ansatz wäre, die nach der Vesikelbildung zurückbleibenden Donormembranen auf ihren Gehalt an Arf1-Dimeren hin zu untersuchen.

3.2.4 Arf1 interagiert mit γ -COP und β -COP

Neben der gleichzeitigen Interaktion von Arf1 mit β - und δ -COP wurde in dieser Arbeit erstmals eine Interaktion der „Rückseite“ von Arf1 mit einer Coatomer-Untereinheit nachgewiesen. Ebenfalls mittels Arf1-Derivaten, welche an zwei Position eine photolabile Aminosäure aufweisen, konnte gezeigt werden, dass I49 in der switch I Region mit γ -COP und E98, welches auf der gegenüberliegenden Seite der switch I Region lokalisiert ist, mit β -COP interagiert (Abb. 3.2 C). Crosslinkstudien mit Arf1 I49Bp E98Bp zeigen im Western Blot eine Bande bei ca. 250 kDa (Abb. 2.20). Das errechnete Molekulargewicht der drei Moleküle beträgt insgesamt 220 kDa. Wie im Falle von Arf1 I46Bp Y167Bp könnte es sich auch hier um ein durch UV-Licht erzeugtes Arf1-Dimer handeln, wovon jeweils ein Molekül mit dessen „Rückseite“ mit β -COP und das andere über die switch I Region mit γ -COP interagiert (Abb. 3.2 D).

Eine Arf1-Dimer Bande würde im SDS-Gel bei einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa erscheinen. Eine derartige Bande nach UV-Belichtung wurde in keinem Ansatz beobachtet. Folglich wurden entweder alle gebildeten Arf1-Dimere mit den Coatomer-Untereinheiten verknüpft, oder nur ein Arf1-Molekül verbrückt β - und γ -COP miteinander. Das erhöhte apparente Molekulargewicht könnte damit begründet werden, dass das verwendete SDS-Gel im höheren Molekularbereich nicht ausreichend Auftrennung bietet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte der trimere Komplex nicht mittels Massenspektrometrie untersucht werden, um, wie auch für Arf1 I46Bp Y167Bp, anhand der iBAQ-Methode die Stöchiometrie der einzelnen Proteine zu bestimmen. Das Potential von Arf1, über seine Vorder- und Rückseite zwei Komplexe miteinander verknüpfen zu können, wurde im Jahr 2013 anhand von kristallografischen Studien von Arf1 im Komplex mit AP1 gezeigt. Hier überbrücken zwei Arf1-Moleküle zwei AP1-Komplexe durch unterschiedliche Interaktionsstellen (Ren et al., 2013). Die Arf1 switch I und II Region bindet dabei an den N-Terminus der β 1-Untereinheit, und die gegenüberliegende Seite interagiert mit der Trunk-Domäne der γ -Untereinheit eines zweiten AP1-Komplexes. Die Autoren konnten jedoch nicht ausschließen, dass es sich bei dieser Interaktion auf der „Rückseite“ um ein Kristallartefakt handelt. Innerhalb eines Coatomer-Komplexes befinden sich γ - und β -COP in einer Entfernung von 110 Å zueinander (Yu et al., 2012). Anhand dieser Entfernung lässt sich ausschließen, dass die beiden Untereinheiten, welche durch Arf1 verbrückt werden, aus dem gleichen Komplex stammen. Daraus lässt sich schließen, dass eine Verbrückung über Arf1 auch zwischen AP1-Komplexen tatsächlich existiert.

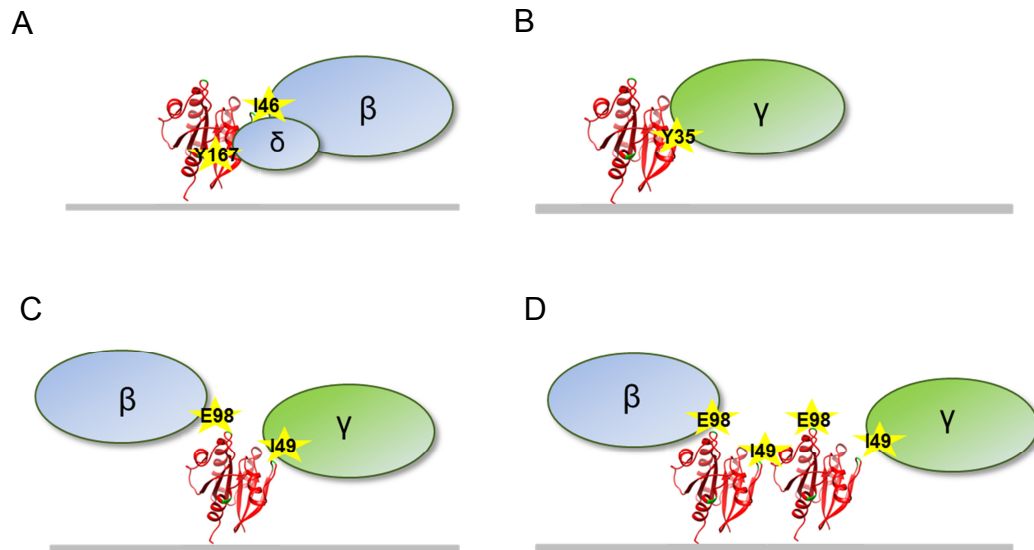


Abb. 3.2: Zusammenfassung der Interaktionen von Arf1 mit Coatomer. Zur Untersuchung der Interaktionen von Arf1 mit Coatomer wurden photolabile Arf1-Derivate verwendet. Hierzu wurden diese an Membranen gebunden und durch Belichtung mit UV-Licht wurde die photolabile Aminosäure aktiviert. Die daraus resultierenden Photocrosslinks wurden anhand von Western Blots untersucht. (A) Arf1 I46Bp Y167Bp interagiert gleichzeitig mit δ -COP und β -COP. (B) Arf1 Y35Bp interagiert mit γ -COP. (C) Arf1 I49Bp E98Bp überbrückt als Monomer β -COP und γ -COP aus unterschiedlichen Coatomer-Komplexen. (D) Arf1 I49Bp E98Bp überbrückt als Dimer die beiden Untereinheiten β - und γ -COP. Das gelbe Sternchen markiert jeweils die Positionen von Bp.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass ein Arf1-Molekül mit zwei Coatomer-Untereinheiten gleichzeitig an unterschiedlichen Stellen interagieren kann. Zudem wurde eine bisher noch nicht beschriebene Interaktion der „Rückseite“ von Arf1 mit β -COP nachgewiesen. Weiterführende Studien könnten sich mit der Identifizierung der jeweiligen genauen Interaktionsstelle innerhalb der hier identifizierten Coatomer-Untereinheiten befassen. Hierzu wurden einige massenspektrometrische Ansätze versucht, jedoch konnte die kreuzvernetzten Peptide nicht eindeutig identifiziert werden. Grund hierfür könnten Unschärfen in der Position der Kreuzvernetzung sein, die durch Bewegung des Bp während der mehrminütigen Belichtungszeit erzeugt werden, und somit eine genaue Bestimmung des interagierenden Peptids erschweren. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit benutzt eine Variante der Methode, bei der ^{13}C -markiertes Benzophenon an definierte Stellen innerhalb eines Proteins eingebaut wird (Pettelkau et al., 2014). Dies erleichtert die nach erfolgtem Crosslink massenspektrometrische Analyse erheblich, da sich ein für das Isotop charakteristisches Muster ergibt. Dies wäre ein möglicher Ansatz, um auf

Seiten des Coatomer-Komplexes die genauen Aminosäuren, die mit Arf1 interagieren, zu identifizieren.

3.3 Herstellung von *Chaetomium thermophilum* Arf1

Bei *Chaetomium thermophilum* handelt es sich um einen Organismus, welcher hohe Temperaturen tolerieren kann. Sein optimales Wachstum ist bei 55 °C. Chaetomium Proteine sind daher hitzestabiler als solche aus Maus oder Mensch. Diese Eigenschaft der größeren Stabilität ist für Kristallisationsansätze vorteilhaft. Bisher konnten nur einzelne Domänen des heptameren Coatomer-Komplexes kristallisiert werden, es ist noch nicht gelungen, die Struktur des gesamten Komplexes als Einheit zu lösen. Ebenso wurde nur die Interaktion von Arf1 mit γ/ζ -COP kristallografisch gelöst, Interaktionen von Arf1 zu weiteren Untereinheiten konnten noch nicht dargestellt werden. Bisher wurde in verschiedenen Laboratorien mit Arf1 der Spezies Maus, Ratte, Rind oder Mensch gearbeitet. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals hitzestabiles Chaetomium Arf1 exprimiert und aufgereinigt. Die cDNA Sequenz hierfür lieferte eine Arbeit, welche das gesamte Genom des Organismus entschlüsselte (Amlacher et al., 2011). Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von humanem Arf1 und Chaetomium Arf1 liefert eine Ähnlichkeit von 90 %. Dabei liegt der größte Unterschied am C-Terminus und in der N-terminalen Helix, welche bei Chaetomium Arf1 um drei Aminosäuren länger ist (Abb. 2.21). Die beiden switch-Regionen, welche die Konformationsänderung nach Aktivierung erfahren und mit den Coatomer-Untereinheiten β - und γ -COP interagieren, sind identisch.

Die Expression und Aufreinigung erfolgte in der gleichen Form wie für humanes Arf1. Interessanterweise lag Chaetomium Arf1 nach der Aufreinigung nicht wie humanes Arf1 in der myristoylierten und nicht-myristoylierten Form vor, sondern es konnte ausschließlich myristoyliertes Arf1 detektiert werden. Der Antikörper, welcher gegen humanes Arf1 gerichtet ist, konnte Chaetomium Arf1 nicht detektieren, daher musste zunächst ein Chaetomium Arf1 Antikörper hergestellt werden. Dieser ist gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet. Bei der Analyse der Funktionalität des Antikörpers zeigte dieser keinerlei Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aus dem Bakterienlysat (Abb. 2.25). Die Bindung an Membranen war sowohl für Chaetomium Arf1 wie für humanes Arf1 GTP-abhängig. Bei der *in vitro* Generierung von COPI-Vesikeln zeigte Chaetomium Arf1 sowohl unter Verwendung von Golgi-Membranen

als auch von liposomalen Membranen die gleiche Ausbeute an Vesikeln wie jene, die mit humanem Arf1 erzielt werden konnten. Ferner zeigte der elektronenmikroskopische Vergleich der jeweiligen Vesikel eine hohe morphologische Ähnlichkeit zu humanen Arf1-gebildeten Vesikeln. Experimente zur Rekrutierung von Coatomer und zur GTP-Hydrolyse zeigten ebenfalls keinen Unterschied zwischen Chaetomium Arf1 und humanem Arf1. Zusammengefasst verfügt Chaetomium Arf1 in den hier durchgeführten Funktionalitätstests über die gleichen Eigenschaften wie humanes Arf1. Demnach kann es für Kristallisationsversuche eingesetzt werden. Da die genaue Interaktionsstelle zwischen Arf1 und β - beziehungsweise δ -COP noch nicht geklärt werden konnte, würde ein Kristall aus diesem trimeren Komplex wesentlich zur Aufklärung der Interaktionsflächen beitragen. Durch die erhöhte Stabilität dieser Arf1-Spezies könnte es womöglich auch gelingen, die Struktur eines Arf1-Dimers und somit dessen Kontaktflächen zu ermitteln.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biorad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gerbu (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

4.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung	
Coomassie-Färbelösung	40 % (w/v)	Ethanol
	10 % (w/v)	Essigsäure
	0,25 % (w/v)	Coomassie R-250
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (w/v)	Ethanol
	5 % (w/v)	Essigsäure
DNA-Probenpuffer (5x)	50 mM	Tris-HCl
	4 M	Harnstoff
	25 % (w/v)	Glycerin
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	100mM	EDTA
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM	Tris
	250 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
1x PBS	137 mM	NaCl
	4,3 mM	Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	pH = 7,4	

PBS-T	1x PBS 0,05% (v/v) Tween-20 pH = 7,4
SDS-Probenpuffer (4x)	30 % (v/v) Glycerol 6 % (w/v) SDS 187,5 mM Tris-HCl pH = 6,8 15 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,0675 % (w/v) Bromphenolblau
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris-HCl 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH = 8,0
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 250 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 0,037 % (w/v) SDS

Spezielle Puffer und Lösungen sind in den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.1.3 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Stratagene (La Jolla, USA)

4.1.4 Nährmedien und Medienzusätze für Bakterienkulturen

LB-Medium 10 g/L NaCl
 5 g/L Hefeextrakt
 10 g/L Trypton

LB-Agar LB-Medium mit 2 % (w/v) LB-Agar

Für die Herstellung von Selektionsmedium wurden folgende Reagenzien verwendet:

Ampicillin (100 µg/ml)

Kanamycin (30 µg/ml)

Chloramphenicol (50 µg/ml)

p-Benzoyl-L-phenylalanin (Bp) für die Expression photolabiler Arf1-Proteine wurde von der Firma Bachem bezogen. Als Stocklösung wurde 1 M Bp in 1 M NaOH gelöst.

4.1.4 Eukaryotische Zelllinien und Nährmedium

Zelllinie	Beschreibung	Nährmedium
Sf9	Ovar-Zellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>	Sf-900 II SFM Invitrogen (Karlsruhe)

4.1.5 Antikörper

Alle Primärantikörper wurden in PBS-T mit 1 % (w/v) BSA verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Antigen	Name	Epitop	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Arf1	Arf1 CT	C-terminales	Kaninchen	1:5000	AG Wieland
	1849 Emma	Peptid			
Arf1	Arf1	Rekombinates Arf1	Maus	1:1000	Acris Antibodies
Chaetomium Arf1	Cht Arf1 CT	C-terminales Peptid	Kaninchen	1:5000	Diese Arbeit

α-COP	α -COP rab1	C-terminales Peptid	Kaninchen	1:1000	AG Wieland
β-COP	B1.2	Internes Peptid	Kaninchen	1:2000	AG Wieland
β'-COP	899	C-terminales Peptid	Kaninchen	1:10000	AG Wieland
γ1/γ2-COP	γ -R	Rekombinantes γ -COP	Kaninchen	1:10000	AG Wieland
δ-COP	877	Internes Peptid	Kaninchen	1:1000	AG Wieland
ϵ-COP	ϵ -COP rab2	Internes Peptid	Kaninchen	1:1000	AG Wieland
ζ-COP	ζ 1R	C-terminales Peptid	Kaninchen	1:3000	AG Wieland
Mannosidase	Mann II	N-terminales Peptid	Kaninchen	1:1000	AG Wieland

Als Sekundärantikörper wurde entweder ein Ziege-anti-Kaninchen Alexa Fluor® 680 oder ein Ziege-anti-Maus Alexa Fluor® 680 jeweils von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Antikörper wurden 1:10000 in PBS-T mit 1 % (w/v) BSA, 0,01 % (w/v) SDS und 0,01 % (w/v) Natriumazid verdünnt und bei 4 °C gelagert.

4.1.6 Vektoren

Plasmidname	Insert	Resistenz	Herkunft
pET-Duet1	-	Amp	Novagen
pEVOL-pBp	tRNA, tRNA Synthetase	Cm	Peter G. Schultz
pRSF-Duet1	-	Kan	Novagen
pET-Duet1- yNMT-hArf1 I46BpY167Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 I46Bp Y167Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 I49BpY167Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 I49Bp Y167Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 I46BpI49Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 I46Bp I49Bp	Amp	Diese Arbeit
pRSF-Duet1-MetAP	Methionin Aminopeptidase	Kan	Diese Arbeit
pETM11-hArf1 Δ 17 Q71L	hArf1 Δ 17 Q71L	Kan	Diese Arbeit
pETM11-hArf1 Δ 17 T31N	hArf1 Δ 17 T31N	Kan	Diese Arbeit
pETM11-hArf1 Δ 17 Q71L I46Bp Y167Bp	Photolabiles hArf1 Δ 17 Q71L I46Bp Y167Bp	Kan	Diese Arbeit
pETM11-hArf1 Δ 17 T31N I46Bp Y167Bp	Photolabiles hArf1 Δ 17 T31N I46Bp Y167Bp	Kan	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 Y35Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 Y35Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 E41Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 E41Bp	Amp	Diese Arbeit

pET-Duet1-yNMT -hArf1 Y58Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 Y58Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 E168Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 E168Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 R97Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 R97Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 E98Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 E98Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 P131Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 P131Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 E138Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 E138Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 D141Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 D141Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 W153Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 W153Bp	Amp	Diese Arbeit
pET-Duet1-yNMT -hArf1 Q156Bp	Hefe NMT Photolabiles hArf1 Q156Bp	Amp	Diese Arbeit
pHV738	Humane NMT Methionin Aminopeptidase	Kan	Richard Kahn
pMON 5840	-	Amp	Gerraint Thomas
pMON5840-h Arf1	Humanes Arf1	Amp	Diese Arbeit
pMON5840-Cht-Arf1	Chaetomium Arf1	Amp	Diese Arbeit

4.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm) bezogen, in Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Name	Sequenz (5'-3')
NMT w/o NdeI for	TGGATAAACAAGTAATTTTCTCGTATGTAGTCGAACAGCCCGAT
NMT w/o NdeI rev	ATCGGGCTGTTGCGACTACATACGAGAAAATTACTTGTTTATCCA
Arf1 FKBP NdeI for	GAGACATATGGGGAACATCTTCGCCAA
Arf1 cys BamHI rev	GAGAGGATCCTCAGCACTGGTTCCGGAGCTGATTG
Arf1 I46 Bp for	AGATCGTGACCACCTAGCCCACCATA
Arf1 I46 Bp rev	TATGGTGGGCTAGGTGGTCACGATCT
Arf1 I49 Bp for	GTGACCACCATTCCCACCTAGGGCTTCAACGTGGAAACC
Arf1 I49 Bp rev	GGTTTCCACGTTGAAGCCCTAGGTGGGAATGGTGGTCAC
Arf1 Y167 Bp for	GGCGACGGGCTCTAGGAAGGACTGGACTG
Arf1 Y167 Bp rev	CAGTCCAGTCCTTCCTAGAGCCCGTCGCC
Arf1 I46BpI49Bp for	GTGACCACCTAGCCCACCTAGGGCTTCAACGTGGAAACC
Arf1 I46BpI49Bp rev	GGTTTCCACGTTGAAGCCCTAGGTGGGCTAGGTGGTCAC

NMT Stopcodon for	GTCGGTGTGTTATGTTGTAAGGATCCGAATTCGAGC
NMT Stopcodon rev	GCTCGAATTCGGATCCTTACAACATAACAACACCGAC
NΔ17 Arf1 Q71L for	GACGTGGGTGGCCTGGACAAGATCCGG
NΔ17 Arf1 Q71L rev	CCGGATCTTGTCCAGGCCACCCACGTC
NΔ17 Arf1 T31N for	GATGCTGCAGGGAAGAACACGATCCTCTACAAG
NΔ17 Arf1 T31N rev	CTTGTCGAGGATCGTGTTCTTCCCTGCAGCATC
Arf1 Y35 Bp for	GGAAGACCACGATCCTCTAGAAGCTTAAGCTGG
Arf1 Y35 Bp rev	CCAGCTTAAGCTTCTAGAGGATCGTGGTCTTCC
Arf1 E41 Bp for	CCTCTACAAGCTTAAGCTGGGTTAGATCGTGACCA
Arf1 E41 Bp rev	TGGTCACGATCTAACCCAGCTTAAGCTTGTAGAGG
Arf1 Y58 Bp for	CGTGGAAACCGTGGAGTAGAAGAACATCAGCTTC
Arf1 Y58 Bp rev	GAAGCTGATGTTCTTCTACTCCACGGTTTCCACG
Arf1 K59 Bp for	TGGAAACCGTGGAGTACTAGAACATCAGCTTCACT
Arf1 K59 Bp rev	AGTGAAGCTGATGTTCTAGTACTCCACGGTTTCCA
Arf1 E168 Bp for	CAGCGGCGACGGGCTCTATTAGGGACTGGACT
Arf1 E168 Bp rev	AGTCCAGTCCCTAATAGAGCCCGTCGCCGCTG
Arf1 R97 Bp for	GTGGTGGACAGCAATGACTAGGAGCGTGTGAACGAGGCC
Arf1 R97 Bp rev	GGCCTCGTTCACACGCTCCTAGTCATTGCTGTCCACCAC
Arf1 E98 Bp for	GTGGTGGACAGCAATGACAGATAGCGTGTGAAC
Arf1 E98 Bp rev	GTTCACACGCTATCTGTCATTGCTGTCCACCAC
Arf1 P131 Bp for	CCAACAAGCAGGACCTCTAGAACGCCATGAATGCGGC
Arf1 P131 Bp rev	GCCGCATTCATGGCGTCTAGAGGTCCTGCTTGTTGG
Arf1 E138 Bp for	GCCATGAATGCGGCCTAGATCACAGACAAGC
Arf1 E138 Bp rev	GCTTGTCTGTGATCTAGGCCGCATTCATGGC
Arf1 D141 Bp for	CGGCCGAGATCACATAGAAGCTGGGGCTGCA
Arf1 D141 Bp rev	TGCAGCCCCAGCTTCTATGTGATCTCGGCCG
Arf1 W153 Bp for	CTACGCCACAGGAAGTACTAGTACATTCAGGCCACC
Arf1 W153 Bp rev	GGTGGCCTGAATGTAAGTACTAGTTCCTGTGGCGTAG
Arf1 Q156 Bp for	CGCCACAGGAAGTGGTACATTTAGGCCACCTCG
Arf1 Q156 Bp rev	CGAGGTGGCCTAAATGTACCAGTTCCTGTGGCG
Cht Arf1 Nco I for	ATATCCATGGGCTTGGCCGGCTCGAAATT
Cht Arf1 Hind III rev	CGCGAAGCTTTCAGTTCGACGATTTTTTAAT

4.1.8 Enzyme und Kits

Enzyme und Kits	Hersteller
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QiaQuick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Quick change site directed mutagenis kit</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>Pfu-Turbo Polymerase</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>T4-DNA Ligase</i>	Fermentas

4.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose Gelapparatur	Peqlab (Erlangen)
Bakterien-Schüttler	Infors (Bottmingen, Schweiz)
Ettan LC FPLC	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Gel Doc	Biorad (München)
Microfluidizer	Microfluidics (Newton, USA)
NanoDrop ND-100 Spektrometer	Nanodrop Technologies (Wilmington, USA)
PCR Maschine	Thermo Hybaid (Ulm)
SDS-Gelapparatur	Biorad (München)
Spektralfluorimeter FP-6500	Jasco (Groß-Umstadt)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Ultraturrax	IKA (Staufen)
UV Lampe Black Ray B100A, 10 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	Henry Weber Labortechnik (Glashütten)
Western Blot Apparatur	Biorad (München)

Zentrifugen:	
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Megafuge 40 R	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)

4.1.10 Computersoftware

Es wurde folgende Computersoftware verwendet: Microsoft Office 2010, Chimera, EndNote XI, Vector NTI.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien wurde ein Teil eines Glycerolstocks auf eine LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie in 10 ml LB-Medium angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelgerät kultiviert. Anschließend wurden 8 ml der Vorkultur in 400 ml LB-Medium + Mg²⁺ Mix überführt und bei 37 °C kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht wurde. Die Bakterienkultur wurde bei 3500 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend vorsichtig in 32 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurde die Suspension erneut zentrifugiert (3500 x g, 4 °C, 10 min) und das Pellet in 10 ml kaltem Puffer 2 resuspendiert. Jeweils 100 µl der Bakteriensuspension wurden anschließend in vorgekühlte Eppendorf Gefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Puffer	Zusammensetzung
Puffer 1 (500 ml)	6,05 g RbCl 4,95 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O 0,74 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 86,2 ml 87 % Glycerol pH 5,8 mit HAc
Puffer 2 (200 ml)	0,42 g MOPS 0,24 g RbCl 2,21 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 34,5 ml 87 % Glycerol pH 6,8 mit NaOH
Mg ²⁺ Mix	1 M MgCl ₂ 1 M MgSO ₄

4.2.2 DNA Restriktion und Ligation

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurde die gewünschte Menge an DNA mit jeweils 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym (New England Biolabs) und dem entsprechenden Puffer in einem Endvolumen von 20 µl für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bei einem präparativen Verdau wurde das gewünschte DNA-Fragment anschließend mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel Extraction Kit* entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

Für die Ligation wurden 50 ng Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 zur Insert-DNA zusammen mit 1x T4-Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (Fermentas) in einem Endvolumen von 10 µl gemischt. Der Ansatz wurde anschließend bei 22 °C für 1 h inkubiert.

4.2.3 DNA Transformation

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl chemisch kompetenter *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden entweder 50 ng Plasmid-DNA oder der gesamte Ligationsansatz hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte für 45 sec ein Hitzeschock bei 42 °C. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 min wurden 900 µl LB-Medium hinzugegeben und die Bakterienlösung anschließend 1 h bei 37 °C und 800 rpm in einem Schüttelgerät (Eppendorf) inkubiert. 200 µl der Bakterien wurden auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden die Proben mit 5x DNA-Probenpuffer versehen und in die Taschen eines Agarosegels (1xTAE, 1 % (w/v) Agarose, 0,5 µg/µl Ethidiumbromid) pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 100-120 Volt für ca. 45 min in einer entsprechenden Gelapparatur. Als Größenmarker wurden 5 µl eines 1 kb Molekulargewichtsstandard (New England Biolabs, USA) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden durch UV-Bestrahlung bei 260 nm mit einem GelDoc Gerät

sichtbar gemacht und fotografiert oder im Falle von einem präparativen Gel ausgeschnitten.

4.2.5 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von DNA aus Bakterienzellen wurde jeweils eine Kolonie von einer Agarplatte in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* entsprechend den Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt.

4.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einer PCR Maschine. Hierzu wurden folgende Komponenten in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt:

100 ng	DNA-Template
0,5 µl	Primer _{forward} (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer _{reverse} (100 pmol/µl)
1,5 µl	Desoxynukleotide (dNTPs, 10 mM)
5 µl	10 x Reaktionspuffer
1,5 µl	<i>Pfu Turbo</i> Polymerase (2,5 U/µl)
<hr/>	
ad 50 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit
1	95 °C	5 min
30	95 °C	1 min
	60 °C	1 min
	72 °C	1 min 30 sec
	72 °C	10 min
	4 °C	~

4.2.7 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen in eine DNA Sequenz wurde das *Quick change site directed mutagenis kit* verwendet. Hierzu wurden sense und antisense Primer synthetisiert, welche das entsprechend modifizierte Codon enthielten. Die Länge der Primer betrug zwischen 25 und 36 bp. Folgende Komponenten wurden zusammengemischt:

20 ng	DNA-Template
0,5 µl	Primer _{forward} (100 pmol/µl)
0,5 µl	Primer _{reverse} (100 pmol/µl)
1,5 µl	Desoxynukleotide (dNTPs, 10 mM)
5 µl	10 x Reaktionspuffer
1,5 µl	<i>Pfu Turbo</i> Polymerase (2,5 U/µl)
<hr/>	
ad 50 µl	H ₂ O

Die Reaktion erfolgte in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm:

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit
1	95 °C	1 min
16	95 °C	30 sec
	55 °C	1 min
	68 °C	12 min
	68 °C	15 min
	4 °C	~

Nach erfolgter PCR wurde zu jedem Reaktionsansatz 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (10U/µl) hinzugegeben und 1h bei 37 °C inkubiert. *DpnI* schneidet methylierte, also in diesem Falle die nicht-mutierte Template-DNA. Anschließend wurden 5 µl des Ansatzes in kompetente *DH5α* Bakterien transformiert und der gesamte Ansatz auf einer entsprechenden Agarplatte ausplattiert. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

4.2.8 Bestimmung der DNA Konzentration

Zur Bestimmung der DNA Konzentration wurde ein *NanoDrop ND-100* Spektrometer verwendet. Hierzu wurde jeweils 1 μl der DNA aufgetragen und bei einer Wellenlänge von 260 nm analysiert. Als Referenz wurde der entsprechende Puffer verwendet.

4.2.9 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung der DNA wurde über Nacht von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 20 μl der DNA mit einer Konzentration von 30 ng/ μl versendet.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe erfolgte entweder mittels diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen (Laemmli, 1970) oder mit kommerziell erhältlichen Gradientengelen (Invitrogen, Karlsruhe). Für die selbst gegossenen Gele wurden je nach Bedarf ein 12-15 % Acrylamid-Trenngel und ein 4 % Acrylamid-Sammelgel verwendet.

Zusammensetzung der Gele:

% Sammel- gel	H ₂ O [ml]	0,5 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
12	1,67	1,25	2,0	50	50	5
15	1,18	1,25	2,5	50	50	5

Die Polymerisation der Gele wurde durch die Zugabe von TEMED und APS gestartet. Direkt nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol durch Spülen mit Wasser entfernt und die Geloberfläche mit einem Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen. Die Gele wurden entweder sofort verwendet oder zur Lagerung im Kühlschrank in feuchtem Papier und Folie eingewickelt. Zum Beladen der Gele wurden die Proben mit 4x SDS-Probenpuffer so versehen, dass die Endkonzentration 1x oder 2x betrug und für 5 min bis 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte bei 110-200 Volt für 1-2 h.

4.3.2 Western Blot

Zum Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Membranen wurde das Nass-Blot Verfahren eingesetzt. Hierzu wurden zunächst 4 Whatman-3MM-Filterpapiere und die PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) auf die Gelgröße zugeschnitten. Die Membran wurde für 1 min in 100 % Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Die Whatman-Filterpapiere und 2 Schwämmchen wurden in Transferpuffer befeuchtet. Anschließend wurde der Blot zusammengebaut. Dabei sollten Luftblasen vermieden werden. Die Kassette wurde in die Transferkammer geschoben, so dass sich die Membran auf der Seite der Anode befand. Anschließend wurde die Kammer mit Transferpuffer und einem Kühlakku gefüllt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei konstanten 100 Volt oder über Nacht bei 30 Volt. Im Falle von gekauften Gradientengelen erfolgte der Transfer für 2,5 Stunden bei 100 Volt oder ebenfalls über Nacht.

Nach erfolgreichem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS-T für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Der Blot wurde kurz in PBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit Primärantikörper unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBS-T wurde der Sekundärantikörper für 30 min hinzugegeben. Nach erneutem Waschen (2x 5 min mit PBS-T, 1x 5 min mit PBS) wurde der Blot mit Hilfe des Li-Cor Odyssey Imaging Systems eingescannt und die Proteinbanden sichtbar gemacht.

4.3.3 Coomassie Brilliant Blau-Färbung

Zur Anfärbung von Proteinen in einem SDS-Gel wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung gelegt und in der Mikrowelle kurz erhitzt. Nach 5-10 minütiger Inkubation auf dem Schüttler wurde die Färbelösung entfernt und kurz mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel durch wiederholten Austausch der Entfärbelösung entfärbt.

4.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Hierzu wurde das Bradford-Reagenz 1:5 mit H₂O verdünnt. 2 µl - 5 µl Proteinprobe wurden mit 1 ml dieser Verdünnung versetzt, die Lösung durch Invertieren gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Anhand einer BSA-Eichgeraden konnte im Folgenden die Proteinkonzentration berechnet werden.

4.3.5 Herstellung von Golgi-like Liposomen

Zur Herstellung von Golgi-like Liposomen wurden die in der Tabelle angegebenen Lipide mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in ein Glasröhrchen mit einer Teflonkappe gegeben. Anschließend wurde das Gemisch mit Chloroform auf 4 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, so dass eine Endkonzentration von 3 mM vorlag. Der Lipidmix wurde in 2 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und mit Stickstoff verblasen. Zur Entfernung des restlichen Chloroforms wurde das geöffnete Eppendorf Gefäß mit Parafilm überzogen, Löcher hineingestochen und für 2 h in einen Exsikkator gelegt. Anschließend wurde der Lipidmix mit Argon überschichtet und bei -80 °C gelagert.

Lipid	mol %	mg/ml	Volumen (µl)
Phosphatidylserin (PS)	5	10	48
Phosphatidylcholin (PC)	43	5	811,3
Phosphatidylethanolamin (PE)	19	10	175,1

Phosphatidylinositol (PI)	10	10	109,1
Cholesterol	16	10	74,2
Sphingomyelin (SM)	7	5	122,8

Der gelagerte Lipidmix wurde in der gewünschten Menge Chloroform aufgenommen und mit 1 mol % PIP₂ und 15 nmol p23 Lipopeptid versetzt. Das Chloroform wurde wie oben beschrieben verblasen und das Eppendorf-Gefäß für 30 min in den Exsikkator gelegt. Anschließend wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge HKM Puffer (25 mM Hepes-KOH, pH 7,4, 150 mM KCl und 1 mM MgCl₂) die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Liposomen, die für UV-Crosslink Experimente verwendet wurden, wurden in HKM Puffer mit 250 mM Sucrose aufgenommen. Das Gemisch wurde gut gevortext, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37 °C im Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Einfrier/Auftau Zyklus wurde insgesamt 10-mal wiederholt. Danach wurden die Liposomen aliquotiert und bei -80 °C weggefroren.

4.3.6 Expression der Volllängen photolabilen Arf1-Derivate

Für die Expression der photolabilen Arf1-Derivate wurden zunächst kompetente BL21 (DE3) *E.coli* Bakterien, welche schon das pEVOL Plasmid enthielten, mit jeweils 50 ng pET-Duet1-yNMT-photolabiles hArf1 und pRSF-Duet1-MetAp kotransformiert, auf Agarplatten mit 15 µg/ml Kanamycin, 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie in 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Anschließend wurden 50 ml der Übernachtskultur in einem Liter LB-Medium ebenfalls mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 weiter kultiviert. Nach Zugabe von 65,5 µM Natrium-Myristat und 1 mM Bp wurde die Temperatur auf 27 °C heruntergeregelt und nach 1 h die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG und 0,5 % Arabinose induziert. Nach 22 h wurde die Bakterienkultur

zentrifugiert (20 min, 3500 x g, 4 °C), mit PBS gewaschen, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet im Wasserbad aufgetaut, in 10 ml Lysepuffer (25 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM KCl, 2mM GDP und Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim) resuspendiert und bei einem Druck von 12000 psi mit einem Microfluidizer aufgeschlossen. Anschließend wurde die Zellsuspension für 1 h bei 100000 x g zentrifugiert. Das Zelllysate wurde aliquotiert und bei -80 °C weggefroren.

4.3.7 Aufreinigung der Vollängen photolabilen Arf1-Derivate

Zur Aufreinigung und Anreicherung der photolabilen Arf1-Derivate wurde eine Gelfiltration an der Ettan LC Anlage durchgeführt. Hierzu wurden 5 ml des Zelllysates bei 100000 x g für 15 min abzentrifugiert und auf eine zuvor äquilibrierte Superdex 200 26/60 Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen. Anschließend wurde das Gelfiltrationsprogramm gestartet. Der Puffer (25 mM Tris pH 7,0 und 150 mM KCl) wurde bei einer Flussrate von 2 ml/min und einem Drucklimit von 145 psi auf die Säule gegeben. Es wurden jeweils 3 ml Fraktionen über ein Gesamtvolumen von 250 ml gesammelt. Zur Analyse wurden jeweils 10 µl der jeweiligen Fraktionen auf ein Coomassie-Gel aufgetragen. Die Fraktionen, welche möglichst viel reines Arf1 enthielten, wurden gepoolt und aufkonzentriert. Hierzu wurde ein 6 ml Konzentrator (Vivaspin, MWCO 10 kDa) verwendet. Das Endvolumen betrug 300-600 µl. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

4.3.8 Photocrosslink mit Vollängen Arf1-Derivaten

Zur Untersuchung der Interaktion von Arf1 mit dem Coatomer-Komplex wurden je nach Konzentration 20 µl-60 µl Arf1-Lysat oder 5 µg aufgereinigtes Arf1-Derivat mit 50 µg isolierten Golgi-Membranen in Gegenwart von 200 mM Sucrose entweder mit oder ohne 100 µM GTPγS in einem Gesamtvolumen von 100 µl in Reaktionspuffer (25 mM Hepes-KOH pH 7,2 und 2,5 mM MgAc) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 16 µg Coatomer wurden die Reaktionsansätze für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen durch 330 µl 15 % (w/w) Sucrose in Reaktionspuffer bei 16000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der

Überstand wurde entfernt und das Pellet in 20 µl Reaktionspuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde geteilt und eine Hälfte für 20-40 min bei UV₃₆₆ auf Eis bestrahlt. Die Proben wurden in einem Abstand von 12 cm zur Lampe positioniert. Anschließend wurde 4 x SDS-Probenpuffer zu den Reaktionsansätzen gegeben und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Wurden Liposomen anstelle von Golgi-Membranen verwendet, so wurden 500 µM Liposomen zusammen mit den oben angegebenen Mengen Arf1-Derivat, 0,4 µg ARNO und 100 µM GTPγS in einem Endvolumen von 100 µl in HKM Puffer für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von Coatomer und erneuter 10 minütiger Inkubation wurden die Membranen bei 16000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 µl HKM Puffer (Zusammensetzung s. 2.3.5) resuspendiert und für 20-40 min auf Eis mit UV₃₆₆ bestrahlt. Im Gegensatz zu den Golgi-Membranen konnte der Ansatz nicht geteilt werden, da ansonsten die Crosslinkeffizienz zu gering war.

4.3.9 Expression der photolabilen NΔ17Arf1-Derivate

Zur Expression der photolabilen NΔ17Arf1-Derivate wurden jeweils 50 ng der Plasmide pETM11-photolabiles NΔ17Arf1 und pEVOL in kompetente BL21 (DE3) Bakterien transformiert und auf Agarplatten mit 30 µg/ml Kanamycin und 50 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde eine Kolonie in 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht inkubiert. Im Folgenden wurden 50 ml der Übernachtskultur in einem Liter LB-Medium + Antibiotika angeimpft und bei 37 °C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurde 1 mM Bp hinzugegeben und die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG und 0,5 % Arabinose induziert. Nach 5 h bei 37 °C wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (20 min, 3500 x g, 4 °C), das Pellet mit PBS gewaschen und anschließend bei -80 °C weggefroren.

4.3.10 Aufreinigung der photolabilen NΔ17Arf1-Derivate

Die photolabilen NΔ17Arf1-Derivate wurden über einen His-tag aufgereinigt. Hierzu wurde das Zellpellet im Wasserbad aufgetaut und in 10 ml Lysepuffer resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte unter Druck bei 12000 psi im Microfluidizer. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 1 h bei 100000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 0,5 ml Nickel Sepharose High Performance Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) gegeben und für 2 h auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden zuvor zweimal mit Waschpuffer und einmal mit Lysepuffer äquilibriert. Hierbei wurden die Beads durch Zentrifugation (5 min, 1500 x g, 4 °C) sedimentiert. Nach der Bindung an die Beads wurden diese abzentrifugiert und zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Im dritten Waschschrift wurde die Suspension in eine leere Säule (Biorad, München) gegeben und gewartet, bis sich die Beads abgesetzt haben. Die Elution erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer in 4 Fraktionen zu je 500 µl. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford bestimmt und die jeweiligen Fraktionen gepoolt. Das überschüssige Imidazol wurde im Anschluss durch eine PD-10 Säule (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) nach Herstellerangaben entfernt.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	50 mM Hepes-KOH pH 7,4 300 mM KCl 30 mM Imidazol 1 mM DTT Protease Inhibitorcocktail
Waschpuffer	50 mM Hepes-KOH pH 7,4 50 mM KCl 30 mM Imidazol 1 mM DTT
Elutionspuffer	50 mM Hepes-KOH pH 7,4 300 mM KCl 250 mM Imidazol
PD-10 Puffer	20 mM Hepes-KOH pH 7,4 150 mM KCl 2 mM MgCl ₂

4.3.11 Photocrosslink mit NΔ17Arf1-Derivaten

Der Photocrosslink mit photolabilen NΔ17Arf1-Derivaten wurde in Lösung durchgeführt. Hierzu wurden 1,25 µg Arf1 zusammen mit 12 µg Coatomer in einem Gesamtvolumen von 20 µl in HKM Puffer für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz geteilt und eine Hälfte für 20 min mit UV₃₆₆ auf Eis bestrahlt. Im Anschluss wurden die Proben mit 4x Probenpuffer versehen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4.3.12 Expression und Aufreinigung von humanem Arf1 und

Chaetomium Arf1

Für die Expression von humanem Arf1 und Chaetomium Arf1 wurden 50 ng der jeweiligen Plasmide pMON5840 zusammen mit 50 ng des Plasmids pHV738 in BL21 (DE3) *E.coli* Bakterien kotransformiert und auf einer Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Eine Kolonie wurde anschließend in 200 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 ml der Vorkultur in 2 Liter LB-Medium + Antibiotika überführt. Die Kultur wurde bis OD₆₀₀ = 0,6 bei 37 °C kultiviert und anschließend wurden 42 mg Natrium-Myristat, gelöst in 18 % fettsäurefreiem BSA, hinzugegeben. Nach 10 Minuten wurde die Expression der N-Myristoyltransferase durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Temperatur auf 27 °C heruntergeschaltet. Nach einer Stunde wurde durch Zugabe von 30 µg/ml Nalidixinsäure (gelöst in 300 mM NaOH) die Expression von Arf1 induziert. Nach weiteren 4 h Inkubation wurde die Bakterienkultur bei 4000 rpm für 20 min zentrifugiert, das Pellet mit PBS gewaschen und anschließend bei -80 °C weggefroren.

Zur Aufreinigung wurde das Zellpellet im Wasserbad aufgetaut und in 20 ml Lysepuffer (25 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM KCl, 2mM GDP und Proteaseinhibitor-Cocktail) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte bei 12000 psi in einem Microfluidizer. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 100000 x g für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Becherglas in einem Eisbad überführt und innerhalb von 45 min wurde unter Rühren durch langsame Zugabe von frisch gemörsertem Ammoniumsulfat eine Konzentration von 35 % Ammoniumsulfat

eingestellt. Nach weiteren 45 min Rühren wurde die Lösung bei 8000 x g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen Gelfiltrationspuffer (25 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM KCl) aufgenommen und auf eine zuvor äquilibrierte Superdex 200 26/60 Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen. Anschließend wurde das Gelfiltrationsprogramm gestartet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden bereits in Abschnitt 4.3.7 beschrieben.

4.3.13 Membranbindungsstudien an Liposomen

Zur Untersuchung der Bindung von Arf1-Proteinen an Liposomen wurde jeweils 5 µg Arf1 zusammen mit 500 µM Liposomen, 2 mM EDTA entweder mit oder ohne 1 mM GTP in HKM Puffer für 15 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 200 µl. Anschließend wurden 4 mM MgCl₂ hinzugegeben und 8 µl (= 4 %) Input abgenommen. Der Rest des Ansatzes wurde durch Zugabe von ca. 150 µl 75 % (w/w) Sucrose in HKM auf 30 % Sucrose eingestellt. Die Mischung wurde in ein SW60 Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 200 µl 25 % (w/w) Sucrose in HKM und danach mit 50 µl HKM Puffer überschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 100000 x g und 4 °C für 1 h wurde 100 µl der oberen Fraktion abgenommen. 10 % hiervon wurden zusammen mit 2 % des Inputs mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

4.3.14 COPI-Vesikelpräparation

Zur Herstellung von COPI-Vesikeln *in vitro* wurden jeweils 5 µg Arf1 zusammen mit 126 µg Golgi-Membranen, 50 µg Coatomer, 240 µM DTT, 20 mM KCl, 200 mM Sucrose und 1,2 mM GTP in Reaktionspuffer (25 mM Hepes-KOH pH 7,2 und 2,5 mM MgAc) in einem Volumen von 250 µl angesetzt. Der gesamte Ansatz wurde für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Input (= 10 %) abgenommen und die Salzkonzentration durch Zugabe von 19,2 µl 3 M KCl auf 250 mM erhöht. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (7 min, 160000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend in ein SW60 Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 50 µl 37,5 % (w/w) Sucrose in Reaktionspuffer und 5 µl 50 % (w/w) Sucrose in Reaktionspuffer unterschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 100000 x g für 50 min wurde in der Interphase zwischen 50 % und

37,5 % 16 µl der Vesikelfraktion gezapft. Zur Analyse wurden hiervon 50 % zusammen mit 1 % des Inputs auf ein SDS Gel geladen und anschließend mittels Western Blot detektiert.

4.3.15 Static light scattering

Die Arf1-abhängige Rekrutierung von Coatomer und die GTP-Hydrolyse wurden mittels *static light scattering* analysiert. Hierzu wurden zunächst in einem Endvolumen von 600 µl HKM Puffer 100 µM Liposomen (400 nm groß) in einer Quarzküvette in einem Spektralfluorimeter bei 300 rpm auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde 1 µM Arf1 hinzugegeben. Nach 60 s erfolgte die Zugabe von 200 nM Coatomer und nach weiteren 60 s 200 µM GTP. Durch die Zugabe von 2 mM EDTA nach 60 s wurde der Austausch von GDP zu GTP gewährleistet, was in einem Anstieg der Fluoreszenz zu sehen war. Nach 600 s wurde durch Zugabe von 4 mM MgCl₂ der GTP-gebundene Zustand stabilisiert. Die GTP-Hydrolyse wurde durch Zugabe von 50 nM ArfGAP2 gestartet, was ein abnehmen der Fluoreszenz zur Folge hatte. Zur Vereinfachung wurde bei der Auswertung die Fluoreszenz vor Zugabe von EDTA auf 0 AU (*arbitrary units*) gesetzt.

4.3.16 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Coatomer

Zur Expression von Strep-getaggttem rekombinantem Coatomer wurden 500 ml SF9-Zellen mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit 4 ml Virus infiziert und für 72 h bei 27 °C und 220 rpm inkubiert. Die Expressionseffizienz wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Hierzu wurde 1 ml Zellsuspension abgenommen und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 150 µl H₂O und 50 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zur Analyse wurden 3 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen. Bei erfolgreicher Expression wurde die gesamte Zellsuspension abzentrifugiert, das erhaltene Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Aus 500 ml Zellen resultierten jeweils 2 Pellets. Zur Aufreinigung wurde das Zellpellet im Wasserbad aufgetaut und in 20 ml Gelfiltrationspuffer (25 mM Hepes KOH pH 7.4, 10% Glycerol, 200 mM KCl, 1 mM DTT) mit Proteaseinhibitor-Cocktail resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte unter Druck in einem Microfluidizer. Nach einstündiger Zentrifugation bei 100000 x g

und 4 °C wurde das Lysat zu 1 ml mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierten Strep-Tactin® Sepharose® Beads (IBA, Göttingen) gegeben und für 1,5 bis 2 h auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 1500 x g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und neuer Gelfiltrationspuffer hinzugegeben. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurde die Suspension in eine leere Säule (Biorad, München) gegeben und gewartet bis sich die Beads auf dem Boden abgesetzt haben. Die Elution des Coatomer-Komplexes erfolgte in insgesamt 8 Fraktionen mit je 500 µl Elutionspuffer (Gelfiltrationspuffer + 2,5 mM Desthiobiotin). Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford bestimmt und die jeweiligen Fraktionen gepoolt. Zum Ansetzen von Coatomer-Mix wurden die Isoformen im Verhältnis 50 % ($\gamma 1\zeta 1$), 30 % ($\gamma 2\zeta 1$) und 20 % ($\gamma 1\zeta 2$) gemischt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.3.17 Isolation von Golgi-Membranen aus Rattenleber

Für die Isolation von Golgi-Membranen aus Rattenleber wurden insgesamt 10 Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 200 g getötet und ausgeblutet. Die Lebern wurden vorsichtig entnommen und mit Homogenisationspuffer gewaschen. Nach dem Wiegen der Lebern wurden diese in kleinere Stücke geschnitten und noch zweimal mit Homogenisationspuffer gewaschen. Anschließend wurden 3 Volumen Homogenisationspuffer hinzugegeben und 3 x für 20 sec mittels Ultraturrax homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand im Anschluss vorsichtig durch drei Lagen Verbandsmull gefiltert. Im Folgenden wurden jeweils 20 ml 1,25 M Sucrose mit 1/10 des Überstandes in einem SW32 Röhrchen überschichtet und bei 80000 x g für 1,5 h und 4 °C zentrifugiert. Die Lipidschicht wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Interphase mit einer Plastik-Pasteurpipette gezapft. Mittels Refraktometer wurde anschließend der Brechungsindex gemessen und die Sucrosekonzentration auf 1,215 M erhöht. In einem zweiten Gradienten wurde 1/10 der Interphase mit jeweils 10 ml 1,1 M Sucrose, 1 M Sucrose und 0,5 M Sucrose überschichtet. Nach 2,5 h Zentrifugation bei 80000 x g und 4 °C wurde die Golgi-Fraktion gezapft. Zum Ankonzentrieren wurde die Sucrosekonzentration auf 250 mM eingestellt und in einem SW32 Röhrchen mit 1,5 ml 50 % Sucrose unterschichtet. Nach einer

einstündigen Zentrifugation wurde die Interphase gezapft und der Golgi vorsichtig mit einer Plastik-Pasteurpipette homogenisiert. Als letztes erfolgte ein Salzwaschschritt um die noch an den Golgi gebunden Proteine zu entfernen. Hierzu wurde durch Zugabe von 3 M KCl und Reaktionspuffer die KCl-Konzentration auf 500 mM erhöht, so dass das Endvolumen das Zweifache des Golgi-Volumens betrug. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis durch leichtes Hin- und Herschütteln wurde die Golgi-Lösung in ein SW32 Röhrchen pipettiert und mit 5 ml 17 %, 2 ml 23 % und 1 ml 50 % Sucroslösung unterschichtet. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei 80000 x g und 4 °C konnte die Golgi-Fraktion gezapft werden. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford bestimmt und der Brechungsindex mittels Refraktometer ermittelt. Die isolierten Golgi-Membranen wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Puffer	Zusammensetzung
Homogenisationspuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4 0,5 M Sucrose 5 mM DTT 5 mM EDTA Protease Inhibitorcocktail
Reaktionspuffer	25 mM Hepes-KOH pH 7,2 2,5 mM MgAc
Sucroslösungen für Gradienten	In 10 mM Tris-HCl pH 7,4
17 %, 23 % und 50 % (w/w) Sucroslösung	in Reaktionspuffer

4.4 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proben auf ein SDS-Gel geladen und über Nacht mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung (Roti®-Blue, Roth) angefärbt. Die weitere Durchführung erfolgte durch Jürgen Reichert von der Arbeitsgruppe Lechner und in der Facility für Massenspektrometrie am Zentrum für Molekularbiologie der Universität Heidelberg unter Leitung von Dr. Thomas Ruppert.

4.5 Elektronenmikroskopische Methoden

4.5.1 Negativkontrastierung

COPI-Vesikel wurden mittels Negativkontrastierung elektronenmikroskopisch untersucht. Hierzu wurden wie in 4.3.14 beschrieben COPI-Vesikel generiert. Die weitere Durchführung übernahm Andrea Hellwig aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hilmar Bading (Interdisziplinäres Zentrum für Neurowissenschaften, Uni Heidelberg).

4.5.2 Epon-Einbettung

Zur Untersuchung von gesamten Reaktionsansätzen und nicht nur frei isolierter COPI-Vesikel wurden Epon-Einbettungen durchgeführt. Hierzu wurden 500 μM Liposomen zusammen mit 5 μg Arf1, 16 μg Coatomer, 0,4 μg ARNO und 100 μM GTP γ S in einem Gesamtvolumen von 100 μl in HKM Puffer für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 800 μl 2 % Glutaraldehyd (in HKM Puffer verdünnt) hinzugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Membranen wurden bei 100000 x g für 1 h pelletiert. Die weitere Durchführung wurde von Andrea Hellwig übernommen.

5. Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

Adolf, F., Herrmann, A., Hellwig, A., Beck, R., Brugger, B. and Wieland, F. T. (2013). Scission of COPI and COPII vesicles is independent of GTP hydrolysis. *Traffic* **14**, 922-32.

Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U. and Ungewickell, E. (1988). Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J* **7**, 919-29.

Amlacher, S., Sarges, P., Flemming, D., van Noort, V., Kunze, R., Devos, D. P., Arumugam, M., Bork, P. and Hurt, E. (2011). Insight into structure and assembly of the nuclear pore complex by utilizing the genome of a eukaryotic thermophile. *Cell* **146**, 277-89.

Amor, J. C., Harrison, D. H., Kahn, R. A. and Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* **372**, 704-8.

Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. and Chabre, M. (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.

Antonny, B., Bigay, J., Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B. and Gounon, P. (2005). Membrane curvature and the control of GTP hydrolysis in Arf1 during COPI vesicle formation. *Biochem Soc Trans* **33**, 619-22.

Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C. and Balch, W. E. (1998). Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol* **141**, 61-70.

Baker, D., Hicke, L., Rexach, M., Schleyer, M. and Schekman, R. (1988). Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport. *Cell* **54**, 335-44.

Bannykh, S. I., Rowe, T. and Balch, W. E. (1996). The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol* **135**, 19-35.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.

Barlowe, C. and Schekman, R. (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. and Wieland, F. T. (2009). ArfGAP1 activity and COPI vesicle biogenesis. *Traffic* **10**, 307-15.

- Beck, R., Prinz, S., Diestelkotter-Bachert, P., Rohling, S., Adolf, F., Hoehner, K., Welsch, S., Ronchi, P., Brugger, B., Briggs, J. A. and Wieland, F.** (2011). Coatomer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *J Cell Biol* **194**, 765-77.
- Beck, R., Sun, Z., Adolf, F., Rutz, C., Bassler, J., Wild, K., Sinning, I., Hurt, E., Brugger, B., Bethune, J. and Wieland, F.** (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., Robineau, S., Chardin, P., Paris, S., Chabre, M., Cherfils, J. and Antony, B.** (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., Kol, M., Hoffmann, J., Reckmann, I., Brugger, B. and Wieland, F.** (2006). Coatomer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Mol Cell Biol* **26**, 8011-21.
- Bi, X., Mancias, J. D. and Goldberg, J.** (2007). Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Dev Cell* **13**, 635-45.
- Bigay, J., Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B. and Antony, B.** (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J* **24**, 2244-53.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S. and Antony, B.** (2003). Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**, 563-6.
- Blobel, G. and Dobberstein, B.** (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 Dobberstein, B.** (1975b). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**, 852-62.
- Boehm, M., Aguilar, R. C. and Bonifacino, J. S.** (2001). Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *EMBO J* **20**, 6265-76.
- Braakman, I. and Bulleid, N. J.** (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **80**, 71-99.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Budnik, A. and Stephens, D. J.** (2009). ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS Lett* **583**, 3796-803.

Caro, L. G. and Palade, G. E. (1964). Protein Synthesis, Storage, and Discharge in the Pancreatic Exocrine Cell. An Autoradiographic Study. *J Cell Biol* **20**, 473-95.

Casanova, J. E. (2007). Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* **8**, 1476-85.

Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L. and Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**, 481-4.

Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. and Zerial, M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317-29.

Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Antonny, B. and Chardin, P. (1998). Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature* **392**, 101-5.

Chin, J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. and Schultz, P. G. (2002). Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of Escherichiacoli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11020-4.

Chirico, W. J., Waters, M. G. and Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**, 805-10.

Ciufo, L. F. and Boyd, A. (2000). Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway. *J Biol Chem* **275**, 8382-8.

Claude, A., Zhao, B. P., Kuziemy, C. E., Dahan, S., Berger, S. J., Yan, J. P., Arnold, A. D., Sullivan, E. M. and Melancon, P. (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.

Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R. and Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **109**, 523-35.

Connolly, T., Rapiejko, P. J. and Gilmore, R. (1991). Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* **252**, 1171-3.

Contreras, I., Ortiz-Zapater, E. and Aniento, F. (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., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R. and Letourneur, F. (1996). Delta- and zeta-COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *EMBO J* **15**, 1792-8.

Cosson, P. and Letourneur, F. (1994). Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629-31.

Crowther, R. A. and Pearse, B. M. (1981). Assembly and packing of clathrin into coats. *J Cell Biol* **91**, 790-7.

Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M. and Cassel, D. (1995). The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* **270**, 1999-2002.

D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347-58.

Dascher, C. and Balch, W. E. (1994). Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **269**, 1437-48.

Dell'Angelica, E. C., Mullins, C. and Bonifacino, J. S. (1999). AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* **274**, 7278-85.

Dell'Angelica, E. C., Ohno, H., Ooi, C. E., Rabinovich, E., Roche, K. W. and Bonifacino, J. S. (1997). AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J* **16**, 917-28.

Deshai, R. J. and Schekman, R. (1989). SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**, 2653-64.

Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J. P., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J. and Nilsson, T. (1998). gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatamer. *J Cell Biol* **140**, 751-65.

Donaldson, J. G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* **278**, 41573-6.

Donaldson, J. G., Cassel, D., Kahn, R. A. and Klausner, R. D. (1992a). ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6408-12.

Donaldson, J. G., Finazzi, D. and Klausner, R. D. (1992b). Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**, 350-2.

Donaldson, J. G. and Honda, A. (2005). Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem Soc Trans* **33**, 639-42.

Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P. and Kreis, T. E. (1991). Beta-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell* **64**, 649-65.

- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. and Duden, R.** (2000). COP I domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J* **19**, 3905-17.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. and Duden, R.** (2004). The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell* **15**, 1011-23.
- Faini, M., Prinz, S., Beck, R., Schorb, M., Riches, J. D., Bacia, K., Brugger, B., Wieland, F. T. and Briggs, J. A.** (2012a). The structures of COPI-coated vesicles reveal alternate coatomer conformations and interactions. *Science* **336**, 1451-4.
- Faini, M., Prinz, S., Beck, R., Schorb, M., Riches, J. D., Bacia, K., Brugger, B., Wieland, F. T. and Briggs, J. A.** (2012b). The Structures of COPI-Coated Vesicles Reveal Alternate Coatomer Conformations and Interactions. *Science*.
- Favaloro, V., Spasic, M., Schwappach, B. and Dobberstein, B.** (2008). Distinct targeting pathways for the membrane insertion of tail-anchored (TA) proteins. *J Cell Sci* **121**, 1832-40.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. and Paris, S.** (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.
- Frigerio, G., Grimsey, N., Dale, M., Majoul, I. and Duden, R.** (2007). Two human ARFGAPs associated with COP-I-coated vesicles. *Traffic* **8**, 1644-55.
- Futatsumori, M., Kasai, K., Takatsu, H., Shin, H. W. and Nakayama, K.** (2000). Identification and characterization of novel isoforms of COP I subunits. *J Biochem* **128**, 793-801.
- Gierasch, L. M.** (1989). Signal sequences. *Biochemistry* **28**, 923-30.
- Gilmore, R., Blobel, G. and Walter, P.** (1982a). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* **95**, 463-9.
- Gilmore, R., Walter, P. and Blobel, G.** (1982b). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* **95**, 470-7.
- Goldberg, J.** (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-48.
- Gommel, D. U., Memon, A. R., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner, J., Reinhard, C., Helms, J. B., Nickel, W. and Wieland, F. T.** (2001). Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J* **20**, 6751-60.
- Ha, V. L., Thomas, G. M., Stauffer, S. and Randazzo, P. A.** (2005). Preparation of myristoylated Arf1 and Arf6. *Methods Enzymol* **404**, 164-74.

- Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F. T. and Rothman, J. E.** (1994). En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J Cell Biol* **124**, 883-92.
- Harroun, T. A., Bradshaw, J. P., Balali-Mood, K. and Katsaras, J.** (2005). A structural study of the myristoylated N-terminus of ARF1. *Biochim Biophys Acta* **1668**, 138-44.
- Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehangel, S., Tschochner, H. and Wieland, F.** (1996). Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1902-6.
- Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H. and Appenzeller, C.** (2000). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci* **113 (Pt 4)**, 587-96.
- Helms, J. B., Palmer, D. J. and Rothman, J. E.** (1993). Two distinct populations of ARF bound to Golgi membranes. *J Cell Biol* **121**, 751-60.
- Hicke, L., Yoshihisa, T. and Schekman, R.** (1992). Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **3**, 667-76.
- Honda, A., Al-Awar, O. S., Hay, J. C. and Donaldson, J. G.** (2005). Targeting of Arf-1 to the early Golgi by membrin, an ER-Golgi SNARE. *J Cell Biol* **168**, 1039-51.
- Hsia, K. C. and Hoelz, A.** (2010). Crystal structure of alpha-COP in complex with epsilon-COP provides insight into the architecture of the COPI vesicular coat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11271-6.
- Hughes, H. and Stephens, D. J.** (2008). Assembly, organization, and function of the COPII coat. *Histochem Cell Biol* **129**, 129-51.
- Jackson, L. P., Kelly, B. T., McCoy, A. J., Gaffry, T., James, L. C., Collins, B. M., Honing, S., Evans, P. R. and Owen, D. J.** (2010). A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* **141**, 1220-9.
- Jackson, L. P., Kummel, D., Reinisch, K. M. and Owen, D. J.** (2012). Structures and mechanisms of vesicle coat components and multisubunit tethering complexes. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 475-83.
- Jamieson, J. D. and Palade, G. E.** (1966). Role of the Golgi complex in the intracellular transport of secretory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 424-31.
- Kahn, R. A. and Gilman, A. G.** (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem* **261**, 7906-11.

- Kanaseki, T. and Kadota, K.** (1969). The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J Cell Biol* **42**, 202-20.
- Keen, J. H., Chestnut, M. H. and Beck, K. A.** (1987). The clathrin coat assembly polypeptide complex. Autophosphorylation and assembly activities. *J Biol Chem* **262**, 3864-71.
- Kirchhausen, T.** (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 705-32.
- Kirchhausen, T.** (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**, 699-727.
- Kirchhausen, T. and Harrison, S. C.** (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell* **23**, 755-61.
- Kirchhausen, T., Harrison, S. C., Parham, P. and Brodsky, F. M.** (1983). Location and distribution of the light chains in clathrin trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2481-5.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Langer, J. D., Roth, C. M., Bethune, J., Stoops, E. H., Brugger, B., Herten, D. P. and Wieland, F. T.** (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.
- Lee, C. and Goldberg, J.** (2010). Structure of coatamer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell* **142**, 123-32.
- Lee, M. C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M. and Schekman, R.** (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* **122**, 605-17.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H. and Cosson, P.** (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199-207.
- Levy, R. J., Alferiev, I. and Stachelek, S. J.** (2012). Photo-activated attachment of cholesterol to polyurethane surfaces for adhesion of endothelial cells: Google Patents.
- Liu, Y., Kahn, R. A. and Prestegard, J. H.** (2010). Dynamic structure of membrane-anchored Arf*GTP. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 876-81.
- Lowe, M. and Kreis, T. E.** (1995). In vitro assembly and disassembly of coatamer. *J Biol Chem* **270**, 31364-71.

- Majoul, I., Sohn, K., Wieland, F. T., Pepperkok, R., Pizza, M., Hillemann, J. and Soling, H. D.** (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., Straub, M., Hell, S. W., Duden, R. and Soling, H. D.** (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell* **1**, 139-53.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J. C. and Rothman, J. E.** (1989). Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell* **58**, 329-36.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R. and Yeung, T.** (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**, 263-75.
- McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T. H. and Rothman, J. E.** (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**, 153-9.
- Miller, J. D. and Walter, P.** (1993). A GTPase cycle in initiation of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Ciba Found Symp* **176**, 147-59; discussion 159-63.
- Moelleken, J., Malsam, J., Betts, M. J., Movafeghi, A., Reckmann, I., Meissner, I., Hellwig, A., Russell, R. B., Sollner, T., Brugger, B. and Wieland, F. T.** (2007). Differential localization of coatamer complex isoforms within the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4425-30.
- Munro, S.** (2004). Organelle identity and the organization of membrane traffic. *Nat Cell Biol* **6**, 469-72.
- Nakano, A., Brada, D. and Schekman, R.** (1988). A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* **107**, 851-63.
- Nakano, A. and Muramatsu, M.** (1989). A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **109**, 2677-91.
- Nie, Z., Hirsch, D. S. and Randazzo, P. A.** (2003). Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 396-404.
- Niu, T. K., Pfeifer, A. C., Lippincott-Schwartz, J. and Jackson, C. L.** (2005). Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell* **16**, 1213-22.
- Novick, P., Field, C. and Schekman, R.** (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-15.

Ooi, C. E., Dell'Angelica, E. C. and Bonifacino, J. S. (1998). ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol* **142**, 391-402.

Orci, L., Stamnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H. and Rothman, J. E. (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-49.

Ostermann, J., Orci, L., Tani, K., Amherdt, M., Ravazzola, M., Elazar, Z. and Rothman, J. E. (1993). Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* **75**, 1015-25.

Owen, D. J., Collins, B. M. and Evans, P. R. (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 153-91.

Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 867.

Paleotti, O., Macia, E., Luton, F., Klein, S., Partisani, M., Chardin, P., Kirchhausen, T. and Franco, M. (2005). The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem* **280**, 21661-6.

Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. and Rapoport, T. A. (1995). Posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 31-40.

Pasqualato, S., Renault, L. and Cherfils, J. (2002). Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep* **3**, 1035-41.

Pavel, J., Harter, C. and Wieland, F. T. (1998). Reversible dissociation of coatamer: functional characterization of a beta/delta-coat protein subcomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2140-5.

Pearse, B. M. (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 1255-9.

Pettelkau, J., Ihling, C. H., Froberg, P., van Werven, L., Jahn, O. and Sinz, A. (2014). Reliable identification of cross-linked products in protein interaction studies by ¹³C-labeled p-benzoylphenylalanine. *J Am Soc Mass Spectrom* **25**, 1628-41.

Popoff, V., Adolf, F., Brugger, B. and Wieland, F. (2011). COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a005231.

Povolotskaya, I. S., Kondrashov, F. A., Ledda, A. and Vlasov, P. K. (2012). Stop codons in bacteria are not selectively equivalent. *Biol Direct* **7**, 30.

Reinhard, C., Harter, C., Bremser, M., Brugger, B., Sohn, K., Helms, J. B. and Wieland, F. (1999). Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1224-8.

Reinhard, C., Schweikert, M., Wieland, F. T. and Nickel, W. (2003). Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8253-7.

Ren, X., Farias, G. G., Canagarajah, B. J., Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H. (2013). Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. *Cell* **152**, 755-67.

Roth, T. F. and Porter, K. R. (1964). Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *J Cell Biol* **20**, 313-32.

Rothman, J. E. and Wieland, F. T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-34.

Scales, S. J., Pepperkok, R. and Kreis, T. E. (1997). Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* **90**, 1137-48.

Schuldiner, M., Collins, S. R., Thompson, N. J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J. F., Weissman, J. S. et al. (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* **123**, 507-19.

Schwanhauser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337-42.

Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A. and Rothman, J. E. (1991). ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* **67**, 239-53.

Smits, A. H., Jansen, P. W., Poser, I., Hyman, A. A. and Vermeulen, M. (2013). Stoichiometry of chromatin-associated protein complexes revealed by label-free quantitative mass spectrometry-based proteomics. *Nucleic Acids Res* **41**, e28.

Sohn, K., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Bremser, M., Lottspeich, F., Fiedler, K., Helms, J. B. and Wieland, F. T. (1996). A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol* **135**, 1239-48.

Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-24.

Spang, A., Matsuoka, K., Hamamoto, S., Schekman, R. and Orci, L. (1998). Coatomer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11199-204.

Stagg, S. M., Gurkan, C., Fowler, D. M., LaPointe, P., Foss, T. R., Potter, C. S., Carragher, B. and Balch, W. E. (2006). Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* **439**, 234-8.

- Stearns, T., Willingham, M. C., Botstein, D. and Kahn, R. A.** (1990). ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1238-42.
- Stefanovic, S. and Hegde, R. S.** (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* **128**, 1147-59.
- Strating, J. R. and Martens, G. J.** (2009). The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface. *Biol Cell* **101**, 495-509.
- Sun, Z., Anderl, F., Frohlich, K., Zhao, L., Hanke, S., Brugger, B., Wieland, F. and Bethune, J.** (2007). Multiple and stepwise interactions between coatamer and ADP-ribosylation factor-1 (Arf1)-GTP. *Traffic* **8**, 582-93.
- Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J. B. and Rothman, J. E.** (1993). Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* **123**, 1365-71.
- Traub, L. M., Ostrom, J. A. and Kornfeld, S.** (1993). Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J Cell Biol* **123**, 561-73.
- Tsuchiya, M., Price, S. R., Tsai, S. C., Moss, J. and Vaughan, M.** (1991). Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J Biol Chem* **266**, 2772-7.
- Ungewickell, E.** (1983). Biochemical and immunological studies on clathrin light chains and their binding sites on clathrin triskelions. *EMBO J* **2**, 1401-8.
- Ungewickell, E. and Branton, D.** (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature* **289**, 420-2.
- Van Valkenburgh, H. A. and Kahn, R. A.** (2002). Coexpression of proteins with methionine aminopeptidase and/or N-myristoyltransferase in *Escherichia coli* to increase acylation and homogeneity of protein preparations. *Methods Enzymol* **344**, 186-93.
- Walter, P. and Blobel, G.** (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 Blobel, G.** (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., Ibrahimi, I. and Blobel, G.** (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.

- Waters, M. G., Serafini, T. and Rothman, J. E.** (1991). 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**, 248-51.
- Wegmann, D., Hess, P., Baier, C., Wieland, F. T. and Reinhard, C.** (2004). Novel isotypic gamma/zeta subunits reveal three coatomer complexes in mammals. *Mol Cell Biol* **24**, 1070-80.
- Weimer, C., Beck, R., Eckert, P., Reckmann, I., Moelleken, J., Brugger, B. and Wieland, F.** (2008). Differential roles of ArfGAP1, ArfGAP2, and ArfGAP3 in COPI trafficking. *J Cell Biol* **183**, 725-35.
- Wittinghofer, A. and Vetter, I. R.** (2011). Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu Rev Biochem* **80**, 943-71.
- Yip, C. K. and Walz, T.** (2011). Molecular structure and flexibility of the yeast coatomer as revealed by electron microscopy. *J Mol Biol* **408**, 825-31.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C. and Schekman, R.** (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* **259**, 1466-8.
- Young, T. S., Ahmad, I., Yin, J. A. and Schultz, P. G.** (2010). An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in *E. coli*. *J Mol Biol* **395**, 361-74.
- Yu, X., Breitman, M. and Goldberg, J.** (2012). A structure-based mechanism for Arf1-dependent recruitment of coatomer to membranes. *Cell* **148**, 530-42.
- Zhao, L., Helms, J. B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J. and Wieland, F. T.** (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., Helms, J. B., Brunner, J. and Wieland, F. T.** (1999). GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatomer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *J Biol Chem* **274**, 14198-203.
- Zhao, X., Lasell, T. K. and Melancon, P.** (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.

5.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALPS	<i>ArfGAP1 Lipid Packing Sensor</i>
AP	Adaptor-Proteinkomplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
Arl	<i>Arf-like</i>
ARNO	<i>Arf nucleotide binding site opener</i>
Arp	Arf-related proteins
AU	<i>arbitrary unit</i>
BFA	Brefeldin A
Bp	p-Benzoyl-L-phenylalanin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celcius
CCV	<i>clathrin coated Vesikel</i>
CGN	<i>cis-Golgi-Netzwerk</i>
Cht	Chaetomium
Coatomer	<i>coat protoamer</i>
COP	<i>coat protein complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Ribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
ERES	<i>ER exit sites</i>
ERGIC	ER-Golgi-intermediäres Kompartiment
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor
Get	<i>guided entry of tail anchored proteins</i>

GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-[γ -thio]-triphosphat
GOLD	<i>golgi dynamics</i>
GPI	Gykosylphosphatidylinositol
h	Stunde, human
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
I	Input
iBAQ	<i>intensity-based absolute quantification</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiol-galactosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LC	<i>Liquid chromatographie</i> , Flüssigchromatographie
min	Minute
mol	Stoffmenge
Mr	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
NMT	N-Myristoyl-Transferase
Ni ²⁺	Nickel
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIPs	Phosphatidylinositol-Phospholipide
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PS	Phosphatidylserin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sar	<i>secretion associated Ras related</i>
SR	SRP Rezeptor

SRP	<i>signal recognition particle</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Sphingomyelin
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptors</i>
SW	switch
T	Topfraktion
TA	<i>Tail-anchored</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
tER	transitional ER
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	Ultraviolett
V	Vesikelfraktion
wt	Wildtyp
w/w	Gewichts-Verhältnis
y	Hefe

Aminosäuren:

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

5.3 Publikationsverzeichnis

Eckert, E. S., Reckmann, I., Hellwig, A., Röhling, S., El-Battari, A., Wieland, F. T. and Popoff, V. (2014). Golgi Phosphoprotein 3 Triggers Signal-mediated Incorporation of Glycosyltransferases into Coatomer-coated (COPI) Vesicles. *J Biol Chem*.

Beck, R., Prinz, S., Diestelkotter-Bachert, P., Röhling, S., Adolf, F., Hoehner, K., Welsch, S., Ronchi, P., Brugger, B., Briggs, J. A. and Wieland, F. (2011). Coatomer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *J Cell Biol* 194, 765-77.

Brenner, D., Brechmann, M., Röhling, S., Tapernoux, M., Mock, T., Winter, D., Lehmann, W. D., Kiefer, F., Thome, M., Krammer, P. H. and Arnold, R. (2009). Phosphorylation of CARMA1 by HPK1 is critical for NF-kappaB activation in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14508-13.

5.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Felix Wieland dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchzuführen. Ich danke ihm für die interessante Fragestellung und seine wissenschaftlichen Anregungen.

Prof. Dr. Britta Brügger und Dr. Petra Diestelkötter-Bachert danke ich für ihre Unterstützung während dieser Arbeit, ihre Hilfsbereitschaft und ihr offenes Ohr auch für persönliche Belange. Bei Prof. Dr. Thomas Söllner möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und des TAC Komitees bedanken. Ebenso danke ich Prof. Dr. Michael Brunner und Prof. Dr. Britta Brügger für die Übernahme des TAC Komitees.

Vielen Dank geht auch an Dr. Klemens Wild für die Unterstützung bei den Proteinstrukturen, an Dr. Bernd Heßling und Jürgen Reichert für die Hilfe bei der Massenspektrometrie und an Andrea Hellwig für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Großer Dank geht an Inge Reckmann für ihre technische Unterstützung vor allem gegen Ende dieser Arbeit. Frau Ingrid Meißner danke ich ebenfalls recht herzlich für ihre stets hilfsbereite und freundliche Unterstützung im Labor.

Bei allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Wieland bedanke ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre, ihre stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden „Veranstaltungen“ außerhalb des Labors, wie beispielsweise unsere grandiosen Ski-Trips.

Großer Dank geht auch an meine Mädels Jessica Gabler, Simone Reimer, Daniela Zdzieblo und Tanja Herbstsommer. Sie waren in guten und schlechten Zeiten immer an meiner Seite. Ich bedanke mich für unsere tolle Freundschaft.

Meinem Mann Thomas danke ich für seine Unterstützung, Geduld und die aufmunternden Worte.

Zu guter Letzt möchte ich mich recht herzlich bei meinen Eltern, Ingrid und Alfred Röhling, für die moralische Unterstützung durch alle Höhen und Tiefen bedanken.