

Entwicklung eines auf nativen Membranen basierenden Untersuchungssystems für das Endoplasmatische Retikulum

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau Mona Grimmer, geb. Groß

geboren am 22.09.1988 in Soest

Gutachter

Prof. Dr. Kirsten Bacia, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Prof. Dr. Claudia Steinem, Georg-August-Universität Göttingen

Öffentlich verteidigt am 13.10.2020

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Zielstellung | 9 |
| 1. Einleitung..... | 10 |
| 1.1 Aufbau und Funktion des Endoplasmatischen Retikulums | 10 |
| 1.1.1 Aufbau und Struktur des ERs in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> | 12 |
| 1.1.2 Aufgaben des ERs | 15 |
| 1.2 Modellmembransysteme | 22 |
| 1.2.1 Lipidmonoschichten | 23 |
| 1.2.2 Lipiddoppelschichten an Trägermaterial..... | 23 |
| 1.2.3 Freistehende Lipiddoppelschichten | 24 |
| 1.3 Grundlagen zur Mikroskopie | 26 |
| 1.3.1 Einige Grundlagen der Optik | 26 |
| 1.3.2 Differentieller Interferenzkontrast..... | 27 |
| 1.3.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie..... | 29 |
| 1.3.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie..... | 32 |
| 2. Material und Methoden | 35 |
| 2.1 Material | 35 |
| 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial..... | 35 |
| 2.1.2 Chemikalien | 35 |
| 2.1.3 Lipide und Lipidfarbstoffe | 36 |
| 2.1.4 Kits | 36 |
| 2.1.5 Enzyme | 37 |
| 2.1.6 Größenstandards und Fluoreszenzfarbstoffe..... | 37 |
| 2.1.7 Verwendete Stämme und Vektoren..... | 37 |
| 2.1.8 Verwendete Antikörper | 39 |
| 2.1.9 Software | 40 |
| 2.1.10 Medien und Puffer | 40 |
| 2.2 Methoden..... | 44 |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden | 44 |
| 2.2.2 Anzucht verschiedener Organismen zur Plasmid- und Proteinproduktion..... | 50 |
| 2.2.3 Proteinreinigungen..... | 51 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 2.2.4 | Lyticase-Aktivitätstest | 54 |
| 2.2.5 | Fluoreszenzmarkierung der Hefezellwand | 54 |
| 2.2.6 | Untersuchung des Zellwandverdaus mit Chitinase und Lyticase | 55 |
| 2.2.7 | Präparation von ER-Membranen..... | 55 |
| 2.2.8 | Beurteilung der Reinigungsqualität von Proteinen und Organellmembranen | 57 |
| 2.2.9 | GTP-vermittelte Membranfusion | 61 |
| 2.2.10 | Apyrase-Verdau | 61 |
| 2.2.11 | Immunologische Fluoreszenzfärbung von <i>Giant ER Vesicles</i> (GERVs) | 61 |
| 2.2.12 | Lipidextraktion und Analytik | 62 |
| 2.2.13 | Vorbereitung des <i>Major-Minor-Mixes</i> | 62 |
| 2.2.14 | Proteinrekonstitution in Liposomen | 63 |
| 2.2.15 | Dynamische Lichtstreuung | 63 |
| 2.2.16 | Elektroformation zur Herstellung von GUVs | 63 |
| 2.2.17 | COPII-Assay..... | 64 |
| 2.2.18 | Mikroskopie..... | 64 |
| 2.2.19 | Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie | 68 |
| 3. | Ergebnisse..... | 69 |
| 3.1 | Anreicherung von ER-Membranen..... | 69 |
| 3.1.1 | Zellwandverdau zur Bildung der Sphäroplasten | 70 |
| 3.1.2 | Qualitätskontrolle der gereinigten Membranfraktionen | 74 |
| 3.1.3 | Analyse der Lipidzusammensetzung der gereinigten Mikrosomen | 83 |
| 3.2 | Bildung von großen Lipidvesikeln aus isolierten ER-Membranen..... | 84 |
| 3.2.1 | Bildung von GUVs aus extrahierten Lipiden..... | 84 |
| 3.2.2 | Bildung von GUVs aus natürlichen ER-Membranen..... | 84 |
| 3.2.3 | Optimierung der Fusionsbedingungen von ER-Membranen zu GERVs..... | 87 |
| 3.3 | Anwendungsbeispiele für das entwickelte GERV-System..... | 93 |
| 3.3.1 | Immunfluoreszenzdetektion des Translocon-Komplexes in GERVs | 93 |
| 3.3.2 | Markierung von GERV-Membranen mit fluoreszierenden Zielproteinen..... | 95 |
| 3.3.3 | Diffusion eines ER-Membranproteins in seiner natürlichen Umgebung | 101 |
| 3.3.4 | Interaktion von COPII-Proteinen mit natürlichen Membranen | 103 |
| 4. | Diskussion..... | 113 |
| 4.1 | Anreicherung von ER-Membranen..... | 113 |
| 4.1.1 | Sphäroplastenbildung durch Lyticase und Chitinase..... | 113 |
| 4.1.2 | Qualität der angereicherten ER-Membranen | 114 |
| 4.2 | ER-Membranen können zu GERVs fusioniert werden..... | 118 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 4.3 | Anwendung konfokalmikroskopischer Techniken an GERVs | 120 |
| 4.4 | COPII-vermittelte Membrandeformation | 123 |
| 5. | Zusammenfassung und Ausblick | 126 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | 130 |
| 7. | Anhang..... | 143 |
| | A1 Geräteübersicht und Materialliste..... | 143 |
| | A2 Vektorkarten | 148 |
| | A3 Fusionsversuche von ER-Membranen..... | 152 |
| | A3.1 Methoden zur Membranfusion..... | 152 |
| | A3.1.1 Elektroformation auf ITO-Gläschen | 152 |
| | A3.1.2 Elektroformation an Platindrähten | 152 |
| | A3.1.3 Quellen auf verschiedenen Medien | 152 |
| | A3.1.4 Ca ²⁺ induzierte Fusion | 153 |
| | A3.2 Ergebnisse | 153 |
| | Danksagung | 154 |
| | Lebenslauf | 156 |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | 158 |

Abkürzungsverzeichnis

Gängige Abkürzungen für Chemikalien können der **Tabelle 2.2** bzw. **Tabelle A.2** entnommen werden.

| | |
|--------------------|--|
| A | Alanin |
| Acetyl-CoA | Acetyl-CoenzymA |
| APD | Lawinenfotodiode (Englisch: <i>avalanche photodiode</i>) |
| CCD | Ladungsgekoppeltes Halbleiterelement (Englisch: <i>charge coupled device</i>) |
| CDP-DAG | Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-cytidindiphosphat |
| ddH ₂ O | doppelt entionisiertes Wasser |
| CL | Cardiolipin |
| COPI | Hüllproteinkomplex I (Englisch: <i>coat protein complex I</i>) |
| COPII | Hüllproteinkomplex II (Englisch: <i>coat protein complex II</i>) |
| CT | C-terminal |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| CytC Red | NADPH-Cytochrom-c-P450-Reduktase |
| DIC | Differentieller Interferenzkontrast (Englisch: <i>differential interference contrast</i>) |
| DLS | Dynamische Lichtstreuung |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (Englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>) |
| DOPA | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat |
| DOPC | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin |
| DOPE | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin |
| DOPS | 1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin |
| DTT | Dithiothreitol |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| | cER kortikales ER |
| | cisER zisternenartiges ER |
| | tER tubuläres ER |
| ERGIC | ER-Golgi-intermediäres Kompartiment |
| ERMES | Englisch: <i>ER-mitochondria encounter structure</i> |
| E-Syt | Englisch: <i>extended Synaptotagmin</i> |
| FCS | Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (Englisch: <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>) |
| FRAP | Fluoreszenzerholung nach Fotobleichen (Englisch: <i>fluorescence recovery after photobleaching</i>) |

| | |
|------------------|---|
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| GAP | GTPase-aktivierendes Protein |
| GERV | sehr großes Endoplasmatisches Retikulum-Vesikel (Englisch: <i>giant Endoplasmic Reticulum vesicle</i>) |
| GGT | γ -Glutamyltransferase |
| GPMV | sehr großes Plasmamembranvesikel (Englisch: <i>giant plasma membrane vesicle</i>) |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| GUV | sehr großes unilamellare Vesikel (Englisch: <i>giant unilamellar vesicle</i>) |
| HEK-Zellen | humane embryonale Nierenzellen (Englisch: <i>human embryonic kidney cells</i>) |
| HSP | Pellet, gewonnen bei hoher Zentrifugationsgeschwindigkeit (Englisch: <i>high speed pellet</i>) |
| IgG | Immunglobulin G |
| ITO | Indiumzinnoxid (Englisch: <i>indium tin oxide</i>) |
| K | Lysin |
| Kryo-TEM | Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie |
| LC-MS/MS | Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie mit zwei massenspektrometrischen Detektoren |
| LD | Lipidtropfen (Englisch: <i>lipid droplet</i>) |
| LFQ | markierungsfreie Quantifizierung (Englisch: <i>label free quantification</i>) |
| LSM | Englisch: <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop |
| LSP | Pellet, gewonnen bei niedriger Zentrifugationsgeschwindigkeit (Englisch: <i>low speed pellet</i>) |
| LUV | große unilamellare Vesikel (Englisch: <i>large unilamellar vesicles</i>) |
| m/z | Masse-zu-Ladungsverhältnis |
| MMM | <i>Major Minor Mix</i> |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (Englisch: <i>messenger RNA</i>) |
| NT | N-terminal |
| PA | Phosphatidsäure |
| PBS-T | Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (Englisch: <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PE | Phosphatidylethanolamin |
| PI | Phosphatidylinositol |
| PIP | Phosphatidylinositol-4-phosphat |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat |

| | |
|-------------|---|
| Pma1 | Plasmamembran ATPase 1 |
| PMT | Photoelektrodenvervielfacherröhren (Englisch: <i>photomultiplier tubes</i>) |
| PS | Phosphatidylserin |
| Rhodamin-PE | Englisch: <i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt)</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | <i>Spinning Disc</i> -Mikroskopie |
| SDH | Succinatdehydrogenase |
| Sey1 | Englisch: <i>synthetic enhancer protein 1</i> |
| sfGFP | super faltendes, grün fluoreszierendes Protein |
| SMA | Styrol-Maleinsäure |
| SMP | Englisch: <i>synaptotagmin like mitochondrial lipid binding protein</i> |
| SNARE | Englisch: <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor</i> |
| SRP | Englisch: <i>signal recognition particle</i> |
| STED | Englisch: <i>stimulated emission depletion</i> |
| SUV | kleine unilamellare Vesikel (Englisch: <i>small unilamellar vesicles</i>) |
| TAG | Triacylglycerin |
| TCB | Thrombin-Spaltpuffer (Englisch: <i>Thrombin cleavage buffer</i>) |
| TIRF | Totalreflexionsfluoreszenz (Englisch: <i>total internal reflection</i>) |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| UPR | Englisch: <i>unfolded protein response</i> |
| WT | Wildtyp |
| 3HB | drei Helixbündel (Englisch: <i>three helix bundle</i>) |

Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Untersuchungssystem für natürliche Endoplasmatische Retikulum (ER)-Membranen entwickelt werden. Das ER übernimmt in der Zelle viele lebenswichtige Aufgaben, die die Synthese und Verteilung von Biomolekülen umfassen. Zur Aufklärung der Funktionsweisen der vielfältigen Stoffwechselprozesse und Signalweiterleitung wurden in der Vergangenheit *in vitro* Experimente mit isolierten Einzelkomponenten und *in vivo* Studien an verschiedenen Organismen durchgeführt. Für *in vitro* Experimente müssen Vereinfachungen des Systems in Kauf genommen werden. Jedoch sind, im Vergleich zur Zelle, die Messbedingungen definiert und zum Teil kontrollierbar bzw. messbar. Es können wichtige Informationen für Modelle der vielfältigen ER-Funktionen gewonnen werden. *In vivo* Experimente hingegen unterliegen den sich stetig ändernden und komplexen Messbedingungen innerhalb der Zelle. Sie haben aber den großen Vorteil, dass keine Vereinfachungen vorgenommen werden und das Objekt, das beobachtet wird, in seiner natürlichen Umgebung agiert. Die Diskrepanz zwischen der *in vitro* und *in vivo* Herangehensweise soll mit dem hier entwickelten Ansatz überbrückt werden. Dazu sollen ER-Membranen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) zunächst isoliert werden. Zur Anreicherung der ER-Membranen werden die Zellmembranen fraktioniert und bezüglich ihrer Zusammensetzung aus Lipiden und Proteinen charakterisiert. Die Membranen der Membranfraktion, die hauptsächlich aus ER-Membranen besteht, soll so umstrukturiert werden, dass sehr große unilamellare Vesikel (GUVs) entstehen. Die Vorteile der Modellform GUV sind die optimale Verwendung für Mikroskopie-basierte Techniken, eine gute Handhabbarkeit und die Tatsache, dass aus GUVs andere Membranmodellsysteme hergestellt werden können. Die Umstrukturierung der Membran soll durch die Fusion der einzelnen fragmentierten ER-Vesikel, Mikrosomen genannt, erfolgen. Die so gewonnenen GUVs sollen bezüglich ihrer Stabilität untersucht und schließlich für die Anwendung eines breiten Spektrums an Mikroskopie-basierten Methoden getestet werden. So generierte GUVs bieten zum Beispiel die Möglichkeit, Prozesse des ERs, wie die COPII-Vesikelabschnürung oder die Diffusion von Proteinen innerhalb der Membran, sowie die Diffusion von Proteinen während der Interaktion mit anderen Proteinen zu studieren (**Abbildung 0.1**).

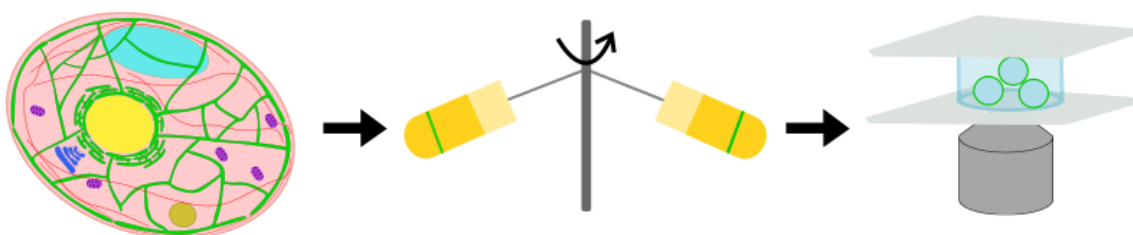


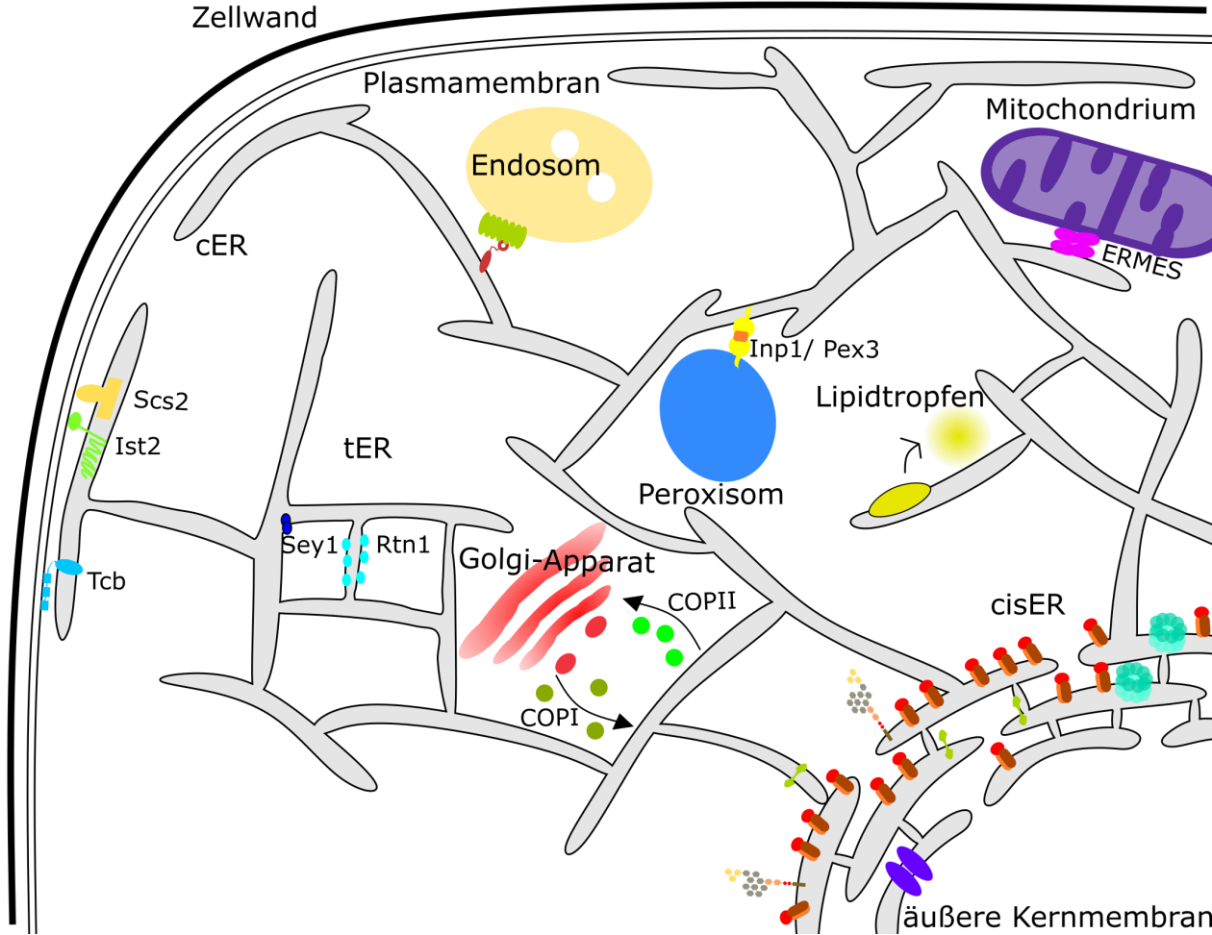
Abbildung 0.1: Das ER (grün dargestellt) soll aus Hefezellen (links) isoliert werden (Mitte), um die Membranen zu GUVs umzustrukturieren und für Mikroskopie-basierte Studien zugänglich zu machen (rechts).

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des Endoplasmatischen Retikulums

In eukaryotischen Zellen sind hochdiverse Aufgaben verschiedener Stoffwechselwege gut organisiert und koordiniert. Die chemischen Reaktionen der Stoffwechselwege erfordern unterschiedliche Bedingungen, die beispielsweise den pH-Wert, die Salzkonzentration oder eine reduktive bzw. oxidative Umgebung betreffen. Die erforderliche Trennung der Prozesse wird durch Organellen realisiert, die jeweils spezifische Aufgaben wie zum Beispiel die Synthese und Verteilung von Biomolekülen, die Bereitstellung von Energieträgern oder den Abbau von Stoffwechselprodukten ausführen. Allen Organellen gemein ist die räumliche Trennung des inneren Milieus von der Umgebung durch eine biologische Membran. Eine solche Membran ist eine Lipiddoppelschicht bestehend aus Lipiden, einzelnen Proteinen und Proteinkomplexen. Dabei können die Proteine in der Membran eingebettet oder peripher mit der Membran assoziiert sein. Sie halten unter anderem die Organellstruktur aufrecht, katalysieren Reaktionen, agieren als Kanäle oder leiten Signale weiter.

In der vorliegenden Arbeit steht das ER der Hefe *S. cerevisiae* im Fokus. Es erfüllt Funktionen im Rahmen der Proteinbiosynthese, der Lipidsynthese sowie dem Transport neu gebildeter Substanzen an den Zielort und dies sowohl über vesikulären Transport als auch über Kontaktstellen mit anderen Organellen (**Abbildung 1.1**).


















| | | | | |
|---|--|--|--|--|
| <p>ER-Peroxisom Kontaktstelle</p>  <p>Pex3/ Inp1</p> | <p>cisER</p>  <p>Ribosomen</p>  <p>Fettsäuresynthase</p>  <p>Ire1</p>  <p>Dolicholphosphat mit Zuckerbaum</p> | <p>ER-PM Kontaktstelle</p>  <p>Scs2</p>  <p>Ist2</p>  <p>Tcb</p> | <p>ER-Endosomen Kontaktstelle</p>  <p>NPC1 und 2</p>  <p>ORP5</p> | |
| <p>tER</p>  <p>Sey1</p>  <p>Rtn1, Yop1</p> | | <p>ER-Golgi-Apparat Kontaktstelle</p>  <p>COPII</p>  <p>COPI</p> | | |
| <p>ER-Mitochondrium Kontaktstelle</p>  <p>ERMES</p> | | | | |

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Ausschnitts einer Hefezelle mit dem ER und seinen vielfältigen Aufgaben und den zahlreichen Kontaktstellen zu anderen Organellen. In den Bereichen der Zisternen (cisER) um den Zellkern ist die ER-Membran mit Ribosomen, Fettsäuresynthasen, Ire1 und Dolicholphosphat besetzt. Die Struktur des tubulären ERs (tER), das ein Netzwerk in der Zelle bildet, wird durch strukturerhaltende Proteine wie Sey1, Rtn1 und Yop1 stabilisiert. In der Nähe des Golgi-Apparats schnüren sich COPII-Vesikel von der ER-Membran ab. An Stellen der Speicherlipidsynthese bilden sich sogenannte Lipidtröpfchen zur Energiespeicherung gebildet werden. Weiterhin sind die Kontaktstellen vom ER zu den Mitochondrien, zu den Peroxisomen, zur Plasmamembran (PM) und der vermutete Kontakt zu den Endosomen dargestellt. (Größen von einzelnen Proteinen und Organellen sind zum Zwecke der Darstellbarkeit nicht maßstabsgerecht.)

1.1.1 Aufbau und Struktur des ERs in der Hefe *S. cerevisiae*

Das ER weist drei strukturell unterschiedliche Bereiche auf: (i) Es liegt in flachen Zisternen (cisER), also sackartigen Strukturen, um den Zellkern vor. (ii) Es bildet ein in der gesamten Zelle verteiltes tubuläres Netzwerk (tER). (iii) Es liegt als, bei Hefen sehr ausgeprägtes, kortikales ER (cER) in Form von Tubuli und stark fenestrierten Zisternen unterhalb der Plasmamembran vor (West *et al.*, 2011). Die unterschiedlichen Strukturen bilden ein kontinuierliches Membransystem mit kontinuierlichem Lumen.

1.1.1.1 ER-Zisternen

Zunächst soll der Bereich des ERs betrachtet werden, der als Zisternen meist in Zellkernnähe vorliegt und cisER genannt wird. Aufgrund der Größe des Zellkerns sind die ihn umgebenden Membranen annähernd planar. Die einzelnen Zisternen bilden sich aus zwei sich gegenüberliegenden Lipiddoppelschichten mit einem gleichmäßigen Abstand von ca. 30 nm (Bernales *et al.*, 2006). Die gleichmäßige Entfernung der beiden Lipiddoppelschichten voneinander lässt vermuten, dass es abstandshaltende Proteine gibt. Diese wurden für Hefen bisher nicht identifiziert. In Säugerzellen wird der Abstand von ca. 50 nm zwischen den einzelnen ER-Schichten von dem Protein Climp63 stabilisiert (Shibata *et al.*, 2010). Ein weiterer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der flachen Struktur ist die flächige Anordnung der *coiled-coiled* Strukturen der Proteine p180 und Kinectin (Shibata *et al.*, 2010). An den jeweiligen Enden der ER-Zisternen ist die Membran stark gekrümmt. Diese starke Krümmung wird energetisch durch die strukturegebenden Proteine Yop1p und Rtn1p ermöglicht. Diese Proteine haben mehrere transmembrane Helices, die sich entlang der Membrankrümmung fächerartig aufspannen (Voeltz *et al.*, 2006). Die größtenteils flachen Strukturen der Zisternen liefern die Voraussetzung zur Bindung großer Proteinkomplexe und ermöglichen die Anlagerung von Ribosomen (Shibata *et al.*, 2006), welche ihrerseits zum Erhalt der zisternenartigen Struktur beitragen (Puhka *et al.*, 2007).

1.1.1.2 Tubuläres ER

Das tubuläre ER-Netzwerk (tER) erstreckt sich über die gesamte Zelle und verbindet alle ER-Regionen miteinander (Shibata *et al.*, 2006). Das ER-Membransystem ist dabei in keiner Weise statisch, sondern wird immer wieder neu gebildet und strukturiert (Lee *et al.*, 1988). Das tubuläre Netzwerk kann sich z.B. dadurch ausbilden, dass Motorproteine an der Membran ziehen oder Membranen mit dem Zytoskelett aus einem Membranreservoir herauswachsen (Lee *et al.*, 1988). In Säugerzellen übernehmen diese Aufgaben die Mikrotubuli (Lee *et al.*, 1988; Waterman-Storer *et al.*, 1998). In Pflanzen- und Hefezellen hingegen wird dies durch das Aktinzytoskelett realisiert (Liebe *et al.*, 1995;

Prinz *et al.*, 2000). Nicht alle ER-Tubuli sind mit dem Mikrotubuli- bzw. Aktin-Netzwerk verbunden. Das ER-Netzwerk ist unabhängig vom Zytoskelett stabil (Dreier *et al.*, 2000; Prinz *et al.*, 2000).

Die Struktur der Tubuli wird wie die starke Krümmung der Enden des cisERs von Yop1p und dem Reticulon Rtn1p aufrechterhalten (Hu *et al.*, 2008). Ein Fehlen der Proteine führt zum Verlust des tubulären Netzwerks (Voeltz *et al.*, 2006). Neben dem Erhalt der tubulären Struktur ist auch eine Verknüpfung der Tubuli miteinander zur Ausbildung des Netzwerkes notwendig. Diese Verknüpfung entsteht durch die Fusion von Membranen durch das *Synthetic Enhancer Protein 1* (Sey1p).

Das strukturerhaltende Protein Sey1p

Die Fusion von ER-Tubuli in Hefen wird maßgeblich durch die GTPase Sey1p, gehörend zur Dynamin-Familie, katalysiert (Hu *et al.*, 2009). Im Jahre 2015 wurde die Struktur von Sey1p aus der Hefe *Candida albicans* gelöst (Yan *et al.*, 2015), die eine Sequenzübereinstimmung mit Sey1p aus *S. cerevisiae* von 43 % aufweist. Das Protein besteht aus einer GTPase-Domäne und einer stabförmigen Domäne, die aus vier aufeinanderfolgenden Helixbündeln aus je drei α -Helices (*three helix bundle* - 3HB) aufgebaut ist (**Abbildung 1.2 B**), (Yan *et al.*, 2015). Das Protein liegt in zwei verschiedenen Konformationen vor, abhängig davon, ob GDP oder ein den Übergangszustand imitierendes GTP-Analogon (GDP/AlF₄) gebunden ist. Untersuchungen mittels Ultrazentrifugation zeigen, dass Sey1p:GDP als Monomer und Sey1p:GDP/AlF₄ als Dimer vorliegt (Yan *et al.*, 2015). Studien, die die Aktivität des Proteins zur Membranfusion untersuchen, zeigen, dass die Fusion sowohl von GTP als auch von Mg²⁺-Ionen abhängig ist (Anwar *et al.*, 2012). Aus den Strukturdaten sowie den biochemischen Untersuchungen wurde folgender Mechanismus der Fusion postuliert: Die Bindung von GTP führt zur Dimerisierung und einer damit einhergehenden Strukturänderung von zwei Monomeren in gegenüberliegenden Membranen, was die Membranen in räumlich Nähe bringt, sodass sie fusionieren können. Die GTP-Hydrolyse und die Freisetzung des Nukleotids führen durch erneute Konformationsänderung zur Auflösung des Dimers (**Abbildung 1.2 C**). Dieser Mechanismus beinhaltet eine für die Dynaminfamilie typische Nukleotid-abhängige Dimerisierung (Bian *et al.*, 2011).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Sey1p-vermittelte Membranfusion nicht die einzige Variante zur Strukturhaltung des tERs in Hefe ist. Ein Fehlen von Sey1p führt nur in Kombination mit dem Fehlen von Yop1p zum Verlust der tubulären Struktur (Anwar *et al.*, 2012). Zellen, denen nur Sey1p fehlt, haben ein intaktes tubuläres Netzwerk. Studien von Anwar *et al.* konnten für Hefen einen Hinweis darauf geben, dass das *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor* (SNARE)-Protein Ufe1p eine Rolle bei der Fusion von ER-Membranen spielt. Weiterführende Studien haben gezeigt, dass Mikrosomen in Anwesenheit von GTP und Magnesium, anders als Vesikel mit rekonstituiertem Sey1p, nicht zu größeren Strukturen fusionieren (Lee *et al.*, 2015). Die Ursache dafür liegt vermutlich darin, dass die physiologische Sey1p-Konzentration 100-600x mal geringer ist als die in den Experimenten mit

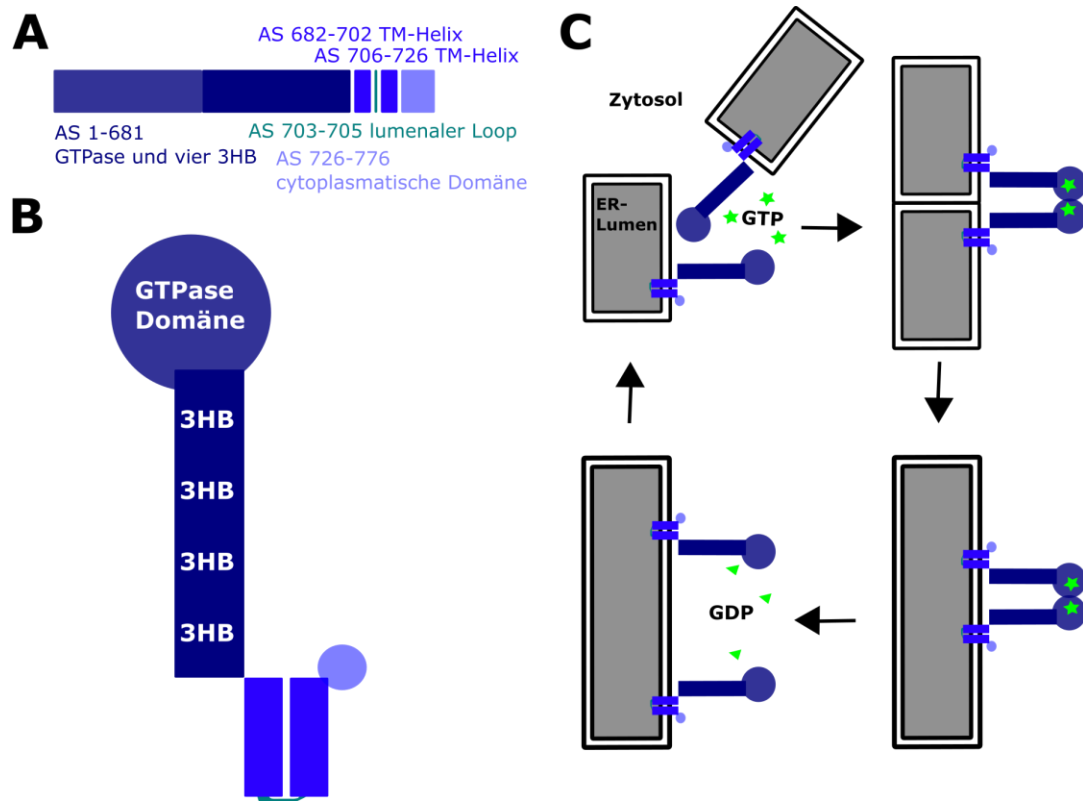


Abbildung 1.2: Sey1p. **(A)** Domänenstruktur von Sey1p aus *S. cerevisiae* (3HB — three helix bundle, TM — transmembran). **(B)** Vorhergesagte Domänenanordnung des Proteins. **(C)** Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus der Sey1p-vermittelten Membranfusion. Adaptiert nach (Yan *et al.*, 2015).

künstlichen Lipidvesikeln. Erst eine Zugabe des löslichen Teils des SNARE-Proteins Sec22p führte zu einer Fusion der Mikrosomen zu größeren Vesikeln. Weiterhin wurde beobachtet, dass auch die SNAREs Sec20p, Ufe1p und Use1p eine Rolle spielen. Möglicherweise sorgt Sey1p für die räumliche Anordnung der entsprechenden Membranen und die Rekrutierung der SNARE-Proteine, sodass eine Membranfusion stattfinden kann (Kim *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2015). Zusammenfassend kann man sagen, dass eine hohe Konzentration von Sey1p zur Fusion von ER-Membranen führt, unter physiologischen Bedingungen aber vermutlich SNAREs zu einer effizienten Membranfusion zur Ausbildung und zum Erhalt des tubulären ER-Netzwerkes beitragen (Lee *et al.*, 2015).

1.1.1.3 Kortikales ER

Hefen haben ein sehr ausgeprägtes kortikales ER (cER) Netzwerk (Baba *et al.*, 1987; Pichler *et al.*, 2001; Preuss *et al.*, 1991; Prinz *et al.*, 2000). Die Analyse der dreidimensionalen cER Struktur in Hefe hat ergeben, dass der ER-Membranbereich unterhalb der Plasmamembran sich sowohl aus Tubuli als auch aus stark fenestrierten Zisternen zusammensetzt (Schuck *et al.*, 2009; West *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass ähnliche Mechanismen zum Erhalt der Struktur des cER verwendet werden wie für das tER und das cisER.

1.1.2 Aufgaben des ERs

Die Aufgaben des ERs sind so vielfältig wie seine Struktur. Hier wird ein kurzer Überblick zu den verschiedenen Hauptaufgaben des ERs gegeben (**Abbildung 1.1**).

1.1.2.1 Proteinbiosynthese und -faltung

Eine zentrale Aufgabe des ERs ist die Proteinbiosynthese sowie die Prozessierung der gebildeten Proteine. Die Synthese neuer Proteine findet an Ribosomen statt, die zum Teil in hoher Konzentration an den ER-Zisternen vorliegen (**Abbildung 1.1**). Diese binden Boten-Ribonukleinsäuren (mRNA) und übersetzen diese mit Hilfe von Transfer-RNA (tRNA) in eine Proteinsequenz. Dieser Vorgang wird als Translation bezeichnet (Alberts *et al.*, 2008). Die entstehende Proteinsequenz enthält Informationen zur weiteren Verarbeitung: Soll die Peptidkette im Zytosol mit Unterstützung von Faltungshelfern, den Chaperonen, in seine dreidimensionale Struktur gefaltet werden und dort verbleiben, oder soll das finale Protein in ein anderes Zielorganell transportiert werden? Proteine, die in andere Organellen oder in die Membran von Organellen eingebaut werden sollen, werden meist vollständig oder teilweise in das ER transloziert. In den Fällen, in denen das Protein zunächst in das ER transloziert wird, wird eine Signalsequenz durch ein *signal recognition particle* (SRP) erkannt und an einen in der ER-Membran integrierten Rezeptor und schließlich an einen Proteintranslokator gebunden. Die Proteinbiosynthese findet dann gleichzeitig mit der vollständigen Translokation von löslichen Proteinen oder mit der partiellen Translokation von Membranproteinen statt (Alberts *et al.*, 2008; Rapoport *et al.*, 2017).

1.1.2.2 N-verknüpfte Glykosylierung von Proteinen im ER

Proteine, die in das ER-Lumen transloziert wurden, werden, sofern sie eine entsprechende Signalsequenz besitzen, glykosyliert. In Eukaryoten werden in der ER-Membran Dolicholmoleküle gebildet, an die im Zytosol durch Glykosyltransferasen Nukleotid-aktivierte Zuckerbausteine geknüpft werden, sodass ein sogenannter Zuckerbaum mit spezifischem Aufbau entsteht (**Abbildung 1.1**). Dieser muss über die ER-Membran in das ER-Lumen gebracht werden (Abeijon *et al.*, 1992), um den Zuckerbaum als Ganzes auf eine Asparagin-Seitenkette innerhalb der erwähnten Signalsequenz der Polypeptidkette zu übertragen. Die Polysaccharidstrukturen auf den Proteinen haben unter anderem Einfluss auf die Faltung. Eine Modifikation der Zuckerbausteine dient als Signal zum Fortschritt der Reifung des Proteins (Aebi, 2013; Aebi *et al.*, 2010). Wie genau die Übertragung des Zuckerbaums verläuft, ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten Proteinen, die zeigen, dass eine Glykosyltransferase direkt am Peptidunnel eines Transloconproteins mit dem entstehenden Polypeptid interagiert (Harada *et al.*, 2009). Ob dies auch in Anwesenheit von Membranen der Fall ist, muss noch in einem Untersuchungssystem bestätigt werden, das Membranen berücksichtigt.

Glykosylierungsmuster sind spezifisch für Organismen und bilden ein wichtiges Erkennungszeichen für das Immunsystem. Daher ist bei der rekombinanten Proteinproduktion für z.B. pharmazeutische Anwendungen beim finalen Produkt die korrekte Glykosylierung von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wird an einer Glykosylierungsplattform außerhalb von Zellen gearbeitet, um diese *in vitro* nachzuahmen (Rexer *et al.*, 2018).

1.1.2.3 Stressreaktion auf ungefaltete Proteine: *unfolded protein response*

Im ER-Lumen und im Zytosol liegen Faltungshelfer, sogenannte Chaperone, vor. Dennoch kann es z.B. aufgrund von Sequenzfehlern vorkommen, dass Proteine nicht korrekt gefaltet werden. Um zu verhindern, dass sich falsch gefaltete Proteine anreichern, gibt es einen Schutzmechanismus: Die *unfolded protein response* (UPR), frei übersetzt mit „die Antwort der Zelle auf ungefaltete Proteine“. Das Schlüsselprotein der Stressreaktion in *S. cerevisiae* ist Ire1p (**Abbildung 1.1**). Ire1p ist ein Transmembranprotein, das im ER-Lumen mit nicht gefalteten Proteinen interagiert. Durch die Bindung ungefalteter Proteine im ER-Lumen wird die zytosolische Kinase-Domäne (Mori *et al.*, 1993) phosphoryliert und in Folge dessen dimerisiert (Shamu *et al.*, 1996). Als Dimer agiert Ire1p als Endoribonuklease (Sidrauski *et al.*, 1997). Diese unterstützt die Reifung der mRNA des Transkriptionsregulators Hac1p (Cox *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 1996), der die Bildung von Chaperonen wie z.B. Kar2p fördert (Nikawa *et al.*, 1996). Sollte die Menge an falsch gefalteten Proteinen dennoch steigen, wird die Apoptose, also der regulierte Zelltod, eingeleitet (Alberts *et al.*, 2008). Da die UPR eine entscheidende Funktion für das Überleben der Zelle innehat, wird diese streng reguliert, was aber noch nicht im Detail verstanden ist.

1.1.2.4 Lipidsynthese und Interaktion mit Lipidtropfen

Neben Proteinen werden am ER auch Lipide synthetisiert. Zum einen dienen Lipide zum Aufbau von Lipiddoppelschichten. Diese bestehen aus Phospholipiden sowie Sphingolipiden und Sterolen. Die Fettsäureketten der Lipide werden durch die Fettsäure-Synthase (FAS) gebildet (**Abbildung 1.1**). Dieser Multienzymkomplex mit acht katalytischen Zentren in sechsfacher Ausführung (Lomakin *et al.*, 2007) beinhaltet die nötigen Enzyme um eine Fettsäurekette ausgehend von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) in einer sich wiederholenden Reaktion mit Malonyleinheiten auf eine Länge von meist 16 oder 18 Kohlenstoff-Atomen, seltener acht, zwölf oder 14 Kohlenstoffatomen, zu synthetisieren (Fichtlscherer *et al.*, 2000; Lomakin *et al.*, 2007). Zur Synthese von Phospholipiden wird zunächst Phosphatidsäure bereitgestellt. Dazu reagieren beispielsweise zwei Fettsäureketten mit einem Glycerinmolekül zu Phosphatidsäure (PA) oder es wird ein Fettsäurerest eines Triacylglycerins abgespalten (Voet *et al.*, 2011). Aus PA werden dann Phospholipide mit den verschiedensten Kopfgruppen gebildet. Die häufigsten Lipidkopfgruppen sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) und Cardiolipin (CL) (Zinser *et al.*, 1991). Die Bindung

der Kopfgruppe am Lipidanker kann durch eine Aktivierung mit CTP zu CDP-DAG und dem anschließenden CDP-DAG-Weg (McMaster *et al.*, 1994) oder über den Kennedy-Weg (Kennedy *et al.*, 1956) erfolgen. Alle Enzyme, die zur Phospholipidsynthese nötig sind, finden sich in der Membran des ERs wieder. Die Bildung von Lipiden kostet viel Energie und ist von dem Nährstoffzugang der Zelle abhängig und damit gut reguliert.

Zum anderen dienen Lipide als Energiespeicher. Dazu werden Triacylglyceride (TAG) und Cholesterinester synthetisiert (Leber *et al.*, 1994). Diese hydrophoben Moleküle sammeln sich zwischen den zwei Membranschichten des ERs und bilden eine Struktur, die aufgrund ihrer Form „Linse“ genannt wird (Czabany *et al.*, 2007; Rajakumari *et al.*, 2008; Walther *et al.*, 2009). Die Anreicherung der Lipide erfolgt solange, bis sich aus der Linse ein annähernd runder Lipidtropfen (*lipid droplet* – LD) abspalten kann, der von einer Lipidmonoschicht und unterstützenden Proteinen umgeben ist (Leber *et al.*, 1994). Der genaue Mechanismus, wie sich von einem Organell mit einer Lipiddoppelschicht ein Speicherorganell mit einer Lipidmonoschicht absondern kann, ist noch nicht verstanden. Bei der Bildung kleiner LDs scheinen unter anderem Proteine der COPI-Vesikelbildung beteiligt zu sein (Wilfling *et al.*, 2014).

1.1.2.5 Der vesikuläre COPII-Transport

Die am ER neugebildeten Zellbausteine müssen zu ihrem Zielorganell transportiert werden. Dies kann mittels des vesikulären Transportes vom ER zum Golgi-Apparat durch die *coat protein complex II* (COPII)-vermittelte Vesikelbildung erfolgen (**Abbildung 1.3**). Die Hefe *S. cerevisiae* weist punktförmige Strukturen verteilt über das gesamte ER auf (Shindiapina *et al.*, 2010), an denen sich der COPII-Mantel assembliert, der mindestens aus Sar1p, Sec23/24p und Sec13/31p besteht (Matsuoka *et al.*, 1998). Diese Strukturen sind in der Hefe *Pichia pastoris* und höheren Eukaryoten zu sogenannten *exit sites* weiter entwickelt, die in der Nähe des ER-Golgi-intermediären Kompartments (ERGIC) lokalisiert sind (Rossanese *et al.*, 1999).

Zur Ausbildung eines Vesikels wird durch den ER-ständigen Guaninnukleotidaustauschfaktor Sec12p die kleine GTPase Sar1p rekrutiert (d'Enfert *et al.*, 1991). Die Interaktion der Proteine miteinander führt zu einem Nukleotidaustausch. Wird GDP gegen GTP getauscht, kommt es zu einer Strukturänderung innerhalb der GTPase Sar1p, bei der eine amphipathische α -Helix ausgeklappt wird (Bi *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2001). Aufgrund ihres amphiphilen Charakters interagiert die α -Helix mit Membranen. Bereits durch die Bindung von Sar1p an die Membran wird eine erste zur Vesikelbildung notwendige Krümmung der Membran induziert (Bacia *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2005). Mit der ER-Membran interagierendes Sar1p bindet das Heterodimer Sec23/24p, welches aufgrund seiner Struktur die Membrankrümmung fördert. Die Interaktion von Sec23/24p mit der Membran wird zusätzlich dadurch

verstärkt, dass die positiv geladene Zinkfingerdomäne auf der der Membran zugewandten Seite des Sec23p-Proteins (Zanetti *et al.*, 2013) mit den negativ geladenen Phosphoinositiden der Membran interagiert (Bi *et al.*, 2002). Sec23p ist ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), dessen Argininrest in die Bindetasche von Sar1p ragt. Dort stabilisiert die Guanidinogruppe des Arginins den Übergangszustand des GTPs während der Hydrolyse und senkt so die Aktivierungsenergie (Bi *et al.*, 2002). Sec24p hat eine ähnliche Domänenstruktur wie Sec23p, weist aber Interaktionsstellen für Cargoproteine auf (Miller *et al.*, 2003; Mossessova *et al.*, 2003) und dient so der Konzentrierung von Cargo im Vesikel. In Folge der Rekrutierung von Sec23/24p zur Bildung des inneren Hüllkomplexes mit Sar1p können die äußeren Hüllproteine, das Heterotetramer Sec13/31p, binden. (**Abbildung 1.3**). Das Sec13/31p-Tetramer fördert die GAP-Aktivität von Sec23p (Antonny *et al.*, 2001). Der Umsatz von GTP zu GDP führt zum Einklappen der amphipathischen Helix und damit zur Lockerung des Proteinmantels (Antonny *et al.*, 2003; Matsuoka *et al.*, 1998). Die von Sec13/31p gebildete Gitterstruktur kann verschiedene Anordnungen annehmen und bietet so die Flexibilität auch große Cargomoleküle wie Procollagen zu transportieren (Bhattacharya *et al.*, 2012; Fath *et al.*, 2007; Zanetti *et al.*, 2013). Wie die tatsächliche Abschnürung des Vesikels vonstatten geht, ist bislang nicht verstanden. Möglicherweise induziert Sar1p am Vesikelhals eine starke Membrankrümmung, die final zur Abschnürung beitragen kann (Futai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

Diese Beschreibung der grundlegend beteiligten Proteine zur COPII-Vesikelbildung ist Resultat langer intensiver Forschung an verschiedenen Modellsystemen. Erste Studien wurden genetisch mit intakten Hefen mit verschiedenen *Knock-out*-Mutanten durchgeführt, weitere an Zelllysaten (Baker *et al.*, 1988; Novick *et al.*, 1980; Pryer *et al.*, 1993). Durch diese Studien wurden Proteine identifiziert, die am Transport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt sind. Um diesen Prozess zu verstehen, sollte er außerhalb der Zelle nachgeahmt werden. Dazu wurden die COPII-Proteine Sar1p, Sec23/24p und Sec13/31p mit Mikrosomen inkubiert (Matsuoka *et al.*, 1998). COPII-Proteine binden in Anwesenheit eines beinahe nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons, Guanosin 5'-[β,γ -imido]triphosphat (GMP-PNP), an Mikrosomen und an Vesikel aus extrahierten ER-Lipiden. In diesem Zusammenhang wurde eine Lipidmischung zusammengestellt, an die die COPII-Proteine besonders gut binden, der sogenannte *Major-Minor-Mix* (MMM), welcher sich aus 34,4 mol-% 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 14,8 mol-% 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE), 5,4 mol-% 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin (DOPS), 3,4 mol-% 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphat (DOPA), 5,4 mol-% L- α -Phosphatidylinositol (PI), 1,5 mol-% L- α -Phosphatidylinositol-4-phosphat aus Hirn vom Schwein (PIP), 0,5 mol-% L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), 1,3 mol-% 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-cytidindiphosphat (CDP-DAG) und 33,3 mol-% Ergosterol zusammensetzt (Matsuoka *et al.*, 1998).

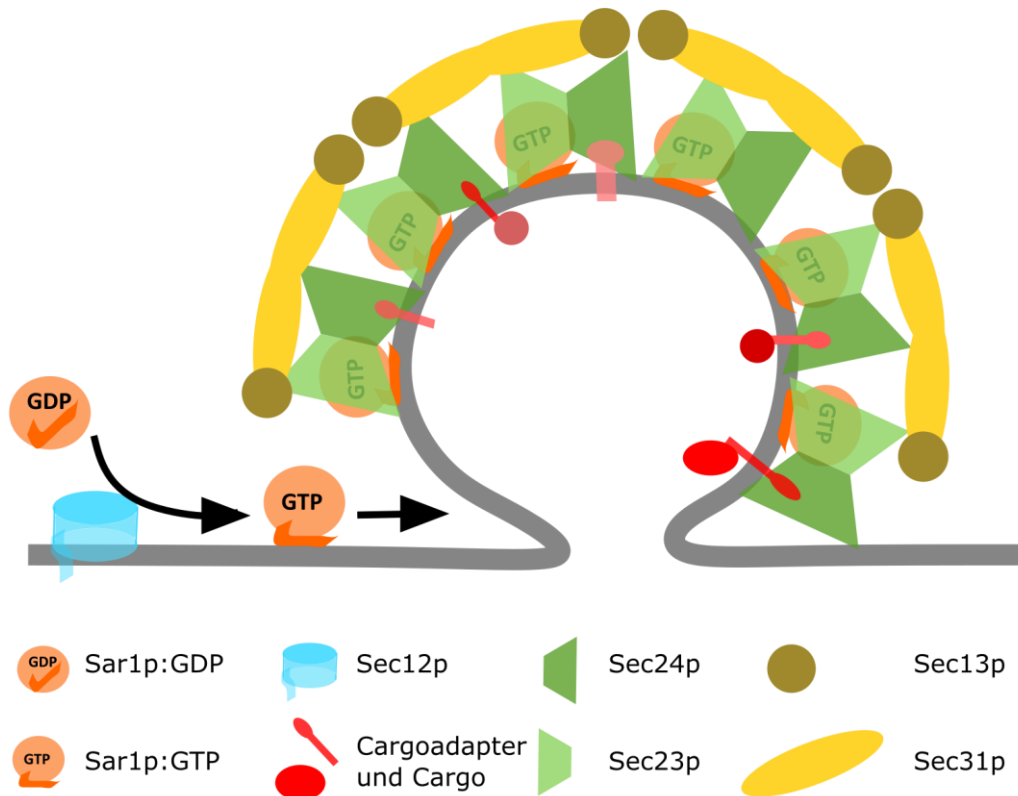


Abbildung 1.3: COPII-Vesikelformation. In Folge der Interaktion von Sar1p:GDP mit dem Guaninnukleotidaustauschfaktor Sec12p wird ein Nukleotid zu Sar1p:GTP ausgetauscht. Die Bindung von GTP führt zum Ausklappen einer amphipathischen α -Helix, die mit der Membran interagiert. In Folge der Bindung von Sar1p an die Membran werden die COPII-Proteine Sec23/24p sowie Sec13/31p rekrutiert und ein Vesikel mit Cargo wird gebildet.

Tatsächlich wurden nicht nur die Bindung der Minimalkomponenten des COPII-Mantels (Sar1p, Sec23/24p und Sec13/31p), sondern auch abgeschnürte COPII-Vesikel nach Dichtegradientenzentrifugation beobachtet (Matsuoka *et al.*, 1998). Unter Umständen könnte die mechanische Belastung des Zentrifugierens zu einer Abschnürung kleiner Vesikel führen. Arbeiten an sehr großen unilamellaren Vesikeln (GUVs) zeigten, dass, wenn sehr geringer mechanischer Stress auf die Membran wirkt, sich COPII-vermittelt Membrantubuli aber keine Vesikel ausbilden (Bacia *et al.*, 2011; Daum *et al.*, 2014). Dies legt nahe, dass weitere Komponenten an der COPII-Vesikelabschnürung beteiligt sind. Im Zusammenhang mit der COPII-Vesikelbildung treten immer wieder neue Fragen zur zeitlichen Organisation sowie der Anpassung an unterschiedlich große Cargo-Moleküle auf. Kürzlich wurde im Säugersystem ein Protein identifiziert, das die GTP-Hydrolyse durch Sar1p verlangsamt, sodass größere Vesikel für größere Cargomoleküle formiert werden können, das FABP5 (Melville *et al.*, 2019). Es ist denkbar, dass weitere Proteine Aufgaben bei der zeitlichen Organisation der COPII-Vesikelbildung bzw. bei der COPII-Vesikelabschnürung erfüllen.

1.1.2.6 Kontaktstellen des ERs mit anderen Organellen und der Plasmamembran

Synthetisierte zelluläre Bausteine werden neben dem vesikulären Transport auch an Kontaktstellen zwischen dem ER und anderen Organellen weitergegeben. Weiterhin kommt es an den Membrankontaktstellen zur Signaltransduktion. Elektronenmikroskopische Studien zeigen, dass Organellen an den Kontaktstellen zum Teil nur 30 nm oder weniger voneinander entfernt sind, aber ihre abgegrenzte Struktur erhalten (Friedman *et al.*, 2011; West *et al.*, 2011). Diese Nähe, bei dennoch konstantem Abstand, wird durch Proteininteraktionen realisiert. Immer mehr Proteine, die Kontaktstellen zwischen Organellen ausbilden, werden identifiziert (**Tabelle 1.1**). Die Erforschung der Funktionsweise dieser Proteine sowie die Aufgaben der Kontaktstellen steckt noch in den Anfängen.

Mitochondrien

Die Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien werden durch den Proteinkomplex *ER mitochondria encounter structure* (ERMES) geformt und spielen eine Rolle in der Phospholipidsynthese (Kornmann *et al.*, 2009). Der ERMES-Komplex setzt sich auf der mitochondrialen Seite aus den Proteinen Mdm34p und Mdm10p und auf der ER-Seite aus den Proteinen Mdm12p und Mmm1p zusammen. Im Jahr 2015 gelang es eine Struktur des Proteinkomplexes aus Mdm12p und Mmm1p elektronenmikroskopisch aufzuklären (AhYoung *et al.*, 2015). Diese Struktur eröffnet Einblicke in die mögliche Funktionsweise des Komplexes. Durch die Bildung eines Heterotetramers aus Mdm12p und Mmm1p entsteht ein hydrophober Kanal, der den Transport von Lipiden vom ER zur mitochondrialen Membran ermöglicht. Eine Bindung von Lipiden mit PC-Kopfgruppe konnte bereits nachgewiesen werden (AhYoung *et al.*, 2015).

Peroxisomen

Peroxisomen können von Zelle zu Zelle weitergegeben werden oder entstehen *de novo* aus dem ER (Hoepfner *et al.*, 2005). Bei der *de novo* Bildung von Peroxisomen wird Pex3p in punktuellen Strukturen am ER angereichert. An diesen Strukturen spalten sich Vesikel ab, aus denen das neue Peroxisom entsteht (Hoepfner *et al.*, 2005). Neben der möglichen Bildung von Peroxisomen aus dem ER, ist zusätzlich eine räumliche Nähe beider Organellen in der Zelle beobachtet worden (Tabak *et al.*, 2008). Neugebildete sowie existierende Peroxisomen sind in ihrer Größe variabel und können wachsen oder schrumpfen. Obwohl Peroxisomen keine lipidsynthetisierenden Proteine besitzen, findet das Wachstum von Peroxisomen unabhängig von verschmelzenden Vesikeln statt (Raychaudhuri *et al.*, 2008). Die für das Wachstum notwendigen Lipide gelangen vermutlich durch ER-Peroxisom-Kontaktstellen vom ER zum Peroxisom (Raychaudhuri *et al.*, 2008). An der Ausbildung dieser Kontaktstellen sind die Proteine Pex3p und Inp1p beteiligt. Inp1p verknüpft dabei in der ER-Membran residierende Pex3p-Moleküle mit solchen der Peroxisomenmembran (Knoblach *et al.*, 2013).

Tabelle 1.1: Übersicht zu den Proteinen und ihren Aufgaben an den Organellmembrankontaktstellen des ERs der Hefe *S. cerevisiae*. Die mit * gekennzeichneten Proteine sind Proteine aus Säugerzellen.

| Organellen | Beteiligte Proteine | Aufgabe | Quelle |
|------------------|---|--|--|
| ER-Mitochondrien | Mdm34p, Mdm10p, Mdm12p, Mmm1p | Lipidtransport | AhYoung <i>et al.</i> , 2015 |
| ER-Peroxisomen | Pex3p, Inp1 | Lipidtransport, weitere? | Raychaudhuri <i>et al.</i> , 2008, Knoblach <i>et al.</i> , 2013 |
| ER-Endosomen | Orp5*, Npc1* | Cholesterinrecycling | Du <i>et al.</i> , 2011 |
| ER-Plasmamembran | Tricalbin1p, 2p und 3p sowie Scs2p, Scs22p, Ist1p | Kontrolle der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran | Manford <i>et al.</i> , 2012 |

Darüber hinaus hat eine massenspektrometrische Untersuchung einen engen Zusammenhang zwischen der Peroxisomen-Proliferation und dem tER hergestellt. Das peroxisomale Protein Pex30p interagiert mit den Retikulons, die die tubuläre Struktur des tERs aufrechterhalten (David *et al.*, 2013).

Endosomen

Endosomen sind Organellen, die bei der Einstülpung von Plasmamembranen und extrazellulärem Material in die Zelle entstehen und durch die Verschmelzung mit Vesikeln wachsen, um final mit der Vakuole bei Hefen bzw. mit dem Lysosom bei Säugerzellen zu verschmelzen. Die Membranen enthalten viel Ergosterol bzw. Cholesterin. Bei Säugetieren werden etwa 30 % des Cholesterins an ER-Endosom-Kontaktstellen recycelt, sodass es der Zelle wieder zur Verfügung steht (Neufeld *et al.*, 1996). Die verantwortlichen Proteine sind das Orp5 in der ER-Membran und das Npc1 in der Endosomen-Membran (Du *et al.*, 2011). Ob bei Hefen Ergosterol ebenfalls recycelt wird, ist unbekannt.

Plasmamembran

In Hefen ist das cER sehr ausgeprägt. Ungefähr 25-40 % des cERs sind nur ca. 30 nm von der Plasmamembran (PM) entfernt (Pichler *et al.*, 2001; West *et al.*, 2011). Eine Interaktion beider Membranen miteinander ist deshalb sehr wahrscheinlich. Bei dieser Interaktion spielen die Proteinen Scs2p, Scs22p, Ist1p und die Tricalbine 1, 2 und 3 vermutlich eine essenzielle Rolle (Manford *et al.*, 2012). Die Funktion der meisten dieser Proteine ist jedoch noch nicht beschrieben. Es handelt sich um Proteine, die Lipidbindestellen aufweisen und damit möglicherweise eine Rolle in der Kontrolle der Lipidzusammensetzung der Plasmamembranen spielen (Manford *et al.*, 2012). Es gibt ausführliche Studien zu den den Tricalbinen (Tcb) orthologen Proteinen aus Säugerzellen, den *extended Synaptotagmins* (E-Syt). Diese bilden in Säugerzellen die Kontaktstelle zwischen dem ER und der Plasmamembran und verhindern gleichzeitig ihre Fusion. Die Kristallstruktur von E-Syt2 zeigt, dass der Kontakt beider Membranen zum einen durch den transmembranen ER-Anker und zum anderen durch

die drei C2-Domänen mit positiv geladenen Aminosäuren, die mit PIP₂ der PM interagieren, hergestellt wird. Zwischen den kontaktherstellenden Domänen befindet sich eine *synaptotagmin like mitochondrial lipid binding protein* (SMP)-Domäne. Massenspektrometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass Glycerophospholipide durch diese gebunden (Schauder *et al.*, 2014) sowie tatsächlich von einer Membran zur anderen transportiert werden können (Saheki *et al.*, 2016).

1.2 Modellmembransysteme

Wie das vorangegangene Kapitel zeigt, sind Membranen zentraler Dreh- und Angelpunkt für Prozesse wie Signaltransduktion, Biosynthese und Stoffaustausch. Dieses hochkomplexe, zusammengesetzte biologische System in ein artifizielles gut handhabbares Modell umzuwandeln, ist eine große Herausforderung—nicht zuletzt wegen der physikochemischen Eigenschaften von Lipiden. Dieser Herausforderung hat sich die Wissenschaft gestellt und verschiedene Modellsysteme zur Nachahmung von Biomembranen entwickelt. Nachfolgend wird eine Auswahl kurz dargestellt (**Abbildung 1.4**).

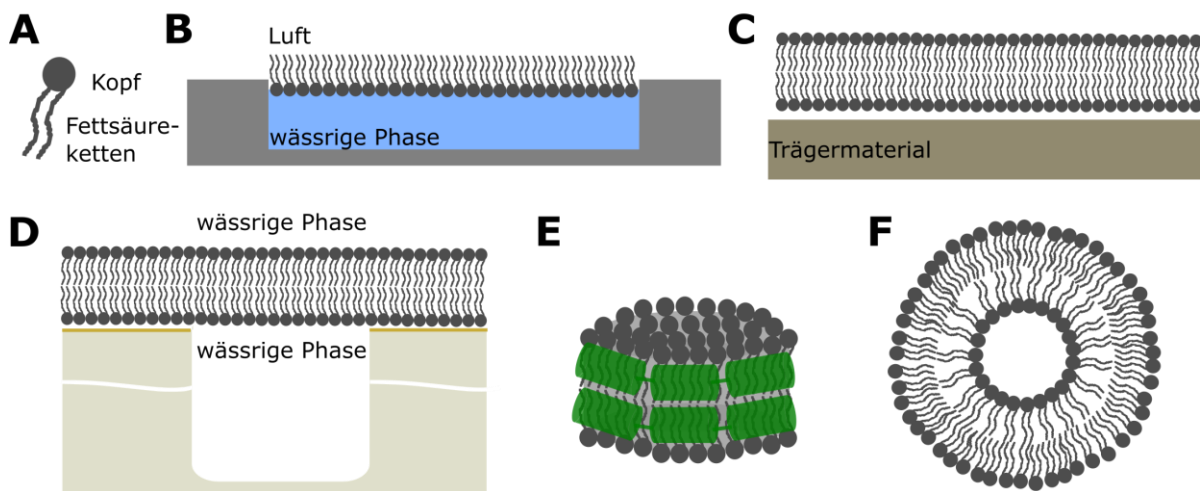


Abbildung 1.4: Membranmodellsysteme. **(A)** Schematische Darstellung eines amphiphilen Lipidmoleküls aus hydrophilem Kopf und hydrophoben Fettsäureketten. **(B)** Trog einer Langmuir-Filmwaage mit Lipidmonoschicht. **(C)** Unterstützte Lipiddoppelschicht auf einem Trägermaterial, beispielsweise Glas. **(D)** Porenüberspannende Lipiddoppelschicht. **(E)** Nanodisc. **(F)** Unilamellares Lipidvesikel.

1.2.1 Lipidmonoschichten

Um die biologische Membran in einem einfachen System mit gut zu charakterisierenden Parametern nachzuahmen, kann z.B. die Langmuir-Filmwaage genutzt werden. An der Wasser-Luft-Phasengrenze ordnen sich die Lipidmoleküle mit ihrer hydrophilen Kopfgruppe zum Wasser hin und mit den hydrophoben Fettsäureketten zur Luft an (**Abbildung 1.4 B**)—es entsteht eine Lipidmonoschicht. Mit Hilfe eines Wilhelmy-Plättchens wird die Oberflächenspannung der Monoschicht gemessen. Bei einer Oberflächenspannung von $32 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ weist die Lipidmonoschicht eine ähnliche Lipiddichte wie eine Lipiddoppelschicht auf (Feng, 1999; Marsh, 2006). Mit dieser Methode können eine gut kontrollierbare Packungsdichte der Lipide sowie eine planare Geometrie der Lipidschicht erreicht werden. Biologische Studien an der Monoschicht können die Bindung von Proteinen an diese (Fritz *et al.*, 1993; Kouzayha *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2006) oder die Bestimmung der Orientierung eines membranassoziierten Proteins in der Membran (Schwieger *et al.*, 2017) beinhalten. An Lipidmonoschichten können viele verschiedene biophysikalische Methoden angewendet werden, wie beispielsweise die Röntgenstreuung, Epifluoreszenzmikroskopie oder Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (Blume *et al.*, 2013). Im Falle von membrandurchspannenden Proteinen stößt die Methode an ihre Grenzen. Auch darf der Effekt, den das Fehlen der zweiten Lipidschicht auf die erste Schicht hat, nicht außer Acht gelassen werden. Auch wenn Lipidmonoschichten deutlich vom natürlichen System abweichen, können sie zur Beantwortung spezifischer Fragestellungen hilfreich sein.

1.2.2 Lipiddoppelschichten an Trägermaterial

Lipiddoppelschichten an Trägermaterial können z.B. in Form von unterstützten oder porenüberspannenden Lipiddoppelschichten bereitgestellt werden.

Unterstützte Lipiddoppelschichten können auf einem geeigneten Trägermaterial, wie z.B. auf Glas, Quarzglas oder Silikon (Tamm *et al.*, 1985), je nach Anforderungen des geplanten Experiments, hergestellt werden (**Abbildung 1.4 C**). Bei Bedarf kann in die Membran auch eine Asymmetrie eingeführt werden (Garg *et al.*, 2007; Kiessling *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006). Diese Art der Doppelschicht ist gut kontrollierbar, reproduzierbar und über einen längeren Zeitraum stabil (Steinem *et al.*, 1996). Unterstützte Lipiddoppelschichten eignen sich besonders für die Anwendung von Rasterkraftmikroskopie (Grandbois *et al.*, 1998; Mingeot-Leclercq *et al.*, 2008), Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) (Nair *et al.*, 2011; Pautot *et al.*, 2005) oder Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (Dahlin *et al.*, 2005; Salamon *et al.*, 1996). So wurden unterstützte Lipiddoppelschichten in der Vergangenheit zum Beispiel dazu verwendet, Protein-Membranbindung (Majd *et al.*, 2005; Terrettaz *et al.*, 1993), Vesikelfusion (Rawle *et al.*, 2011) und Vesikelabschnürung (Pucadyil *et al.*, 2008) sowie die Funktionsweise von porenformenden Proteinen

(Epanand *et al.*, 2002; Schuster *et al.*, 1998) zu studieren. Die Einbaurichtung von rekonstituierten Proteinen ist wie bei anderen Methoden nicht leicht zu kontrollieren. Ein anderer Nachteil, der mit dieser Methode einhergeht, ist die Tatsache, dass eine Membranseite an eine Oberfläche gebunden ist und damit die laterale Mobilität der Proteine sowie die der Lipide eingeschränkt ist.

Der Nachteil der eingeschränkten lateralen Mobilität kann zum Beispiel mit **porenüberspannenden Lipiddoppelschichten (Abbildung 1.4 D)** umgangen werden. In diesem Fall ist die Lipiddoppelschicht auf beiden Seiten von Lösung umgeben. Porenüberspannende Lipiddoppelschichten sind allerdings nicht so stabil wie die unterstützten Lipiddoppelschichten (Hennesthal *et al.*, 2000).

1.2.3 Freistehende Lipiddoppelschichten

Nanodiscs sind eine Möglichkeit, Lipiddoppelschichten in wässriger Suspension zu generieren. Diese können sowohl mit einem strukturgebenden Protein (Bayburt *et al.*, 2002) oder mit Polymeren (Cuevas Arenas *et al.*, 2016; Knowles *et al.*, 2009) gebildet werden (**Abbildung 1.4 E**). Dabei wird der hydrophobe Teil einer kreisförmigen Lipiddoppelschicht durch das auf Apolipoprotein A basierende Protein *membrane scaffold protein* (MSP) (Bayburt *et al.*, 2002) oder von einem Polymer wie z.B. der Styrolmaleinsäure (SMA) (Cuevas Arenas *et al.*, 2016; Knowles *et al.*, 2009) von der Lösung abgeschirmt. MSP-Nanodiscs werden z.B. für die Strukturaufklärung mittels Kernspinresonanzspektroskopie (Gluck *et al.*, 2009) oder Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) (Frauenfeld *et al.*, 2011) verwendet. Aber auch Bindungsstudien oder Funktionsanalysen können mit in Nanodiscs rekonstituierten Proteinen durchgeführt werden (Hernandez-Rocamora *et al.*, 2012; Mills *et al.*, 2014). Der Experimentator kann sich zu Nutze machen, dass das Protein von beiden Seiten zugänglich ist. Während MSP-Nanodiscs meist mit künstlichen Lipiden und gereinigten Proteinen gebildet werden, können Polymer-Nanodiscs unspezifisch Bereiche aus biologischen Membranen herauslösen (Oluwole *et al.*, 2017). So bleibt ein kleiner Bereich der tatsächlichen Umgebung eines oder mehrerer Proteine erhalten.

Ein gut etabliertes und weit verbreitetes System bilden **Liposomen**, also sphärische Wasser- bzw. Puffer-gefüllte Lipiddoppelschichten (**Abbildung 1.4 F**). Liposomen werden entsprechend ihrer Größe und dahingehend, ob sie unilamellar oder multilamellar sind, eingeteilt. Multilamellare Vesikel haben den Nachteil, dass sie bezüglich der zugänglichen Lipidmenge nicht definierbar sind. Unilamellare Vesikel können in kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*— SUVs) mit Durchmessern bis zu 100 nm, große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*— LUVs) mit Durchmessern größer als 100 nm und sehr große unilamellare Vesikel (*giant unilamellar vesicles*— GUVs) mit Durchmessern größer als 1 µm eingeteilt werden (Storm *et al.*, 1998). Zunächst werden die SUVs und LUVs beschrieben und im folgenden Abschnitt die GUVs. Abhängig von der Größe der Vesikel ist die

Membran unterschiedlich stark gekrümmt. Sie haben ein inneres und äußeres Milieu. Liposomen sind leicht herzustellen und können mit verschiedenen Methoden analysiert werden. An Vesikeln sind beispielsweise Bindungs- und Transportstudien möglich (Harlan *et al.*, 1994; Matsuoka *et al.*, 1998). Aufgrund ihrer Größe sind sie geeignet für Lichtstreuungsexperimente (Futai *et al.*, 2004) und, wenn die Interaktion von Liposomen mit Proteinen beobachtet werden soll, für Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) (Kruger *et al.*, 2017) oder Anisotropiemessungen (Zigoneanu *et al.*, 2012). Aufgrund ihrer geringen Größe sind bildgebende Mikroskopie-basierte Methoden nur schwierig anzuwenden.

Für lichtmikroskopische Studien eignen sich sehr große unilamellare Vesikel (*giant unilamellar vesicles* **GUVs**). Diese weisen einen Durchmesser größer als 1 µm auf. GUVs haben als Membranmodell viele Vorteile: (1) Die Lipidzusammensetzung kann mit wenigen Beschränkungen bezüglich geladener Lipide frei gewählt werden (Akashi *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2008). (2) Sie zeichnen sich durch ein inneres und äußeres Milieu—wie auch Organellen—aus. Dies ermöglicht beispielsweise Transportstudien (Aimon *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). (3) Die Membranspannung kann durch osmotisch aktive Substanzen moduliert werden. So sind Studien zur bevorzugten Bindung von Proteinen an unterschiedlich stark gespannten Membranen möglich (Arumugam *et al.*, 2012). (4) Der große Durchmesser der GUVs führt dazu, dass, wenn man sich auf einen kleinen Bereich beschränkt, diese quasiplanar sind. So können Diffusionsmessungen von Lipiden und Proteinen durch Methoden wie die Regeneration von Fluoreszenz nach Photobleichen (FRAP) (Aimon *et al.*, 2014; Garcia-Saez *et al.*, 2010) oder FCS (Bacia *et al.*, 2004b; Garcia-Saez *et al.*, 2010) durchgeführt werden. (5) Die Umgebung von GUVs lässt sich unter Berücksichtigung des osmotischen Drucks durch Pufferwechsel oder Zugabe von Proteinen flexibel verändern. So können fluoreszenzmarkierte Proteine hinzugefügt werden, um so komplexe Vorgänge wie die Rekrutierung des COPII-Proteinmantels zu beobachten (Bacia *et al.*, 2011; Daum *et al.*, 2014). Problematisch bei GUV-basierten Studien ist, dass die Rekonstitution von Proteinen in die Membran schwierig und in ihrer Anzahl begrenzt ist. Die Einbaurichtung von Proteinen ist nur schwierig zu kontrollieren und je nach den Eigenschaften des Proteins aufwendig zu bestimmen. GUVs werden meist durch Elektroformation hergestellt, bei der es zur Oxidation der eingesetzten Lipide kommen kann, sodass die eingesetzte Lipidmischung von der finalen Lipidmischung des GUVs abweichen kann (Morales-Pennington *et al.*, 2010).

Im Allgemeinen ist die Arbeit mit Lipiden in flüchtigen Lösungsmitteln schwierig, da eine Konzentrationszunahme durch das verdunstende Lösungsmittel berücksichtigt werden muss. Dies gilt für alle auf synthetischen bzw. isolierten Lipiden basierenden Modellsysteme.

Die auf artifiziellen Membranmodellen basierenden Anwendungen haben den Vorteil der vereinfachten Handhabbarkeit und Reproduzierbarkeit. Allerdings werden wichtige Aspekte wie die

komplexe Lipid- und Proteinzusammensetzung sowie die Membranasymmetrie wie sie in der Zelle vorliegen nicht oder nur in Ansätzen berücksichtigt. Die perfekte Nachahmung einer komplexen Membran ist kaum möglich. Eine Kombination aus natürlichen Membranen und der GUV-Modellmembran, wie im Fall der *giant plasma membrane vesicles (GPMVs)*, kann die Lücke zwischen *in vivo* und *in vitro* Daten überbrücken (Czogalla *et al.*, 2014). GPMVs werden aus der Plasmamembran von Zellen gebildet. Sie bestehen aus der natürlichen, komplexen Membran, haben aber alle oben aufgeführten Vorteile des Modellsystems GUV.

1.3 Grundlagen zur Mikroskopie

Die Mikroskopie ermöglicht es, für das menschliche Auge nicht auflösbare Strukturen sichtbar zu machen. Neben der Vergrößerung von Objekten durch Linsen spielen auch die Kontrastierung und die Auflösung eine Rolle. Hier sollen einige Grundlagen der Optik sowie die in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopie-Techniken und eine damit verwandte Methode die Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie (FCS) vorgestellt werden.

1.3.1 Einige Grundlagen der Optik

Die Lichtmikroskopie basiert auf der Vergrößerung eines Objektes mit Hilfe von Linsen, die durch die geometrische Optik theoretisch beschrieben werden kann. Ein einfacher Grundtyp des Lichtmikroskops setzt sich aus der Objektivlinse und der Linse des Okulars zusammen. Der Abstand zwischen dem Objektiv und dem Objekt muss in diesem Fall zwischen dem einfachen und dem zweifachen Wert der Brennweite der Linse liegen. Dann führt die Objektivlinse zu einem vergrößerten reellen Zwischenbild und die Linse des Okulars gefolgt von der Linse des Auges führt zu einem reellen vergrößerten Bild auf der Netzhaut (Quercioli, 2011). Im Falle eines modernen einfachen Hellfeldmikroskops wird sich zu Nutze gemacht, dass, wenn das Objekt in der Brennebene liegt, hinter der Objektivlinse ein Unendlichkeitsraum entsteht. Hier verlaufen die Lichtstrahlen parallel zueinander. Folglich wird eine weitere Linse benötigt, die die parallelen Strahlen wieder bündelt. Dies wird durch die Tubuslinse realisiert, die das vergrößerte reelle Zwischenbild generiert (**Abbildung 1.5**). Der Unendlichkeitsraum ermöglicht, dass beispielsweise ein Farbfilter oder andere planparallele optische Elemente eingebaut werden können, ohne einen schlechten Einfluss auf das entstehende Bild zu nehmen (Murphy, 2001; Quercioli, 2011). Durch das Okular gelangt das Licht weiter zum Auge, wo ein reelles Bild entsteht.

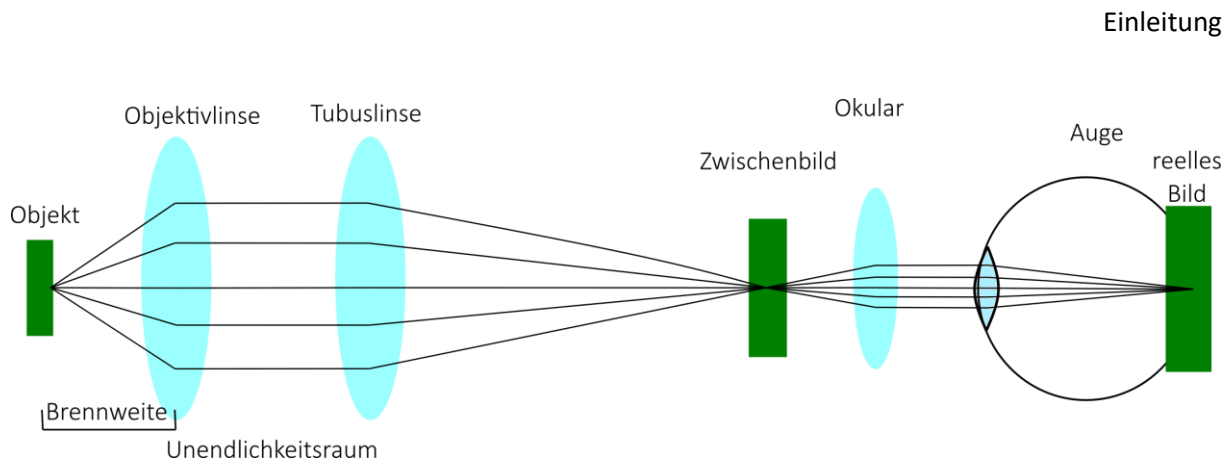


Abbildung 1.5: Detektionsstrahlengang eines einfachen Hellfeldmikroskops. Vom möglichst gleichmäßig ausgeleuchteten Objekt wird das Licht durch die Objektivlinse und die Tubuslinse so gebrochen, dass ein vergrößertes Zwischenbild entsteht, das durch das Okular zum Auge gelangt, wo ein reelles vergrößertes Bild wahrgenommen wird. Zwischen Objektivlinse und Tubuslinse entsteht ein Unendlichkeitsraum. Abbildung adaptiert nach Franco Quercioli (Quercioli, 2011).

Neben der geometrischen Optik muss für das Verständnis der Bildentstehung auch ein weiterer Effekt berücksichtigt werden: Licht ist eine elektromagnetische Welle. Eine für die Mikroskopie wichtige Eigenschaft von Wellen ist die Beugung. Trifft Licht auf einen kleinen Spalt, dessen Größe in der Größenordnung der Wellenlänge des Lichtes liegt, dann tritt hinter diesem Spalt ein Beugungsmuster aus hellen und dunklen Bereichen auf. Dieses entsteht durch die Interferenz der Wellen. Aufgrund der Beugung des Lichtes ist eine unendliche, räumliche Auflösung, also die Abbildung eines Punktes getrennt von einem anderen, bei einer Abbildung durch Linsen nicht möglich. So entwickelte Ernst Karl Abbe im 19. Jahrhundert basierend auf Experimenten an Beugungsgittern die Theorie zur Auflösungsgrenze d . Für den Fall der Köhlerschen Beleuchtung mit einem Kondensator mit der gleichen numerischen Apertur wie die des Objektivs gilt:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha)} \quad (1.1)$$

Die Auflösung ist also abhängig von der Wellenlänge λ des eingestrahnten Lichtes, dem Brechungsindex n des umgebenden Mediums, durch das sich die Welle bewegt, und dem Sinus des Öffnungswinkels α des Objektivs (Formel 1.1) (Abbe, 1873). Durch neu entwickelte Hochauflösungsmikroskopietechniken, wie zum Beispiel die *stimulated emission depletion* (STED) Mikroskopie (Hell, 2007), kann heute eine höhere Auflösung, als durch die Abbesche Theorie vorhergesagt wird, erreicht werden.

1.3.2 Differentieller Interferenzkontrast

In der Hellfeldmikroskopie ist es häufig notwendig, Kontrast durch Einfärben einer für das menschliche Auge einheitlichen Probe einzuführen. Durch technische Weiterentwicklungen und der Anwendung der Welleneigenschaften von Licht kann auch ohne Einfärben der Probe ein kontrastreiches Bild erzielt werden, sodass die Probe unverändert und in ihrem natürlichen Zustand belassen werden kann.

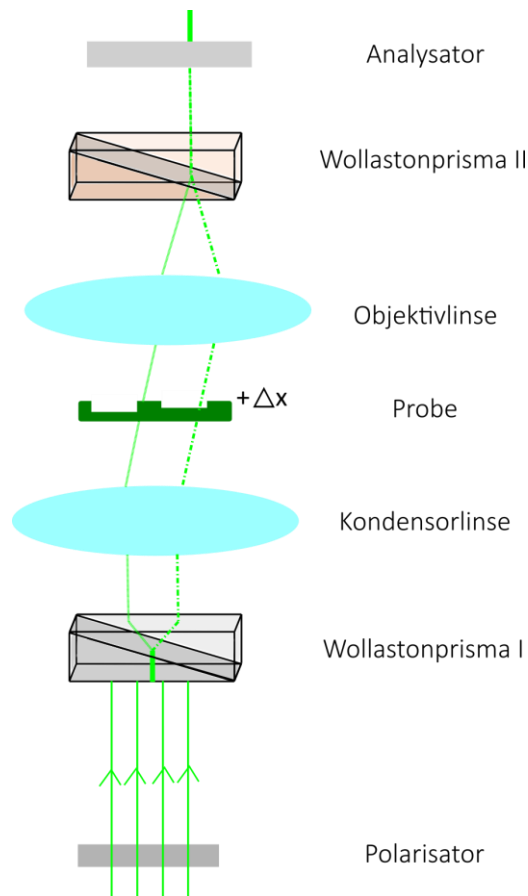


Abbildung 1.6: Darstellung der optischen Komponenten, die für den differentiellen Interferenzkontrast benötigt werden. Unpolarisiertes Licht wird durch den Polarisator bezüglich seiner Polarisation vereinheitlicht und trifft so auf das erste modifizierte Wollastonprisma, wo das Lichtbündel geteilt wird und unterschiedlich polarisiert über die Kondensorlinse in die Probe gelangt. Dort entsteht ein Gangunterschied ($+\Delta x$) aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Probe. Die resultierenden Strahlen gelangen über das zweite modifizierte Wollastonprisma, wo die Strahlen wieder gebündelt werden, zum Analysator (Abbildung adaptiert nach (Murphy, 2001)).

Basierend auf der Phasenkontrastmikroskopie wurde der differentielle Interferenzkontrast (DIC) entwickelt (Nomarski, 1955).

Bei dieser Mikroskopievariante (**Abbildung 1.6**) wird Licht mit Hilfe eines Polarisationsfilters, dem Polarisator, einheitlich polarisiert. Dieses Licht wird in einem Wollastonprisma in zwei Strahlen geteilt, die senkrecht zueinander polarisiert sind. Diese werden über die Kondensorlinse in die Probe geleitet. Die beiden senkrecht zueinander polarisierten Strahlen gelangen räumlich leicht versetzt in die Probe, dabei ist der Versatz kleiner als eine Airy-Einheit (Schiller *et al.*, 2011). So treffen die Strahlen auf unterschiedliche Bereiche der Probe, die sich bezüglich der Dicke und dem Brechungsindex unterscheiden können. Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit verschiedener Bereiche der Probe resultiert ein Gangunterschied Δx . Die Strahlen gelangen über die Objektivlinse in das zweite Wollastonprisma, in dem sie wieder vereint werden. Es kommt zur Interferenz, also der Überlagerung der beiden Teilwellen und eine Welle einer neuen Polarisation entsteht. Diese trifft auf den zweiten Polarisationsfilter, dem Analysator (Murphy, 2001). Es resultiert ein Bild mit Helligkeitsunterschieden

auf der Grauskala. Die reliefartige Darstellung spiegelt dabei die Effekte der unterschiedlichen Dicke und der unterschiedlichen Brechungsindices der Probe wider (Hoppert, 2003). Daher sind insbesondere Kanten, bei denen die Dicke und der Brechungsindex des Objektes stark von den benachbarten Bereichen abweichen, deutlich dargestellt.

1.3.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Eine weitere Variante der Lichtmikroskopie ist die Fluoreszenzmikroskopie. Für diese Methode wird der photophysikalische Effekt der Fluoreszenz genutzt. Fluoreszierende Proteinproben sind durch Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen über eine chemische Reaktion oder durch eine genetische Kopplung mit fluoreszierenden Proteinen zugänglich. Ein Beispiel für ein fluoreszierendes Protein ist das grünfluoreszierende Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962). Fluoreszenz entsteht, wenn Elektronen von Fluoreszenzfarbstoffen durch eingestrahktes Licht einer spezifischen Wellenlänge vom Grundzustand (S_0) auf ein höheres Energieniveau (S_1) angehoben werden (**Abbildung 1.7 A**). Die aufgenommene Energie kann in Form von Fluoreszenz, zur Anregungswellenlänge rotverschobenes Licht, oder strahlungslos unter Abgabe von Wärme emittiert werden. Neben der Abgabe von Energie in Form von Wärme und Fluoreszenz, kann es auch zu einer Interkombination (*intersystem crossing*) kommen, sodass der Fluorophor den Triplett-Zustand (T) einnimmt, der energetisch zwischen dem S_0 - und S_1 -Zustand liegt. Aus diesem Zustand gelangt das Molekül durch Phosphoreszenz oder strahlungslos zurück in den Grundzustand.

Fluoreszenz birgt für die Mikroskopie den Vorteil, dass ein fluoreszenzmarkiertes Objekt mit gutem Kontrast spezifisch darstellbar ist. Der schematische, beispielhafte Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops (epi – auf, darüber; bezieht sich hier auf die Belichtung von oben) ist in **Abbildung 1.7 B** dargestellt. Der Fluorophor soll bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Dazu wird der entsprechende Wellenlängenbereich zur Anregung durch den Anregungsfilter herausgefiltert und von einem dichroitischen Spiegel in die Probe reflektiert. Bei dem dichroitischen Spiegel in **Abbildung 1.7 B** handelt es sich um einen Langpassfilter, der kurze Wellenlängen reflektiert und lange weiterleitet. Das nach Anregung in der Probe resultierende rotverschobene emittierte Licht gelangt wiederum zum dichroitischen Spiegel, wird dort weitergeleitet und gelangt über einen Emissionsfilter zum Detektor **Abbildung 1.7 B**. Die Aufgabe des Emissionsfilters, auch Sperrfilter genannt, ist es, Licht von Wellenlängen kleiner oder größer als der Fluoreszenz herauszufiltern, um das Fluoreszenzsignal spezifisch zu erfassen (Murphy, 2001). Für die Weitfeldfluoreszenzmikroskopie oder die nachfolgend beschriebene *Spinning Disc*-Mikroskopie (SD) eignen sich Flächendetektoren, wie *charge coupled devices* (CCD) Kameras. Für Mikroskopiemethoden wie die konfokale *Laser-Scanning-*

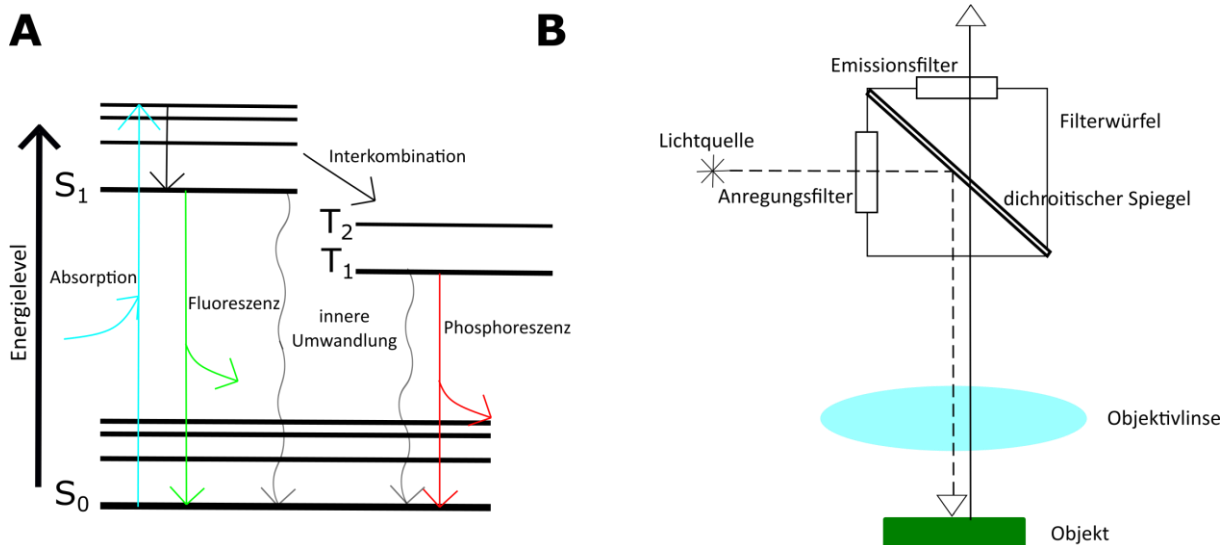


Abbildung 1.7: Fluoreszenzmikroskopie. **(A)** Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Darstellung der Entstehung von Fluoreszenz. Ein Molekül im Grundzustand S_0 wird bei einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Durch Absorption des eingestrahnten Lichtes werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau in den S_1 -Zustand angehoben (türkis). Beim Zurückkehren in den S_0 -Zustand wird Energie in Form von Fluoreszenz freigesetzt (grün). Es kann aber auch zur Interkombination (intersystem crossing) vom S_1 zum Triplett-Zustand (T_1 und T_2) kommen. In diesem Fall wird die bei der Umwandlung von T_1 zu S_0 freiwerdende Energie in Form von Phosphoreszenz (rot) bzw. strahlungslos (grau) freigesetzt. **(B)** Beispielhafter Strahlengang eines Epifluoreszenzmikroskops mit Filterwürfel. Der Anregungsstrahl (gestrichelte Linie) wird durch den Anregungsfilter geleitet und vom dichroitischen Spiegel (hier ein Langpassfilter) reflektiert. Das Anregungslicht einer spezifischen Wellenlänge beziehungsweise eines kleinen Wellenlängenbereichs gelangt über die Objektivlinse in die Probe und die dort resultierende emittierte Fluoreszenz (durchgezogene Linie) gelangt zunächst über den gleichen Weg durch die Objektivlinse zum dichroitischen Spiegel. Die Fluoreszenz weist eine höhere Wellenlänge auf als das Anregungslicht und wird daher vom dichroitischen Spiegel (Langpassfilter) zum Emissionsfilter durchgelassen. Abbildung adaptiert nach (Murphy, 2001).

Mikroskopie eignen sich Punktdetektoren, wie z.B. *Photomultiplier Tubes* (PMTs), sehr sensitive *avalanche photodiodes* (APDs) oder Hybriddetektoren mit Galliumarsenphosphid (GaAsP)-Photokathoden.

Um die Auflösung in axialer Richtung zu verbessern, wird bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopen das konfokale Prinzip angewendet. Konfokal ist ein Aufbau dann, wenn er mit Hilfe einer Lochblende (Englisch: *pinhole*) im wesentlichen nur Licht der fokussierten Ebene zum Detektor leitet und Licht aus anderen Ebenen vom Detektor abschirmt (**Abbildung 1.8 A**) (Fine, 2011). Mikroskope, die das konfokale Prinzip anwenden, sind z.B. das *Spinning Disc* (SD)- und das *Laser-Scanning-Mikroskop* (LSM).

Im Falle eines **SD-Mikroskops** wird das konfokale Prinzip durch eine Nipkow-Scheibe umgesetzt. Laserlicht oder Licht einer Bogenentladungslampe der entsprechenden Wellenlänge wird in die Probe eingestrahlt. Zunächst wird das Licht auf eine Nipkow-Scheibe geleitet. Die in dieser Arbeit verwendete CSU-X1 Einheit von Yokogawa hat 20.000 Linsen mit einem Durchmesser von $50 \mu\text{m}$, die in um 30° versetzte archimedischen Spiralen angeordnet sind (**Abbildung 1.8 B**). So entsteht ein multipler Lichtstrahl, der durch einen dichroitischen Spiegel geleitet wird, der Licht kleinerer Wellenlängen

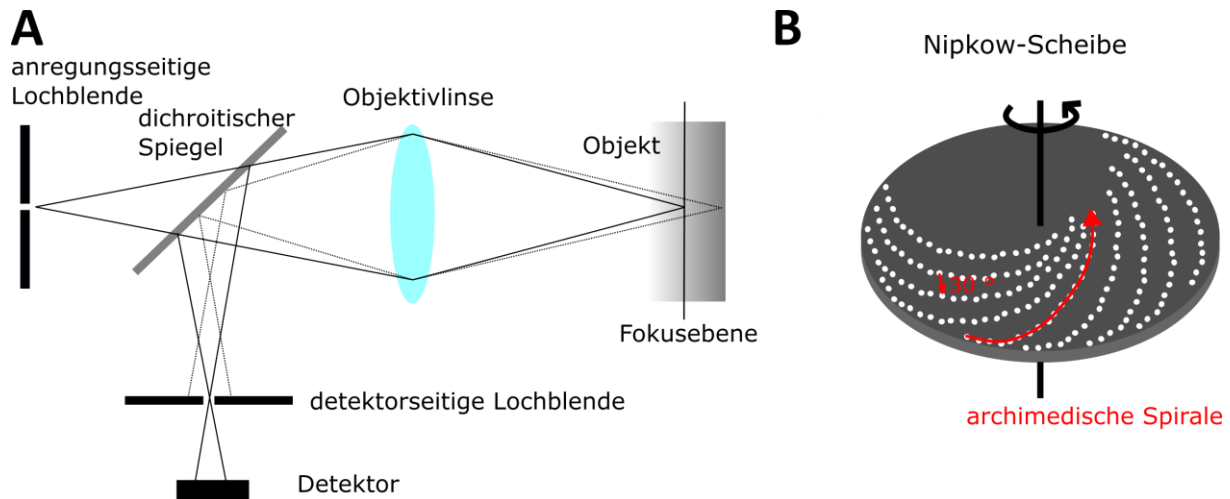


Abbildung 1.8: (A) Konfokales Prinzip. Licht wird über einen dichroitischen Spiegel und die Objektivlinse in die Probe gestrahlt. Die resultierende Fluoreszenz wird durch die Linse eingefangen und über den dichroitischen Spiegel zum Detektor gelenkt. Strahlen der Fokusebene werden durch die detektorseitige Lochblende zum Detektor gelassen. Strahlen anderer Ebenen werden von der detektorseitigen Lochblende abgeschirmt. Abbildung modifiziert nach Fine, 2011 (Fine, 2011). **(B)** zeigt eine Nipkow-Scheibe mit Linsen in Anordnung einer archimedischen Spirale, die jeweils um 30° versetzt sind.

durchlässt und Licht größerer Wellenlängen reflektiert (Kurzpassfilter). Dann treffen die Lichtbündel auf eine weitere synchronisierte Nipkow-Scheibe, die anstelle von Linsen Lochblenden aufweist. Von dort wird das Licht als vielfacher Anregungsstrahl in die Probe geleitet. Das resultierende Fluoreszenzsignal nimmt den gleichen Weg über das Objektiv und über die Lochblenden, um von dem dichroitischen Spiegel zur Tubuslinse und zum Detektor reflektiert zu werden. Die beiden Scheiben drehen sich dabei im Falle der CSU-X1 Einheit von Yokogawa mit 1.500-5.000 Umdrehungen pro Minute, sodass nur Teile der Probe für Bruchteile von Sekunden belichtet werden. Ist die Probe hell genug, kann eine hohe zeitliche Auflösung erreicht werden. Dieser Vorteil geht bei dunklen Proben verloren, da eine Verlangsamung der Scheiben, die notwendig ist, um die resultierende Fluoreszenz zu sammeln, mit einer Verschlechterung der zeitlichen Auflösung einhergeht. Durch die enge Anordnung der Lochblenden auf der Nipkow-Scheibe kann es dazu kommen, dass Licht tieferer Ebenen als der Fokusebene durch benachbarte Lochblenden gelangt und sich so die axiale Auflösung verschlechtert. Dieses Phänomen wird Lochblendenübersprechen genannt und kommt besonders bei sehr dicken Proben vor (Murphy, 2001; Toomre *et al.*).

Bei der **LSM-Technik** wird die Probe mit einem Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge abgerastert. Dieser Scanvorgang wird durch sich bewegende Scanspiegel realisiert. Diese bewegen den Laserstrahl Zeile um Zeile über die Probe und leiten das emittierte Licht über den dichroitischen Spiegel zum Detektor. Vor dem Detektor befindet sich eine einzelne detektorseitige Lochblende, die im Wesentlichen Fluoreszenzsignale der Fokusebene, nicht aber aus tieferen oder höheren Ebenen, zum Detektor durchlässt. Durch die einzelne detektorseitige Lochblende wird das oben beschriebene Lochblendenübersprechen vermieden. Die einzelnen Bildpunkte des Scans werden durch eine

Software zu einem Bild zusammengesetzt. Die zeitliche Auflösung hängt von der mit den Spiegeln erreichbaren Scangeschwindigkeit ab (Murphy, 2001).

1.3.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ermöglicht die Messung der Diffusion fluoreszierender Teilchen (Magde *et al.*, 1974). Dabei kann die technische Umsetzung von FCS-Messungen mit einem konfokalen LSM erfolgen. Die Verwendung eines LSM birgt den Vorteil, dass die Position der FCS-Messung in der Probe durch ein LSM-Bild dokumentiert werden kann. Für die eigentliche Messung wird ein Laser einer spezifischen Wellenlänge in die Probe gelenkt. Aufgrund der Lochblende entsteht ein Detektionsvolumen im Femtoliter-Maßstab (Rigler *et al.*, 1993). Die fluoreszierenden Partikel diffundieren in den Fokus, werden angeregt und geben ein Fluoreszenzsignal ab (**Abbildung 1.9 A und B**). Da das Fluoreszenzsignal von möglichst jedem fluoreszierenden Partikel detektiert werden soll, werden hoch sensitive Detektoren wie z.B. APDs eingesetzt (Rigler *et al.*, 1993), die auch einzelne Photonen detektieren können. Je nach Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel weisen die Partikel eine unterschiedliche Verweildauer im Fokus auf, was sich im fluktuierenden Fluoreszenzsignal niederschlägt (Magde *et al.*, 1974). Das Signal ist daher von der Diffusionsgeschwindigkeit eines fluoreszierenden Teilchens innerhalb des gegebenen Fokusvolumens abhängig (**Abbildung 1.9 C**). Um die Diffusionszeit durch den Fokus zu berechnen wird die Fluoreszenzintensität F üblicherweise mit der in Formel (1.2) definierten Gleichung korreliert (Magde *et al.*, 1972).

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1.2)$$

Dabei gilt für die Fluktuation der Fluoreszenzintensität:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (1.3),$$

wobei die Winkelklammern für die Bildung des zeitlichen Mittels der Fluoreszenzintensität stehen.

Durch die Korrelation in Formel (1.2) wird jedem τ , also jedem zeitlichen Abstand von dem ersten Zeitpunkt t , ein Wert für die Korrelationsfunktion $G(\tau)$ zugeordnet (**Abbildung 1.9 D**). Die nichtlineare Regression dieser Korrelationsfunktion kann zum Beispiel mit Formel (1.4) erfolgen, die eine dreidimensionalen Diffusion einer einzelnen Komponente ohne Berücksichtigung photophysikalischer Effekte beschreibt (Bacia *et al.*, 2003).

$$G(\tau) = \frac{1}{N_{eff}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{diff}} \right)^{-1/2} \tag{1.4}$$

Rot hervorgehoben ist der Ordinatenabschnitt, der dem reziproken Wert der Teilchenzahl im effektiven Fokusvolumen entspricht (N_{eff}). Es folgt ein Diffusionsterm (grün), der die Diffusion in lateraler Richtung berücksichtigt. Dabei wird die Diffusionszeit mit τ_{diff} beschrieben. Es schließt sich ein weiterer Diffusionsterm an (blau), der die Diffusion in axialer Richtung (z) beschreibt. Die axiale Richtung wird durch den Strukturparameter S berücksichtigt, der dem Verhältnis der axialen und der lateralen Ausdehnung des Fokusvolumens entspricht ($S=z_0/\omega_0$).

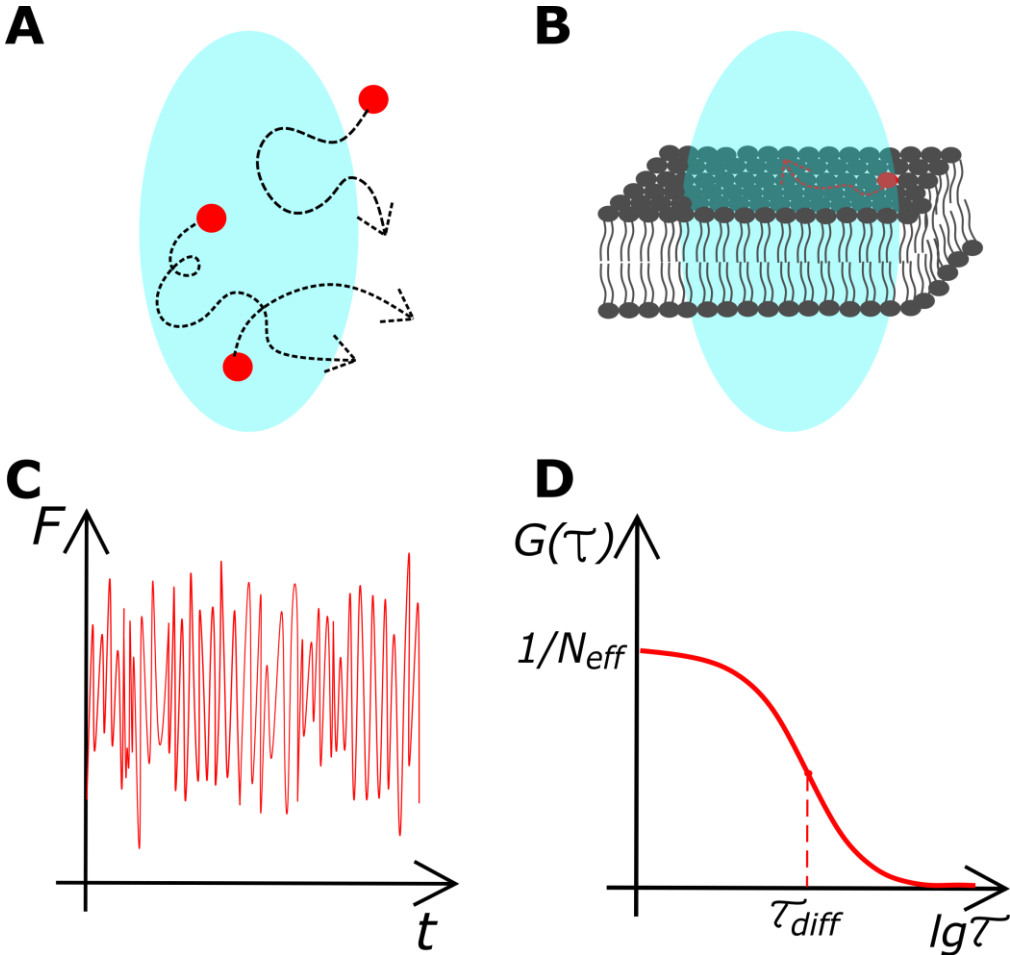


Abbildung 1.9: Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. **(A)** Schematische Darstellung der dreidimensionalen Diffusion fluoreszierender Teilchen in einem Fokusvolumen. **(B)** Schematische Darstellung zweidimensionaler Diffusion eines fluoreszierenden Moleküls in einer Lipiddoppelschicht innerhalb eines Fokusvolumens. **(C)** Schematische Darstellung einer Fluoreszenzintensität (F) in Abhängigkeit von der Zeit und **(D)** der Korrelationsfunktion $G(\tau)$. Der Achsenabschnitt auf der Ordinate entspricht dem reziproken Wert der Teilchenzahl (N_{eff}). Der τ -Wert, der dem halbmaximalen Wert der $G(\tau)$ -Kurve entspricht, ist ungefähr die Diffusionszeit (τ_{diff}).

Beobachtet man die Diffusion eines fluoreszierenden Teilchens in einer Membran, kann dieses Teilchen lediglich in der lateralen Ausrichtung des Fokus diffundieren, sodass der Term, der die Diffusion in der axialen Ausdehnung des Detektionsvolumens berücksichtigt, vernachlässigt werden kann (Bacia *et al.*, 2003).

$$G(\tau) = \frac{1}{N_{eff}} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}} \quad (1.5)$$

In die Fluoreszenzfluktuation gehen neben der gewünschten Teilchendiffusion auch photophysikalische Effekte der Fluorophore mit ein. Ein Beispiel für solche Effekte ist der Übergang eines Fluorophors in den Triplett-Zustand. „Blink“-Effekte dieser Art können durch weitere Terme in der nichtlinearen Regression berücksichtigt werden.

Aus der nichtlinearen Regression der Autokorrelationskurve kann neben der Teilchenzahl (N_{eff}) auch die Diffusionszeit (τ_{diff}) bestimmt werden. Ist der Radius des Fokus in xy-Richtung (ω_0) aus Kalibriermessungen bekannt, so kann der Diffusionskoeffizient berechnet werden (Formel (1.6)).

$$D = \frac{\omega_0^2}{4 \tau_{diff}} \quad (1.6)$$

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Eine Liste mit den verwendeten Geräten und deren Herstellern ist in Anhang A1 zu finden.

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterial

| Verbrauchsmaterial | Hersteller | Sitz des Herstellers |
|--|---------------------------|------------------------------------|
| 0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml und 2 ml Reaktionsgefäße | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| 15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße | Brand GmbH + Co KG | Wertheim, Deutschland |
| Glaskapillaren (Ringcaps) | Hirschmann | Eberstadt, Deutschland |
| Glasgefäße mit Schraubdeckeln (2 ml, 5 ml) | Whaeton, DWK lifesciences | Wertheim, Deutschland |
| ITO-Beschichtung von Deckgläsern | Delta Technologies Ltd. | Loveland, Colorado, USA |
| Kohlenstoff beschichtete Elektronenmikroskopiegrids (C-flat™, CF-212-3Cu-50) | Protochips Inc. | Raleigh, North Carolina, USA |
| Kupferband | 3M SPI supplies | West Chester, Pennsylvania, USA |
| Laborglas | Schott/ Brand | Mainz/ Wertheim, Deutschland |
| Nitrocellulose Membran: Amersham Protran 0.45 NC | GE Healthcare | Chalfont St. Giles, Großbritannien |
| Pipettenspitzen | Brand | Wertheim, Deutschland |
| PE Petrischalen | Greiner Bio-One | Stonehouse, Großbritannien |
| Plastikpipetten (3,5 ml) | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Serologische Pipetten | TPP | Trasadingen, Schweiz |
| UV-Küvetten Mikro | Brand GmbH + Co KG | Wertheim, Deutschland |
| Zentrifugalfilter (Amicon) | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Mikrotiterplatten (96 Kammern) | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet, aber nicht in **Tabelle 2.2** aufgeführt worden sind, wurden von der Carl Roth GmbH bezogen (s. **Tabelle A2**).

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien, die nicht von der Carl Roth GmbH bezogen wurden

| Chemikalie | Hersteller | Sitz des Herstellers |
|--|-------------------|----------------------------|
| Aniline blue solution | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Bradford Reagenz | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Brilliant Blau Coomassie G-250 | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor White M2R) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Quick Coomassie Stain | Serva | Heidelberg, Deutschland |
| dNTP-Mix | Life Technologies | Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Ficoll 400 | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |

| | | |
|--|-------------------|-----------------------------|
| Gelatine | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Guanosindiphosphat (GDP) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Guanosintriphosphat (GTP) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Leupeptin | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Malachitgrünes Oxalatsalz | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| <i>n</i> -Octylglucopyranosid (<i>n</i> -OG) | Glycon | Luckenwalde, Deutschland |
| OptiPrep (Iodixanollösung) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Pepstatin A | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Polyvinylalkohol (PVA) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Polyethylenglycol (PEG) 4000 | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Protease Inhibitor „complete EDTA free“ | Roche | Rotkreuz, Risch, Schweiz |
| <i>Salmon Sperm</i> Desoxyribonukleinsäure (DNA) | Life Technologies | Carlsbad, Kalifornien, USA |
| <i>Supplemental Dropout</i> | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Tween 20 | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| RapiGest | Waters | Milford, Massachusetts, USA |
| Xylencyanol FF | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |

2.1.3 Lipide und Lipidfarbstoffe

Die Lipide 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin (DOPS), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphat (DOPA), L- α -Phosphatidylinositol (PI), L- α -Phosphatidylinositol-4-phosphat aus Hirn vom Schwein (PIP), L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat aus Hirn vom Schwein (PIP₂), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-cytidindiphosphat (CDP-DAG) und der Lipidfarbstoff 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (Rhodamin-PE) wurden von der Firma Avanti Polar Lipids, Alabasta, Alabama, USA bezogen. MM1-43 (4-(E)-2-[4-(Dibutylamino)phenyl]vinyl-1-[3-(triethylammonio)propyl]pyridiniumdibromid) sowie MM4-64 (4-(Diethylamino)phenyl)-1,3,5-hexatrien-1-yl-1-[3-(triethylammonio)propyl]pyridiniumdibromid) von Abcam bezogen. Die Farbstoffe MM1-43 und MM4-64 sind auch bekannt als FM1-43 bzw. FM4-64.

2.1.4 Kits

Tabelle 2.3: Verwendete Kits

| Kit | Hersteller |
|--|----------------------------|
| <i>Cytochrome c Reductase Assay Kit</i> | Sigma Aldrich |
| <i>ECL Western Blotting substrate</i> | Thermo Fisher, Pierce |
| <i>InFusion Cloning Kit</i> | ClonTech/ TaKaRa |
| <i>In Gel purification Kit</i> | Peqlab Biotechnologie GmbH |
| <i>γ-Glutamyltransferase Activity Fluorometric Assay Kit</i> | Sigma Aldrich |
| <i>MiniPrep Kit</i> | Thermo Fisher Scientific |
| <i>Succinate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit</i> | BioVision |

2.1.5 Enzyme

Tabelle 2.4: Verwendete kommerziell erhältliche Enzyme

| Enzym | Hersteller | Sitz des Herstellers |
|----------------|--------------------------|-----------------------------|
| Apyrase | Sigma-Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| BamHI | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| Chitinase | Sigma-Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Dpnl | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| EcoRI | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| HindIII | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| Pfu-Polymerase | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| T4-DNA-Ligase | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| XhoI | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |

Die Enzyme von Thermo Fisher Scientific wurden mit entsprechenden Reaktionspuffern geliefert. Die Reaktionspuffer für die Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI, HindIII und XhoI sind der BamHI-Puffer und der Tango-Puffer. Der Reaktionspuffer für die T4-Ligase ist der T4-Ligase Reaktionspuffer mit Dithiothreitol (DTT) und für die Pfu-Polymerase der Pfu-Puffer mit 20 mM Magnesium.

2.1.6 Größenstandards und Fluoreszenzfarbstoffe

Es wurden nicht vorgefärbte und gefärbte Proteingrößenstandards von Thermo Scientific für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. AlexaFluor®488-C5-Maleinimid und SYBR™ Safe wurden von Invitrogen.

2.1.7 Verwendete Stämme und Vektoren

Tabelle 2.5: Verwendete Organismen und deren Genotyp

| Stamname | Organismus | Genotyp | Referenz/ Herkunft |
|----------|---|---|--|
| KBY1092 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -FY1679-01D | MAT α ; HIS3; LEU2; ura3-52; TRP1; GAL2 | Winston <i>et al.</i> , 1995 Euroscarf |
| KBY1139 | <i>S. cerevisiae</i> -BY4741 | MAT α ; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0 | Brachmann <i>et al.</i> , 1998 AG Breunig, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |
| | <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5 α | F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 hsdA1R17(<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻¹ | Invitrogen |
| | <i>E. coli</i> BL21(DE3) (T7 Expressionstamm) | F ⁻ <i>ompT</i> Δ <i>hsdS</i> (<i>r_S</i> ⁻ <i>m_S</i> ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^r <i>gal</i> (λ DE3) <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>argU</i> <i>proL</i> <i>Cam</i> ^r] [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> <i>Strep/Spec</i> ^r] | Agilent Technologies |
| | <i>E. coli</i> Rosetta | F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pRARE (<i>Cam</i> ^R) | Novagen |

| | | |
|------------------------|--|----------|
| <i>E. coli</i> Stellar | F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , $\Phi 80d$ <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , λ^- | Clontech |
|------------------------|--|----------|

Tabelle 2.6: Verwendete Vektoren

| Bezeichnung | Vektor | Insert | Resistenz | Selektionsmarker |
|-------------|-----------------|------------------------|-----------|------------------|
| V1072 | BG1805 | Sey1p-Tag | Amp | URA |
| V1073 | BG1805 | Sey1p | Amp | URA |
| V1077 | BG1805 | - | Amp | URA |
| V1078 | p413GAL1 | - | Amp | HIS |
| V1079 | p415GAL1 | - | Amp | LEU |
| V1080 | pWaldo | sfGFP | Kan | - |
| V1081 | pESC-TRP | mCherry-myc | Amp | TRP |
| V1082 | pOP95-15/pBR322 | Lyticase | Amp | TRP |
| V1083 | p413GAL1 | Sec12p-sfGFP | Amp | HIS |
| V1084 | p413GAL1 | Sec12p-sfGFP_A206K | Amp | HIS |
| V1085 | p415GAL1 | Bet1p-mCherry | Amp | LEU |
| V1086 | p415GAL1 | Emp24p | Amp | LEU |
| V1087 | p415GAL1 | mCherry-Emp24p | Amp | LEU |
| V1088 | p413GAL1 | sfGFP_A206K | Amp | HIS |
| V1089 | p415GAL1 | mCherry | Amp | LEU |
| V1090 | p413GAL1 | Bet1p-sfGFP_A206K | Amp | HIS |
| V1094 | pET21a+ | Bet1p-sfGFP_A206K-His6 | Amp | - |

Basierend auf den oben genannten Organismen und den aufgeführten Vektoren wurden die in **Tabelle 2.7** aufgeführten *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämme erzeugt.

Tabelle 2.7: *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämme, die in dieser Arbeit erzeugt wurden.

| Stamname | Organismus | Vektor | Insert |
|----------|-----------------------------|--------|------------------------------|
| KBB1133 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1073 | Sey1p |
| KBB1142 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1078 | - |
| KBB1143 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1079 | - |
| KBB1144 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1080 | sfGFP |
| KBB1145 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1081 | mCherry-myc |
| KBB1147 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1083 | Sec12p-sfGFP |
| KBB1148 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1084 | Sec12p-sfGFP_A206K |
| KBB1149 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1085 | Bet1p-mCherry |
| KBB1150 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1086 | Emp24p |
| KBB1157 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1087 | mCherry-Emp24p |
| KBB1159 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1088 | sfGFP_A206K |
| KBB1160 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1089 | mCherry |
| KBB1164 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1090 | Bet1p-sfGFP_A206K |
| KBB1170 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1094 | Bet1p-sfGFP-His ₆ |

| | | | |
|---------|---------------------------|---------------|--------------------------------|
| KBB1171 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | V1094 | Bet1p-sfGFP-His ₆ |
| KBY1151 | <i>S. cerevisiae</i> | V1077 | - |
| KBY1139 | <i>S. cerevisiae</i> | - | - |
| KBY1140 | <i>S. cerevisiae</i> | V1073 | Sey1p |
| KBY1152 | <i>S. cerevisiae</i> | V1072 | Sey1p-Tag |
| KBY1153 | <i>S. cerevisiae</i> | V1072 + V1084 | Sey1p-Tag + Sec12p-sfGFP_A206K |
| KBY1154 | <i>S. cerevisiae</i> | V1073 + V1084 | Sey1p + Sec12p-sfGFP_A206K |
| KBY1155 | <i>S. cerevisiae</i> | V1072 + V1085 | Sey1p-Tag + Bet1p-mCherry |
| KBY1156 | <i>S. cerevisiae</i> | V1073 + V1085 | Sey1p + Bet1p-mCherry |
| KBY1158 | <i>S. cerevisiae</i> | V1072 + V1087 | Sey1p-Tag + mCherry-Emp24p |
| KBY1161 | <i>S. cerevisiae</i> | V1073 + V1087 | Sey1p + mCherry-Emp24p |
| KBY1162 | <i>S. cerevisiae</i> | V1073 + V1088 | Sey1p + sfGFP_A206K |
| KBY1163 | <i>S. cerevisiae</i> | V1073 + V1089 | Sey1p + mCherry |
| KBY1165 | <i>S. cerevisiae</i> | V1073 + V1090 | Sey1p + Bet1p-sfGFP_A206K |

Tabelle 2.8: *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämme, die für die Proteinproduktion verwendet wurden.

| Stammsname | Organismus | Vektor | Insert | Antibiotikaresistenz/ Auxotrophiemarker |
|------------|-----------------------------|-----------------|-------------------------------------|--|
| KBB1012 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | V1003 | GST-Sar1p | Amp |
| KBB1023 | <i>E. coli</i> Rosetta | V1006 | Sec12p Δ C(1-354)-GST | Amp, Cam |
| KBB1034 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | V1020 | GST-Sar1p-H77L | Amp |
| KBB1060 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | V1029 | Bet1p-2C-GST | Amp |
| KBB1071 | <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | V1094 | Bet1p-sfGFP-His ₆ | Amp |
| KBB1146 | <i>E. coli</i> DH5 α | V1082 | Lyticase | Amp |
| KBY1011 | <i>S. cerevisiae</i> | V1013, V1014 | Sec23p, Sec24p-His ₆ | Amp/ LEU2, URA3 |
| KBY1047 | <i>S. cerevisiae</i> | V1011, V1025 | Sec13-His ₆ , Sec31 | Amp/ URA3, LEU2 |
| KBY1052 | <i>S. cerevisiae</i> | V1026, V1014 | Sec23pR722A/Sec24p-His ₆ | Amp/ LEU2, URA3 |

2.1.8 Verwendete Antikörper

Die Übersicht der verwendeten Antikörper ist in **Tabelle 2.9** dargestellt.

Tabelle 2.9: Verwendete Antikörper

| Antikörper | Bezugsquelle |
|--|---|
| Anti-Kex2 Protease Antikörper | Abcam |
| Anti-Sec61p, Antiserum aus Kaninchen | Prof. Martin Spieß, Biozentrum Universität Basel |
| Fibrillarin Antikörper | Antikoerper-online.de |
| IgG gegen Kaninchen gekoppelt mit Alexa647 | Abcam |
| IgG gegen Kaninchen gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase | Sigma Aldrich |
| IgG gegen Maus gekoppelt mit Alexa647 | Abcam |

| | |
|--|-------------------|
| IgG gegen Maus gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase | Sigma Aldrich |
| IgG gegen Ziege gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase | Sigma Aldrich |
| Natrium/Kalium ATPase Alpha1-Antikörper | Thermo scientific |

2.1.9 Software

Tabelle 2.10: Verwendete Software

| Software | Hersteller/ Quelle |
|-------------------------------------|---|
| Expsy Translate und Expsy Protparam | www.expsy.org, Swiss institute of Bioinformatics, Schweiz |
| ImageJ | https://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2016 |
| Microsoft Office | Microsoft, WA, USA |
| MaxQuant | www.maxquant.org, (Cox et al., 2014) |
| Origin2016 | Origin, Massachusetts, USA |
| SnapGene software | GSL Biotech LLC, Illinois, USA |
| T-coffee | http://tcoffee.crg.cat/, (Notredame et al., 2000) |
| ZEN blue 2011 und ZEN black 2009 | Zeiss, Jena |

2.1.10 Medien und Puffer

Puffer und Lösungen zur Herstellung chemokompetenter Zellen

| | |
|--|--|
| Chemokompetente Hefezellen: PLAG-Lösung, pH 7,5: 10 mM Tris-HCl 40 % (v/v) PEG 4000 0,1 M LiAc 1 mM EDTA 15 % (v/v) Glycerin pH-Wert wurde mit verdünnter Salzsäure eingestellt | Chemokompetente <i>E. coli</i> -Zellen: Mg ²⁺ /Ca ²⁺ -Lösung: 80 mM MgCl ₂ , 20 mM CaCl ₂ Ca ²⁺ -Lösung: 100 mM CaCl ₂ |
|--|--|

Medien

| | |
|--|--|
| <i>E. coli</i> -Anzucht: LB-Medium: 10 % (m/v) Pepton 5 % (m/v) Hefeextrakt 10 % (m/v) NaCl LB-Agarplatten: 10 % (m/v) Pepton 5 % (m/v) Hefeextrakt 10 % (m/v) NaCl 1,5 % (m/v) Agar SOC-Medium: 2 % (m/v) Pepton 0,5 % (m/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose | <i>S. cerevisiae</i> -Anzucht: Yeast extract, peptone, dextrose (YEPD)-Medium: 2 % (m/v) Pepton 1 % (m/v) Hefeextrakt 2 % (m/v) Glukose Selektivmedium: 0,67 % (m/v) Hefe-Stickstoff-Basismedium 0,14 % (m/v) Drop Out Supplement 2 % (m/v) Raffinose Zusätzlich: 0,2 ‰ (m/v) L-Trp 0,2 ‰ (m/v) L-His 1 ‰ (m/v) L-Leu je nach Auxotrophiemarker (s. Tabelle 2.7) wurden neben dem fehlenden Uracil (URA) auch L-Leu, L-His oder L-Trp weggelassen |
|--|--|

Tabelle 2.11: Mediumzusätze für *E. coli*-Anzuchten

| Antibiotikum | Stammlösung | Gelöst in | Finale Konzentration |
|-----------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| Ampicillin | 100 mg ml ⁻¹ | ddH ₂ O | 100 µg ml ⁻¹ |
| Chloramphenicol | 34 mg ml ⁻¹ | 50 % Ethanol reinst. | 34 µg ml ⁻¹ |

Puffer zur Agarosegelelektrophorese

| | |
|------------------|-----------------------------|
| TAE-Puffer: | Ladepuffer (6x): |
| 40 mM Tris | 30 % (v/v) Glycerin |
| 1 mM EDTA | 0,25 % (m/v) Bromphenolblau |
| 20 mM Essigsäure | 0,25 % (m/v) Xylencyanol FF |

Puffer für die SDS-PAGE

| | |
|--|--|
| SDS-Laufpuffer, ca. pH 8,3, nicht nachstellen: | Sammelgel (4,8 %): |
| 192 mM Glycin | 4,8 % (m/v) Rotiphereose Gel 30 |
| 25 mM Tris | 0,015 % (m/v) Tris |
| 3,5 mM Natriumlaurylsulfat (SDS) | 1 % (m/v) SDS |
| Trenngel (15 %): | 0,1 % (v/v) TEMED |
| 15,3 % (v/v) Rotiphereose Gel 30 | 0,23 ‰ (m/v) APS |
| 0,04 % (m/v) Tris | SDS-Probenpuffer (6x): |
| 1 % (m/v) SDS | 31 % (v/v) Sammelgelpuffer (s.o.) |
| 0,05 % (v/v) Tetramethylethylendiamin (TEMED) | 5,8 % (m/v) SDS |
| 0,23 ‰ (m/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) | 10 % Glycerin |
| Trenngel (12,5 %): | 0,01 % β -Mercaptoethanol (β -ME) |
| 12,7 % (v/v) Rotiphereose Gel 30 | eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau |
| 0,04 % (m/v) Tris | Coomassie-Färbelösung: |
| 1 % (m/v) SDS | 0,2 % (m/v) Coomassie R250 |
| 0,05 % (v/v) TEMED | 0,05 % (m/v) Coomassie G250 |
| 0,23 ‰ (m/v) APS | 10 % (v/v) Essigsäure (glazial) |
| Trenngel (10 %): | 30 % (v/v) Methanol |
| 10,2 % (v/v) Rotiphereose Gel 30 | 17,5 % (v/v) Ethanol (96 %, vergällt) |
| 0,04 % (m/v) Tris | Entfärbelösung: |
| 1 % (m/v) SDS | 10 % (v/v) Essigsäure (glazial) |
| 0,05 % (v/v) TEMED | 20 % (v/v) Ethanol (96 %, vergällt) |
| 0,23 ‰ (m/v) APS | |

Puffer für Western Blots

| | |
|---|--|
| Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween (PBS-T), pH 7,4: | Transferpuffer, pH ca. 8,3, pH wird nicht eingestellt: |
| 1,76 mM KH_2PO_4 | 192 mM Glyzin |
| 10 mM Na_2HPO_4 | 25 mM Tris Base |
| 2,7 mM KCl | 0,1 % (m/v) SDS |
| 137 mM NaCl | 10 % (v/v) Methanol |
| 0,02 % (v/v) Tween20 | Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung: |
| Milchpulver-Lösung: | 3 % (m/v) BSA in PBS-T Puffer |
| 5 % (m/v) Milchpulver in PBS-T Puffer | |

Puffer für ProteinreinigungenSec23/24p-Reinigung

Sec23/24p-Lysepuffer, pH 7,4:

- 50 mM HEPES
- 750 mM KOAc
- 0,1 mM EGTA
- 10 % (v/v) Glycerin
- 250 mM Sorbitol

BII-Puffer, pH 6,3:

- 50 mM MES
- 750 mM KOAc
- 0,1 mM EGTA
- 10 % (v/v) Glycerin
- 250 mM Sorbitol
- 20 mM Imidazol

BIII-Puffer, pH 7,4:

- 50 mM HEPES
- 750 mM KOAc
- 0,1 mM EGTA
- 10 % (v/v) Glycerin
- 250 mM Sorbitol
- 20 mM Imidazol

Ni-Elutionspuffer, pH 7,4:

- 50 mM HEPES
- 750 mM KOAc
- 0,1 mM EGTA
- 10 % (v/v) Glycerin
- 250 mM Sorbitol
- 200 mM Imidazol

DEAE-Verdünnung, pH7,4:

- 50 mM HEPES
- 0,1 mM EGTA
- 10 % (v/v) Glycerin

DEAE-A-Puffer, pH 7,4:

- 50 mM HEPES
- 250 mM KOAc
- 0,1 mM EGTA
- 10 % (v/v) Glycerin

DEAE-B-Puffer, pH 7,4:

- 50 mM HEPES
- 1 M KOAc
- 0,1 mM EGTA
- 10 % (v/v) Glycerin

Sar1p und Sar1pH77L-Reinigung

TBS-Puffer, pH 7,4:

- 50 mM Tris
- 5 mM MgCl₂
- 150 mM NaCl
- 5 μM GDP

Thrombin cleavage buffer (TCB) mit GDP, pH 8,0:

- 25 mM Tris
- 250 mM KOAc
- 5 mM CaCl₂
- 5 mM MgCl₂
- 5 μM GDP

Sec12pΔC-Reinigung

Sec12p-Puffer, pH 8:

- 25 mM Tris Base
- 400 mM KCl
- 10 % (v/v) Glycerin

TCB-Puffer, pH 8,0:

- 25 mM Tris
- 250 mM KOAc
- 5 mM CaCl₂
- 5 mM MgCl₂

HKM-Puffer, pH 6,8:

- 20 mM HEPES
- 150 mM KOAc
- 1 mM MgCl₂

Lyticase-Reinigung

Waschpuffer I, pH 7,4:

- 25 mM Tris-HCl

Waschpuffer II, pH 7,4:

- 25 mM Tris-HCl
- 40 % (m/v) Saccharose

Resuspensionslösung:

- 0,5 mM MgSO₄

Lyticase-Aktivitätstest

Lyticase-Aktivitätstest-Puffer, pH 7,4:

- 50 mM Tris-HCl
- 40 mM β-ME

Die pH-Werte der Puffer für die Sec23/24p-Reinigung und der Sec12pΔC-Reinigung wurden mit einer Kaliumhydroxid-Lösung eingestellt und die pH-Werte der Tris-Puffer mit verdünnter Salzsäure.

Puffer für die Mikrosomen Präparation

| | |
|---|---|
| Solubilisierungspuffer I, pH 9,4: 10 mM DTT 100 mM Tris-HCl | Lysepuffer, pH 7,4: 0,1 M Sorbitol 20 mM HEPES 50 mM KOAc 2 mM EDTA 1 mM DTT 1 mM PMSF 0,7 µg/ml PepstatinA 0,5 µg/ml Leupeptin |
| Solubilisierungspuffer II, pH 7,4: 0,7 M Sorbitol 1,5 % (m/v) Pepton 0,75 % (m/v) Hefeextrakt 0,5 % (m/v) Glukose 10 mM Tris-HCl | |
| Vor Nutzung vervollständigen mit: 100 U ml ⁻¹ Lyticase, wenn erforderlich 0,5 U ml ⁻¹ Chitinase | <u>OptiPrep-Gradienten Lösungen</u> |
| Kissenlösung, pH 7,4 (eingestellt mit KOH): 0,8 M Saccharose 1,5 % (m/v) Ficoll 400 20 mM HEPES | Verdünnungspuffer, pH 7,4: 10 mM Tris-HCl 8,75 % (m/v) Sorbitol |
| B88-Puffer, pH 6,8: 20 mM HEPES 150 mM KOAc 5 mM MgAc 250 mM (m/v) Sorbitol | OptiPrep-Puffer, pH 7,4: 30 mM Tris-HCl 12,25 % (m/v) Sorbitol 40 % OptiPrep: 2 Teile OptiPrep Puffer 4 Teile OptiPrep Stammlösung (60 % (m/v) Iodixanol in ddH ₂ O) |

Die pH-Werte der Tris-Puffer wurden mit verdünnter Salzsäure und die pH-Werte der HEPES-Puffer mit einer Kaliumhydroxidlösung eingestellt.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der OptiPrep-Gradientenlösungen

| Lösung | V (40 % OptiPrep) [ml] | V (Verdünnungspuffer) [ml] |
|--------|------------------------|----------------------------|
| 25 % | 6,25 | 3,75 |
| 22,5 % | 5,625 | 4,375 |
| 21 % | 5,25 | 4,75 |
| 19 % | 4,75 | 5,25 |
| 18 % | 4,5 | 5,5 |
| 16 % | 4 | 6 |
| 14 % | 3,5 | 6,5 |
| 10 % | 2,5 | 7,5 |
| 5 % | 1,25 | 8,75 |
| 0 % | 0 | 10 |

HPLC-Laufpuffer, pH 6,3

| |
|--|
| HPLC-Laufpuffer 50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 8,7 10 mM Tetra- <i>n</i> -butylammoniumbromid 5 % Acetonitril |
|--|

Für alle Puffer wurde mit der Reinstwasseranlage GenPur (TKA, Thermo Fisher Scientific) hergestelltes doppelt entionisiertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten bzw. Plasmiden wurde die PCR verwendet. Primer wurden mit einer Länge von 18-27 bp konstruiert und wiesen eine Übereinstimmung von mindestens 15 bp mit der Zielsequenz auf. Weiterhin enthielten sie die entsprechende Schnittstelle für den Restriktionsverdau bzw. den Basenaustausch für die Mutagenese und einen Überhang von vier Basenpaaren. Dieser diente dazu, die Bindestellen für die Restriktionsenzyme zu generieren und gleichzeitig Einfluss auf die Schmelztemperatur der Primer zu nehmen, damit diese zwischen 50 °C und 68 °C lag. Für die Konstruktion von Primern für die InFusion-Klonierung wurden weitere Aspekte beachtet, die unter dem Punkt 2.2.1.4 beschrieben werden. Die Primersynthese wurde von *Eurofins genomics* (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die jeweiligen Primersequenzen sind jeweils bei der entsprechenden Klonierungsvariante aufgeführt.

Zusammensetzung des Mastermixes für 4 Reaktionen:

20 µl Pfu-Puffer 10-fach mit 20 mM MgSO₄

4 µl Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs): je 10 mM Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP)

8 µl Vorwärts-Primer (10 µg µl⁻¹)

8 µl Rückwärts-Primer (10 µg µl⁻¹)

8 µl Vektor mit Ziel-DNA (ca. 100 µg ml⁻¹)

2 µl Pfu-Polymerase

Ad 200 µl ddH₂O

→ für 4 x 50 µl Ansätze

Direkt nach dem Pipettieren wurde die PCR im PCR-Gerät peqSTAR (peqLab, Deutschland) mit der in **Tabelle 2.13** dargestellten Programmierung durchgeführt.

Tabelle 2.13: PCR-Zyklus

| Schritt | Dauer | Temperatur | Schritt |
|--|--------------|------------|--|
| 1 | 3 min | 95 °C | Initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge |
| 2 | 30 s | 95 °C | Denaturierung der DNA-Doppelstränge |
| 3 | 30 s | 55-62 °C | Anlagerung der Primer an die Zielsequenz. Test verschiedener Temperaturen, um die optimale Anlagerungstemperatur zu ermitteln. |
| 4 | 1 min/ 1 kbp | 72 °C | Amplifikation der Zielsequenz durch die Pfu-Polymerase |
| 35 Mal wiederholen ab Schritt 2 | | | |
| 5 | 10 min | 72 °C | Amplifikation aller nicht vollständig synthetisierter DNA-Fragmente |

2.2.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese (QuickChange PCR)

Durch ortsgerechte Mutagenese soll zum einen in den Sey1p-Tag kodierenden Vektor (V1072) ein Stopp-Codon „TGA“ hinter die Sey1p-kodierende Sequenz eingebracht werden (Primer s. **Tabelle 2.14**), sodass ein Sey1p ohne Tag entsteht. Zum anderen soll die DNA-Sequenz, kodierend für das superfaltende, grün fluoreszierende Protein (sfGFP), so verändert werden, dass sie an Position 206 der Proteinsequenz anstelle eines Alanins (A) ein Lysin (K) kodiert. Dies hat zum Ziel die Dimerisierung von GFP zu unterdrücken (Zacharias *et al.*, 2002). Für den Aminosäureaustausch in sfGFP wurden Primer entworfen, die in drei Schritten die Alanin-kodierende Sequenz „GCC“ in eine Lysin-kodierende Sequenz „AAG“ mutierten (**Tabelle 2.15**). Für die Mutagenese-PCR wurde das Programm in **Tabelle 2.13** dahingehend modifiziert, dass nur 20 anstelle 35 Wiederholungen des Zyklus stattfanden.

Direkt nach der PCR wurde die parentale, methylierte DNA durch DpnI abgebaut. Dazu wurden 5 µl PCR-Ansatz mit 0,5 µl DpnI (10 U µl⁻¹) gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden *E. coli* DH5α-Zellen mit dem Ansatz transformiert (s. Abschnitt 2.2.1.9).

Tabelle 2.14: Übersicht zu den für die Einbringung eines Stopp-Codons hinter die Sey1p-kodierende Sequenz verwendeten Primern. Das eingefügte Stopp-Codon ist hervorgehoben.

| Primer | Sequenz 5' → 3' |
|-----------------|--|
| Position | |
| Sey-Stopp-for | GCAAAAAGAAAAA TGA AACCCAGCTTTCT |
| Sey-Stopp-rev | AGAAAGCTGGGTTTCATTTTTCTTTTTGC |

Tabelle 2.15: Übersicht zu den für die Mutagenese von sfGFP_A206K verwendeten Primern. Die zu mutierende Base ist jeweils hervorgehoben.

| Primer | Sequenz 5' → 3' |
|----------------------|---|
| Position 2440 | |
| GFP_G2440A_for | CCTGTCGACACAATCT A CCCTTTTCGAAAGATCC |
| GFP_G2440A_rev | GGATCTTTTCGAAAGGGTAGATTGTGTCGACAGG |
| Position 2441 | |
| GFP_C2441A_for | CCTGTCGACACAATCT A CCCTTTTCGAAAGATCC |
| GFP_C2441A_rev | GGATCTTTTCGAAAGGTTAGATTGTGTCGACAGG |

| Poition 2442 | |
|----------------|------------------------------------|
| GFP_C2442G_for | CCTGTCGACACAATCTAAGCTTTTCGAAAGATCC |
| GFP_C2442G_rev | GGATCTTTTCGAAAGCTTAGATTGTGTCGACAGG |

2.2.1.3 Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Die Klonierung über Restriktionsschnittstellen ermöglichte DNA-Fragmente ortsspezifisch in einen Zielvektor mit entsprechenden Schnittstellen für Restriktionsenzyme einzubringen. Zunächst wurden die gewünschten DNA-Fragmente mittels PCR hergestellt. Dabei wurde berücksichtigt, dass ein Überhang mit Restriktionsschnittstellen entsteht. Die verwendeten Primer zur Herstellung von V1088 (p413GAL1_sfGFP_A206K), V1089 (p415GAL1-mCherry) und V1094 (pET21a+-Bet1p-sfGFP_A206K-His₆) sind in **Tabelle 2.16** aufgelistet. Die Vektoren p413GAL1 und p415GAL1 sowie die durch PCR hergestellten DNA-Fragmente kodierend für mCherry und sfGFP_A206K wurden mit BamHI und XhoI, in zweifachem Überschuss gegenüber BamHI, in BamHI-Puffer 1 h bei 37 °C verdaut. Die verdauten PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und isoliert (s. Abschnitt 2.2.1.5). Der Vektor pET21a+ sowie das PCR-Fragment Bet1p-sfGFP_A206K wurden mit EcoRI und HindIII in zweifachem Überschuss in 2 x Tango-Puffer ebenfalls 1 h bei 37 °C verdaut und über ein Agarosegel gereinigt. Für die Ligation der Vektoren mit den Fragmenten wurde die T4-Ligase verwendet. Dazu wurden 14 µl des verdauten PCR-Fragments und 3 µl des verdauten Vektors mit DTT-haltigem T4-Ligase-Puffer sowie 1 µl einer 5 U L⁻¹ Ligase-Lösung gemischt. Nachdem der Ligationsansatz 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurde, wurden chemokompetente *E. coli* DH5-α Zellen mit 5 bis 10 µl des Ansatzes transformiert (s. Abschnitt 2.2.1.9). Vektorkarten der Konstrukte sind im Anhang A2 zu finden.

Tabelle 2.16: Primer für die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten zur Klonierung über einen Restriktionsverdau

| Primer | Sequenz 5'→3' |
|--|-----------------------------|
| mCherry-myc-Konstrukt | |
| BamHI-mCherry-for | ATTCGGATCCATGGTGAGCAAGGGC |
| mCherry-rev-XhoI | ACGTCTCGAGTTACTCGAGGTCTTCTT |
| sfGFP_A206K | |
| BamHI-sfGFP-for | AGCTGGATCCATGAGCAAAGGAGAAGA |
| sfGFP-rev-XhoI | ACGTCTCGAGTCATTTGTAGAGCTCAT |
| Bet1p-sfGFP_A206K-His₆ | |
| EcoRI-Bet1p | ATCGGAATTCATGTCAAGTAGATTTGC |
| sfGFP_A206K_ohne Stopp-Codon-HindIII | ATGCAAGCTTTTTGTAGAGCTCATCCA |

2.2.1.4 InFusion-Klonierung

Mit der InFusion-Klonierung sollten Sec12p-sfGFP, Bet1p-mCherry und mCherry-Emp24p Konstrukte in Hefevektoren kloniert werden. Das Fluoreszenzprotein wurde jeweils an den Terminus konstruiert, der nicht an Protein-Proteininteraktionen beteiligt ist. Bei der Klonierung von Bet1p-mCherry (V1085) wurde ein Codon für ein Glycin als Abstandshalter zwischen Bet1p und dem Fluoreszenzprotein eingefügt. Im Fall von Emp24p (V1087) sollte das Fluoreszenzprotein am N-Terminus liegen. Ein Teil des N-Terminus dient als Signalsequenz für die Translokation ins ER und wird nach Einbau in die Membran abgespalten. Daher wurde die mCherry-Sequenz zwischen die Signalsequenz und die restliche Emp24p-Sequenz eingefügt.

Bei der InFusion-Klonierung wird die Rekombination ca. 15 bp langer homologer einzelsträngiger DNA-Überhänge von DNA-Doppelsträngen genutzt. Für die Amplifikation der DNA-Fragmente mittels PCR wurden Primer mit Unterstützung der SnapGene Software konstruiert. Die Primer wurden so konstruiert, dass diese am 5'-Ende eine Übereinstimmung von 15 bp mit der zukünftigen Nachbarsequenz und am 3'-Ende eine Übereinstimmung von ca. 10 bp mit der Zielgen-Sequenz beinhalten. Die Länge der übereinstimmenden 3'-Sequenz wurde so angepasst, dass die Schmelztemperaturen der Primer zwischen 55 °C und 68 °C lagen. Eine Übersicht der verwendeten Primer befindet sich in **Tabelle 2.17**. Für die Rekombination der homologen DNA-Bereiche wurde das InFusion *Cloning Kit* von TaKaRa verwendet. Es wurden Reaktionsansätze mit maximaler Menge von 200 ng DNA, mit einem maximalen Probenvolumen von 8 µl und molaren Verhältnissen von Vektor zu Fragment von 1 zu 2 bzw. bei zwei gleichzeitig einzubringenden Fragmenten von 1 zu 2 zu 2 pipettiert. Die verwendeten Vektoren p413GAL und p415GAL wurden mittels Restriktionsverdau mit BamHI und XhoI (s. Abschnitt 2.2.1.3) oder PCR (Primer s. **Tabelle 2.17**) linearisiert und die DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Sowohl Vektor als auch Fragment wurden über ein Agarosegel gereinigt und anschließend aus diesem isoliert (s. Abschnitt 2.2.1.5). Die Reaktionsansätze wurden mit 2 µl *HD-Enzyme-Premix* komplementiert und 30 min bei 50 °C inkubiert. Maximal 2,5 µl des für *E. coli*-Zellen an sich toxischen Reaktionsansatzes wurden in *E. coli* Stellar-Zellen transformiert. Nach Zugabe des Reaktionsansatzes wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Dem sich anschließenden Hitzeschock bei 42 °C für 45 s folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min, bevor die Zellen mit 500 µl SOC-Medium versetzt wurden. Nachdem die Zellen 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurden, wurden sie pelletiert und auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden antibiotischen Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Vektorkarten aller klonierten Konstrukte sind im Anhang A2 zu finden.

Tabelle 2.17: Primer für die über das InFusion-System hergestellten Konstrukte

| Primer | Sequenz 3' → 5' |
|--|---|
| Klonierung von Sec12p-sfGFP (V1083) | |
| Vektor-Sec12p-for | CGGATCCGGCATCGTCGATTTCTCTAAAGGTGCG |
| Sec12p-sfGFP | TAGAACTAGTGGATCATGAAGTTCGTTACAGCAAGCTACAA |
| S-sfGFP-for GFP | ACGATGCCGGATCCGAAAACCTGTACTTCCAG |
| sfGFP-Vektor | AATTACATGACTCGATCATTGTAGAGCTCATCCATGCCATGT |
| Klonierung von Bet1p-mCherry (V1085) | |
| Vektor-Bet1p | GGATTCTAGAACTAGTATGTCAAGTAGATTTGCAGGGGGA |
| Bet1p-Gly-mCherry | TCACCATGCCTGTAATCCATACCCAAAAAATAGCACGCC |
| mCherry-Gly-Bet1 | GGATTACAGGCATGGTGAGCAAGGGCGAG |
| mCherry-CT | ATGACTCGAGCCCCGGGTTACTCGAGGTCTTCTTCGGAAATCAACTTCT |
| Klonierung von mCherry-Emp24p | |
| InFusion-Klonierung zum Einbau von Emp24p in den p415GAL Vektor (V1086) | |
| Vektor-Emp-for | ATGACTCGAGCCCCGGGACTAGAGATGTGACCTCAAAGAATCTTCT |
| Emp-Vektor-rev | GGATTCTAGAACTAGTATGGCCTCATTTGCTACTAAGTTTGT |
| Primer zur Linearisierung | |
| Vektor rev | CATAATGTCCTTCTTCCAGCTTATGGCC |
| Vektor for | GGCGGACGCCGAGAAG |
| InFusion-Klonierung zur Einbringung von mCherry zwischen N-terminale Signalsequenz und kodierende Sequenz (V1087) | |
| EmpNT-mCherry | TTCTCGGCGTCCGCCATGGTGAGCAAGGGCG |
| mCherry-EmpCT | AAGAAGGACATTATGGAGGTCTTCTTCGGAAATCAACTTCTGT |

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese und Reinigung von DNA aus dem Agarosegel

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde 1 % (m/v) Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Um die Agarose-Konzentration nicht durch verdunstete Flüssigkeit zu verfälschen, wurde mit ddH₂O auf das Ausgangsvolumen der Agaroselösung aufgefüllt. Nachdem die Lösung auf etwa 50 °C abgekühlt war, wurde sie mit SYBR™ Safe DNA-Farbstoff in 10.000-facher Verdünnung versetzt und in die dafür vorgesehenen Kammern (Carl Roth GmbH, Deutschland) gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und 5-15 µl des Gemischs aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente anhand ihrer Größe erfolgte bei 120 V für 50 min. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Gel entweder mit einem FUJI Scanner LAS4000 mit Y515Di-Filterset gescannt oder auf einem UV-Transilluminator (Bioview von Biostep) betrachtet.

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurden die entsprechenden Banden mit dem Skalpell unter UV-Bestrahlung ausgeschnitten und mittels des Peqlab *Gel-Purification* Kit über Silica-Membranen nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde mit autoklaviertem ddH₂O eluiert.

2.2.1.6 Plasmidpreparation

Die Reinigung von Plasmiden aus 5 ml-Kulturen von *E. coli* DH5- α Zellen erfolgte nach Herstellerangaben (MiniPrep Kit, Thermo Scientific), wobei mit autoklaviertem ddH₂O eluiert wurde.

2.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) mit Standardprimern oder gezielt synthetisierten Primern, die komplementär zu einem zu sequenzierenden Sequenzbereich waren, durchgeführt.

2.2.1.8 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen

E. coli DH5 α -Zellen wurden auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Am Folgetag wurde eine 5 ml-Vorkultur mit einer Einzelkolonie von der Platte inokuliert und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit 1 ml der 5 ml-Vorkultur wurde die 100 ml Hauptkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,4-0,6 schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Alle weiteren Lösungen sowie Gefäße wurden bei 4 °C oder auf Eis vorgekühlt. Nachdem die Hauptkultur ca. 5 min auf Eis gekühlt wurde, erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation in zwei 50 ml-Reaktionsgefäßen bei 4 °C für 10 min bei 5.000 x g (Zentrifuge 5804R, Eppendorf). Die Zellpellets wurden vorsichtig in 15 ml kalter Mg²⁺/Ca²⁺-Lösung durch Schütteln gelöst und nach 30 min Inkubation auf Eis erneut bei 5.000 x g, 4 °C für 10 min pelletiert. Die Pellets wurden jeweils in 2 ml Ca²⁺-Lösung resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und vereinigt. Zu der Zellsuspension wurde 700 μ l kaltes, steriles Glycerin gegeben und gemischt. Aliquots à 100 μ l wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.9 Transformation chemokompetenter *E. coli* Zellen

100 μ l chemokompetente Zellen wurden 5 min auf Eis angetaut und mit 2-4 ng des zu transformierenden Vektors versetzt. Der Ansatz wurde zunächst 1 h auf Eis inkubiert, dann 90 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, anschließend ca. 3 min auf Eis gekühlt und dann mit 400 μ l LB-Medium für eine einstündige Inkubation bei 37 °C versetzt. Die Zellen wurden kurz bei 4.000 x g pelletiert (Heraeus Fresco21, Thermo Fisher). Das Zellpellet wurde in ca. 300 μ l des Überstandes gelöst und auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen, die mit dem entsprechenden Antibiotikum (s. **Tabelle 2.8** und **Tabelle 2.11**) versetzt worden war. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.10 Herstellung chemokompetenter Hefezellen

Chemokompetente Hefezellen wurden nach Akada *et al.*, 2000 hergestellt (Akada *et al.*, 2000). Das Protokoll wird hier kurz beschrieben: Über Nacht wurden 5 ml YEPD-Medium mit einer BY4741-Kolonie

inokuliert und als Vorkultur bei 30 °C schüttelnd angezogen. Eine 50 ml-Hauptkultur wurde mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 wachsen gelassen. Die Zellen wurden in einem 50 ml-Reaktionsgefäß bei 4.000 x g für 10 min bei 21 °C pelletiert (Zentrifuge 5804R, Eppendorf) und in 2 ml PLAG-Lösung resuspendiert. Es wurden 250 µl einer 10 mg ml⁻¹ konzentrierten *Salmon Sperm* DNA-Lösung als Träger-DNA hinzugefügt. Die chemokompetenten Hefezellen wurden als 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.11 Hefetransformation

Chemokompetente BY4741 Zellen wurden mit 2 ng Vektor-DNA versetzt und 45 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Es folgte der Hitzeschock für 30 min bei 42 °C und das anschließende Ausplattieren auf Selektivmedium-Agarplatten (entsprechend **Tabelle 2.6**). Die Platten wurden bei 30 °C für 2-4 Tage inkubiert.

2.2.1.12 Herstellung von Glycerinkulturen

Eine 5 ml-Kultur wurde mit einer Einzelkolonie der frisch transformierten *E. coli* oder *S. cerevisiae* Zellen in mit Antibiotikum versetztem LB-Medium bzw. in Hefeselektionsmedium inokuliert und über Nacht bei 37 °C bzw. 30 °C schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurden 5 ml frisches Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultiviert. 800 µl der Kultur wurden mit 200 µl sterilem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Anzucht verschiedener Organismen zur Plasmid- und Proteinproduktion

Für alle Anzuchten wurden die entsprechenden Kulturröhrchen, Glaskolben oder Schikanekolben zu etwa einem Drittel gefüllt.

E. coli DH5α-Zellen wurden zur Vermehrung von Plasmiden in 5 ml LB-Medium, das entsprechend der vermittelten Antibiotikaresistenz vervollständigt wurde, bei 37 °C schüttelnd angezogen.

Die Anzucht verschiedener *E. coli*-Stämme für die Proteinproduktion wird im Folgenden beschrieben, Abweichungen von diesem Protokoll sind im Abschnitt der entsprechenden Reinigung beschrieben. Aus einer Vorkultur wurde die Hauptkultur bestehend aus LB-Medium, das mit den entsprechenden Antibiotika vervollständigt war (**Tabelle 2.8**), zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Genexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert und erfolgte bei 37 °C schüttelnd für 4 h. Die Zellen wurden bei 4.000 x g, 15 min bei 4 °C geerntet (Beckman Coulter Avanti, J30i), in dem proteinspezifischen Aufschlusspuffer suspendiert (s. Abschnitt 2.2.3), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Sec23/24p-Produktion wurde der *S. cerevisiae*-Stamm KBY1011 zunächst auf einer Agarplatte (Selektivmedium, -URA, -L-Leu) ausplattiert und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Eine 100 ml-Vorkultur

(Selektivmedium, -URA, -L-Leu) wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und schüttelnd bei 30 °C über Nacht inkubiert. 14 Kolben à 1 L Selektivmedium (-URA, -L-Leu) wurden zu einer OD₆₀₀ von 0,01 angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-1 wurde die Genexpression mit 0,5 % (m/v) Galaktose induziert und die Temperatur auf 20 °C reduziert. Nach 12-14 h wurden die Zellen bei 4.000 x g, 4 °C für 15 min geerntet (Avanti J-30I, Beckman Coulter), in Sec23/24p-Lysepuffer zu 12 g pro 40 ml resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Anzucht der Hefestämme zur ER-Membran-Präparation ist im Abschnitt 2.2.7 beschrieben.

2.2.3 Proteinreinigungen

Die Überprüfung der Protein-Reinheit erfolgte in allen nachfolgend beschriebenen Reinigungen mittels SDS-Gelelektrophorese.

2.2.3.1 Sar1p und Sar1pH77L

Der Stamm KBB1012 zur Bildung von Sar1p und der Stamm KBB1034 zur Bildung von Sar1pH77L wurden wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben angezogen. Die Zellen wurden zur Lagerung in TBS-Puffer resuspendiert (ca. 12 g in 40 ml). Beide Proteine wurden als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionskonstrukte synthetisiert.

Für die Reinigung wurden 80 ml Zellsuspension in einem Wasserbad bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und mit 5 µM GDP vervollständigt. Zur Lyse der Zellwand wurde die Zellsuspension mit 1 mg ml⁻¹ Lysozym für 20 min auf Eis inkubiert und dann mittels French Press (A.P.V. Schröder GmbH) aufgeschlossen. Der Aufschlussprozess wurde mindestens dreimal wiederholt. Zelltrümmer wurden bei 20.000 x g, bei 4 °C für 1 h pelletiert (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Der Überstand wurde auf eine selbstgepackte 2 ml-Glutathion (GSH)-Agarose Tropfsäule, die nach Herstellerangaben vorbereitet und mit TBS-Puffer mit 5 µM GDP äquilibriert worden war, aufgetragen. Es folgten Waschschrte mit ca. 50 ml TBS-Puffer und ca. 20 ml TCB-Puffer, die jeweils mit 5 µM GDP vervollständigt waren. Zum Abspalten des GST-Tags wurde nach Einsinken des Restpuffers 2 ml TCB-Puffer mit 4 U Thrombin zum Säulenmaterial gegeben. Der Ansatz wurde in einem Überkopfschüttler (Grant instruments) 1 h bei RT inkubiert. Das gespaltene Sar1p bzw. Sar1pH77L wurde im Kühlraum mit TCB-Puffer eluiert und per Zentrifugalkonzentrator (Merck, Molekulargewichtsgrenzwert: 10 kDa) auf 5 ml aufkonzentriert. Die konzentrierte Sar1p bzw. Sar1pH77L Lösung wurde auf eine mit TCB-Puffer mit 5 µM GDP äquilibrierte Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex S75 16/600 pg (120 ml) (GE Healthcare) mit einer Flussrate von 1 ml pro Minute mittels des Äkta-Purifiersystems (GE Healthcare) aufgetragen. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt, mittels Zentrifugalfiltern aufkonzentriert (Zentrifugalfilter von Merck, Molekulargewichtsgrenzwert: 10 kDa), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Sec12p Δ C

KBB1023-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben angezogen und in 4 °C-kaltem Sec12-Puffer zu ca. 0,3 g ml⁻¹ resuspendiert.

Für eine Reinigung von Sec12p Δ C wurden 80 ml Zellsuspension in einem RT-Wasserbad aufgetaut und mit je einer Tablette *cOplete EDTA free* Protease Inhibitor sowie 20 μ l β -ME und 1 mg ml⁻¹ Lysozym vervollständigt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen, wie für Sar1p beschrieben, mittels French Press (A.P.V. Schröder GmbH) aufgeschlossen. Die Abtrennung von Zellfragmenten erfolgte bei 75.000 x g, 4 °C für 1 h (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Es folgte eine Affinitätschromatographie mit GSH-Säulenmaterial, das mit Sec12-Puffer äquilibriert wurde. Nach dem Auftragen des Lysats und dem Waschen mit Sec12-Puffer, wurde ein Pufferaustausch zu, für die Thrombinspaltung geeignetem, TCB-Puffer vorgenommen. Der Thrombinverdau sowie die Elution erfolgte wie für Sar1p beschrieben. Sec12p Δ C wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Sec23/24p

Für die Reinigung von Sec23/24p aus KBY1011 wurde die Zellsuspension (vgl. Abschnitt 2.2.2) der gesamten Anzucht (ca. 30 g feuchtes Zellpellet) im Wasserbad aufgetaut und mit einer Tablette *cOplete EDTA free* Protease Inhibitor vervollständigt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Kugelmühle (Bead-Beater, Biospec). Dazu wurde das Probengefäß zur Hälfte mit Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 1 mm und der Zellsuspension befüllt und dann mit Sec23/24p-Lysepuffer bis zur oberen Begrenzung aufgefüllt. Die Kammer wurde zusammengesetzt und mit einem Wasser/Eis/NaCl-Gemisch gekühlt. Der Aufschluss erfolgte in 5 Sequenzen aus 1 min Mixen und 2 min Pause. Der Überstand wurde abgenommen und die Glaskügelchen zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Der Waschpuffer wurde mit dem ersten Überstand vereint. Das Lysat wurde 10 min bei 4 °C und 20.000 x g zentrifugiert (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Der Überstand des ersten Zentrifugationsschritts wurde erneut für 1 h bei 4 °C und 100.000 x g zentrifugiert (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Der resultierende Überstand wurde bei 4 °C auf eine mit Lysepuffer äquilibrierte 5 ml-Ni-NTA HiLoad Säule (GE Healthcare) mit einem Fluss von 1 ml min⁻¹ aufgetragen (Äkta Purifier, GE Healthcare). Es erfolgten Waschschriffe mit BII-Puffer und BIII-Puffer. Die Elution erfolgte mit imidazolhaltigem Elutionspuffer. Das Eluat wurde auf 5 bis 10 ml aufkonzentriert (Zentrifugalfilter von Merck, Molekulargewichtsgrenzwert: 30 kDa) und mit DEAE-Verdünnungspuffer so verdünnt, dass eine finale KOAc-Konzentration von 250 mM erreicht wurde. Die Proteinlösung wurde bei RT auf eine mit DEAE-A-Puffer eingespülte DEAE-HiLoad Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Anschließend wurde mit 30 % DEAE-B-Puffer gewaschen und Sec23/24p bei 60 % DEAE-B-Puffer, d.h. einer KOAc-Konzentration von

700 mM, eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.4 Bet1p-2C und Sec13/31p

Bet1p-2C wurde als GST-Fusionskonstrukt produziert und mittels einer GSH-Affinitätschromatographie durch Dr. Sebastian Daum gereinigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (vergleiche Sar1p bzw. Sec12p Δ C, Abschnitte 2.2.3.1 und 2.2.3.2). Das Heterotetramer Sec13/31p wurde von Herrn Dr. Sebastian Daum nach Daum *et al.*, 2014 (Daum *et al.*, 2014) hergestellt und zur Nutzung in dieser Arbeit überlassen.

2.2.3.5 Bet1p-2C-Markierung mit Alexa488-C5 Maleinimid

Die Markierung von Bet1p-2C erfolgte über das zu diesem Zwecke eingeführte Cystein an Position 2 der Aminosäuresequenz. Ein 10-facher molarer Überschuss an Alexa488-C5 Maleinimid-Farbstoff wurde mit Bet1p-2C gemischt und 3 h bei RT inkubiert. Der freie Farbstoff wurde durch eine PD10 Säule (GE Healthcare), die zuvor mit HKM-Puffer mit 2 % (m/v) *n*-OG eingespült wurde, nach Herstellerangaben abgetrennt.

Die Analyse der Markierung erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese. Fluoreszierende Proteinbanden wurden zunächst mit dem FUJI-LAS4000 Gelscanner mit dem für GFP vorgesehenem Filtersatz 510DF10 sichtbar gemacht. Im Anschluss erfolgte die Anfärbung aller Proteine mittels Coomassie-Färbung. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Spektren von 260 bis 360 nm und von 430 bis 540 nm aufgenommen (s. Abschnitt 2.2.8.1).

2.2.3.6 Lyticase

Der Stamm KBB1146 bildet das zelltoxische Protein Lyticase periplasmatisch. Zur Anzucht wurde die Hauptkultur 1 zu 100 aus einer über Nacht angezogenen Vorkultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Die Genexpression wurde mit final 0,4 mM IPTG induziert und die Zellen für weitere 5 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Zur Zellernte wurde die Kultur 10 min bei 4.000 x g und 21 °C zentrifugiert (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Das Zellpellet wurde mit Waschpuffer I gewaschen. Das Pellet wurde erneut in Waschpuffer I mit 2 mM EDTA gelöst, sodass das finale Volumen 2 % des Volumens der Hauptkultur entsprach. Dann wurde soviel Waschpuffer II zugegeben, dass eine finale Saccharosekonzentration von 20 % (m/v) vorlag. Die Zellsuspension wurde bei 7.300 x g für 10 min pelletiert (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Der Überstand sowie der weniger feste Teil des Pellets wurden verworfen. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das weitestgehend von der Saccharose-haltigen Lösung befreite Zellpellet wurde für die osmotische Lyse in eiskalter Resuspensionslösung suspendiert. Dazu wurde die Hälfte des Volumens des zuvor verwendeten

Waschpuffer-Gemisches aus Waschpuffer I und II genutzt. Die Suspension wurde 20 min vorsichtig im Kühlraum auf Eis mit einem Magnetrührer gerührt und anschließend bei 10.000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Der Überstand enthielt die ins Periplasma sekretierte Lyticase. Dieser wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Analyse der Lyticase erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und einem Aktivitätstest.

2.2.4 Lyticase-Aktivitätstest

Zur Analyse der Aktivität der gereinigten Lyticase wurden Hefezellen in 5 ml Vollmedium als Vorkultur über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurde eine 25 ml-Hauptkultur zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Ernte erfolgte bei 3.000 x g für 5 min bei RT (Zentrifuge 5804R, Eppendorf). Das mit 25 ml ddH₂O gewaschene Pellet wurde zu einer OD₆₀₀ von 7,5 in 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 resuspendiert.

Für den Aktivitätstest wurden vier Ansätze des Mastermix bestehend aus 7,7 ml Lyticase-Aktivitätstest-Puffer und 320 µl Zellsuspension pipettiert. Es wurden viermal die gleichen Reihen pipettiert, bei denen sich die Reaktionsansätze aus 1 ml Mastermix und 0, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 µl Lyticase (100-fach in Lyticase-Aktivitäts-Puffer vorverdünnt) zusammensetzten. Die Ansätze wurden 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Messung der OD₆₀₀. Die Berechnung der Aktivität erfolgte wie in Shen *et al.*, 1991 beschrieben (Shen *et al.*, 1991). Dazu wurde die Abnahme der OD₆₀₀ prozentual berechnet. Eine *Unit* (U) des Umsatzes der Zellwand durch Lyticase wurde als 10 % der Abnahme des OD₆₀₀-Wertes pro 30 min definiert. Der Umsatz der hier erzeugten Lyticase betrug 80 U ml⁻¹.

2.2.5 Fluoreszenzmarkierung der Hefezellwand

Hefezellwände setzen sich aus verschiedenen Zuckerbestandteilen zusammen. Für die Fluoreszenzmarkierung von zwei verschiedenen Zellwandbestandteilen wurden 50 ml Hefemedium mit einer Einzelkolonie des zu untersuchenden Hefestammes KBY1139 bzw. KBY1140 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 30 °C angezogen. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation im 50 ml-Reaktionsgefäß für 30 s bei 1.000 x g und 21 °C (Zentrifuge 5804R, Eppendorf).

Für die Markierung der β-1,3-Glucane wurde das Pellet in 1 ml PBS-Puffer suspendiert und dreimal für 5 s bei 1 Watt mit Ultraschall behandelt (Ultraschallsonde von Vibracell, Bioblock Scientific). Die Zellen wurden dann 30 s bei 10.000 x g pelletiert und in 90 µl PBS und 10 µl Anilinblau gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden auf ein Deckgläschen pipettiert und am LSM (s. Abschnitt 2.2.18.5) bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm mit einem Bandpassfilter von 410-470 nm beobachtet.

Für die Markierung von Chitin wurden die Zellpellets in ddH₂O suspendiert und ebenfalls wie oben beschrieben mit Ultraschall behandelt. Die Zellen wurden in 100 µl einer *Calcofluor White* Lösung (*Fluorescence brightener* W2T) mit einer Konzentration von 1 mg ml⁻¹ suspendiert und 1 min bei RT

inkubiert. Danach wurde der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml ddH₂O entfernt, die Zellen final in 100 µl ddH₂O gelöst und auf ein Deckgläschen für die Mikroskopie pipettiert. Bilder wurden mittels LSM (s. Abschnitt 2.2.18.5) bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm mit einem Bandpassfilter von 410-470 nm aufgenommen.

2.2.6 Untersuchung des Zellwandverdaus mit Chitinase und Lyticase

Für die Untersuchung des Zellwandverdaus von Zellen, die zusätzlich artifiziell eingebrachte Gene exprimieren und auf Selektivmedium wachsen, wurde der oben beschriebene Lyticase-Aktivitätstest (s. Abschnitt 2.2.4) mit abweichenden Lyticase- bzw. Chitinase-mengen durchgeführt. Die Reihen setzten sich wie folgt zusammen: (i) 0, 1, 3, 5, 10, 20 µl Lyticase (1:100 verdünnt), (ii) 0, 1, 3, 5, 10, 20 µl einer Chitinase-Lösung mit 0,5 U ml⁻¹ und (iii) 0, 1, 3, 5, 10, 20 µl beider Enzyme.

2.2.7 Präparation von ER-Membranen

Die Präparation von ER-Membranen wurde mit einigen Veränderungen nach Wuestehube und Schekman (1992) durchgeführt. Im Rahmen der Arbeit wurden ER-Membranen aus Wildtyp (WT)-Zellen sowie aus Zellen isoliert, die entweder Sey1p oder eine Kombination aus Sey1p und Sec12p-sfGFP, Sey1p und Bet1p-mCherry, Sey1p und Bet1p-sfGFP oder Sey1p und mCherry-Emp24p bilden. Die verschiedenen Zelllinien wurden in mit jeweils 700 ml Medium gefüllten 2 L-Schikanekolben (Schott, Mainz) bei 30 °C schüttelnd zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 1 angezogen. Die Expression von Sey1p und den oben genannten Fusionskonstrukten wurde dann mit 0,5 % (m/v) Galaktose induziert. Nach 4-5 h bei 30 °C bzw. nach 12-15 h bei 20 °C wurden die Zellen bei 4.000 x g für 10 min bei 21 °C geerntet (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Für die Präparation von ER-Membranen aus WT-Zellen wurden diese bis zu einer OD₆₀₀ von 2-4 angezogen und wie beschrieben geerntet. Das Zellpellet wurde in Solubilisierungspuffer I zu einer OD₆₀₀ von 100 aufgenommen. Die Suspension wurde 10-60 min auf einem Taumelschüttler bei RT geschwenkt und erneut bei 1.000 x g und 21 °C für 10 min zentrifugiert (Avanti J-30I, Beckman Coulter).

Die äußere Zellwand der Zellen wurde mit Lyticase und Chitinase abgebaut und zellwandfreie Zellen, Sphäroplasten, wurden gebildet. Dazu wurde das Pellet zu einer OD₆₀₀ von 100 in Solubilisierungspuffer II gelöst und mit 20 U µl⁻¹ Lyticase und 0,5 U µl⁻¹ Chitinase vervollständigt und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. An dieser Stelle ist es wichtig, die angegebene OD₆₀₀ nicht zu überschreiten, da es sonst zu einer stark verringerten Ausbeute an Sphäroplasten kommt. Der Fortgang des Zellwandverdaus wurde anhand der OD₆₀₀ einer 1 zu 200 Verdünnung der Suspension in ddH₂O verfolgt, welche sich aufgrund des osmotischen Platzens der Sphäroplasten verändert. Dabei sank die OD₆₀₀ innerhalb von 1 bis 2 h um etwa 40-70 % des Ausgangswertes. Nach dem Verdau wurden die Sphäroplasten geerntet. Dazu wurden 5 bis 7 ml der Sphäroplasten-Suspension auf 7 ml

Kissenlösung geschichtet und 10 min bei 10.000 x g und 4 °C im JS24.15 Rotor (Avanti J-30I, Beckman Coulter) bei maximal möglicher Beschleunigungsstufe und Verzögerungsstufe zentrifugiert. Die Sphäroplasten wurden in Lysepuffer zu einer OD₆₀₀ von 100 resuspendiert, bezogen auf die OD₆₀₀ der Zellkultur bei der Ernte, und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder es wurde wie folgt weiterverfahren:

Die in Lysepuffer resuspendierten Sphäroplasten wurden im Kühlraum auf Eis langsam im Potter-Elvehjem Homogenisator mit 10 Zügen unter Verwendung des festen Pistills behandelt. Dann wurde das *low speed pellet* (LSP) durch Zentrifugation bei 4 °C, 4.000 x g für 10 min abgetrennt (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Um eine maximale Ausbeute an Organellmembranen zu erreichen, wurde das LSP erneut in der gleichen Menge Lysepuffer resuspendiert und wie oben beschrieben mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator behandelt und zentrifugiert. Die Überstände des ersten und zweiten LSPs wurden vereint und bei 27.000 x g und 4 °C zur Gewinnung des *high speed pellets* (HSP) zentrifugiert (Avanti J-30I, Beckman Coulter). Dieses wurde in so wenig Lysepuffer wie möglich, aber mindestens in 1 ml resuspendiert. Je 0,5 ml wurden auf einen Saccharosegradienten aus je 1 ml einer 1,5 M und 1,2 M Saccharoselösung in Lysepuffer aufgetragen. Der Saccharosegradient wurde 1 h bei 10.000 x g bei 4 °C, einer Beschleunigungsstufe von 5 und einer Verzögerungsstufe von 7 im MLS50 *Swingout* Rotor (Optima MAX-XP, Beckman Coulter) zentrifugiert. Die Schicht zwischen der 1,5 M und 1,2 M Saccharoselösung wird Mikrosomenfraktion genannt und enthält Mikrosomen, die reich an fragmentierten ER-Membranen sind. Diese wurden geerntet, in Lysepuffer verdünnt und 20 min bei 50.000 x g und 4 °C pelletiert. Anders als bei der Präparation nach Wuestehube und Schekman wurde das Pellet in 19 %iger OptiPrep-Lösung resuspendiert. OptiPrep enthält das Reagenz Iodixanol, das wiederum eine Dichtegradientenzentrifugation ermöglicht. Dazu wurde ein 10-schichtiger Gradient mit der in **Tabelle 2.18** angegebenen Zusammensetzung vorbereitet. Der Gradient wurde 3 h-14 h bei 150.000 x g, 4 °C und einer Beschleunigungsstufe von 5 und einer Verzögerungsstufe von 7 zentrifugiert. Die weiße Schicht auf Höhe der ursprünglichen 22 %-OptiPrep-Schicht wurde geerntet, in B88-Puffer verdünnt und 20 min bei 50.000 x g und 4 °C pelletiert. Das finale ER-Membranenthaltende Pellet wurde in B88-Puffer zu ca. 1 mg ml⁻¹ Membran solubilisiert. Die Gesamtproteinmenge der Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung des OptiPrep-Gradientens

| OptiPrep-Anteil | Volumen |
|-----------------|---------|
| 25 % | 300 µl |
| 22,5 % | 300 µl |
| 21 % | 400 µl |
| Membran in 19 % | 400 µl |
| 18% | 400 µl |
| 16 % | 400 µl |
| 14 % | 400 µl |
| 10 % | 300 µl |
| 5 % | 200 µl |
| 0 % | 200 µl |

2.2.8 Beurteilung der Reinigungsqualität von Proteinen und Organellmembranen

2.2.8.1 UV/Vis Spektroskopie

Zur Konzentrationsbestimmung und zur Bestimmung des Reinheitsgrades von Proteinen und Nukleinsäuren wurde mit dem *Multimode Microplate Reader Infinite® 200 PRO series* (Tecan) ein Absorptionsspektrum von 240 nm bis 360 nm aufgenommen. Für AlexaFluor®488 wurden Spektren von 450 -570 nm und für Rhodamin-PE von 500-620 nm aufgenommen. Die Konzentrationen wurden basierend auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz (Formel 2.1) berechnet. Die verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten sind in **Tabelle 2.19** aufgelistet.

$$E = \lg \frac{I_0}{I_1} = \varepsilon \times c \times d, \quad (2.1)$$

E – Extinktion, I_0 – die Intensität des eingestrahlenen Lichtes, I_1 – die Intensität des Lichtes am Detektor, ε – molarer Extinktionskoeffizient, c – molare Konzentration, d – Schichtdicke der Küvette

Tabelle 2.19: Übersicht zu den Extinktionskoeffizienten. Die molaren Extinktionskoeffizienten der Proteine wurden mittels Expsy Protparam basierend auf der Primärsequenz der Proteine berechnet (Gasteiger et al., 2005).

| Molekül | Molarer Extinktionskoeffizient ε [L mol ⁻¹ cm ⁻¹] | Wellenlänge, für die ε gilt |
|----------------------|--|---|
| AlexaFluor488 | 72.000 (Herstellerangaben) | 488 nm |
| Rhodamin-PE | 85.000 (Herstellerangaben) | 560 nm |
| Sec12pΔC | 20.400 (Expsy Protparam) | 280 nm |
| Sec23/24p | 141.880 (Expsy Protparam) | 280 nm |
| Sec13/31p | 469.360 (Expsy Protparam) | 280 nm |

2.2.8.2 Bradford-Assay

Zur Konzentrationsbestimmung des Nukleotid-bindenden Sar1p und von Proteinmischungen wurde der Bradford-Assay eingesetzt. Dazu wurde eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 0-1 mg ml⁻¹ BSA erstellt. Je 10 µl der Kalibrierreihe bzw. der Probe wurden in den Probenkammern einer Mikrotiterplatte (96-Well Format, Brand) mit 200 µl Bradford Reagenz gemischt. Nach 7-10 min wurde

die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Konzentration der Proben konnte mit Hilfe einer linearen Regression der Kalibrierreihe bestimmt werden.

2.2.8.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Gele wurden mittels der Gießapparatur von Hoefer wie folgt hergestellt: Eine Glas- und eine gekerbte Aluminiumoxidplatte wurden, durch einen 0,75 mm starken Platzhalter getrennt, fest in die Apparatur eingespannt. Es wurde zunächst das Trenngel mit einem Massenanteil von 10, 12,5 oder 15 % Acrylamid gegossen und unter Luftausschluss mit Hilfe der Polymerisationsinitiatoren APS und TEMED polymerisiert. Das Sammelgel mit einem Massenanteil von 4,8 % Acrylamid wurde auf das Trenngel gegossen und Probenkämme mit 10 oder 15 Taschen eingebracht. Nach der vollständigen Polymerisierung des Sammelgels wurden die Gele feucht bei 4 °C gelagert.

Die Proben wurden jeweils mit SDS-Probenpuffer versetzt. Proben der Proteinreinigungen von löslichen Proteinen wurden 5 min bei 95 °C erhitzt, membranhaltige Proben wurden 5 min bei 70 °C erhitzt. 10-20 µl der Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Für diese Arbeit wurde das Tris-HCl/ Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die Stromstärke pro Gel betrug 20 mA. Die Färbung der Proteine im Gel erfolgte mit Coomassie-Färbelösung oder *Quick Coomassie Stain* (Serva). Coomassie gefärbte Gele wurden nach 2 h bis 16 h für wiederum 2 h bis 16 h mit Entfärbelösung behandelt.

2.2.8.4 Western Blot

Für den immunologischen Nachweis verschiedener spezifischer Organellmarker wurden Western Blots durchgeführt. In diesem Fall folgte der SDS-PAGE die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Dazu wurde ein Stapel aus drei Lagen in Transferpuffer getränktem Blotpapier (je 3 mm dick), einer in PBS-T Puffer getränkten Nitrocellulosemembran, dem SDS Gel und drei weiteren in Transferpuffer getränkten Lagen Blotpapier in die Western Blot Apparatur (Hoefer) möglichst blasenfrei eingespannt. Der Transfer erfolgte bei 2 mA pro cm² SDS-Gel für 1 h - 2 h je nach Acrylamidgehalt des SDS-Gels, wobei ein höherer Anteil an Acrylamid eine längere Blotdauer bedingt. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosemembran für 1 min in PBS-T Puffer gewaschen und dann für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in PBS-T mit 3 % (m/v) BSA oder 5 % (m/v) Milchpulver behandelt, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Mit Milchpulver geblockte Membran wurde dreimal für 5 min in PBS-T oder in PBS-T Puffer mit 3 % (m/v) BSA gewaschen. Die mit BSA geblockte Membran wurde direkt weiterverwendet. Der primäre Antikörper wurde in 10 ml PBS-T-Lösung mit 3 % BSA verdünnt (s. **Tabelle 2.20**) und 1 h - 3 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht schüttelnd mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit PBS-T bzw. PBS-T mit 3 % (m/v)

BSA für 5 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt war, wies eine Affinität zum Immunglobulin des Spenderorganismus des primären Antikörpers auf und wurde 5.000-fach in 10 ml PBS-T mit 3 % (m/v) BSA verdünnt. Die Membran wurde mit diesem für 1 h schüttelnd bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Chemilumineszenz des sekundären Antikörpers mittels ECL-Reagenz im FUJI-LAS4000 Scanner mit dem Programm LAS4000 unter Chemilumineszenz-Einstellung detektiert. Dabei betrug die Dauer der Detektion der Chemilumineszenz zwischen 10 s und 30 min. Um den Größenstandard sichtbar zu machen, wurden neben der Aufnahme der Chemilumineszenz auch Aufnahmen mit dem, für die Detektion von GFP vorgesehenem, Filtersatz 510DF10 gemacht.

Tabelle 2.20: Antikörper-Verdünnungen

| Primärer Antikörper | Spenderorganismus | Verdünnung |
|--|-------------------|-------------|
| Anti-Kex2 Protease Antikörper | Maus | 1 zu 5.000 |
| Anti-Natrium/Kalium-ATPase α 1 Antikörper (Anti-Pma1) | Maus | 1 zu 10.000 |
| Anti-Fibrillarin Antikörper | Maus | 1 zu 5.000 |
| Anti-Sec61p Antikörper | Kaninchen | 1 zu 3.000 |

2.2.8.5 Aktivitätstests für Succinatdehydrogenase, Cytochrom-c-Reduktase und γ -Glutamyltransferase

Um Membranfraktionen auf ihren Gehalt bestimmter Markerproteine zu testen, wurden Aktivitätstests von Organellmarkern durchgeführt. Für die Bestimmung der Aktivität des spezifischen Mitochondrienproteins Succinatdehydrogenase (SDH), des integralen ER-Proteins NADPH-Cytochrom-c-Reduktase (CytC Red) und des Vakuolenproteins γ -Glutamyltransferase (GGT) wurden kommerzielle Kits nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden so vorbereitet, dass sie entsprechend einer Bradford-Proteinbestimmung den gleichen Proteingehalt hatten.

2.2.8.6 Massenspektrometrische Untersuchung der Reinigungsfractionen der Mikrosomenpräparation

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Gruppe von Juniorprofessorin Carla Schmidt, ZIK HALOmem, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, durchgeführt. Die Proben von Sphäroplasten, LSP, HSP, der oberen Fraktion des Saccharosegradientens, der Mikrosomenfraktion und die OptiPrep-Fraktion wurden zu einer Proteinkonzentration von 0,4 mg ml⁻¹ verdünnt und mit Chymotrypsin hydrolysiert. Mit dem Ziel, die Proteine zu fällen, wurden die Reinigungsfractionen, mit einer Proteinkonzentration von 0,4 mg ml⁻¹, mit final 75 % Ethanol (reinst.) und 73 mM Natriumacetat (pH 5,3) versetzt. Die Proben wurden dazu mindestens 12 h bei -20 °C gelagert. Das gefällte Protein wurde bei 14.800 x g für 30 min bei 4 °C pelletiert (Haraeus Fresco21, Thermo Fisher Scientific). Das Pellet wurde mit 1 ml 80 %-igem eiskalten Ethanol (reinst.) gewaschen und erneut bei 14.800 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die unter

Vakuum getrockneten Proben (SpeedVac, Thermo Scientific) wurden in 10 µl einer 1 % (m/v) RapiGest-Detergenzlösung solubilisiert, mit final 25 mM DTT reduziert und mit 33 mM 2-Iodacetamid alkyliert. Zur Hydrolyse der Proteine wurden die Ansätze mit Chymotrypsin in einem Verhältnis von 1 zu 20 (w/w, Enzym:Protein) für 16 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,8 M Trifluoressigsäure gestoppt und das Detergenz säurekatalysiert gespalten. Die Rückstände des RapiGest wurden bei 13.000 x g, 30 min pelletiert. Der Überstand wurde vakuumgetrocknet und die resultierenden Peptide wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC Typ Dionex Ultimate 3000 BioRS-System, Thermo Fisher Scientific) aufgetrennt. Als Laufmittel dienten 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH₂O und 0,1 % (v/v) Ameisensäure in 80 % (v/v) Acetonitril. Nach Konzentrieren und Entsalzen auf der Vorsäule (Acclaim™ PepMap™ 100 C18 300 µm x 5 mm, 5 µm Partikelgröße, Thermo Fisher Scientific) wurden die Peptide über insgesamt 300 min bei einem Fluss von 300 nl min⁻¹ auf der Hauptsäule (Acclaim™ PepMap™ 100 C18 75 µm x 500 mm, 3 µm Partikelgröße, Thermo Fisher Scientific) aufgetrennt. Hierzu wurde ein Gradient von 4 % auf 8 % in 3 min erzeugt, gefolgt von einem Anstieg von 8 % auf 20 % Acetonitril in 260 min. Sehr hydrophobe Peptide wurden anschließend durch zwei stärkere Anstiege der Acetonitrilkonzentration auf 40 und 72 % binnen 10 bzw. 4 min eluiert. Nach 5 min bei 72 % Acetonitril folgte ein Umspülen der Säule auf 3,2 % Acetonitril, um die nächste Probe zu injizieren. Die HPLC war mit einem Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer gekoppelt (Thermo Fisher Scientific). Die Kopplung erfolgte durch nano-Elektrospray-Ionisation der eluierten Peptide bei 2,8 kV in den Probeneinlass des Massenspektrometers.

Zur Analyse der Ionen wurde zunächst ein Spektrum der Vorläufer-Ionen (MS1, Auflösung 70.000) im Orbitrap-Detektor aufgenommen. Die 20 intensivsten Signale wurden bestimmt und die entsprechenden Masse/Ladungsverhältnisse im Quadrupol isoliert. Die selektierten Ionen wurden in die Kollisionskammer transferiert, wo sie durch Kollision mit Helium fragmentierten. Die erhaltenen Fragmentationen wurden ebenfalls im Orbitrap-Detektor analysiert (MS2, Auflösung 17.500).

Die Daten wurden mittels MaxQuant-Software (Version 1.5.7.0) analysiert, um die erhaltenen Spektren den Proteinen einer Datenbank des Proteoms von *S. cerevisiae* (inkl. Isoformen) zuzuordnen. Danach wurden die identifizierten Proteine durch Vergleich mit der annotierten UniProt Datenbank einem Organell zugeordnet und mit der MaxQuant-Software *label free* quantifiziert. Für Proteine der ER-Membran, der Golgi-Apparat-Membran, der Vakuolenmembran, der Kernmembran, der Endosomenmembran, der Peroxisomenmembran, der inneren bzw. äußeren Mitochondrienmembran und der Plasmamembran wurde jeweils eine separate Datei erstellt, die die *label free quantification* (LFQ)-Intensitäten der gefundenen Proteine in allen gemessenen Datensätzen und damit in den unterschiedlichen Schritten der Mikrosomenpräparation beinhalten. Für die Auswertung der Anreicherung der Proteine in den Fraktionen wurden nur solche Proteine berücksichtigt, die in allen

Replikaten detektiert wurden. Um die Anreicherung der Proteine gegenüber der Sphäroplastenfraktion zu bestimmen, wurden Verhältnisse der LFQ-Intensitäten aller anderen Fraktionen zu der Fraktion der Sphäroplasten berechnet. Von den jeweiligen Verhältnissen wurde ein Mittelwert über die gemessenen biologischen Replikate berechnet und die entsprechende Standardabweichung ermittelt um Schwankungen innerhalb der Reinigung zu beschreiben. Die Probenvorbereitung hat Susann Kostmann durchgeführt und die Probenauswertung Julian Bender (AG Schmidt).

2.2.9 GTP-vermittelte Membranfusion

Für die Fusion von Mikrosomen zu GUVs wurde eine Stammlösung von 100 mM GTP in B88-Puffer hergestellt. 1-50 mM GTP wurden mit in B88-Puffer verdünnten Mikrosomen der finalen Konzentrationen von 0,01-5 mg ml⁻¹ gemischt. Je nach Anwendung wurden die Farbstoffe MM1-43 oder MM4-64, die bei Einbau in die Membran fluoreszieren (Schote *et al.*, 1998), hinzugegeben. Nachfolgende Experimente konnten nach 2 h-4 h Inkubation bei RT durchgeführt werden.

Für die Bestimmung von Vesikeldurchmessern wurden 10–15 Aufnahmen auf einer Fläche von 127 µm x 127 µm gemacht. Berücksichtigt wurden nur vollständig runde Vesikel, die größer als 2 µm waren und deren Äquator mindestens zu einem Drittel frei von Aggregaten waren. Für die Berechnung der Vesikel-Ausbeute pro Fläche wurde die Anzahl der Vesikel durch die Fläche in mm² geteilt.

2.2.10 Apyrase-Verdau

Apyrase wurde zum Abbau von GTP verwendet. Dazu wurden 0,01 bzw. 0,1 U ml⁻¹ Apyrase zu 1 mM GTP in B88-Puffer hinzugegeben und 3 min, 44 min bzw. 85 min bei RT inkubiert. Der Abbau des GTPs wurde mittels HPLC (Thermo Fisher Scientific) verfolgt. Dazu wurde eine C18 Säule von phenomenex (Jupiter 5u C18, 300 A, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm) mit HPLC-Laufpuffer äquilibriert und 50 µl der Probe bei isochratischem Fluss und einer Flussrate von 0,8 ml min⁻¹ aufgetragen. Neben der Kontrolle der GTP-Hydrolyse durch Apyrase wurde auch der Effekt des GTP-Abbaus durch Apyrase auf die gebildeten Vesikel untersucht. Hierzu wurden am LSM (s. Abschnitt 2.2.18.5) die Größe und Form der Vesikel nach den in Abschnitt 2.2.9 beschriebenen Kriterien nach 0,5 h, 2 h und 4 h nach Zugabe der Apyrase gezählt.

2.2.11 Immunologische Fluoreszenzfärbung von *Giant ER Vesicles* (GERVs)

ER-Membranen mit einer finalen Konzentration von 0,5 mg ml⁻¹ Protein wurden in Mikroskopiekammern mit 5 mM GTP und 2 µl einer wässrigen 0,5 mg ml⁻¹ MM1-43-Lösung für 4 h bei RT zur GERV-Bildung inkubiert. Nach optischer Kontrolle der Fusion am LSM (s. Abschnitt 2.2.18.5) wurden 200 µl Überstand abgenommen und der primäre Sec61p-Antikörper in einer 50-fachen Verdünnung in 100 µl B88-Puffer zugesetzt. Um den ungebundenen Antikörper zu entfernen wurde

nach 1 h bei RT der Überstand abgenommen und erneut mit B88-Puffer gewaschen. Nach 10 min wurde dieser Waschschrift noch zweimal wiederholt. Danach erfolgte die Zugabe des Alexa647-gekoppelten, Immunglobulin G (IgG)-spezifischen sekundären Antikörpers. Nach einer einstündigen Inkubation wurde wie oben beschrieben dreimal mit B88-Puffer gewaschen. Dann erfolgte die Analyse mittels LSM.

2.2.12 Lipidextraktion und Analytik

Die Lipidextraktion wurde mit Änderungen nach Matsuoka *et al.*, 1995 und 1997 durchgeführt. Die Extraktion der Lipide einer Mikrosomenlösung (500 µl) erfolgte mit Chloroform/ Methanol/ Salzsäure in einem Volumenverhältnis von 100:100:1 (600 µl). Die Mischung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach dem Auftauen für 2 min bei 14.000 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 1 ml Chloroform/ Methanol/ Salzsäure (100:100:1) gelöst, eingefroren und zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgenommen, mit dem ersten Überstand vereint und mit Chloroform (ca. ein Drittel des Volumens des Überstands) sowie 0,9 % (m/v) NaCl in ddH₂O (ca. ein Drittel des Volumens des Überstands) versetzt. Nach gutem Mischen durch Pipettieren wurde erneut 2 min bei 14.000 x g bei RT zentrifugiert. Die organische Phase (untere Phase) wurde gesammelt. Es erfolgte ein Waschschrift, bei dem das Probenvolumen 1 zu 1 mit mit HCl angesäuertem ddH₂O (final 0,7 % HCl) versetzt wurde. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Zum Trocknen des Produkts wurde Ammoniumsulfat verwendet. Der Schritt zur Trocknung mit Benzol im genannten Protokoll wurde ausgelassen. Final wurde das Chloroform mit den extrahierten Lipiden abgenommen, unter einem Stickstoffstrom getrocknet, mit Argon überschichtet und bei -20 °C eingefroren. Die Analytik erfolgte massenspektrometrisch durch Tommy Hofmann (AG Schmidt).

2.2.13 Vorbereitung des *Major-Minor-Mixes*

Zur Herstellung des *Major-Minor-Mixes* (MMM) wurden die in Pulverform gelieferten Lipide in Chloroform:Methanol (2:1) gelöst. Diese Lipide sowie die Lipide, die in Chloroform bzw. in einem Lösungsmittelmix gelöst geliefert wurden, wurden in folgenden molaren Prozentanteilen zu einer final 15 mM konzentrierten Lipidlösung gemischt: 34,4 mol-% DOPC, 14,8 mol-% DOPE, 5,4 mol-% DOPS, 3,4 mol-% DOPA, 5,4 mol-% PI, 1,5 mol-% PIP, 0,5 mol-% PIP₂, 1,3 mol-% CDP-DAG und 33,3 mol-% Ergosterol (Matsuoka *et al.*, 1998). Die Lösungen wurden mit Glaskapillaren pipettiert. Um die Liposomen oder GUVs fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen, wurden je nach Anwendung 0,01-0,5 mol-% Rhodamin-PE zugegeben. Aliquotierte Lipidmischungen wurden unter leichtem Stickstoffstrom eingetrocknet und mit Argon überschichtet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.14 Proteinrekonstitution in Liposomen

MMM-Aliquote wurden ca. 30 min bei RT erwärmt und mit 200 μ l HKM-Puffer mit 2 % (m/v) *n*-OG und dem jeweiligen einzubauenden Membranprotein gelöst. Das molare Verhältnis zwischen Membranprotein und Lipid betrug je nach Experiment 1 zu 500 oder 1 zu 5.000. Sowohl nach Zugabe als auch nach 1 h und 2 h wurde die Lipid-Proteinsuspension auf- und abpipettiert, um die Bildung der Mischmizellen zu fördern. Diese Suspension wurde auf eine mit ddH₂O äquilibrierte PD10 Säule (GE Healthcare) aufgetragen und nach Herstellerangaben mit ddH₂O eluiert. Es wurden 500 μ l-Fractionen gesammelt, wobei die Liposomen in den ersten drei Fraktionen enthalten waren. Zur Abtrennung von nicht rekonstituiertem Protein folgte eine Dichtegradientenzentrifugation zur Flotation. Dazu wurde 1,4 ml Proteoliposomensuspension mit 1 ml einer 2,5 M Saccharoselösung zu final 1 M Saccharose-Lösung gemischt und in ein dickwandiges 3,5 ml-Zentrifugengefäß pipettiert. Diese Schicht wurde mit 1 ml einer 0,75 M Saccharose-Lösung und 200 μ l ddH₂O überschichtet. Die Gradienten wurden für 2 h bei 268.000 x g, 22 °C, einer Beschleunigungsstufe von 5 und einer Verzögerungsstufe von 7 zentrifugiert (Optima Max-XP, MLS50, Beckman Coulter). Die obere Schicht wurde mittels SDS-PAGE auf den Einbau des Proteins untersucht. Ebenfalls wurde der Durchmesser der Vesikel mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) (s. Abschnitt 2.2.15) ermittelt.

2.2.15 Dynamische Lichtstreuung

Die Vesikeldurchmesser wurden durch DLS mit einem Zetasizer Nano S (Malvern Instruments) bestimmt. Dazu wurden 80 μ l Probe in eine UV-Küvette pipettiert und 10 Mal für 60 s bei 22 °C in wässrigem Puffer (Viskositätsinkrement 1,003) unter Liposomen-Einstellungen gemessen. Zur Auswertung wurde das Programm DTS (Nano) verwendet. Autokorrelationskurven wurden mit Hilfe des *General-purpose*-Modus ausgewertet, in dem Partikel mit ähnlichem Durchmesser zu einer Population zusammengefasst werden. Die Größenangaben in dieser Arbeit entsprechen dem ermittelten *Z-Average*.

2.2.16 Elektroformation zur Herstellung von GUVs

Für die Bildung von GUVs aus Lipiden bzw. Proteoliposomen wurde die Elektroformation angewendet (Dimitrov *et al.*, 1987; Politano *et al.*, 2010). Dazu wurden 40 μ l einer zu 15 mM in Chloroform/Methanol (2:1) gelösten Lipidmischung auf ein Indiumzinnoxid (ITO) beschichtetes Glas (Delta Technologies) ausgestrichen, das auf einer 70 °C heißen Heizplatte erwärmt wurde. Proteoliposomen zur GUV-Herstellung wurden in ddH₂O produziert und in 2 μ l großen Tropfen in kleinem gleichmäßigen Abstand auf das ITO-Glas aufgetragen (**Abbildung 2.1 A**). Die Proteoliposomen-Tröpfchen wurden im Exsikkator bei 4 °C über Nacht eingetrocknet, sodass die Membranen am Glas anhaften. Zwei der beschichteten ITO-Gläschen wurden an gegenüberliegenden Seiten jeweils auf der beschichteten Seite

mit ca. 2 cm stromleitenden Kupferband (3M SPI supplies) beklebt, wobei 0,5 cm auf dem Gläschen waren und der Rest überragte (**Abbildung 2.1 C**). Daran wurden die, mit einem Funktionsgenerator gekoppelten, Kabel befestigt. Die Elektroformationskammer wurde aus den jeweils beschichteten und mit Kupferband versehenen ITO-Gläschen und einem 3 mm dicken Silikondichtungsring zusammengesetzt, der eine wiederverschließbare Öffnung aufwies. So konnte die Kammer mit ca. 600 μl einer 500 mOsmol kg^{-1} Saccharose-Lösung gefüllt und mit vier herkömmlichen Vielweckklemmen zusammengehalten werden. Die Kammer wurde an eine sinusförmige Wechselspannung mit einer Frequenz von 10 Hz und einer Amplitude von $\pm 3\text{ V}$ für 7 h angeschlossen. Zur Gewinnung der GUVs wurde die Saccharose-GUV-Suspension in das 5-fache Volumen einer 500 mOsmol kg^{-1} Glukose-Lösung gegeben, sodass die GUVs in der weniger dichten Glukoselösung über Nacht sedimentierten und konzentriert entnommen werden konnten.

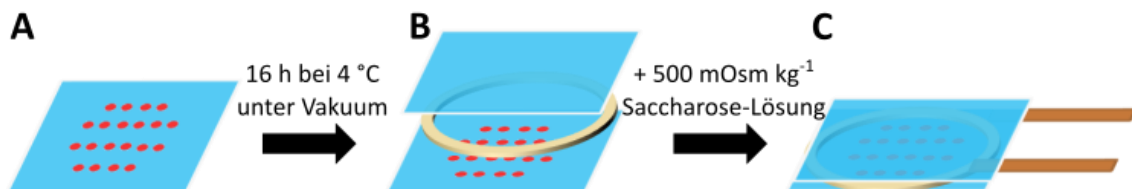


Abbildung 2.1: Aufbau einer Elektroformationskammer zur Bildung von GUVs aus Proteoliposomen. **(A)** ITO-Gläschen (blau) mit aufgetropfter Proteoliposom-Suspension (rot). Proteoliposomen wurden für 16 h bei 4 °C unter Vakuum eingetrocknet. **(B)** Zusammensetzen der GUV-Kammer mit Silikonring (gelb). **(C)** Anbringung des Kupferbands (braun) sowie Befüllen der Kammer mit einer 500 mOsm kg^{-1} Saccharose-Lösung.

2.2.17 COPII-Assay

Der COPII-Assay, der die COPII-vermittelte Krümmung von Membranen untersucht, wurde nach Bacia *et al.*, 2011 durchgeführt. Die verwendeten Protein- und Nukleotidvarianten sind im Ergebnisteil angegeben. Es wurde darauf geachtet eine Osmolalität von 700 mOsm kg^{-1} nicht zu überschreiten. Für den COPII-Assay an natürlichen Membranen wurden die doppelten Proteinkonzentrationen eingesetzt. Einzelheiten sind im Ergebnisteil beschrieben.

2.2.18 Mikroskopie

2.2.18.1 Mikroskopiekammern

Für die Mikroskopie von GERVs wurde eine Mikroskopiekammer mit einem doppelzylindrischen Aufbau hergestellt (s. **Abbildung 2.2**). Dies ermöglicht den Austausch von Puffersubstanzen nach Bildung der GERVs. Dazu wurde in die Mitte des Bodens einer Probenkammer einer 96-Well Platte (Brand) ein Loch mit einem Durchmesser von 4,2 mm gebohrt (**Abbildung 2.2 A**). Die Löcher wurden auf der Bodenseite mit Schleifpapier und innen mit einer Feile geglättet. Auf die Stege zwischen den Löchern wurde UV-aushärtender Kleber (Loctite 3201, Henkel) verteilt (**Abbildung 2.2 B-E**). Auf diese

Fläche wurde eine Silikonmatte (*Press-to-seal silicone isolator sheets*, 0,5 mm von Invitrogen) geklebt. Überschüssiger Kleber wurde mit Wattestäbchen entfernt (**Abbildung 2.2 F**). Zum Aushärten des Klebers wurde die Kammer mit UV-Licht der Wellenlängen von 254 nm und 365 nm für 1 - 5 h bestrahlt (**Abbildung 2.2 G**). Nach dem vollständigen Aushärten des Klebers wurden mit einem Skalpell in die Silikonmatte Löcher geschnitten (**Abbildung 2.2 H**). Nun wurde UV-Kleber um die Löcher in der Silikonmatte wie zuvor beschrieben verteilt und es wurden 18x18 mm Deckgläschen der Stärke 0,16-0,19 mm (#1,5 von Menzel) so aufgelegt, dass keine Luftbläschen eingeschlossen wurden und eine abgedichtete Verbindung entstand (**Abbildung 2.2 I und J**). Wiederum wurde für 2 h mit UV-Licht

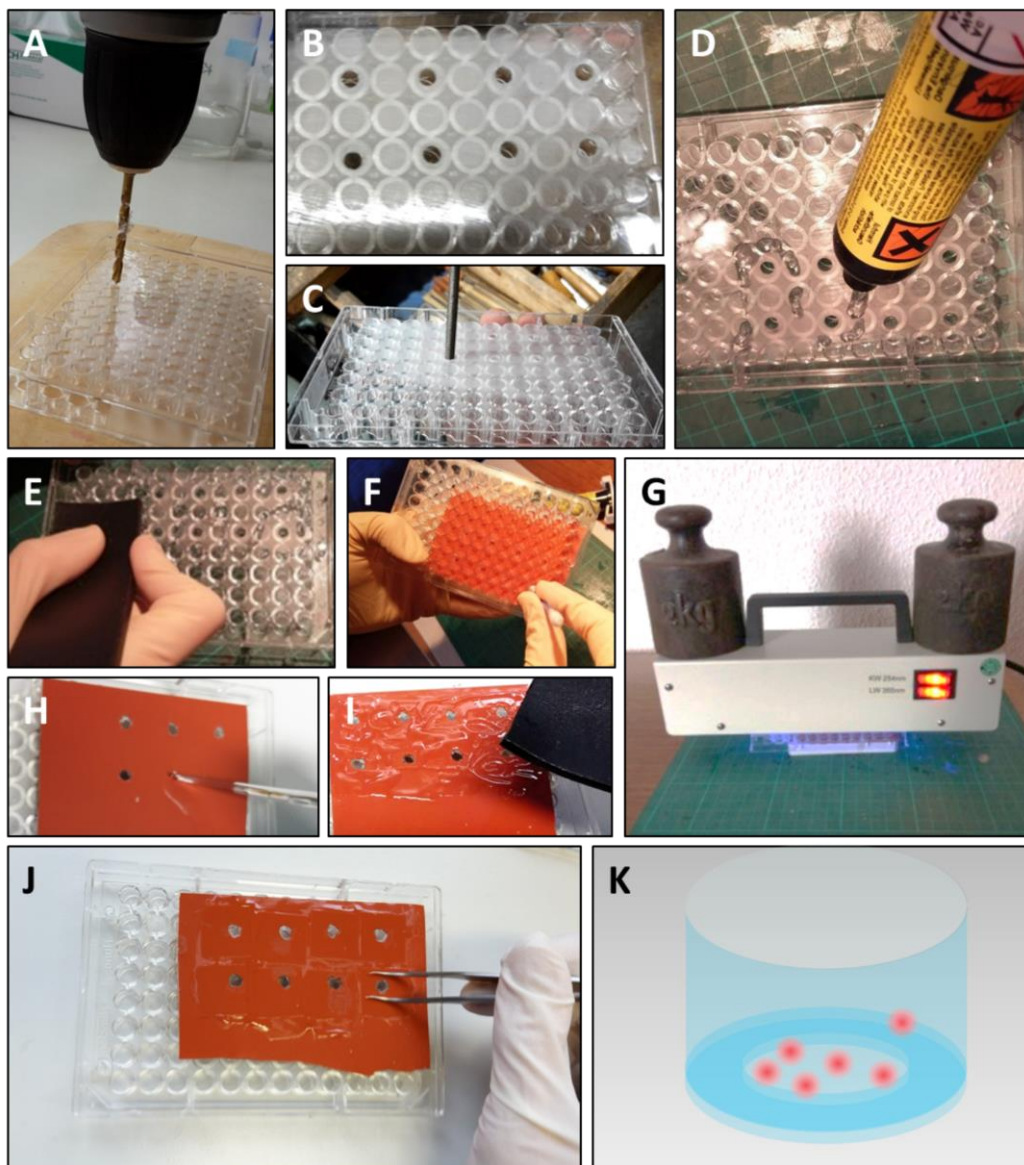


Abbildung 2.2: Konstruktion einer Mikroskopiekammer. **(A)** Bohren von Löchern in 96-Well Platte mit einem 4,2 mm-Bohrer. **(B)** Schleifen der Bodenfläche mit Schleifpapier. **(C)** Glätten der Löcher mit einer Rundpfeile. **(D)** und **(E)** Verteilen von unter UV-Licht aushärtendem Kleber auf der Bodenfläche und Aufkleben einer Silikonmatte zur Abdichtung. **(F)** Entfernung von überschüssigem Kleber mittels Wattestäbchen. **(G)** Bestrahlung des Klebers zum Aushärten erfolgte unter Druck 1-5 h mit UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 365 nm. **(H)** Ausschneiden vorgebohrter Löcher mit dem Skalpell. **(I)** Gleichmäßige Verteilung des UV-Klebers auf der Silikonmatte um die Löcher. **(J)** Anbringung von Deckgläschen (Menzel, #1,5, 18 x 18 mm) und Andrücken mit einer Pinzette. **(K)** Schematische Darstellung des Aufbaus der zylindrischen Kammer mit zweiteiligem Boden. (Fotos: Robin H. Grimmer)

bestrahlt. Die fertige Kammer hat einen doppelzylindrischen Aufbau (**Abbildung 2.2 K**): Die ursprüngliche Probenkammer bildet den oberen Zylinder, in dem Puffer ausgetauscht werden kann. Unterhalb dieses Zylinders, in den Kammerboden eingelassen, ist durch das gebohrte Loch ein zweiter Zylinder entstanden, dessen Boden aus einem für die Mikroskopie geeigneten Deckglas (#1,5 von Menzel) besteht. In diesen unteren Zylinder sinken die GERVs. Der Pufferaustausch findet im oberen Zylinderbereich statt, sodass gebildete GERVs kaum der Verwirbelung des Puffers ausgesetzt sind.

2.2.18.2 Gelatinebeschichtung

Zur Verminderung des Spreitens der Lipide auf verwendeten Glasflächen wie z.B. Mikroskopiedeckgläschen wurden diese mit einer Gelatineschicht überzogen. Dazu wurden 2 % (m/v) Gelatine durch Erhitzen in ddH₂O gelöst. Für die Beschichtung von 24 mm x 24 mm und 18 mm x 18 mm Deckgläschen mit einer Dicke von 0,16-0,19 mm (#1,5 von Menzel) wurden diese mit einer Pinzette in eine handwarme Gelatinelösung getunkt und anschließend aufrecht an den Rand einer Plastischale zum Trocknen gelehnt. Für die Beschichtung von selbstgebauten Mikroskopiekammern wurden dreimal 200 µl einer 2 % (m/v) Gelatinelösung in die Probenkammer pipettiert. Der Überstand wurde verworfen. Die dennoch verbleibende Lösung wurde abpipettiert. Die Kammern wurden über Nacht an der Luft getrocknet. Nach Nutzung der Kammern wurden diese im Wechsel mit 70 % (v/v) Ethanol (vergällt) und ddH₂O ausgespült und getrocknet. So konnten sie erneut beschichtet und wiederverwendet werden.

2.2.18.3 Differentieller Interferenzkontrast (DIC)

Biologische Proben wie z.B. Zellen oder Liposomen erzeugen in der herkömmlichen Lichtmikroskopie wenig Kontrast. Daher wurde zur Visualisierung von Zellen und GUVs die DIC-Mikroskopie genutzt. Es wurde das Observer Z1 Mikroskop (Carl Zeiss) mit einem Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat, 40x/ NA 1,2) verwendet. Nach Einstellung der Köhlerbeleuchtung wurden zwei Prismen und zwei Polarisationsfilter eingesetzt. Das erste Prisma und der erste Polarisationsfilter sind Teil des Kondensors (*LD condenser 0,35*). Das zweite Prisma wurde unterhalb des Objektivs eingesetzt und der zweite Polarisationsfilter (*DIC slider CA 40x/1,2 W*), der Analysator, wurde mittels eines Schiebers unterhalb des Objektivs in den Strahlengang gebracht. Das resultierende Bild wurde mittels der ZEN blue Software (2011) (Carl Zeiss) dargestellt.

2.2.18.4 *Spinning Disc*-Mikroskopie

Für Aufnahmen in dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältliches *Spinning Disc* (SD)-Mikroskop (Carl Zeiss) verwendet. Es handelte sich um einen Z1 Observer-Aufbau mit einer Yokogawa CSU-X1 *Spinning Disc*-Einheit (Yokogawa, Japan). Es wurde ein C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv (40x/ NA 1,2)

verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte über eine CCD-Kamera. Für die Steuerung von Belichtungszeit und Drehgeschwindigkeit für ein optimales Bild sowie für die Bildbearbeitung wurde die ZEN blue Software (2011) (Carl Zeiss) verwendet.

2.2.18.5 Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die vorliegende Arbeit wurde das inverse Z1 Observer Stativ mit dem LSM 710 sowie ConfoCor3 von Carl Zeiss verwendet. Der Aufbau beinhaltet die Laserwellenlängen 405, 458, 488, 514, 561 sowie 633 nm. Das Anregungslicht wurde von der Quelle über den Hauptfarbteiler (dichroitischer Spiegel) reflektiert und durch das C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv (40x/ NA 1,2) in die Probe geleitet. Das emittierte Fluoreszenzsignal wurde wiederum durch das Objektiv und den dichroitischen Spiegel geleitet. Das eintreffende Licht wurde an optischen Gittern so gebeugt, dass nur der eingestellte Wellenlängen-Bereich des Fluoreszenzsignals zum Detektor gelangte. Als Detektor fungierten PMTs. Bei sehr geringem Fluoreszenzsignal wurden zur Signaldetektion APDs verwendet. Die Darstellung der detektierten Signale erfolgte durch die ZEN black Software (2009) (Carl Zeiss). Aufnahmen von Objekten mit geringem Fluoreszenzsignal wurden zum Teil mittels der genannten Software mit einer γ -Korrektur versehen. Bei der γ -Korrektur werden die Intensitätswerte im Bild mittels einer Potenzfunktion nicht linear dargestellt, sodass schwächere Signale verstärkt und stärkere Signale abgeschwächt werden. Wenn in der vorliegenden Arbeit eine γ -Korrektur verwendet worden ist, ist dies in der Bildunterschrift unter Angabe des γ -Wertes vermerkt.

2.2.18.6 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)

FCS-Messungen wurden an dem oben beschriebenen LSM-Aufbau mit ConfoCor3 Ausstattung und dem C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv (40x/ NA 1,2) durchgeführt. Aufgrund der benötigten Einzelmolekülempfindlichkeit wurden APDs verwendet.

Für die Diffusionsmessung von Bet1p-sfGFP wurden ER-Membranen aus Mikrosomen mit Bet1p-sfGFP und Bet1p-mCherry in einem Verhältnis von 1 zu 4.000 zu final 0,5 mg ml⁻¹ Protein nach Bradford Bestimmung gemischt. Zur Bildung von GERVs in den selbstgebauten Mikroskopiekammern wurden 5 mM GTP zugesetzt. Die GERV-Bildung sowie die Suche nach geeigneten GERVs erfolgte über die Anregung und Detektion der mCherry-Fluoreszenz. Untersucht wurden am Kammerboden liegende GERVs, die keine Aggregate an und in der Nähe des Pols aufwiesen und sich kaum bewegten. Diese Ausschlusskriterien wurden auch zur Auswahl von MMM-GUVs mit rekonstituiertem Bet1p-Alexa488 angewendet. Diese wurden aus in ddH₂O hergestellten Proteoliposomen (s. Abschnitt 2.2.14) wie im Abschnitt 2.2.16 beschrieben hergestellt.

Für die FCS-Messung wurde der Pol eines GERVs oder GUVs in die Fokusebene gebracht. Dies wurde mit einem z-Scan der Fluoreszenzintensität überprüft. Für die FCS-Messungen wurde der 488 nm-Laser

sowie ein Bandpassfilter (505-540 nm) verwendet. Für die Diffusionsmessungen von Bet1p-sfGFP betrug die Laserleistung 5,9 μW und für die Diffusionsmessungen von Bet1p-Alexa488 47 μW . Die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitätsfluktuationen in der Membran erfolgte viermal für 30 s bzw. zweimal für 60 s. Die Daten wurden in Echtzeit korreliert und mittels der ZEN black (2009) Software ausgewertet. Dazu wurde die Formel 1.5 um einen Term, der das Blinken des Fluorophors berücksichtigt, ergänzt (Formel 2.2):

$$G(\tau) = \frac{1}{N_{eff}} \left(1 + \frac{F_{dunkel} e^{-\frac{\tau}{\tau_{dunkel}}}}{1 - F_{dunkel}} \right) \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}} \quad (2.2)$$

$G(\tau)$ – Korrelationsfunktion; N_{eff} – effektive Teilchenzahl im Detektionsvolumen; τ_{diff} – Diffusionszeit; F_{dunkel} – Fraktion der Fluoreszenzmoleküle im nicht emissionsfähigen Zustand; τ_{dunkel} – Relaxationszeit der Fluoreszenzmoleküle im nicht emittierenden Zustand; τ – Zeit

Um den Diffusionskoeffizienten nach Formel 1.6 berechnen zu können wurde eine Kalibrierung des lateralen Radius des Detektionsvolumens (ω_0) durchgeführt. Dazu wurde die Diffusionszeit (τ_{diff}) von Alexa488-Hydrazid gemessen. Der Diffusionskoeffizient (D) wurde zu 435 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ angenommen (Petrasek *et al.*, 2008), sodass der Radius ω_0 nach Formel 1.6 berechnet werden konnte. Der jeweils ermittelte Wert für ω_0 wurde für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten von Bet1p-sfGFP und Bet1p-Alexa488 eingesetzt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Origin2016 (Origin, Massachusetts, USA).

2.2.19 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Die Vorbereitung der Proben für die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Daum durchgeführt. Es wurden kleine Kupfernetze mit 300 Maschen verwendet, die einen Kohlenstofffilm mit Löchern von 2 μm Durchmesser im Abstand von 2 μm aufweisen (C-Flat 2-2-3C von Firma Protochips), sogenannte *Grids*. Diese wurden mit der kohlenstoffbeschichteten Seite nach oben weisend für 60 s im PlasmaCleaner (Harrick Plasma) bei leichter Luftzufuhr beglimmt, um die Oberfläche hydrophiler zu machen. Das *Grid* wurde in die Probenhalterung des EM Grid Plungers (Leica, Wetzlar) eingespannt. In der Probenkammer des Grid Plungers herrschten 80 % Luftfeuchtigkeit und 21 °C. Es wurden je 3 μl Probe zunächst auf die Rückseite und dann auf die Vorderseite des *Grids* aufgetragen. Die Flüssigkeit wurde für 12 s durch Blottpapier abgesaugt, um einen sehr dünnen Probenfilm in den Löchern der *Grids* zu erhalten. Dem Absaugen der Flüssigkeit folgte das extrem schnelle Einfrieren, das Vitrifizieren, in flüssigem Ethan. Die *Grids* wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Untersuchung der Proben erfolgte an einem Libra 120kV-Elektronenmikroskop (Zeiss, Jena) durch Dr. Dr. Gerd Hause.

3. Ergebnisse

ER-Membranen sind essenziell für die Protein- und Lipidbiosynthese, für die Verteilung neu gebildeter Stoffe in der Zelle und für die Signaltransduktion. Aufgrund der Lage innerhalb der Zelle und des Aufbaus aus verschiedenen strukturellen Bereichen ist die Untersuchung der ER-Membran eine Herausforderung. Um dieser zu begegnen, wurden ER-Membranen zunächst angereichert und die gewonnenen Membranen wurden auf ihre Zusammensetzung untersucht. Es wurden verschiedene Techniken angewendet, um eine für die Mikroskopie geeignete Modellmembran in Form von GUVs zu produzieren. Die erfolgreich gebildeten GUVs wurden mit verschiedenen mikroskopischen Techniken bezüglich ihrer Eignung als Untersuchungssystem für ER-Membranen getestet. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel dargestellt.

3.1 Anreicherung von ER-Membranen

Die technischen Details der Reinigung der ER-Membranen wurden im Abschnitt 2.2.7 beschrieben. Aus Gründen der Übersicht und der Zuordnung von Reinigungsstufen und Fraktionsnamen ist das Vorgehen in **Abbildung 3.1** dargestellt und wird im Folgenden noch einmal kurz wiedergegeben, bevor auf einzelne Schritte des Reinigungsprozesses im Detail eingegangen wird. Nach der Anzucht geeigneter Hefezellen wurde die Zellwand enzymatisch verdaut. So wurden zellwandfreie, kugelförmige Zellen, die Sphäroplasten genannt werden, gewonnen. Die Ernte der Sphäroplasten erfolgte durch Zentrifugation über ein Saccharose-Ficoll-Kissen (**Abbildung 3.1 B**). Die geernteten Sphäroplasten wurden in Lysepuffer resuspendiert und zum Aufbrechen der Plasmamembran mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator behandelt. Mittels Zentrifugation bei 1.000 x g wurden schwere Zellbestandteile abgetrennt, wobei das LSP entstand. Im nächsten Schritt wurde der erhaltene Überstand zur Bildung des HSPs bei 27.000 x g zentrifugiert. Dabei wurden Organellen und Membranstrukturen pelletiert und von anderen zellulären Bestandteilen abgetrennt. Das gewonnene Membranpellet wurde zunächst solubilisiert und bei den folgenden Saccharose- und OptiPrep-Dichtegradientenzentrifugationen entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt (**Abbildung 3.1 C**). Dabei wurden im Saccharosegradienten die obere Fraktion des Saccharosegradientens (S) und die untere Fraktion des Saccharosegradientens, im Folgenden Mikrosomenfraktion (M) genannt, gewonnen. Die Mikrosomen wurden im OptiPrep-Gradienten unter Bildung der OptiPrep-Fraktion (OP) weiterverarbeitet.

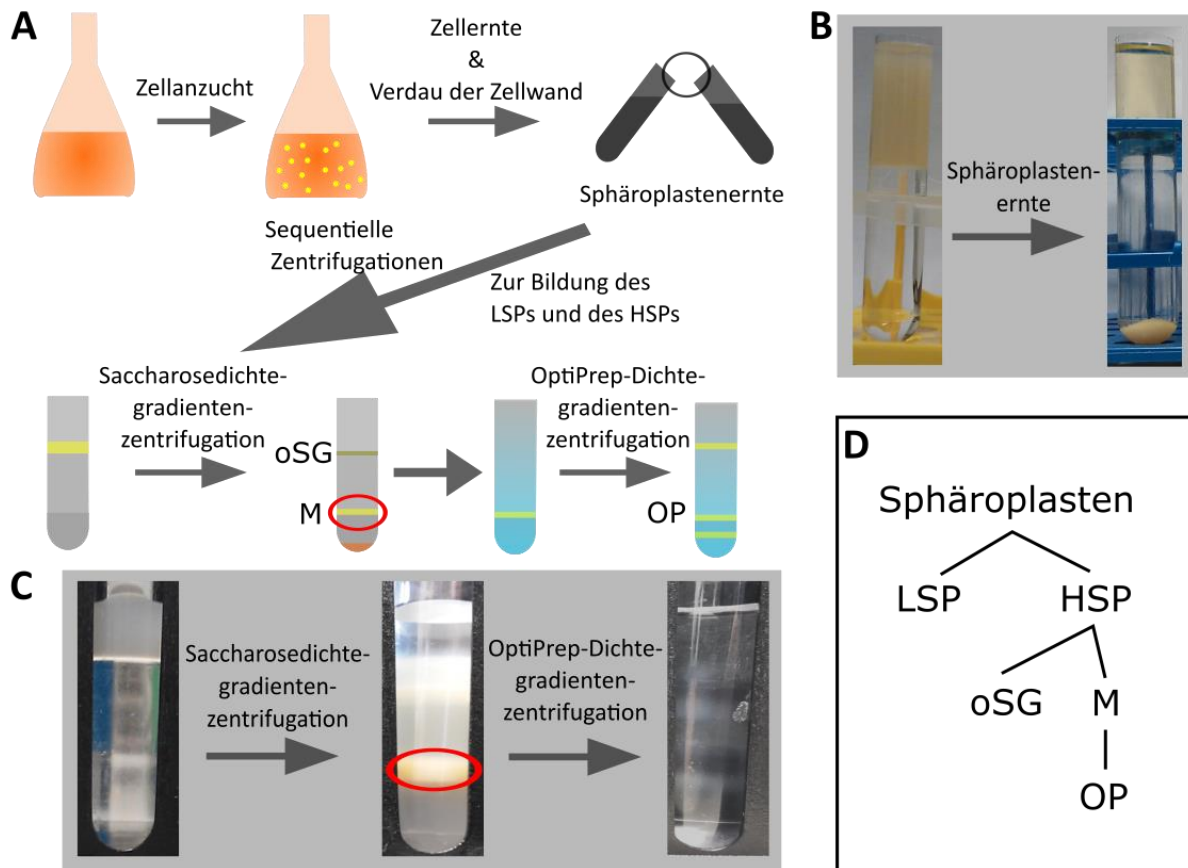


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Präparation von ER-Membranen. **(A)** Hefestämme wurden in Schüttelkolben angezogen. Nach Zellernte und enzymatischem Verdau der Zellwand folgte die Ernte der Sphäroplasten über ein Saccharose-Ficoll-Kissen. Mittels sequentieller Zentrifugation wurde zunächst das low speed pellet (LSP) und dann das high speed pellet (HSP) gewonnen. Mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation wurden die Membranen des HSPs über einen dreischichtigen Saccharosegradienten in die obere Saccharosegradientenfraction (S) und in die untere Saccharosegradientenfraction, die Mikrosomenfraction (M), aufgetrennt. Die M (rot hervorgehoben) wurde für den OptiPrep-Gradienten, aus dem die OptiPrep-Fraktion (OP) resultiert, eingesetzt. **(B)** Zentrifugenröhrchen vor (links) und nach (rechts) der Ernte der Sphäroplasten. **(C)** Zentrifugenröhrchen vor dem Saccharosegradienten (links), nach dem Saccharosegradienten (mittig) und nach dem OptiPrep-Gradienten (rechts). **(D)** Entstehung der verschiedenen Reinigungsfraktionen.

3.1.1 Zellwandverdau zur Bildung der Sphäroplasten

Die Entfernung der Zellwand nach Anzucht der Hefe ist für die spätere Ausbeute entscheidend und soll daher im Folgenden genauer betrachtet werden. Die Zellwand, bestehend aus Zuckerpolymeren, sollte ohne mechanischen Stress enzymatisch durch das β -1,3-Glucan-verdauende Enzym Lyticase abgebaut werden. Zum Abbau der Zellwand wurden geerntete Zellen aus dem WT-Stamm oder aus Stämmen, die zusätzliche Gene exprimieren wie z.B. dem hier verwendeten SEY1-exprimierenden Stamm KBY1140, mit Lyticase versetzt. Eine Probe der Zellen wurde zur Untersuchung des Fortschritts des Zellwandverbaus vor und während der Lyticasebehandlung mit ddH₂O zu einer OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt und mittels DIC-Mikroskopie begutachtet. Bei einer intakten Zellwand wurde trotz der Verdünnung mit ddH₂O keine Formänderung und kein Platzen der Zellen in Folge des osmotischen Drucks erwartet. Wurde die Zellwand aber abgebaut, platzten die Zellen oder bildeten runde, gefüllte Sphäroplasten. Die DIC-Aufnahme in **Abbildung 3.2 A** zeigt typische WT-Hefezellen vor dem Lyticaseverdau. Die in

Abbildung 3.2 B und **C** gezeigten Zellen sind, vor der Verdünnung mit ddH₂O, 30 min mit Lyticase inkubiert worden. In **Abbildung 3.2 B** sieht man zum einen im Vergleich zu intakten Hefezellen eine Formänderung zu eher runden Sphäroplasten. Zum anderen ist die Anzahl an Hefezellen reduziert. Dies sind Hinweise auf einen erfolgreichen Abbau der Zellwand und darauf, dass Sphäroplasten vorliegen. In **Abbildung 3.2 C** sind SEY1-exprimierende Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit Lyticase gezeigt. In diesem Fall werden hauptsächlich intakte Zellen beobachtet. Die Zellwand dieser Zellen wird nicht effektiv durch Lyticase abgebaut.

Die Bildung der Sphäroplasten konnte somit für WT-Zellen nach Wuestehube und Schekman (1992) reproduziert werden. Zellwände von Zellen, die zur Genexpression auf Selektionsmedium angezogen wurden, konnten nicht mit Lyticase verdaut werden (**Abbildung 3.2 C**). Da die Produktion von Zielproteinen wie Sey1p durch die Zelle für spätere Anwendungen jedoch notwendig ist, wurde nach der Ursache für den mangelnden Abbau der Zellwand gesucht:

Die Hefezellwand von WT-Zellen besteht aus den für den Zell-Zell-Kontakt wichtigen glykosylierten Proteinen, die 21-27 % der Gesamtzellwand ausmachen (Nguyen *et al.*, 1998). Die innere strukturgebende Schicht der Zellwand besteht, neben anderen Komponenten, zu 2-8 % aus Chitin und zu ca. 63-77 % aus β -1,3- bzw. β -1,6-Glucanen, wobei β -1,3-Glucane den größeren Teil ausmachen (Nguyen *et al.*, 1998). Um eine mögliche Veränderung der Zusammensetzung der Zellwand unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen beobachten zu können, wurden die β -1,3-Glucane sowie das Chitin mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen nach Hiroki und Ohya (Hiroki *et al.*, 2016) markiert (**Abbildung 3.3**). Für den direkten Vergleich wurden beide Markierungsmethoden parallel an WT-Zellen und SEY1-exprimierenden Zellen durchgeführt.

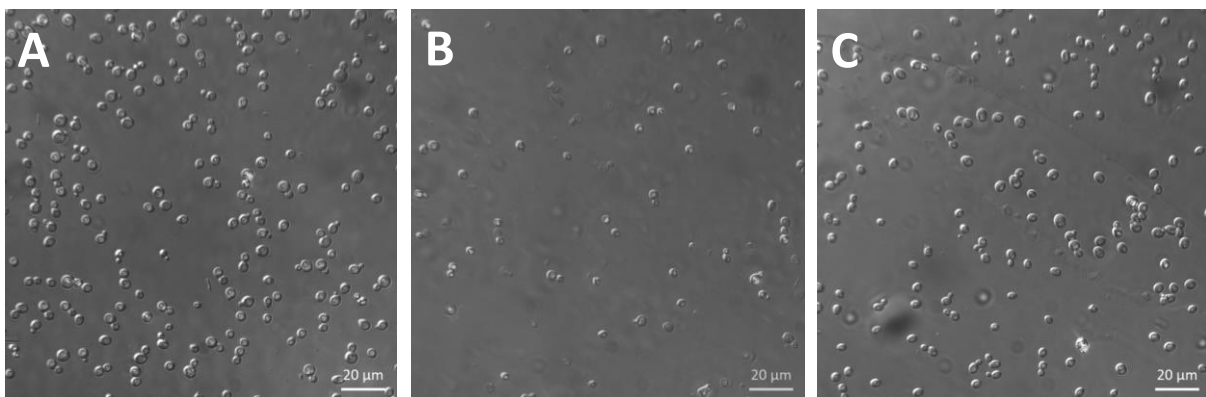


Abbildung 3.2: DIC-Aufnahmen von Hefezellen mit ddH₂O zu einer OD₆₀₀ von 0,5 verdünnt. **(A)** unbehandelte auf Vollmedium angezogene WT-Zellen (KBY1139). **(B)** WT-Zellen aus A nach 30-minütiger Inkubation mit 0,2 U ml⁻¹ Lyticase. **(C)** SEY1-exprimierende, auf Minimalmedium gewachsene Zellen (KBY1140) nach 30-minütiger Inkubation mit 0,2 U ml⁻¹ Lyticase.

Anilinblau diente hierbei als Indikator für β -1,3-Glucane und damit für den Hauptbestandteil der Zellwand (Peter J. Wood, 1984). Die Anilinblau-Markierung der WT-Zellen sowie der SEY1-exprimierenden Zellen ergibt eine gleichmäßig über die Zellwand verteilte Fluoreszenzintensität (**Abbildung 3.3 A und B**).

Die Markierung von Chitin in WT-Zellen sowie in SEY1-exprimierenden Zellen erfolgte mit *Calcofluor White*, das mit Chitin interagiert (Herth, 1980). Ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Zellwände beider Zelllinien zeigt, dass die Zellwand von auf Minimalmedium gewachsenen SEY1-exprimierenden Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität aufweist als die Zellwand von WT-Zellen, also wesentlich mehr *Calcofluor White* einlagert (**Abbildung 3.3 C und D**). SEY1-exprimierende Zellen bauen unter den gegebenen Wachstumsbedingungen mehr Chitin in ihre Zellwand ein als WT-Zellen.

Im Falle eines erhöhten Chitingehalts der Zellwand reicht der Abbau der β -1,3-Glucane durch Lyticase zur Bildung von Sphäroplasten scheinbar nicht aus. Um die Zellwand dennoch effizient abzubauen, wurde deshalb die Wirkung des Chitin-abbauenden Enzyms Chitinase getestet. Dazu wurden SEY1-exprimierende Zellen (OD_{600} ca. 1,8) mit $0-10 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ Chitinase versetzt. Die Beobachtung der Zellen im zeitlichen Verlauf zeigt, dass die OD_{600} nicht stärker sinkt als in Abwesenheit der Chitinase (**Abbildung 3.4 B**). Chitinase allein fördert in dem eingesetzten Konzentrationsbereich die Bildung von Sphäroplasten nicht. In diesem Fall stabilisieren die β -1,3-Glucane die Zellwand hinreichend. Werden aber Lyticase und Chitinase zu den SEY1-exprimierenden Zellen gegeben, also wird der Abbau des β -1,3-Glucans und des Chitins kombiniert, dann wird nach 90 min ein sehr starker Abfall der OD_{600} und somit die Bildung von Sphäroplasten beobachtet (**Abbildung 3.4 B**). Für weitere Präparationen wurden beide Enzyme zur Sphäroplastenbildung eingesetzt.

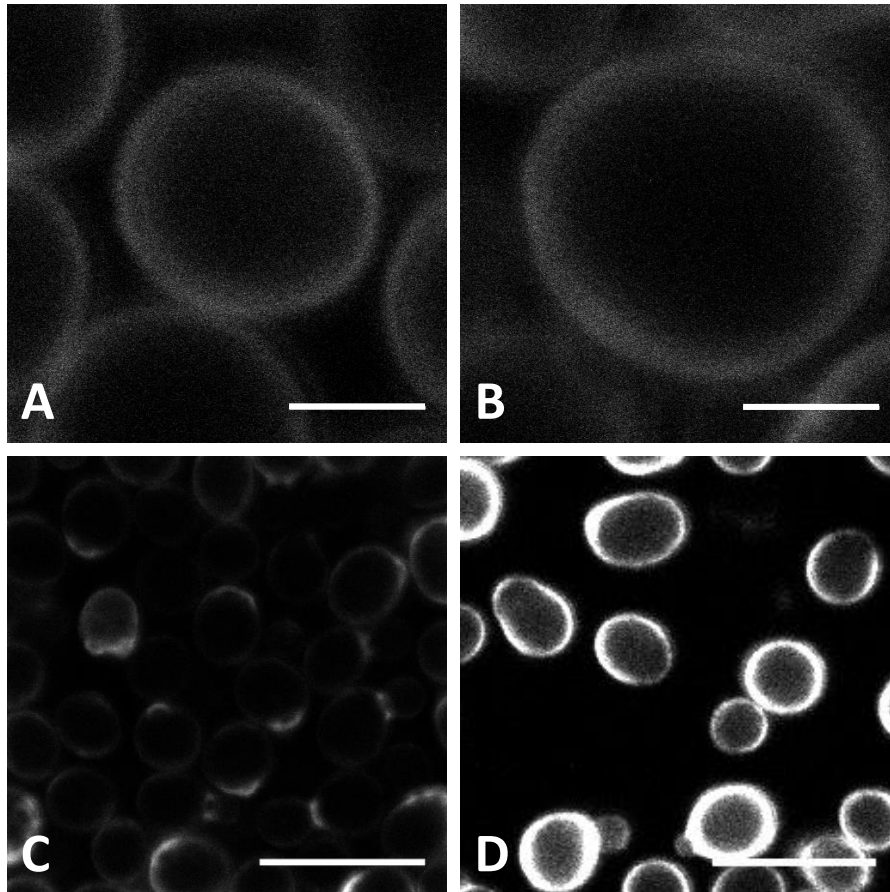


Abbildung 3.3: Zellwandmarkierung von KBY1139 (WT-BY4741 Zellen), (links) und KBY1140 (SEY1-exprimierende BY4741 Zellen), (rechts) (A) und (B) mit Anilinblau zur Markierung der β -1,3-Glucane (Maßstabsbalken entsprechen 2 μ m) bzw. (C) und (D) mit Calcofluor White zur Markierung von Chitin (Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m). Die Anregung der Farbstoffe erfolgte bei 405 nm für alle Aufnahmen mit 72 μ W. Es wurde im Bereich von 410-740 nm detektiert.

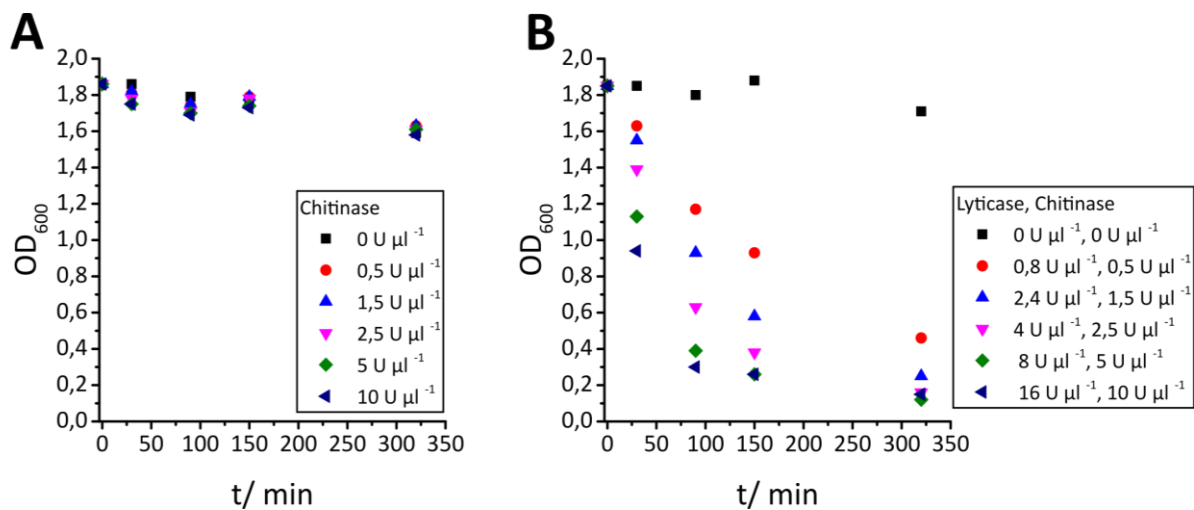


Abbildung 3.4: Darstellung der optischen Dichte gegenüber der Zeit beim Verdau der Zellwand von auf Minimalmedium gewachsenen Hefen mit (A) Chitinase bzw. (B) einer Kombination aus Lyticase und Chitinase.

3.1.2 Qualitätskontrolle der gereinigten Membranfraktionen

Der Verlauf der Reinigung der ER-Membranen wurde mit verschiedenen Methoden verfolgt. Die anfallenden Membranfraktionen wurden, wie bei subzellulären Fraktionierungen üblich, auf die Anwesenheit spezifischer Organellmarker mittels Western Blots bzw. Funktionsassays untersucht (Zinser *et al.*, 1995). Außerdem wurde in Kooperation mit der AG Schmidt des ZIK HALOmems der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ein massenspektrometrischer Ansatz zur Untersuchung der Reinigungsqualität entwickelt.

3.1.2.1 Untersuchung der Reinigungsfractionen anhand von Organellmarkern

Bei der Fraktionierung von Hefezellen zur Gewinnung von ER-Membranen sollen Membranen anderer Organellen, wie beispielsweise die des Golgi-Apparats, abgetrennt werden. Um die erfolgreiche Verringerung von Fremdorganellen zu beobachten, wurden während des Präparationvorgangs Proben entnommen und analysiert. Damit die Ergebnisse der Untersuchung einzelner Fraktionen einer Reinigung miteinander verglichen werden können, wurde jeweils die Gesamtproteinmenge dieser Fraktionen mittels Bradford-Assay bestimmt. Für Western Blots und Funktionsassays wurde die Gesamtproteinmenge der Proben durch eine entsprechende Verdünnung angeglichen. Im Fall der Western Blots mussten die Bedingungen, unter denen der Nachweis einzelner Proteine erfolgte, zusätzlich optimiert werden. Die Testparameter sind in **Tabelle 3.1** zusammengefasst, wobei die final verwendeten Parameter hervorgehoben sind. An dieser Stelle werden die Ergebnisse der jeweils optimalen Western Blot Variante, die im Abschnitt 2.2.8.4 beschrieben worden ist, vorgestellt.

Tabelle 3.1: Übersicht der getesteten Western Blot-Bedingungen. Die final verwendeten Parameter sind hervorgehoben. Legende: – ungeeignete Bedingung, + reproduzierbare Bedingung. (Abkürzungen: PM – Plasmamembran, üN – über Nacht, AK – Antikörper, n.u. – nicht untersucht, RT – Raumtemperatur, MP – Milchpulver, BSA – Rinderserumalbumin)

| Schritt | Parameter | Nop9 Kernmarker | Pma1 PM-Marker | Kex2 Golgi-Marker | Sec61p ER-Marker |
|---------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| Probenvorbereitung | unverändert | + | - | - | + |
| | TCA-Fällung | + | + | + | + |
| | EtOH-Fällung | + | - | + | n.u. |
| Blotting-Variante | <i>Wet Blot</i> | - | - | - | n.u. |
| | <i>Semidry Blot</i> | + | + | + | + |
| Blockierungsreagenz | 5 % (m/v) MP | + | + | + | + |
| primärer AK | Verdünnung, 4 °C, üN | 1 zu 5.000 | 1 zu 10.000 | 1 zu 5.000 | 1 zu 3.000 |
| Waschschritte | 3 % BSA | + | + | + | + |
| | PBS-T | + | - | - | + |
| sekundärer AK | Verdünnung, 1 h, RT | 1 zu 2.000 | 1 zu 2.000 | 1 zu 2.000 | 1 zu 2.000 |

ER-Marker Sec61p. Zunächst wurde der Verbleib der ER-Membran während der Reinigung mittels des ER-Markers Sec61p mittels Western Blot beobachtet (**Abbildung 3.5 A**). Aufgrund der angepassten Gesamtproteinkonzentrationen ist die Bandenintensität im Western Blot ein Indiz für den Verbleib des Markerproteins in den gesammelten Fraktionen. In den Sphäroplasten sowie im LSP ist die Signalintensität für Sec61p im Vergleich zu anderen Fraktionen geringer. Der Organellmarker ist im HSP deutlich angereichert. Dies gilt auch für die Mikrosomenfraktion und die final gewonnene OptiPrep-Fraktion des OptiPrep-Gradientens bei einer OptiPrep-Dichte von ca. 22 %. Ein direkter Vergleich der Mikrosomenfraktion und der OptiPrep-Fraktion dreier Replikate zeigt, dass im Mittel der OptiPrep-Gradient zu einer leichten Verringerung des Anteils des ER-Marker Proteins Sec61p führt. Trotz dieser leichten Verringerung des ER-Markers, verbessert der OptiPrep-Gradient die Qualität und Reinheit der Probe, wie am Ende dieses Unterkapitels näher erläutert wird.

Weitere, mittels Western Blot untersuchte, Organellmarker waren die Plasmamembran-ATPase (Pma1) als Markerprotein für die Plasmamembran, Nop9 für die Kernmembran und Kex2 für die Membran des Golgi-Apparats (Zinser *et al.*, 1995).

Plasmamembranmarker Pma1. Der Western Blot zum Nachweis von Pma1 weist auf der erwarteten Laufhöhe (110 kDa) nur schwache Signale auf (**Abbildung 3.5 B**). Diese sind in der Sphäroplastenfraktion und im LSP am intensivsten. Ein vergleichbares Signal wurde auch in der oberen Fraktion des Saccharosegradientens gemessen. In der OptiPrep-Fraktion wurde keine deutliche Bande in Laufhöhe der Pma1 detektiert.

Kernmarker Nop9. Die Kernmembran wird durch Nop9 repräsentiert und ist mittels Western Blots untersucht worden (**Abbildung 3.5 C**). Nop9 war im LSP am stärksten angereichert. Die weiteren Reinigungsschritte führen dazu, dass in der Fraktion des OptiPrep-Gradientens nur noch eine sehr geringe Menge des Proteins nachgewiesen wurde, was auf eine fast vollständige Entfernung der Kernmembran hindeutet.

Golgi-Apparat-Marker Kex2. Die Untersuchung zum Verbleib der Membran des Golgi-Apparats (**Abbildung 3.5 D**) zeigt, dass das Markerprotein Kex2 im HSP detektiert und in der oberen Fraktion des Saccharosegradientens angereichert wird. Dennoch ist auch in der Mikrosomenfraktion ein geringes Signal für die Golgi-Apparat-Membran detektiert worden. Der OptiPrep-Gradient trägt zur weiteren Abtrennung des Golgi-Apparat-Markers bei.

Zusammengefasst zeigen die Western Blots, dass in der finalen OptiPrep-Fraktion das ER-Markerprotein Sec61p angereichert wurde und die Markerproteine für die Kern-, Golgi-Apparat- und Plasmamembran abgereichert wurden.

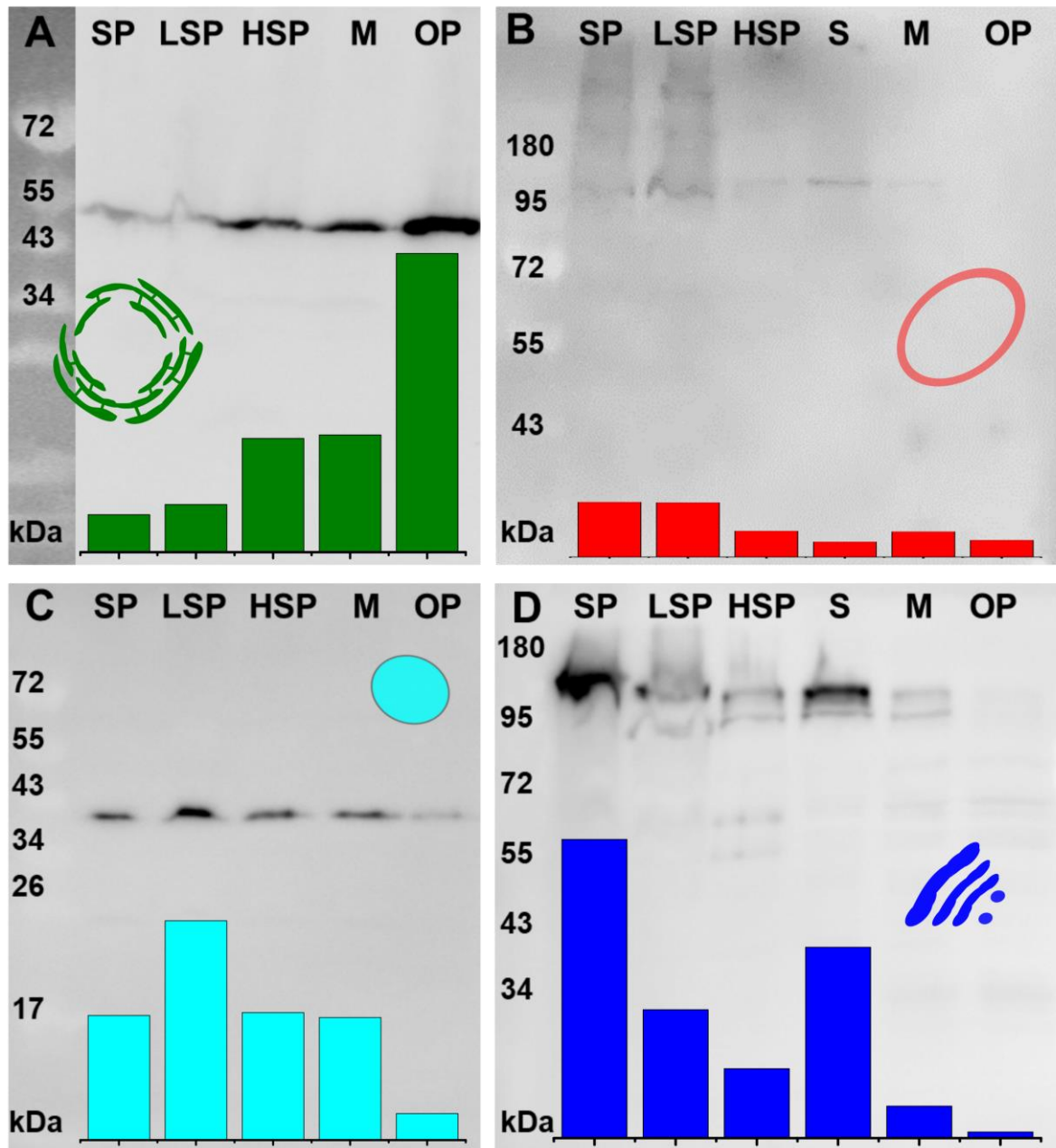


Abbildung 3.5: Western Blots verschiedener Reinigungsfraktionen gegen verschiedene Organellmarker am Beispiel einer Fraktionierung. Die Balkendiagramme entsprechen der densitometrischen Auswertung mittels ImageJ in arbiträren Einheiten. Western Blot gegen (A) den ER-Marker Sec61p, (B) gegen den Plasmamembranmarker Pma1, (C) gegen den Kernmembranmarker Nop9 (Fibrillarlin) und (D) gegen den Golgi-Apparat-Marker Kex2. Die gezeigten Fraktionen sind Sphäroplasten (SP), low speed pellet (LSP), high speed pellet (HSP), obere Fraktion des Saccharosegradientens (S), Mikrosomenfraktion (M), OptiPrep-Fraktion (OP).

Neben den immunologischen Untersuchungen wurden zum Nachweis der ER-, der Mitochondrien- und der Vakuolenmembran Funktionsassays zur Bestimmung der Aktivität eines Organell-spezifischen Enzyms durchgeführt. Wiederum wurden alle Fraktionen auf die gleiche Proteinmassenkonzentration eingestellt. Es wurden ein weiterer ER-Marker, das Enzym CytC Red, sowie der Mitochondrienmarker SDH und der Vakuolenmarker GGT untersucht (Abbildung 3.6).

ER-Marker NADPH-Cytochrom-c-P450-Reduktase (CytC Red). Dieses Enzym katalysiert die Übertragung von Elektronen von NADPH auf verschiedene Oxygenasen. In einem Zwischenschritt dieser Reaktion wird Cytochrom c durch die Aufnahme von Elektronen von NADPH reduziert (Uniprot: P16603). Diese reduzierte Form des Cytochrom c hat ein Absorptionsmaximum bei 550 nm und kann so photometrisch nachgewiesen werden. Die hier verwendete Nachweismethode nutzt die Höhe des Absorptionspeaks als Indikator für die Menge der CytC Red einer bestimmten Membranfraktion (**Abbildung 3.6 A**). Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen von CytC Red in den einzelnen Fraktionen spiegeln das immunologisch untersuchte Vorkommen von Sec61p recht gut wider. Die Sphäroplasten weisen eine verhältnismäßig geringe Aktivität des Enzyms auf, das heißt, der Anteil an CytC Red ist im Vergleich zum Gesamtprotein gering. Im LSP kann anders als beim immunologisch nachgewiesenen Sec61p kein Signal gemessen werden. Hingegen wird im HSP eine Reduktion des Cytochrom c und somit eine Aktivität des Markerenzym CytC Red gemessen. Auch in der oberen Saccharosegradientenfraktion wird ein Signal des ER-Markers CytC Red gemessen. Am höchsten ist die Aktivität der CytC Red in der Mikrosomenfraktion. Durch den finalen OptiPrep-Gradienten sinkt die gemessene Aktivität von CytC Red im Vergleich zu den Mikrosomen zwar um knapp 30 %. Verglichen mit den Sphäroplasten als Ausgangspunkt liegt dennoch ein Anreicherungsfaktor der ER-Membran von 4 vor, der in dieser Größenordnung auch in der Literatur beschrieben wird (Zinser und Daum, 1995).

Mitochondrienmarker Succinatdehydrogenase (SDH). Der Gehalt an mitochondrieller Membran wurde anhand der Aktivität von SDH ermittelt (**Abbildung 3.6 B**). Letztere ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert dort die Oxidation von Succinat zu Fumarat als Teilschritt des Citratzyklus unter Übertragung von zwei Elektronen auf $FADH_2$ (Uniprot: Q00711). Der Nachweis der Reaktion erfolgte durch die Übertragung der Elektronen auf den bei 600 nm absorbierenden Farbstoff 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP), der in der reduzierten Form als Aminodiphenol nicht mehr bei dieser Wellenlänge absorbiert. In der Sphäroplastenfraktion wurde nur eine geringe Absorption gemessen, was auf eine starke DCIP Reduktion hinweist und somit für eine hohe Enzymaktivität steht. Ein Teil des Enzyms wird zusammen mit der Mitochondrienmembran im LSP abgetrennt. Die Membranen mit SDH-Aktivität, die im HSP gesammelt wurden, sind scheinbar auch in der Mikrosomenfraktion enthalten. Durch den OptiPrep-Gradienten wird die Menge dieser Membranen um etwa 75 % reduziert.

Vakuolenmarker γ -Glutamyltransferase (GGT). Zum Nachweis der Vakuolenmembran wurde die Aktivität des Transmembranproteins GGT, das ein Glutamyl-Rest bei der Bildung von Glutathion überträgt, bestimmt. Dabei bindet die in der Probe enthaltene GGT das zugesetzte Substrat L- γ -Glutamyl-*p*-Nitroanilid und setzt es zu *p*-Nitroanilin um, welches in dieser Form bei 418 nm absorbiert. So konnte die Produktbildung photometrisch verfolgt werden. Die Aktivitätsverteilung zeigt, dass

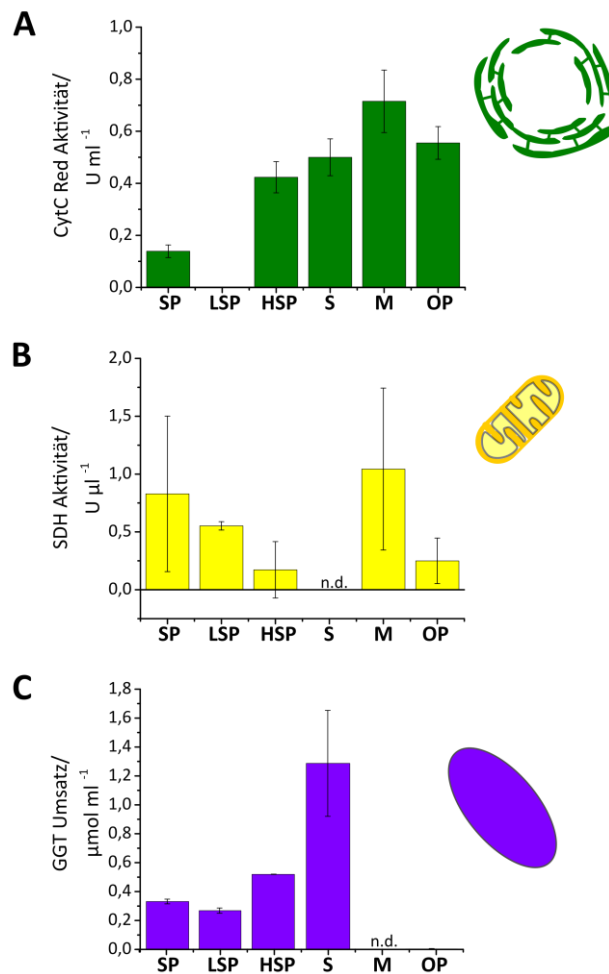


Abbildung 3.6: Enzymaktivität von Markerenzymen für **(A)** das ER (CytC Red), **(B)** die Mitochondrien (SDH) und **(C)** die Vakuole (GGT) in den Reinigungsfraktionen der ER-Präparation. Untersuchte Fraktionen: Sphäroplasten (SP), low speed pellet (LSP), high speed pellet (HSP), obere Fraktion des Saccharosegradientens (S), Mikrosomenfraktion (M) und OptiPrep-Fraktion (OP). (n.d. – nicht detektiert, CytC Red – NADPH-Cytochrom-c-P450-Reduktase, SDH – Succinatdehydrogenase, GGT – γ -Glutamyltransferase).

dieses Markerprotein zu einem geringeren Teil im LSP abgetrennt wird (**Abbildung 3.6 C**). Der Anteil des Markerproteins, der sich im HSP wiederfindet, wird in der oberen Fraktion des Saccharosegradientens angereichert und so von der Mikrosomenfraktion effektiv abgetrennt.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Markerprotein-basierten Charakterisierung der Reinigungsfraktionen. **Abbildung 3.7** fasst die Ergebnisse der Western Blots und Funktionsassays von Organellmarkern zusammen. Es wird jeweils das Verhältnis des Signals der finalen Fraktion zu der Ausgangsfraktion, den Sphäroplasten, auf einer \log_2 -Skala betrachtet. Diese Skalierung wurde gewählt, um das Maß der Abreicherung, das zwischen 0 und 1 liegt, optisch besser ins Verhältnis mit der Anreicherung zu setzen, deren Werte 1 bis unendlich betragen können. Die Grenze zwischen Abreicherung (<1) und Anreicherung (>1) wurde als Schnittpunkt mit der Ordinate gewählt. Die aus

den Signalen gebildeten Verhältnisse OP zu SP (bzw. M zu SP., s.u.) der Organellmarker für die Vakuolenmembran, die Mitochondrienmembran, die Plasmamembran, die Golgi-Apparat- und die Kernmembran ergeben Werte kleiner 1, was auf einen reduzierten Gehalt von Fremdorganellen im finalen Produkt hinweist. Die Werte der gebildeten Verhältnisse für das ER-Translocon (Sec61) und für CytC Red sind größer als 1, sodass eine Anreicherung im finalen Produkt vorliegt.

Beurteilung des Nutzens des OptiPrep-Gradientens. Anhand der **Abbildung 3.7** lässt sich beurteilen, ob der OptiPrep-Gradient als Ergänzung zur klassischen Präparation von Wuestehube und Schekman eine Steigerung der Reinigungsqualität bewirkt. Dazu wurde das Verhältnis zwischen den Signalen der Mikrosomenfraktion und den Signalen der Sphäroplasten (helle Farbvariante) sowie das Verhältnis zwischen den Signalen der OptiPrep-Fractionen und den Signalen der Sphäroplasten (kräftige Farbvariante) für die jeweiligen Organellmarker aufgetragen. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der Mikrosomenfraktion und der OptiPrep-Fraktion und damit die Einschätzung des Nutzens des OptiPrep-Gradientens. Es wird deutlich, dass insbesondere der Gehalt an Kern-, Mitochondrien- und Golgi-Apparat-Marker durch den zusätzlichen OptiPrep-Gradienten in der finalen Fraktion verringert wird. Für die Plasmamembran ist kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Durch den OptiPrep-Gradienten wird auch der Anreicherungsfaktor für die ER-Membran leicht verringert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ER-Membranen durch das hier beschriebene Protokoll angereichert werden. Fremdorganellen werden größtenteils abgetrennt. Diese Wirkung wird durch den angeschlossenen OptiPrep-Gradienten verstärkt.

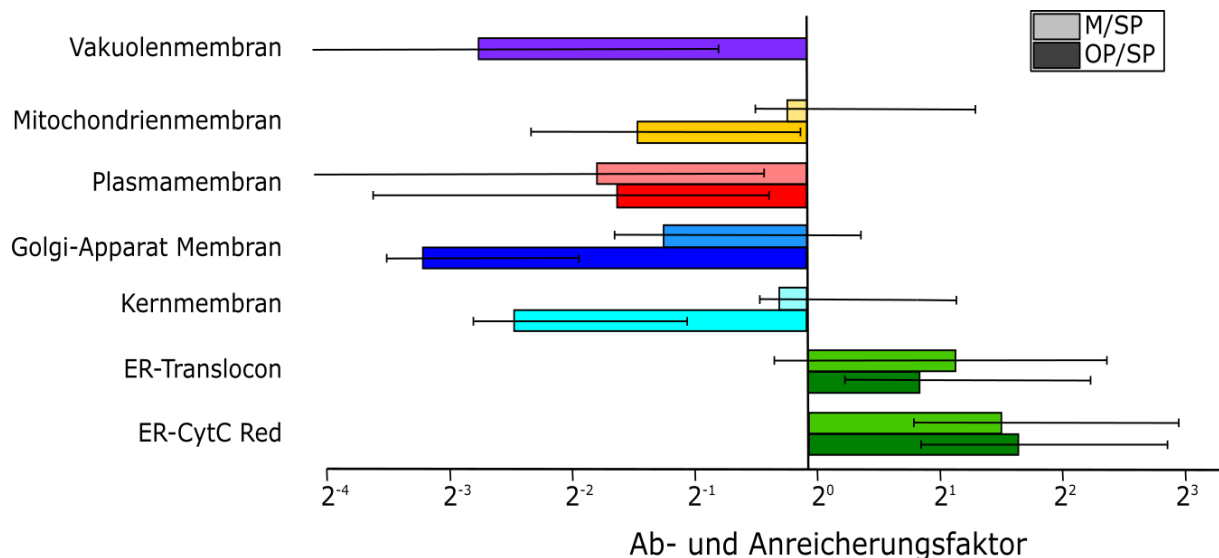


Abbildung 3.7: Übersichtsdarstellung der Reinigungscharakterisierung durch klassische Organellmarker durch Western Blots und Funktionsassays. Aufgetragen ist das Verhältnis der Signalintensität der Mikrosomenfraktion (M) und der Signalintensität der Sphäroplasten (SP) (helle Farbvariante) bzw. die Signalintensität der OptiPrep (OP)-Fraktion und der Signalintensität der SP (dunkle Farbvariante). Der M/SP-Wert für die Vakuolenmembran wurde nicht bestimmt, da keine GGT-Aktivität in der Mikrosomenfraktion detektiert wurde. Die Daten basieren auf drei, im Ausnahmefall zwei, Replikaten aus verschiedenen Reinigungsansätzen. Die Balken entsprechen dem Mittelwert der Messungen. Die Enden der Fehlerbalken entsprechen dem maximalen beziehungsweise minimalen gemessenen Wert und stellen somit die Spannweite der gemessenen Ergebnisse dar.

3.1.2.2 Analyse des Reinigungsverlaufs mittels Massenspektrometrie

Die Beurteilung der Reinigungsqualität mittels immunologischer und funktionaler Nachweise von Organellmarkern basiert auf in der Literatur etablierten Vorgehensweisen (Zinser *et al.*, 1995). Außerdem wurde ein Ansatz gewählt, der einen Großteil der Proteine der einzelnen Fraktionen berücksichtigt. Dazu wurden die Fraktionen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jun.-Prof. Carla Schmidt mittels Flüssigkeitschromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie mit zwei massenspektrometrischen Detektoren (LC-MS/MS) nach enzymatischem Verdau der Proteine analysiert (Andersen *et al.*, 2006) und die Verteilung der Hefeproteine betrachtet. Da es sich bei den eingesetzten Proben um Membranen handelt, wurde die Untersuchung auf Membranproteine und Membran-assoziiierter Proteine fokussiert.

Die Probenvorbereitung der auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellten Reinigungsfractionen beinhaltet die Spaltung der Proteine durch die Protease Chymotrypsin, welche C-terminal von aromatischen Aminosäuren sowie Leucin schneidet. Die Proben mit den erhaltenen Peptiden wurden mittels LC-MS/MS untersucht und die Spektren durch die Analysesoftware MaxQuant ausgewertet (durchgeführt von Susann Kostmann und Julian Bender, AG Schmidt, MLU Halle-Wittenberg). Unter Verwendung der MaxQuant Software wurden die Peptidspektren anhand einer Datenbanksuche annotiert und den entsprechenden Hefeproteinen zugeordnet. Um Aussagen zur relativen An- und Abreicherung von Proteinen in den verschiedenen Fraktionen zu machen, wurde die in MaxQuant (Cox *et al.*, 2014) implementierte „*label free quantification*“ (LFQ) genutzt. Hierbei wurden die Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z -Werte) der zu quantifizierenden Peptide relativ zwischen den Proben verglichen, sodass die Abundanz der jeweiligen Proteine berechnet werden konnte. In der hier verwendeten Software wurden nur solche Proteine berücksichtigt, die in den unterschiedlichen Datensätzen mindestens zweimal die gleichen m/z -Werte aufweisen (Cox *et al.*, 2014). Das Programm berücksichtigt weiterhin, dass die Retentionszeit eines Peaks in der Probe leicht verschoben sein kann. Basierend auf korrigierten Retentionszeiten und m/z -Werten der Vorläuferionen kann auch ein Peptid ohne Fragmentierung quantifiziert werden. Wurde ein Peptid während einer Analyse nur im MS-Modus aber nicht im MS/MS-Modus aufgezeichnet, aber in einem anderen Datensatz bei gleicher Retentionszeit und gleichem m/z -Wert ein Peptid im MS/MS identifiziert, so wird angenommen, dass es sich um das gleiche Peptid handelt („*Identification transfer*“). Aus den von der Software ermittelten LFQ-Intensitäten der Peptide wurden Intensitätswerte der Proteine berechnet. Diese Intensitätswerte der jeweiligen Fraktionen wurden dann durch die LFQ-Intensitäten der Sphäroplastenfraktion geteilt, um so einen relativen Wert der Abundanz eines bestimmten Proteins zu erhalten.

Die Zuordnung der identifizierten Proteine zu ihren Ursprungsorganellen erfolgte anhand der in der UniProt-Datenbank beschriebenen Lokalisation. So wurde vermieden, dass cytosolische Proteine, die

von Plasmamembran- oder ER-Membranvesikeln aufgenommen worden sind, in der Analyse berücksichtigt werden. Die gezeigten Daten beinhalten außerdem nur Proteine, die in mindestens zwei von vier Replikaten identifiziert wurden. In der Sphäroplastenfraction wurden acht Golgi-Apparat-Membranproteine, zwei Plasmamembranproteine, 17 ER-Membranproteine, drei Kernmembranproteine, 20 Mitochondrienmembranproteine und vier Vakuolenmembranproteine identifiziert. Proteine aus Peroxisomen oder Endosomen wurden in allen Analysen nie mehr als einmal identifiziert und wurden daher nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3.8** zusammengefasst:

Im **LSP**, welches schwere Zellbestandteile sowie Zellwandrückstände enthält, wurden nur wenige Proteine, davon ein Kernprotein, detektiert. Im **HSP** hingegen wurden Proteine der Plasmamembran und der Organellmembranen detektiert.

Durch den Saccharosegradienten wurden die Membranen des HSPs in die **obere Fraktion des Saccharosegradientens** und in die Mikrosomenfraction aufgetrennt. Die obere Fraktion des Saccharosegradientens enthält die detektierten Golgi-Apparat-Membranproteine sowie Vakuolenmembranproteine in vergleichsweise konzentrierter Form. Auch Proteine der Kernmembran wurden hier mit erhöhter Konzentration nachgewiesen. Von den 17 ER-Membranproteinen, welche in der Sphäroplastenfraction detektiert wurden, liegen 14 auch in dieser Fraktion vor. Mitochondriale Membranproteine sind in dieser Fraktion kaum enthalten.

In der **Mikrosomenfraction** wurden viele ER- und mitochondriale Proteine identifiziert. Gleichzeitig wurden nur zwei von vier Vakuolenmembranproteinen zugeordnet. Eines von diesen wurde im Vergleich zu den Sphäroplasten stark angereichert. Des Weiteren wurde nur eine geringe Zahl an Membranproteinen des Golgi-Apparats und des Kerns identifiziert. Folglich enthält diese Fraktion vor allem ER-Membranproteine und mitochondriale Membranproteine.

Der in der Mikrosomenfraction beobachtete Trend, dass Proteine aller Organellen außer des ERs und der Mitochondrien angereichert wurden, setzt sich in der **OptiPrep-Fraction** fort. Es wurden vier Golgi-Apparat-spezifische Proteine detektiert, von denen lediglich Sar1p angereichert vorlag. Die kleine GTPase Sar1p bindet als Teil ihrer Aufgabe bei der COPII-Vesikelbildung an das ER (d'Enfert *et al.*, 1991). Ein einzelnes Protein der Plasmamembran wurde scheinbar angereichert. Dabei handelt es sich um Gas1p, ein Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Protein, das Zuckerbausteine zur Zellwandsynthese verknüpft und über das ER und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert wird (Mouyna *et al.*, 2000). Auch Kernmembranproteine sowie Vakuolenmembranproteine wurden im Vergleich zu den Mikrosomen weiter angereichert. Mitochondriale Proteine wurden in großer Anzahl

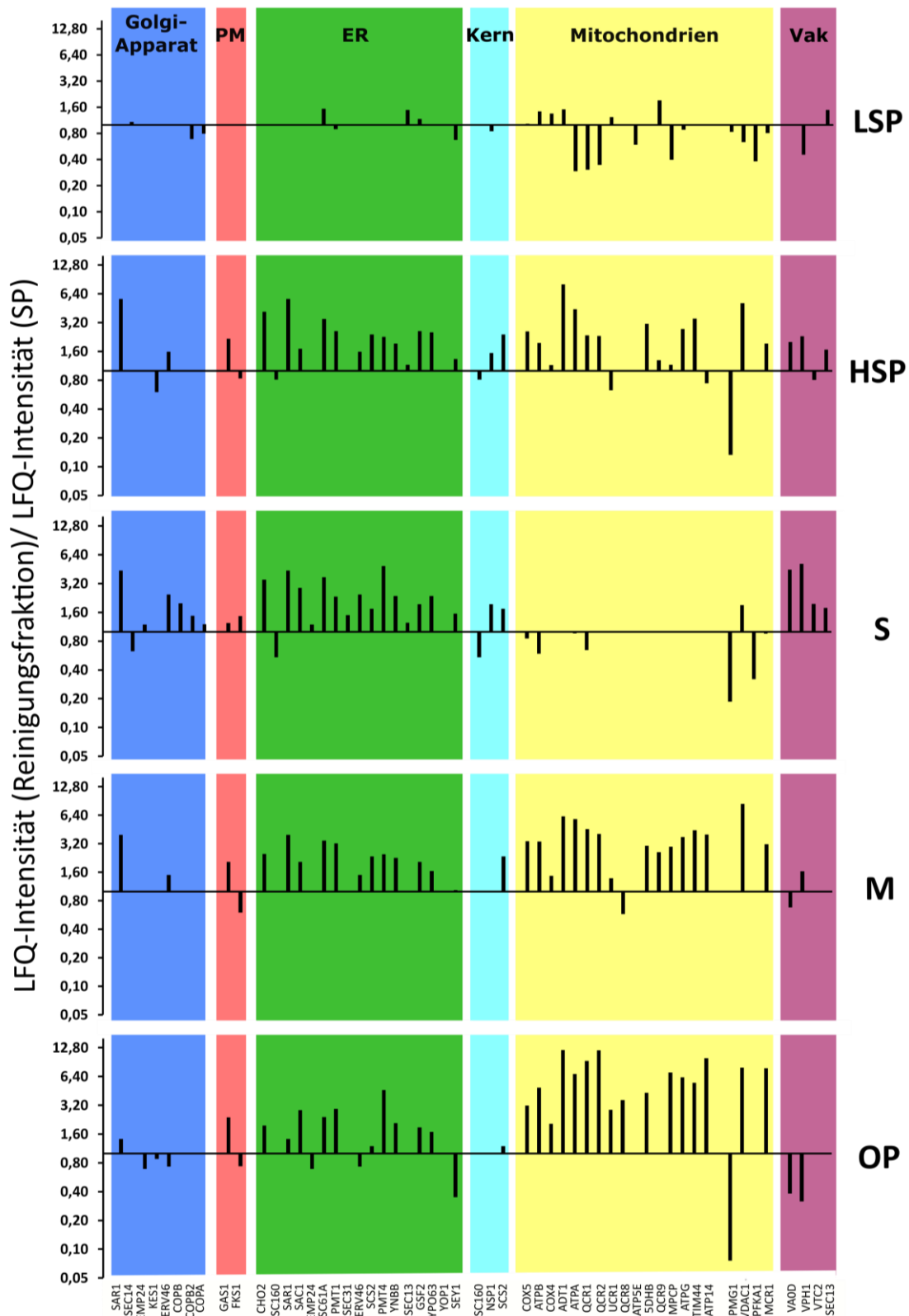


Abbildung 3.8: Verhältnisse der LQ-Intensitäten der verschiedenen Proteine (vgl. Gennamen unterhalb der Diagramme) in ihren Reinigungsfraktionen (rechts aufgeführt) gegenüber den LQ-Intensitäten in den Sphäroplasten (SP). Die Ergebnisse sind auf einer log₂-Skala dargestellt. Jeder Balken stellt den Mittelwert der Replikate dar. Die Organellnamen stehen stellvertretend für die Membran der jeweiligen Organellen. Außerdem wird die Plasmamembran (PM) berücksichtigt. Die jeweiligen Farben spiegeln die Zuordnung der gefundenen Proteine zu einem bzw. mehreren Organellen anhand der UniProt-Datenbank wider. (Vak – Vakuole, LQ – label free quantification, HSP – high speed pellet, LSP – low speed pellet, S – Saccharosegradient obere Fraktion, M – Mikrosomenfraktion, OP – OptiPrep-Fraktion)

und hoher Konzentration identifiziert. Da der Gehalt an mitochondrialer Membran in den Mikrosomen und in der OptiPrep-Fraktion vergleichbar war, scheint der OptiPrep-Gradient kaum zu einer Abreicherung speziell dieser Membranen beizutragen. ER-Membranproteine liegen im Vergleich zu den Sphäroplasten angereichert vor, allerdings nahm das Verhältnis an ER-Membranen im Vergleich zu den Sphäroplasten von der Mikrosomenfraktion zur OptiPrep-Fraktion ab. Der OptiPrep-Gradient führt demnach zur Verringerung von Fremdmembranen, wirkt sich aber auch negativ auf den Anreicherungsfaktor der ER-Membranen aus.

3.1.3 Analyse der Lipidzusammensetzung der gereinigten Mikrosomen

Aus der Mikrosomenfraktion wurden die enthaltenen Lipide nach Matsuoka *et al.*, 1995 extrahiert und von Tommy Hofmann (AG Jun.-Prof. Carla Schmidt, ZIK HALOmem, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) massenspektrometrisch untersucht. Bei den identifizierten Lipiden handelt es um solche mit folgenden Kopfgruppen: Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI). Die identifizierten Fettsäureketten sind heterogen (**Tabelle 3.2**). Vor allem wurden Lipidspezies mit C₁₆- und C₁₈-Acylketten identifiziert, die z.T. eine Doppelbindung aufwiesen. Das Vorhandensein von Ergosterol wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht, da es einen m/z-Wert von 396,34 aufweist und somit nicht im Aufzeichnungsbereich von 500 bis 1000 m/z liegt. Dieser Massenbereich wurde gewählt, um z.B. Lösungsmittelverunreinigungen zu umgehen. Auch Cardiolipin wurde mit der genutzten Methode nicht identifiziert, da der entsprechende m/z-Wert oberhalb der Aufzeichnungsgrenze eines m/z-Wertes von 1000 liegt.

Tabelle 3.2: Identifizierte Lipidklassen und Fettsäurereste

| Kopfgruppe | Fettsäureketten |
|------------|-----------------|
| PA | 16:1/18:1 |
| | 16:0/18:1 |
| PE | 16:1/18:1 |
| | 16:0/18:1 |
| PS | 16:0/16:1 |
| | 16:1/16:1 |
| | 16:1/18:1 |
| | 16:0/18:1 |
| PI | 16:1/16:0 |
| | 16:0/16:0 |
| | 16:0/18:0 |
| | 16:0/18:1 |
| | 18:0/18:1 |
| | 16:0/10:0 |

3.2 Bildung von großen Lipidvesikeln aus isolierten ER-Membranen

Im vorangegangenen Kapitel ist die erfolgreiche Anreicherung von ER-Membranen aus Hefezellen dargestellt. Dieses Unterkapitel beschreibt zum einen, wie aus den aus Membranen extrahierten Lipiden GUVs formiert werden, und zum anderen, wie die gesamte Biomembran zur Bildung von GUVs eingesetzt wird.

3.2.1 Bildung von GUVs aus extrahierten Lipiden

Für Studien des ERs auf Grundlage der Lipide und unter Vernachlässigung der Proteine wurden aus der Mikrosomenfraktion isolierte Lipide elektroformiert (Angelova *et al.*, 1986). Dazu wurden die extrahierten Lipide (s. Abschnitt 2.2.12) mit Rhodamin-PE versetzt und auf ein ITO-Gläschen getropft, um lokal eine hohe Lipidmenge zu erhalten. Für ein ITO-Gläschen wurde die Hälfte der Extraktionsausbeute einer 14 L-Kultur verwendet. Die Elektroformation wurde, wie in Abschnitt 2.2.16 beschrieben, durchgeführt. Die erfolgreiche Bildung der GUVs aus isolierten ER-Lipiden wurde mit dem LSM überprüft und ist in **Abbildung 3.9** dargestellt.

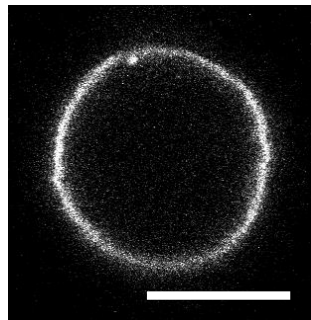


Abbildung 3.9: GUV aus extrahierten Lipiden. Der GUV-Ansatz wurde über eine Zeitdauer von 7 h bei 10 Hz und 3 V (Spitze-Spitze-Wert) elektroformiert. Die Visualisierung erfolgte durch die Anregung von Rhodamin-PE bei 561 nm. Die Fluoreszenz wurde in einem Emissionsbereich von 570-735 nm detektiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

3.2.2 Bildung von GUVs aus natürlichen ER-Membranen

Um dem natürlichen System einen weiteren Schritt näher zu kommen, sollen hier GUVs aus allen Bestandteilen der natürlichen ER-Membran, also Lipiden und Proteinen, gebildet werden. Die angereicherten ER-Membranen bilden kleine aggregatartige Ansammlungen an Vesikeln, die Mikrosomen, die einen Durchmesser unterhalb der Auflösung des LSMs haben (**Abbildung 3.10 A** und **B** links). Um diese zu GUVs zu fusionieren, wurden zunächst verschiedene etablierte Methoden getestet. Diese umfassten die Membranfusion durch divalente Kationen (Fohr *et al.*, 1993; Papahadjopoulos *et al.*, 1976), das Quellen auf Agarose (Horger *et al.*, 2009) bzw. Polyvinylalkohol (PVA) (Weinberger *et al.*, 2013) und darüber hinaus Elektroformationsmethoden mit ITO-beschichteten Gläschen (Angelova *et al.*, 1986; Dimitrov *et al.*, 1987; Politano *et al.*, 2010) bzw. mit

Platindrähten (Bagatoli *et al.*, 1999). Eine kurze Übersicht zur Durchführung und zu den Ergebnissen ist im Anhang A3 gezeigt. Diese Experimente führten nicht zur Fusion der isolierten Membranen, sodass eine neue biochemische Herangehensweise gewählt wurde. Dazu wurde das ER aus Hefestämmen gereinigt, die das Protein Sey1p verstärkt produzieren. So kann der Mechanismus der Sey1p-katalysierten Fusion von Membranen zur Bildung sehr großer Vesikel genutzt werden (Dreier *et al.*, 2000). Da die Fusion der Membranen durch die Dimerisierung von zwei Sey1p-Molekülen bei GTP Bindung stattfindet (Yan *et al.*, 2015), wurden die Membranen mit GTP gemischt. Innerhalb weniger Minuten konnte mittels Mikroskopie (LSM) eine Fusion der Mikrosomen zu Giant Endoplasmic Reticulum vesicles (GERVs) beobachtet werden (**Abbildung 3.10 A und B rechts**). Da die konfokale Mikroskopie zur Abbildung einer einzelnen z-Ebene führt, entspricht die ringförmige Struktur dem Äquator einer hohlen Kugel – also dem Querschnitt eines GERVs. Dies konnte durch die Aufnahme mehrere Bilder in der gleichen xy-Ebene an verschiedenen z-Positionen (Z-Scan) zur Generation einer Maximumintensitätsprojektion bestätigt werden (**Abbildung 3.10 C**). An der Membranoberfläche haften kleinere Membranvesikel und -ansammlungen.

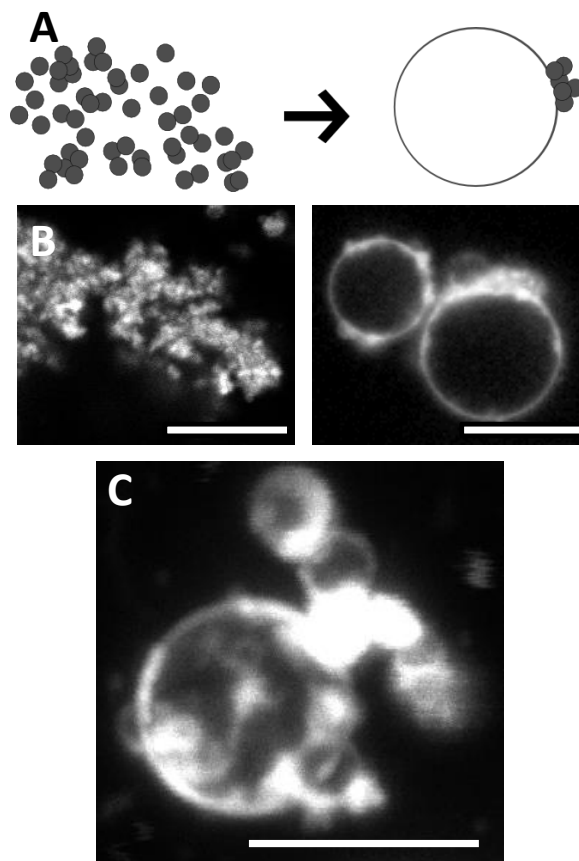


Abbildung 3.10: (A) Schematische Darstellung und (B) konfokale Fluoreszenzaufnahmen von gereinigten, Sey1p-angereicherten ER-Membranen ohne (links) und mit GTP (rechts). (C) Maximumintensitätsprojektion aus einem Z-Scan zur Darstellung eines gebildeten GERVs. Membranen wurden mit MM1-43 markiert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 488 nm und die Detektion bei 495-630 nm. Die Maßstabbalken entsprechen 5 μm .

Um sicher zu stellen, dass die GERV-Bildung ein Effekt der Sey1p-vermittelten Fusion ist, wurde die ER-Membranfusion von zwei Zelllinien analysiert. Bei den Zelllinien handelte es sich zum einen um den WT-Stamm KBY1139 alias BY4741 (Brachmann *et al.*, 1998), der keine Plasmide zur zusätzlichen Genexpression enthält und zum anderen um den Stamm KBY1140, der zusätzlich Plasmid-kodiertes SEY1 exprimiert. Die isolierten Membranen wurden jeweils mit 10 mM GTP versetzt und unter gleichen Bedingungen für 4 h inkubiert. Nur in dem Ansatz, der Membranen mit einer erhöhten Kopienzahl an Sey1p enthielt, entstanden GERVs (**Abbildung 3.11**).

Neben den gewünschten GERVs wurden am Deckglasboden bei einzelnen Ansätzen auch tubuläre Strukturen, die ein dreidimensionales Netzwerk bildeten, beobachtet (**Abbildung 3.12**). Einzelne Tubuli hatten einen Durchmesser von 0,5 μm . Die Strukturen traten unter sehr verschiedenen Bedingungen, sehr unregelmäßig auf. Sie wurden bei 2,5 mM GTP und 30 mM GTP sowie bei frisch präparierten, einmal in flüssigem Stickstoff eingefrorenen und bei -80 °C gelagerten Präparationen beobachtet.

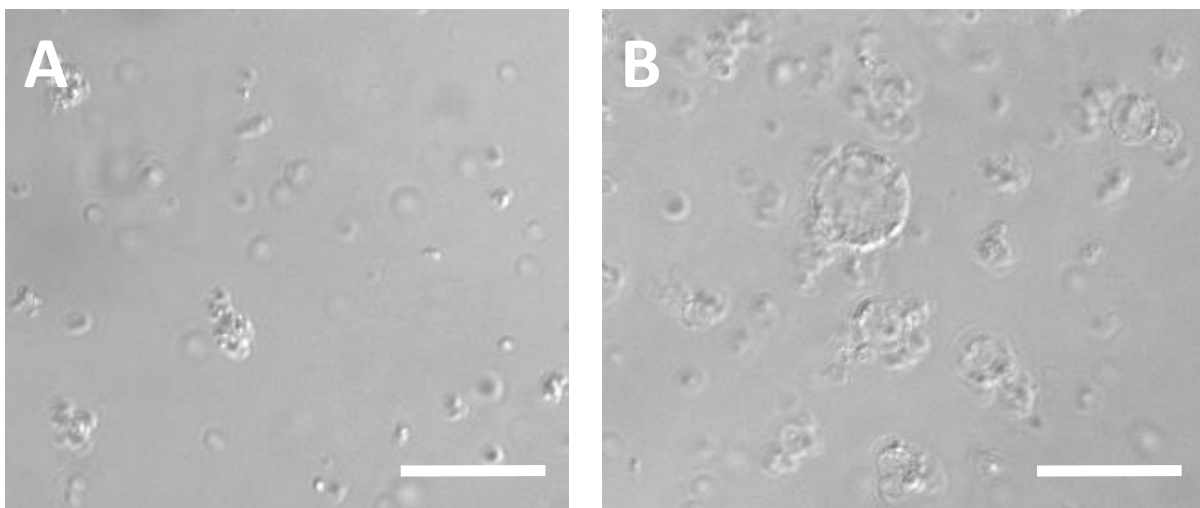


Abbildung 3.11: ER-Membranen (**A**) aus WT-Zellen und (**B**) aus verstärkt SEY1-exprimierenden Zellen mit 10 mM GTP aufgenommen unter DIC-Bedingungen. Maßstabsbalken entsprechen 20 μm .

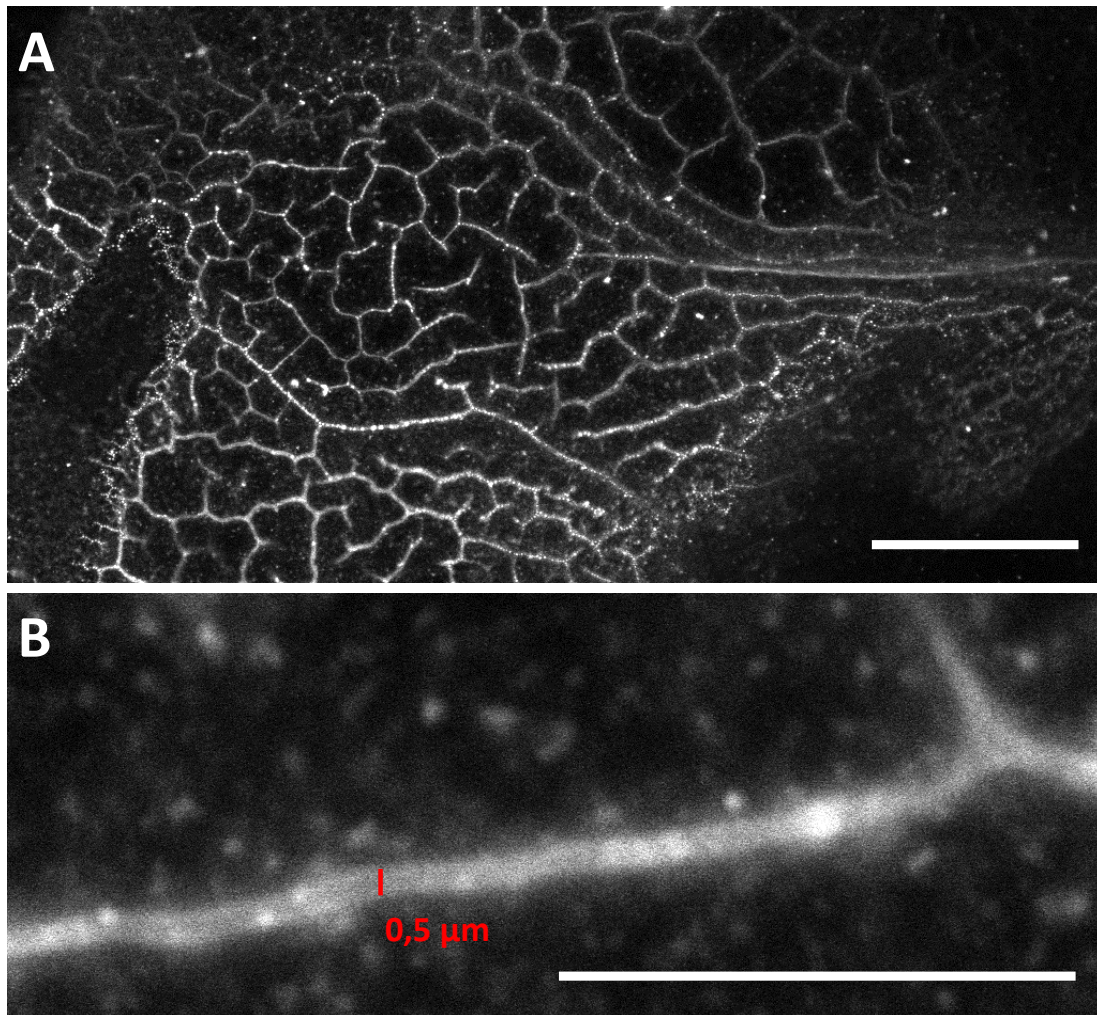


Abbildung 3.12: Tubuläre Strukturen am Deckglasboden. **(A)** zeigt einen Überblick einer ER-Membran-Probe isoliert aus KBY1140 6,5 h nach Zugabe von 2,5 mM GTP. Maßstabsbalken entspricht 40 µm. **(B)** zeigt eine Vergrößerung einer tubulären Struktur derselben Probe. Maßstabsbalken entspricht 10 µm. Die Fluoreszenz des Membranfarbstoffs MM1-43 wurde bei 488 nm angeregt und im Bereich von 495-630 nm detektiert.

3.2.3 Optimierung der Fusionsbedingungen von ER-Membranen zu GERVs

Membranen werden durch Sey1p zu GERVs fusioniert. Der Prozess der Membranfusion sollte für Folgeexperimente optimiert werden. Die folgenden Parameter wurden zu Optimierungszwecken näher untersucht: die Art der Probenkammer, die optimale Membranmenge sowie die Konzentration an eingesetztem GTP.

3.2.3.1 Einsatz verschiedener Probenkammern für die Bildung und spätere Verwendung von GERVs

Bei der Verwendung von inversen Mikroskopen muss eine Probenkammer mit dünnem Glasboden verwendet werden. Es gibt viele Möglichkeiten, dies im Zusammenhang mit der GERV-Bildung umzusetzen. Eine Variante ist es, die ER-Membranen in einem Reaktionsgefäß mit GTP zu mischen und nach der GERV-Bildung auf einen dünnen Objektträger zu überführen. Bei diesem Prozess vermindert

sich allerdings die GERV-Ausbeute, da ein Teil der GERVs beim Pipettieren durch die mechanische Belastung platzen kann. Außerdem hat man während der Bildung der GERVs keinen Überblick über die Probe, sondern beobachtet erst am Ende der Inkubationsdauer, ob GERVs gebildet wurden. Setzt man die GERV-Bildung zwischen zwei Deckgläschen in einer geschlossenen Kammer an (**Abbildung 3.13 A**), liegt ein geschlossenes System vor, zu dem keine weiteren Komponenten hinzugefügt werden können. Eine Alternative stellen Flusskammern dar. Diese können zunächst mit ER-Membranen befüllt und dann mit GTP oder anderen Substanzen versetzt werden. Setzt man eine solche Flusskammer ein, bilden sich große GERVs aus (**Abbildung 3.13 B**). Die Handhabung erfordert einige Übung und das Spülen der Kammer mit verschiedenen Substanzen führt zu einer schwer kontrollierbaren Gesamtzusammensetzung der Probe in der Flusskammer. Darüber hinaus können GERVs im Fluss mitgerissen werden. Als einfach zu handhabende Alternative wurden selbst modifizierte Mikrotiterplatten verwendet (s. 2.2.18.1). Dazu wurden 96-Well Platten eingesetzt, bei denen ein Teil des Bodens durch Deckgläschen ersetzt wurde (**Abbildung 3.13 C und D**). Die Probenkammern besitzen mittig einen kleinen Trog, den man mit einem inversen Mikroskop beobachten kann (vgl. **Abbildung 2.2**). Oberhalb des Trogs befindet sich eine Kante, an der man die Pipette absetzen kann, um vorsichtig

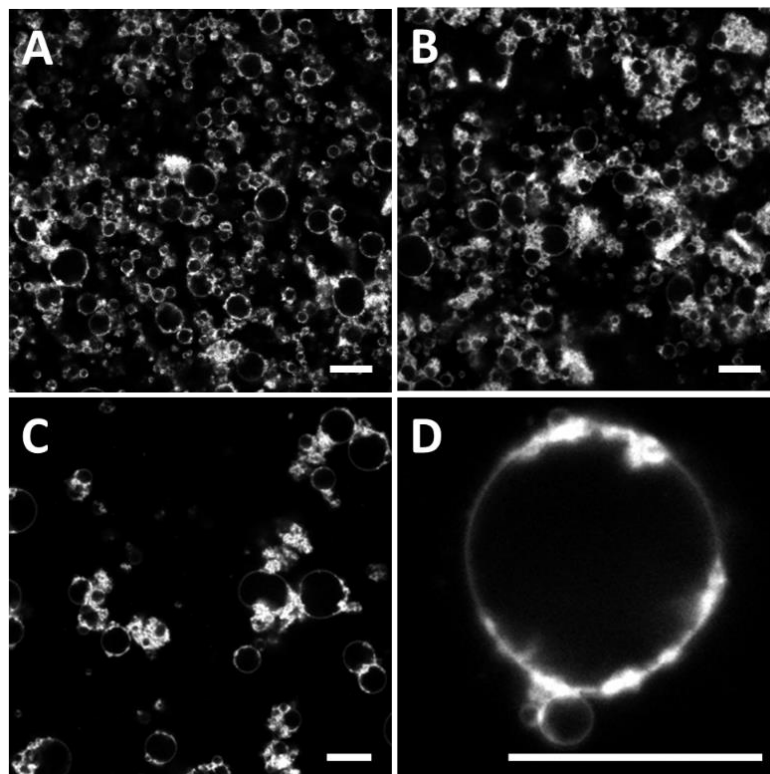


Abbildung 3.13: GERV-Bildung in verschiedenen Mikroskopiekammern. **(A)** Fusion von ER-Membranen in Anwesenheit von 5 mM GTP zwischen zwei Deckgläschen (17x17 mm) mit drei Schichten doppelseitigem, ausgestanztem Klebeband als Abstandhalter. Die Bildaufnahme erfolgte nach 3 h Inkubationszeit. **(B)** Fusion in einer Flusskammer mit einem Probenvolumen von 1,6 ml bei 1 mM GTP. Die Bildaufnahme erfolgte 4 h nach GTP Zugabe. **(C)** und **(D)** Fusion von ER-Membranen in Anwesenheit von 1 mM GTP in selbstgebauten Mikroskopiekammern. Die Bildaufnahmen erfolgten nach 45 min (C) bzw. 3 h (D). Die Membranen wurden mit MM1-43 markiert, dessen Fluoreszenz bei 488 nm angeregt wurde und bei 495-630 nm detektiert wurde. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm (A-C) bzw. 10 μm (D).

Flüssigkeit auszutauschen. Im Verlauf oder im Anschluss an die GERV-Bildung ist es jederzeit möglich durch Pipettieren Membranen aus der Kammer zu entfernen oder weitere Membranen zuzugeben. Auch die Zugabe weiterer Komponenten ist problemlos möglich. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit wurden alle folgenden Experimente in selbstgebaute Probenkammern durchgeführt.

3.2.3.2 Optimierung der Membran- und GTP-Konzentration im Fusionsansatz

Die Bildung von GERVs ist abhängig von der Menge an eingesetzter Membran und dem verfügbaren GTP. Daher wurden die Menge an Membranen und die GTP-Konzentration variiert und die Fusion beobachtet. Um die eingesetzte Menge an ER-Membranen zu quantifizieren, wurde die Konzentration aller enthaltenen Proteine mittels Bradford-Assay in mg ml^{-1} Protein bestimmt. Membranen wurden so in B88-Puffer verdünnt, dass Proteinkonzentrationen von $0,01$ bis $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$ vorlagen. Diese wurden jeweils mit 5 mM GTP versetzt und nach 4 h mittels LSM analysiert (**Abbildung 3.14**). Bei einer Proteinkonzentration von $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ wurden freiliegende, gut zu beobachtende GERVs mit einer guten Ausbeute beobachtet. Bei höherer Konzentration ist die Probe sehr unübersichtlich und es gibt wenig freiliegende Membranen. Liegt sie darunter, bilden sich weniger GERVs.

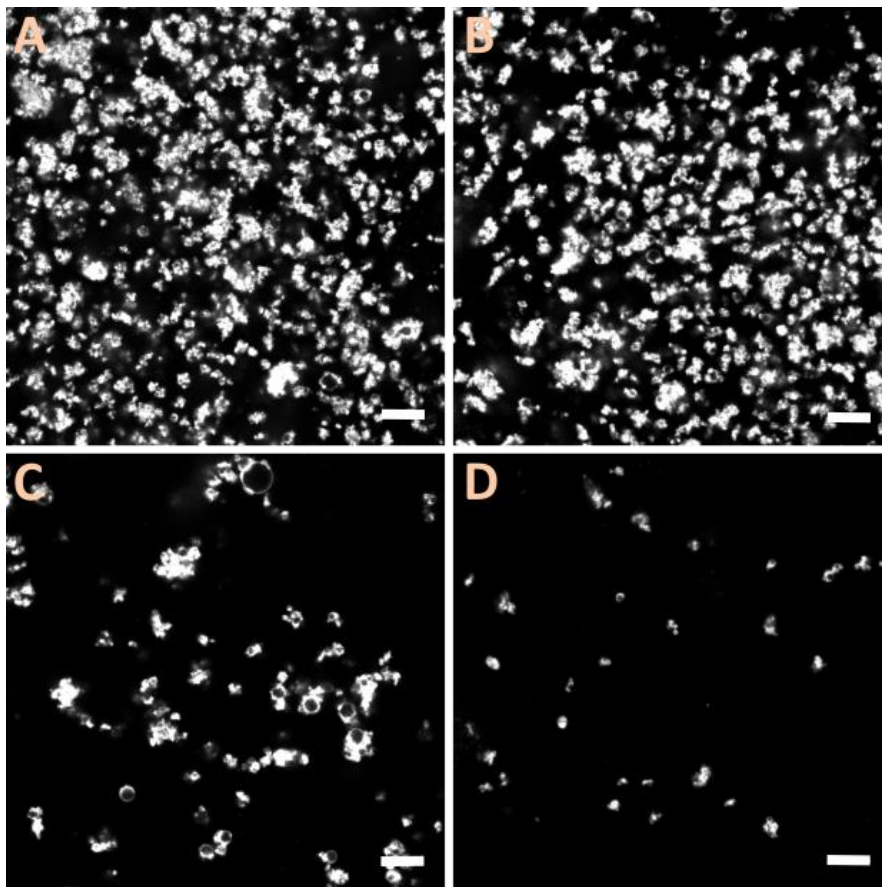


Abbildung 3.14: Gereinigte und mit MM1-43 markierte ER-Membranen wurden zu Proteinkonzentrationen von (A) $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$, (B) $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$, (C) $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$, bzw. (D) $0,01 \text{ mg ml}^{-1}$ in B88-Puffer verdünnt und 4 h mit 5 mM GTP inkubiert. Fluoreszenzbilder wurden nach Anregung bei 488 nm in einem Wellenlängenbereich von $496\text{-}735 \text{ nm}$ aufgenommen. Die Maßstabsbalken entsprechen $10 \text{ }\mu\text{m}$.

Weiterhin wurde der Einfluss der GTP-Konzentration geprüft. Dazu wurden isolierte ER-Membranen mit unterschiedlichen GTP-Konzentrationen gemischt. Es wurden jeweils zwischen 7 und 15 Bilder mit dem LSM aufgenommen. Zur Auswertung der Bilder wurden die Durchmesser derjenigen GERVs erfasst, die größer als 2 μm waren, die sphärisch waren, die vollständig auf der Aufnahme zu sehen waren und deren Äquator mindestens zu einem Drittel frei von Aggregaten waren. Die in **Abbildung 3.15** gezeigten Ergebnisse basieren auf zwei bis vier biologischen Replikaten. Aufgetragen wurde jeweils die Anzahl der GERVs pro Quadratmillimeter bei GTP-Konzentrationen zwischen 0 und 50 mM. Bei allen GTP-Konzentrationen bilden sich GERVs mit einem Durchmesser von 2-3 μm . Bei 5, 10 und 20 mM GTP waren 64 bis 77 % der GERVs 2-3 μm groß und 22-33 % 4-6 μm groß. GERVs mit sehr großen Durchmessern ($\geq 7 \mu\text{m}$) wurden bei eher hohen GTP-Konzentrationen aber insgesamt betrachtet mit einer sehr geringen Ausbeute beobachtet. Die größte Gesamtzahl an GERVs wurde bei 5 mM GTP erhalten, weshalb diese Konzentration für die Folgeexperimente gewählt wurde.

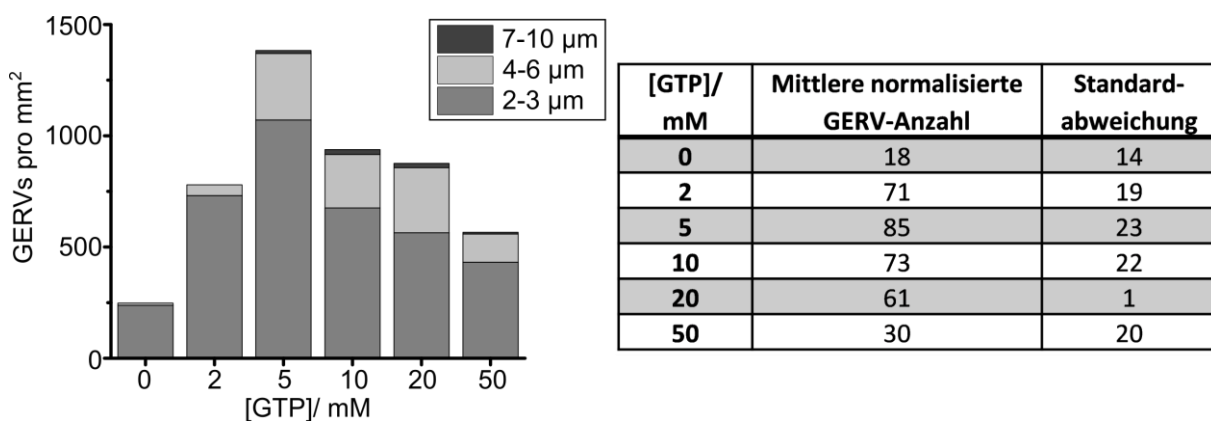


Abbildung 3.15: Untersuchung der Durchmesser von gebildeten GERVs in Abhängigkeit der GTP-Konzentration. Aufgetragen wurde die Anzahl an GERVs pro mm^2 gegen die GTP-Konzentration. Es wurden nur sphärische GERVs, bei denen mindestens ein Drittel der Membran des Äquatorumfangs frei von Aggregaten waren und die vollständig in den entsprechenden Aufnahmen zu sehen waren, berücksichtigt. Die Daten basieren auf zwei bis vier biologischen Replikaten. Es ist eine Gesamtfläche von $538.011 \mu\text{m}^2$ ausgewertet worden. Die Tabelle gibt einen Überblick zur mittleren GERV-Ausbeute pro mm^2 , wobei die GERV-Ausbeute auf das jeweilige Maximum einer Präparation normiert wurde. Außerdem ist die dazugehörige Standardabweichung angegeben.

3.2.3.3 Stabilität der GERVs nach vollständigem Abbau des GTPs

Da in Folgeexperimenten das Vorhandensein von GTP als Substrat oder Botenstoff stören könnte, wurde untersucht, ob GTP entfernt werden kann, ohne die Stabilität und Form der GERVs zu verändern. Eine Option zur Entfernung von überschüssigem GTP besteht darin, den Puffer des Überstands mehrfach auszutauschen. Da dies zu einer Verdünnung von GTP führt, nicht aber zur vollständigen Beseitigung des GTPs, wurde ein enzymatischer Abbau von GTP durchgeführt. Dazu wurde die ATPase Apyrase, die auch eine hohe Aktivität für GTP aufweist, verwendet (Amthauer *et al.*, 1992). Apyrase baut Nucleosidtriphosphate über Nucleosiddiphosphate zu

Nukleosidmonophosphaten und zwei anorganischen Phosphaten ab. Die Effizienz des Abbaus von GTP wurde bei zwei verschiedenen Apyrase-Konzentrationen mittels HPLC untersucht (**Abbildung 3.16 C** und **E**). Im Laufprofil sind zwei gut getrennte Peaks für GDP (bei ca. 9,5 ml) und GTP (bei ca. 17,0 ml) zu sehen. Der GMP-Peak lag im Bereich des Auftragungspeaks. Für eine quantitative Einschätzung des GTP-Abbaus wurden die Peakflächen mit Hilfe von Origin bestimmt. Bei einer Apyrase-Konzentration von $0,01 \text{ U ml}^{-1}$ wurde binnen 44 min 80 % des GTPs zu GDP und GMP abgebaut. Bei $0,1 \text{ U ml}^{-1}$ Apyrase war der Umsatz von GTP binnen dieser Zeit bereits vollständig. Im Fall der geringeren Apyrase-Konzentration von $0,01 \text{ U ml}^{-1}$ war das GTP nach 85 min vollständig hydrolysiert (grüner Kurvenverlauf).

Ob die Anwesenheit des Enzyms und der Abbau des freien GTPs Einfluss auf die gebildeten GERVs nimmt, wurde sowohl visuell als auch quantitativ bezüglich der GERV-Ausbeute untersucht. Die gezeigten LSM-Bilder wurden nach 4 h GERV-Bildung (**Abbildung 3.16 A**) bzw. nach 4 h GERV-Bildung und anschließenden 4 h Inkubation mit $0,01 \text{ U ml}^{-1}$ Apyrase (**Abbildung 3.16 B**) aufgenommen. Qualitativ ist keine Verschlechterung der GERV-Form oder -Anzahl festzustellen. Um die Ergebnisse mit Zahlen zu untermauern wurden die GERVs bei entsprechenden Ansätzen nach den unter 3.1 beschriebenen Kriterien ausgezählt (**Abbildung 3.16 D** und **F**). Die Zugabe von $0,1 \text{ U ml}^{-1}$ Apyrase verändert die Anzahl an $2 \mu\text{m}$ -großen GERVs nicht. Sehr große GERVs ($\geq 5 \mu\text{m}$) wurden nach 4 h Inkubation mit $0,1 \text{ U ml}^{-1}$ Apyrase nicht mehr detektiert. Die Anzahl an $3 \mu\text{m}$ und $4 \mu\text{m}$ großen GERVs veränderte sich während der Dauer des Experimentes unter Berücksichtigung der Schwankungen kaum. Betrachtet man Proben, die mit $0,01 \text{ U ml}^{-1}$ Apyrase versetzt worden sind, können keine Veränderungen bzgl. der GERV-Größe und -Qualität beobachtet werden. Die Größenverteilungen zeigen kaum Unterschiede.

Die Größe und Struktur der GERVs wurden in einem Zeitraum von 4 h durch $0,1 \text{ U ml}^{-1}$ Apyrase leicht und durch $0,01 \text{ U ml}^{-1}$ Apyrase nicht beeinflusst.

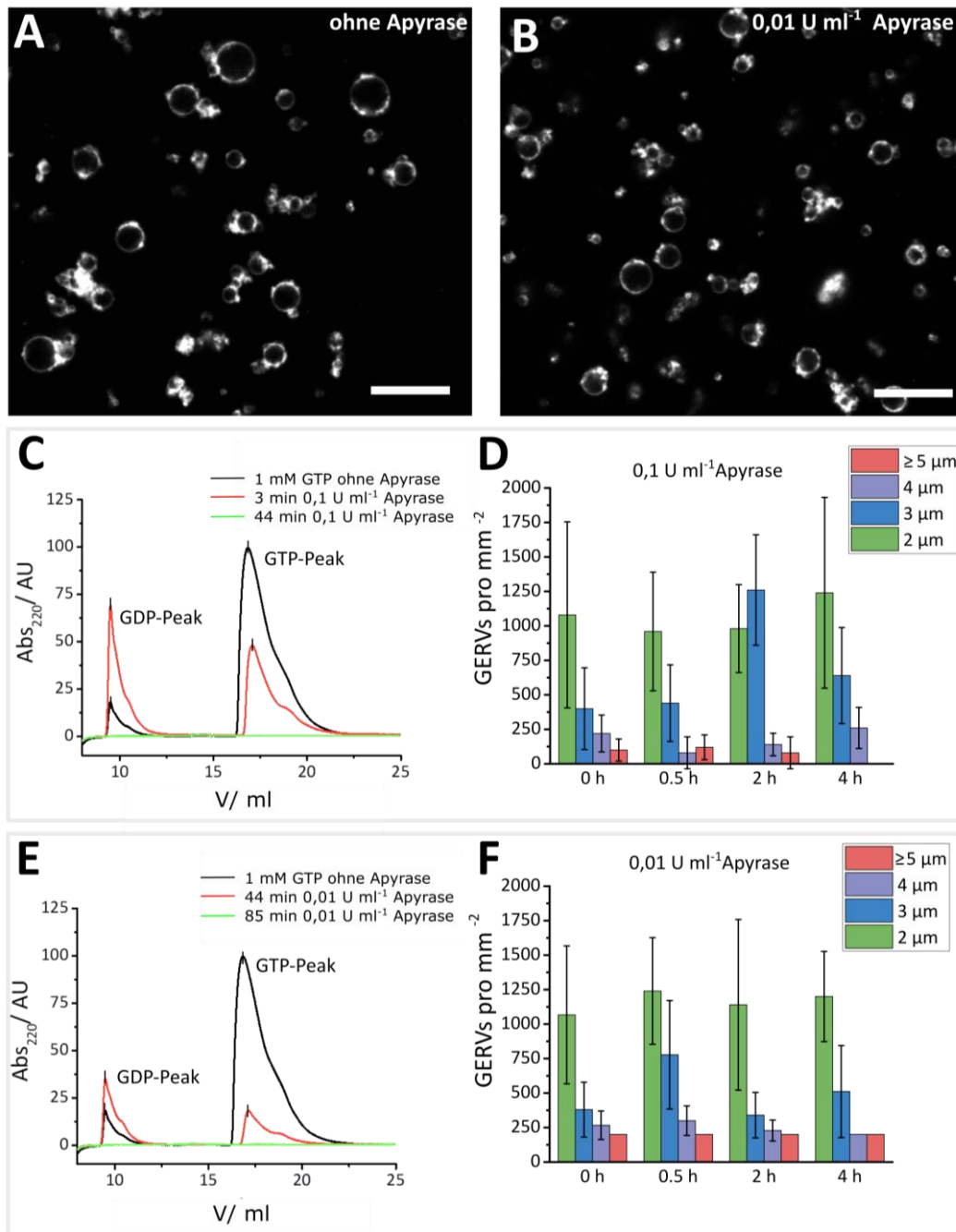


Abbildung 3.16: Einfluss des GTP-Abbaus durch Apyrase auf die GERV-Stabilität. **(A)** zeigt Fluoreszenzaufnahmen mit dem LSM von MM1-43 markierten und in Anwesenheit von 5 mM GTP gewachsenen GERVs ohne Apyrase. In **(B)** ist dieselbe Probe 4 h nach Zugabe von 0,01 U ml⁻¹ Apyrase gezeigt. Maßstabsbalken entsprechen 20 μ m. **(C)** zeigt ein HPLC-Chromatogramm, bei dem die Absorption bei 220 nm gegen das Retentionsvolumen in ml aufgetragen ist. Laufprofile von 1 mM GTP bzw. 1 mM GTP mit 0,1 U ml⁻¹ Apyrase nach 3 bzw. 44 min sind dargestellt. **(D)** zeigt die ausgewerteten GERV-Größen vor Zugabe von Apyrase (0 h) bzw. nach 0,5 h, 2 h und 4 h nach Zugabe von 0,1 U ml⁻¹ Apyrase. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dreier Replikate. **(E)** zeigt ein HPLC-Chromatogramm, bei dem die Absorption bei 220 nm gegen das Retentionsvolumen in ml aufgetragen ist. Laufprofile von 1 mM GTP bzw. 1 mM GTP mit 0,01 U ml⁻¹ Apyrase nach 44 bzw. 85 min sind dargestellt. **(F)** zeigt die ausgewerteten GERV-Größen vor Zugabe von Apyrase (0 h) bzw. nach 0,5 h, 2 h und 4 h nach Zugabe von 0,01 U ml⁻¹ Apyrase. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung dreier Replikate.

3.3 Anwendungsbeispiele für das entwickelte GERV-System

Es wurde gezeigt, dass aus isolierten natürlichen Sey1p-angereicherten ER-Membranen durch die Zugabe von GTP binnen 1-4 h GERVs gebildet werden, die über mindestens 6 h stabil sind. Mit diesem hier entwickelten Untersuchungssystem für natürliche ER-Membranen sind verschiedenste Studien möglich. Das folgende Unterkapitel zeigt erste Beispiele für die Verwendung von GERVs. Dazu wurden verschiedene methodische Herangehensweisen wie die Immunfluoreszenzmarkierung eines ER-Proteins, die Fluoreszenzmarkierung der Membran durch Fluoreszenzfusionsproteine, Diffusionsmessungen von einem Membranprotein mittels FCS sowie Bindungsstudien ausgewählt.

3.3.1 Immunfluoreszenzdetektion des Translocon-Komplexes in GERVs

Zunächst wird hier die immunologische Markierung des Translocon-Komplexes durch einen Antikörper aus Kaninchen, der gegen den C-Terminus von Sec61p gerichtet ist, beschrieben. Dazu wurden die mit MM1-43 markierten GERVs in selbstgebauten Mikroskopiekammern (s. Abschnitt 2.2.18.1) gebildet. Durch den doppelzylindrischen Aufbau der Mikroskopiekammer konnte der Überstand oberhalb der GERV-Schicht, ohne diese stark zu zerstören, abgenommen und durch ein Medium der gleichen Osmolarität ausgetauscht werden. Die dadurch resultierende Verdünnung des GTPs hat, wie unter 3.2.3.3 beschrieben, keinen Einfluss auf die GERV-Stabilität. Durch den Pufferaustausch kommt es außerdem zur Verdünnung des Membranfarbstoffs MM1-43. Daher nimmt das Fluoreszenzsignal der Membran aufgrund des Verteilungsgleichgewichtes des Farbstoffes zwischen Puffer und Membran ab. Dies kann, wenn gewünscht, durch nachträgliche Zugabe des Farbstoffes in den jeweiligen Inkubations- und Waschpuffern ausgeglichen werden.

Um Sec61p in der GERV-Membran nachzuweisen, wurde die Fluoreszenz von MM1-43 markierten Membranen und Alexa647 markiertem Antikörper in zwei separaten Kanälen aufgenommen. In **Abbildung 3.17 A** ist die Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde Alexa647 des sekundären Antikörpers in rot dargestellt. Der Membranfarbstoff MM1-43 ist in grün abgebildet (**Abbildung 3.17 B**). Die konfokalen Schnittbilder der GERVs weisen eine kreisförmige Verteilung des Farbstoffs am Äquator auf. Es gibt Bereiche, die eine sehr hohe Fluoreszenzintensität aufweisen, was auf eine Aggregation hinweist (Harder *et al.*, 1998). Legt man die Bilder von A und B übereinander (**Abbildung 3.17 C**), erkennt man im Rahmen der vorhandenen Auflösungsgrenze eine Kollokalisierung von Sec61p und der Membran. Bereiche mit erhöhter Fluoreszenzintensität im roten Kanal kollokalisieren nicht vollständig mit der Membran. Um auszuschließen, dass der sekundäre Antikörper unspezifisch die Membran bindet oder unter den gegebenen Pufferbedingungen aggregiert, wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem der primäre Antikörper weggelassen wurde. Eine Aufnahme dieser Probe zeigt, dass die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers gleichmäßig verteilt in der Lösung vorliegt

(**Abbildung 3.17 F**) und keine Anreicherung an der Membran zu erkennen ist (Vergleiche **Abbildung 3.17 E** und **F**). Eine zweite wichtige Kontrolle bildet die Überprüfung der Spezifität des primären Antikörpers gegen Sec61p. Dazu wurde die OptiPrep-Fraktion, die auch für die Immunfluoreszenzmarkierung der GERVs verwendet wurde, mittels SDS-PAGE analysiert und ein Western Blot mit dem zuvor verwendeten Antikörper gegen Sec61p und einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörper durchgeführt. Im Blot wird nur ein Signal in Laufhöhe des Zielproteins detektiert (**Abbildung 3.17 D**). Der Antikörper Anti-Sec61p detektiert somit Sec61p spezifisch in der GERV-Membran.

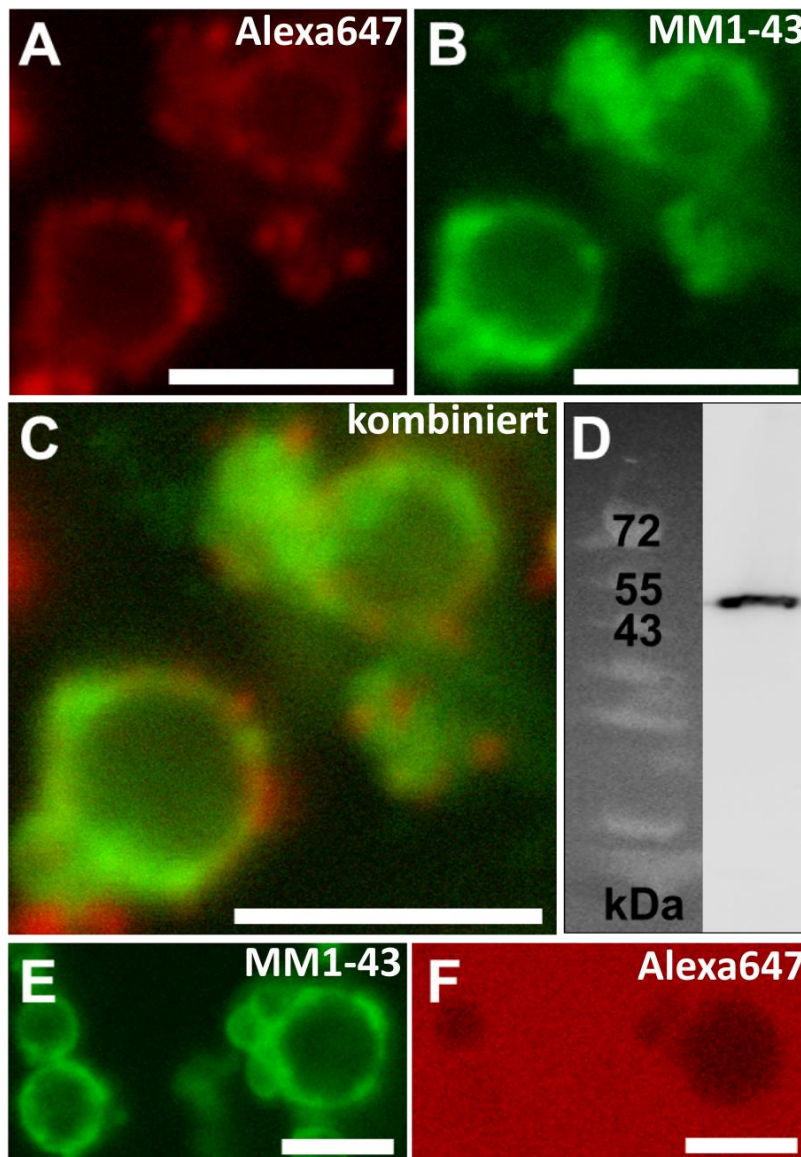


Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzmarkierung des Translocon-Komplexes über das Transloconprotein Sec61p an MM1-43 markierten GERVs. Die Bildung von GERVs erfolgte mit 5 mM GTP für 2 h in selbstgebaute Mikroskopiekammern. **(A)** zeigt die Fluoreszenz des mit Alexa647 markierten sekundären Antikörpers (rot). **(B)** zeigt die Fluoreszenz des Membranfarbstoffes MM1-43 (grün). **(C)** ist die Überlagerung von A und B. **(D)** Western Blot von ER-Membranen mit AntiSec61p Antikörper. **(E)** und **(F)** zeigen die GERVs nach Immunfluoreszenzmarkierung, bei der der primäre Antikörper weggelassen wurde. Die Anregung von MM1-43 erfolgte bei 488 nm und die Detektion im Bereich von 495-630 nm. Die Fluoreszenz von Alexa647 wurde bei 633 nm angeregt und im Bereich von 640-740 nm detektiert. Die Aufnahmen erfolgten in getrennten Kanälen. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 µm, γ -Wert = 0,45.

3.3.2 Markierung von GERV-Membranen mit fluoreszierenden Zielproteinen

3.3.2.1 Bildung und Rekonstitution von ER-Membranproteinen

Durch die immunologische Detektion von Proteinen in GERVs, unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper, gelingt eine indirekte Markierung eines Membranproteins. Eine direktere Möglichkeit stellt die Rekonstitution von fluoreszenzmarkierten ER-Proteinen dar. Dies ist in *in vitro* Systemen mit großem Aufwand verbunden. Das Zielprotein muss funktional mit dem optimalen Detergenz gereinigt, fluoreszenzmarkiert und in eine GUV-Membran rekonstituiert werden. Im Falle der GERVs ergibt sich eine andere, einfache Möglichkeit. Es bietet sich die Option, die Genexpressionsmaschinerie der Hefe zu nutzen. Fusionskonstrukte, kodierend für ein ER-ständiges Membranprotein und ein Fluoreszenzprotein, sollten dazu in der Hefe exprimiert und auf natürliche Weise in die ER-Membran eingebaut werden. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, die die Klonierung über Restriktionsschnittstellen bzw. die homologe Rekombination umfassen, wurden Konstrukte aus COPII-assoziierten ER-Membranproteinen und dem rotfluoreszierenden mCherry bzw. dem grünfluoreszierenden sfGFP_A206K, im Folgenden als sfGFP bezeichnet, hergestellt. Der Guaninnukleotidaustauschfaktor Sec12p-sfGFP und das SNARE-Protein Bet1p-sfGFP wurden jeweils in p413-GAL Vektoren und Bet1p-mCherry und das Cargoadapterprotein mCherry-Emp24p jeweils in p415-GAL Vektoren kloniert. Die Vektorkarten der Konstrukte sind im Anhang unter A.2 dargestellt. Die Fluoreszenzproteine wurden jeweils an den Terminus kloniert, der nicht an der natürlichen Protein-Protein-Interaktion beteiligt ist. Im Fall von Emp24p wurde mCherry zwischen das N-terminale Translokationssignal, das nach erfolgreichem Einbau in die ER-Membran abgespalten wird, und den Rest des Proteins kloniert. Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um sogenannte *single-copy* Vektoren mit einem GAL-Promotor. Während die Vektoren einen starken Promotor haben, um die Genexpression durch Induktion zu starten, wird diese gleichzeitig dadurch begrenzt, dass die Vektoren in der Zelle in geringer Kopienzahl vorliegen.

Zur Überprüfung, ob übertragene Gene der verschiedenen Proteine erfolgreich exprimiert werden, wurde eine Testexpression durchgeführt (**Abbildung 3.18**). Das Wachstum aller vier generierten Stämme teilt sich in eine verzögerte Anfangsphase, in den Bereich des exponentiellen Wachstums und in die Sättigungsphase ein (**Abbildung 3.18**). Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit der Zellen bei 30 °C mit Galaktose zur Induktion der Genexpression wurden diese fluoreszenzmikroskopisch untersucht (**Abbildung 3.18**). Betrachtet man den Querschnitt der Zellen, die Sec12p-sfGFP (**Abbildung 3.18 A**) und Bet1p-sfGFP (**Abbildung 3.18 B**) bilden, sieht man helle Strukturen, die sich wie Schnüre entsprechend des tERs durch die Zellen ziehen. Außerdem ist ein helles Band, welches möglicherweise dem cER entspricht, zum Teil unterbrochen, zum Teil scheinbar durchgängig am Rand der Zelle im

Bereich der Plasmamembran zu beobachten. Es gibt in vielen Zellen einen weiteren kleineren hellen Ring. Bei diesem könnte es sich möglicherweise um das cisER, welches den Zellkern umgibt, handeln.

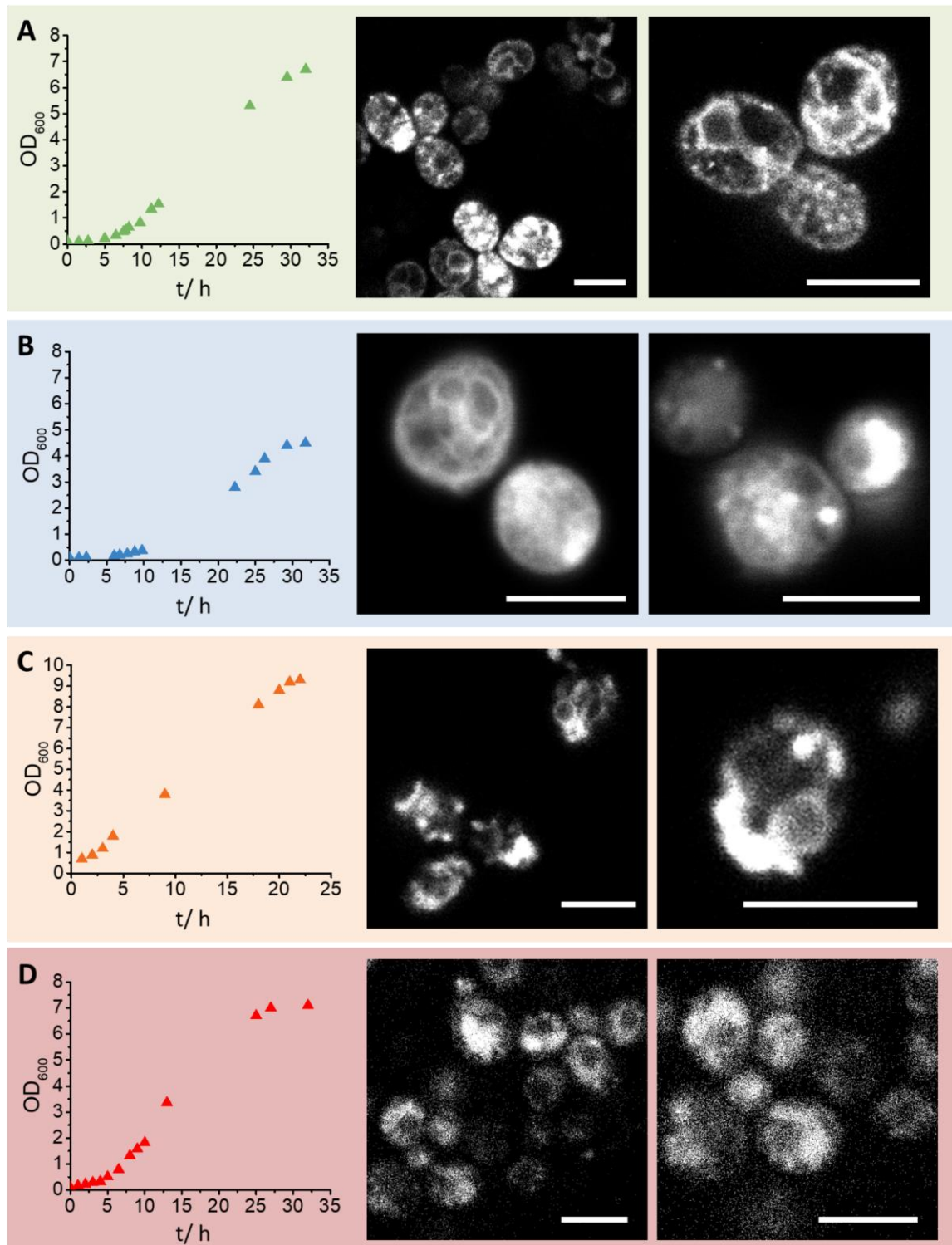


Abbildung 3.18: Testexpression der Fluoreszenzproteinkonstrukte **(A)** *Sec12p-sfGFP*, **(B)** *Bet1p-sfGFP*, **(C)** *mCherry-Emp24p* und **(D)** *Bet1p-mCherry*. Dargestellt sind jeweils die Wachstumskurve und zwei LSM-Bilder der Fluoreszenzintensitätsverteilung in den Hefen. Die Bilder wurden 4 h nach Induktion der Genexpression durch Zugabe von 2 % (m/v) Galaktose aufgenommen. SfGFP wurde bei 488 nm angeregt und im Bereich von 495-630 nm detektiert. Die mCherry-Fluoreszenz wurde bei 561 nm angeregt und mittels APDs ab einer Wellenlänge von 580 nm detektiert. Die Aufnahmen erfolgten zum Teil mit weiter geöffnetem Pinhole. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm .

Die Zellen, die mCherry-Konstrukte produzieren, wurden auf die gleiche Weise untersucht. Die Fluoreszenzintensität von mCherry war geringer als die von sfGFP, sodass die Verwendung von APDs zur Detektion der mCherry-Fluoreszenz notwendig war. Die Verteilung der Fusionskonstrukte von mCherry-Emp24p (**Abbildung 3.18 C**) und Bet1p-mCherry (**Abbildung 3.18 D**) ist durch die geringe Fluoreszenzintensität schwer zu beurteilen. Die Zellen, die mCherry-Emp24p bilden, zeigen eine ungleichmäßige punktuelle Verteilung sowie eine ringförmig angeordnete Struktur, die möglicherweise den Zellkern umgibt. Bet1p-mCherry verteilt sich ähnlich wie mCherry-Emp24p in der Zelle. Eine solche Verteilung wurde auch für andere ER-Membranproteine in der Literatur beschrieben (Preuss *et al.*, 1991).

Es sollte zusätzlich überprüft werden, ob die beobachteten Strukturen in der Zelle auf der von der Membranprotein-induzierten Lokalisation der fluoreszierenden Fusionskonstrukte basiert. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen für sfGFP und mCherry ohne Membrananker als lösliche Proteinvarianten in Zellen eingebracht und unter den gleichen Bedingungen wie die Fusionskonstrukte exprimiert (**Abbildung 3.19**). Das sfGFP ist gleichmäßig in der Zelle verteilt. Es gibt verschiedene dunkle Bereiche innerhalb der Zelle, bei denen es sich um ein Organell wie beispielsweise die Vakuole handeln könnte. Die mCherry-Fluoreszenz wurde mittels APDs detektiert. Auch hier wird eine Verteilung der Fluoreszenz beobachtet, die sich von der von Bet1p-mCherry und mCherry-Emp24p unterscheidet. Die Fluoreszenz verteilt sich gleichmäßig in einem Großteil der Zelle (**Abbildung 3.19 C**). **Abbildung 3.19 D** zeigt eine Maximumintensitätsprojektion von Zellen, deren Querschnitt in **Abbildung 3.19 C** gezeigt ist. Dieses Bild verdeutlicht die zuvor beobachtete gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz. Die löslichen Proteine zeigen also eine cytosolische Lokalisation, wohingegen die Konstrukte aus Membranprotein und Fluoreszenzprotein eine spezifische Membranlokalisation typisch für ER-Strukturen aufweisen (Preuss *et al.*, 1991).

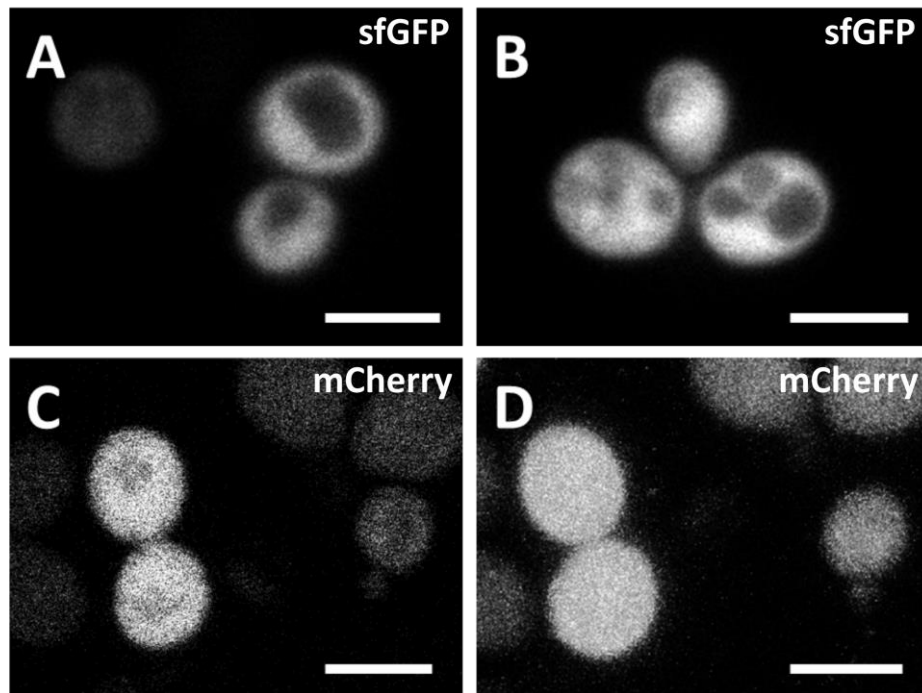


Abbildung 3.19: Testexpression von (A) und (B) sfGFP bzw. (C) und (D) mCherry als lösliche Proteine in BY4741 Zellen, die gleichzeitig SEY1 exprimieren. Die Bilder der Zellen wurden 4 h nach der Induktion der Genexpression mit 2 % (m/v) Galaktose aufgenommen. Die Fluoreszenz von sfGFP wurde bei 488 nm angeregt und mCherry bei 561 nm. Detektiert wurde die sfGFP-Fluoreszenz mit PMTs im Bereich von 495 – 600 nm und die mCherry-Fluoreszenz mittels APDs, denen ein Langpassfilter LP580 vorgeschaltet war. Abbildungen A-C entsprechen jeweils einem Schnittbild durch die Hefezellen. In D ist eine Maximumintensitätsprojektion aus mehreren in z-Richtung aufgenommenen Bildern derselben Zellen wie in C. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

3.3.2.2 Fusion gereinigter ER-Membranen mit fluoreszierenden Fusionsproteinen zu GERVs

Die ER-Membranen, die sowohl Sey1p als auch eines der fluoreszierenden Fusionskonstrukte enthalten, wurden nach dem für die Expressionsstämme optimierten Protokoll gereinigt. Die Membranfusion wurde mit 5 mM GTP induziert und mit dem LSM beobachtet. Die ER-Membranen, die Sec12p-sfGFP (Abbildung 3.20 A), Bet1p-sfGFP (Abbildung 3.20 B), mCherry-Emp24p (Abbildung 3.20 C) oder Bet1p-mCherry (Abbildung 3.20 D) enthalten, fusionierten zu GERVs. Die Visualisierung der GERVs erfolgte ausschließlich über die produzierten und rekonstituierten Fluoreszenzproteine. Die gereinigten OptiPrep-Fractionen beinhalten folglich eine zur Visualisierung ausreichende Menge an in die Membran eingebauten fluoreszierenden Fusionsproteinen. Außerdem zeigt dieses Ergebnis, dass die Sey1p-vermittelte Membranfusion auch mit Membranen möglich ist, die diese Proteine in erhöhter Konzentration enthalten.

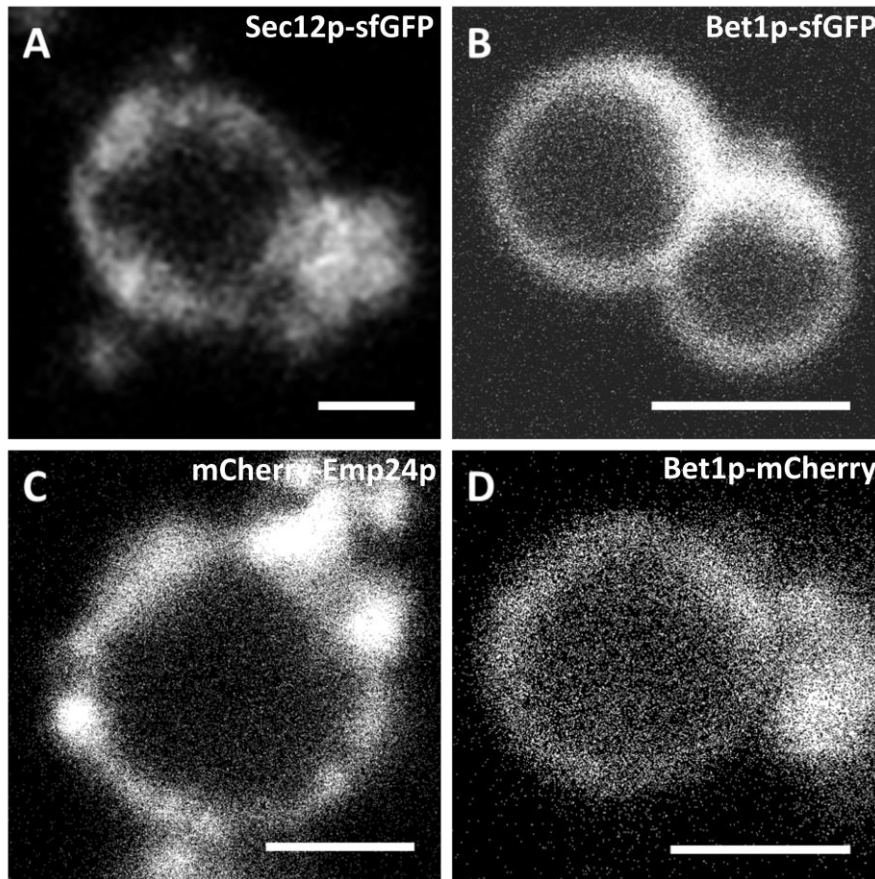


Abbildung 3.20: GERVs aus ER-Membranen, die ein fluoreszierendes Fusionsprotein wie **(A)** Sec12p-sfGFP, **(B)** Bet1p-sfGFP, **(C)** mCherry-Emp24p oder **(D)** Bet1p-mCherry enthalten. ER-Membranen wurden mit 5 mM GTP für 2 h inkubiert und dann am LSM untersucht. Die Fluoreszenz von sfGFP wurde bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenz wurde mittels PMTs in einem Bereich von 495-598 nm (A) bzw. von 495-735 nm (B) detektiert. Die Fluoreszenz von mCherry wurde bei 561 nm angeregt und mit APDs mit einem vorgeschalteten Bandpassfilter von 580-610 nm detektiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 2 μ m.

3.3.2.3 Fusion zweier verschiedener ER-Präparationen zu zweifarbigen GERVs

Bis hierher konnte gezeigt werden, dass ER-Membranen mit einem fluoreszierenden Fusionskonstrukt zu GERVs fusionieren. Für weiterführende experimentelle Versuchsaufbauten kann es notwendig sein, mehr als ein Protein zu markieren. Da es hefeogenetisch sehr aufwendig ist, mehr als zwei Plasmide zur Expression von Genen in eine Zelle zu bringen und zwei Plasmide für die Expression von SEY1 und einem Fusionskonstrukt bereits enthalten sind, soll für eine in zwei Farben fluoreszierende GERV-Membran eine andere Variante getestet werden. Dazu wurden ER-Präparationen aus zwei Zellstämmen, die je ein unterschiedliches fluoreszierendes Fusionsprotein produzieren, kombiniert. Als Beispiel wurden mCherry-Emp24p- bzw. Bet1p-mCherry-haltige Sey1p-Membranen mit Sec12p-sfGFP-haltigen Sey1p-Membranen in Anwesenheit von GTP inkubiert. In beiden Fällen resultierten zweifarbige GERVs, also GERVs aus zwei verschiedenen ER-Membran-Präparationen (**Abbildung 3.21** und **Abbildung 3.22**). Es können also zwei unterschiedliche ER-Präparationen erfolgreich zu gemischten GERVs fusioniert werden.

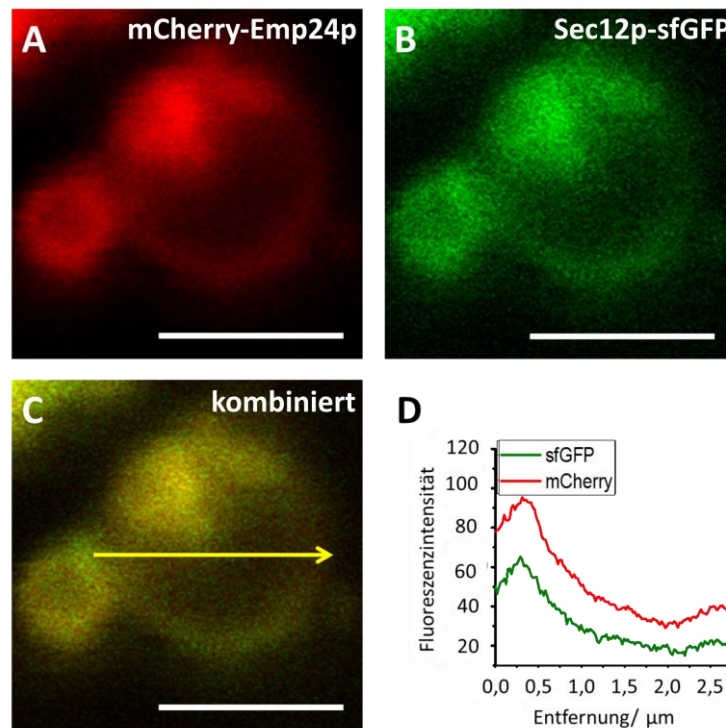


Abbildung 3.21: GERVs, die mit 5 mM GTP aus einer Mischung von Sey1p-Membranen gebildet wurden, die sowohl mCherry-Emp24p als auch Sec12p-sfGFP beinhalten. **(A)** Die Anregung der mCherry-Fluoreszenz erfolgte bei 561 nm und die Detektion mittels PMTs im Bereich von 575-700 nm. **(B)** Die Anregung der sfGFP-Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm und die Detektion mittels PMTs im Bereich von 495-550 nm. **(C)** Überlagerung der Bilder A und B. **(D)** Fluoreszenzintensität entlang einer Strecke, die in C als gelber Pfeil markiert ist. Die Maßstabsbalken entsprechen 2 µm.

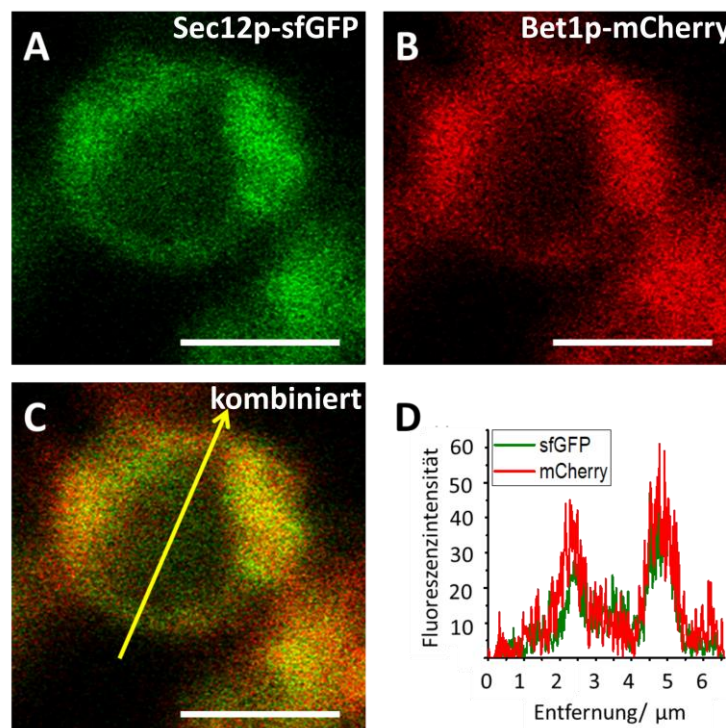


Abbildung 3.22: GERVs, die mit 5 mM GTP aus einer Mischung von Sey1p-Membranen gebildet wurden, die sowohl Bet1p-mCherry als auch Sec12p-sfGFP beinhalten. **(A)** Die Anregung der sfGFP-Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm und die Detektion mittels PMTs im Bereich von 495-550 nm. **(B)** Die Anregung der mCherry-Fluoreszenz erfolgte bei 561 nm und die Detektion mittels PMTs im Bereich von 566-735 nm. **(C)** Überlagerung der Bilder A und B. **(D)** Fluoreszenzintensität entlang einer Strecke, die in C als gelber Pfeil markiert ist. Der Maßstabsbalken entsprechen 2 µm.

3.3.3 Diffusion eines ER-Membranproteins in seiner natürlichen Umgebung

Die Markierung der Membran mit fluoreszierenden Proteinen sowie die Möglichkeit, ER-Membranen verschiedener Zelllinien miteinander zu fusionieren, ermöglicht die Bildung von GERVs mit einstellbarer Fluoreszenzproteindichte. Dies bildet eine günstige Voraussetzung für FCS-Messungen. Da diese Methode ein breites Anwendungsspektrum für Studien zur z.B. Proteindiffusion oder zur Analyse von Interaktionspartnern bietet, soll hier die mögliche Verwendbarkeit von GERVs für FCS-Messungen untersucht werden. Mit dem Ziel, die Membranen zu visualisieren aber gleichzeitig eine geringe Fluorophordichte für die FCS-Messung zu generieren, wurden Bet1p-sfGFP-Membranen mit Bet1p-mCherry Membranen in einem Verhältnis von 1 zu 4.000 gemischt. So konnte die mCherry-Fluoreszenz zur Visualisierung und Auswahl geeigneter GERVs verwendet werden und die Fluoreszenzfluktuation von sfGFP am Pol des GERVs gemessen werden (**Abbildung 3.23**). Beispielhaft ist ein GERV mit Äquator und Pol in **Abbildung 3.23 A** und **B** dargestellt. FCS-Messungen erfolgten nur an GERVs, die einen Mindestdurchmesser von 4,5 μm besaßen, sich nicht bewegten und einen Pol aufwiesen, der frei von Aggregaten war. Waren diese Kriterien erfüllt, wurden für zweimal 60 s die Fluoreszenzfluktuationen gemessen. Signale von Aggregaten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Eine resultierende Korrelationskurve sowie die nichtlineare Regression, die mit der ZEN black 2009 Software durchgeführt wurde, ist beispielhaft in **Abbildung 3.23 C** dargestellt. Der Mittelwert aus acht Messungen resultierte in einem lateralen Diffusionskoeffizienten von $0,28 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \pm 0,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$.

Zum Vergleich wurde die Diffusion von Bet1p-Alexa488 in synthetischen Membranen gemessen. Dafür wurde Bet1p_2C gereinigt, mit Alexa488-C5 Maleinimid markiert und in MMM-Lipiden (Matsuoka *et al.*, 1998) zunächst in Liposomen rekonstituiert, aus denen dann GUVs gebildet wurden. Die FCS-Messungen wurden wie für Bet1p-sfGFP vorgestellt durchgeführt. Ein Beispiel für eine Korrelationskurve ist in **Abbildung 3.24** dargestellt. Der resultierende Diffusionskoeffizient basierend auf Messungen an sechs verschiedenen GUVs betrug $2,4 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \pm 0,8 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Der Diffusionskoeffizient von Bet1p-Alexa488 in einer homogenen künstlichen Membran ist fast 9-fach so groß wie der von Bet1p-sfGFP in seiner natürlichen Membranumgebung, die eine asymmetrische Lipidverteilung, mögliche Mikrodomänen und eine Vielzahl von Membranproteinen enthält.

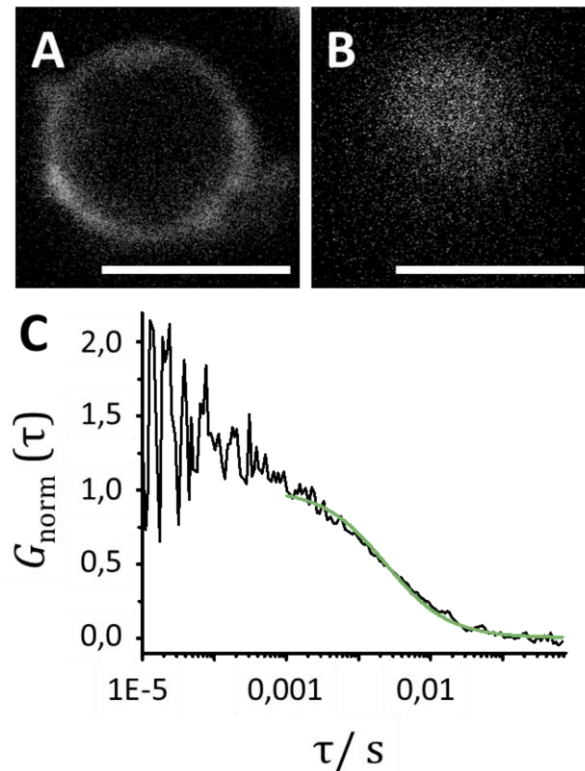


Abbildung 3.23: FCS-Messungen von Bet1p-sfGFP in GERV-Membranen. Dargestellt ist exemplarisch die detektierte mCherry-Fluoreszenz eines ausgewählten GERVs **(A)** am Äquator und **(B)** am Pol, an dem eine FCS-Messung durchgeführt wurde. Die mCherry-Fluoreszenz wurde bei 561 nm angeregt und im Bereich von 568–735 nm detektiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μm . In **(C)** ist eine beispielhafte Autokorrelationskurve (schwarz) sowie die nichtlineare Regression (grün) dieser gezeigt. Messbedingungen: 5,9 μW Laserleistung des 488 nm Argonlasers, Verwendung eines Bandpassfilter 505-540 nm. Die Datenaufnahme erfolgte zweimal über 60 s. Die Auswertung erfolgte mit einer nichtlinearen Regression, basierend auf einem 2D-Diffusionsmodell unter Berücksichtigung der Diffusion einer Komponente sowie von Triplettübergängen des Fluorophors.

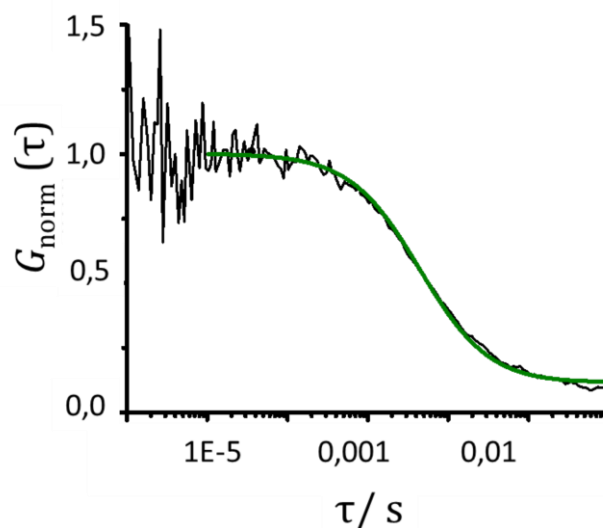


Abbildung 3.24: Autokorrelationskurve und nichtlineare Regression der Fluktuation von Bet1p-Alexa488 in der MMM-GUV-Membran. Messbedingungen: 24,7 μW Laserleistung des 488 nm Argonlasers, Verwendung eines Langpassfilters LP505. Die Datenaufnahme erfolgte viermal über 30 s. Die Auswertung erfolgte mit einer nichtlinearen Regression, basierend auf einem 2D-Diffusionsmodell unter Berücksichtigung der Diffusion einer Komponente sowie von Triplettübergängen des Fluorophors.

3.3.4 Interaktion von COPII-Proteinen mit natürlichen Membranen

Eine wichtige Aufgabe des ERs, an der auch die zuvor beschriebenen fluoreszierenden Fusionsproteine beteiligt sind, ist die COPII-vermittelte Vesikelabschnürung zum Transport neu gebildeter Proteine und Lipide zum Golgi-Apparat. Die COPII-Vesikelbildung wurde bereits auf viele Gesichtspunkte hin untersucht (s. Abschnitt 1.1.2.5). Wenn Harnstoff-gewaschene Mikrosomen mit Sar1p, Sec23/24p und Sec13/31p sowie GTP oder GMP-PNP inkubiert werden, können im Anschluss COPII-besetzte Vesikel aus einem kontinuierlichem Saccharose-Gradienten isoliert werden (Matsuoka *et al.*, 1998). Aus den gewonnenen Daten wurde somit geschlossen, dass zur Abschnürung von COPII-Vesikeln mindestens Sar1p, Sec23/24p und Sec13/31p notwendig sind. Diese COPII-Proteine werden in genannter Reihenfolge an die Membran rekrutiert (Matsuoka *et al.*, 1998). Bei späteren Experimenten wurde im Zusammenhang mit der Probenvorbereitung für die Kryo-TEM festgestellt, dass es durch Scherkräfte, wie sie beim Zentrifugieren und Pipettieren auftreten, zur mechanischen Abtrennung von Vesikeln aus größeren Membranstrukturen kommen kann (Bacia *et al.*, 2011). Daher ist die These, dass Sar1p, Sec23/24p und Sec13/31p zur Vesikelabtrennung ausreichend sind, nicht eindeutig belegt. In Folge dessen wurde ein experimenteller Aufbau entwickelt, bei dem GUVs aus synthetischen Lipiden verwendet wurden und bei dem ein geringer mechanischer Stress auf die Membran ausgeübt wird. Mit diesem Untersuchungssystem konnte bislang keine Vesikelbildung mit Sar1p, Sec23/24p und Sec13/31p nachgewiesen werden (Bacia *et al.*, 2011; Daum *et al.*, 2014). In den folgenden zwei Unterkapiteln soll zum einen die Bindung von COPII-Proteinen an GERVs untersucht werden und zum anderen sollen die Ergebnisse von COPII-Versuchen nach Bacia *et al.*, 2011 an GUVs aus ER-Lipiden und an GERVs gezeigt werden.

3.3.4.1 COPII-Proteine binden natürliche Membranen

Die Bindung von COPII-Proteinen an GERVs wurde mit fluoreszenzmarkierten Varianten von Sar1p, das die Bindung weiterer COPII-Komponenten initiiert, und Sec13/31p, das den äußeren Mantel bildet, durchgeführt. Sar1p-Alexa488 wurde in Anwesenheit von 2 mM GMP-PNP mit GERVs für 30 min inkubiert und dann mit dem LSM analysiert. Die Probe zeigt eine geringe Hintergrundfluoreszenz, die durch ungebundenes Sar1p-Alexa488 bedingt ist. Desweiteren zeigt die Probe ein deutliches Fluoreszenzsignal an den nicht markierten GERV-Membranen (**Abbildung 3.25 A**), welches auf die Bindung von Sar1p-Alexa488 an die Membran hindeutet. Die Rekrutierung weiterer COPII-Komponenten, das heißt die Bindung von Sec23/24p und Sec13/31p, wurde mit Alexa488 markiertem Sec13/31p untersucht (zur Verfügung gestellt von Eugene Futai, (Bacia *et al.*, 2011)). Die Sec13/31p-Alexa488-Fluoreszenz kann an der Membran beobachtet werden (**Abbildung 3.25 B**). Folglich wird der gesamte COPII-Mantel an die GERV-Membran rekrutiert.

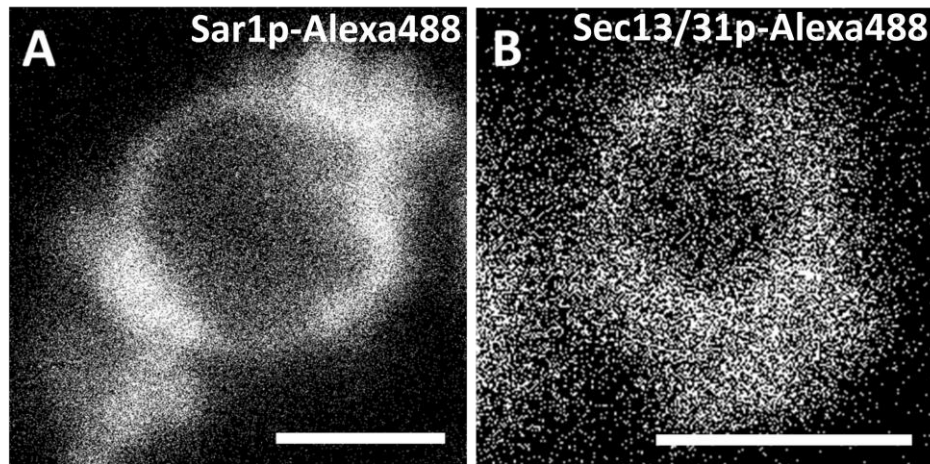


Abbildung 3.25: Bindung von Alexa488-markierten COPII-Proteinen an GERVs. Nach der Bildung von GERVs wurden diese mit **(A)** 1 μM mit Sar1p-Alexa488 und 2 mM GMP-PNP bzw. mit **(B)** 1 μM Sar1pH77L (diese Mutante hydrolysiert GTP nur sehr langsam, vgl. Abschnitt 3.3.4.2), 320 nM Sec23/24p, 540 nM Sec13/31p, das sich zu 90 % der Konzentration aus unmarkierter Proteinlösung und zu 10 % der Konzentration aus einer mit Alexa488-markierten Sec13/31p-Lösung zusammen setzt, und 2 mM GTP für 2 h inkubiert und mittels LSM analysiert. Zur Anregung des Fluorophors wurde ein 488 nm Argonlaser verwendet. Zur Detektion der Fluoreszenz wurden APDs mit vorgeschaltetem 505 nm Langpassfilter eingesetzt. Die Maßstabsbalken entsprechen 2 μm .

3.3.4.2 Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchung von COPII-Interaktionen mit natürlichen Membranen

Die Bindung des COPII-Proteinkomplexes induziert die Krümmung der Membran, die letztlich zur Abschnürung von Vesikeln führen soll. Wie zuvor beschrieben führt die COPII-induzierte Deformation der Membran an MMM-GUVs, unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen zur Ausbildung von steifen Tubuli (**Abbildung 3.26**), (Bacia *et al.*, 2011; Daum *et al.*, 2014). Unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen liegt Sar1p in der membranbindenden Form vor. Dieser Zustand kann durch die Sar1p-Mutante Sar1pH77L erreicht werden, bei der die Aktivierung der GTP-Hydrolyse durch das Sec23/24p gestört ist (**Abbildung 3.26 A und B**). Alternativ kann das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GMP-PNP verwendet werden (**Abbildung 3.26 C und D**).

Da sich Tubuli und nicht wie in der Zelle Vesikel bilden (Bykov *et al.*, 2017), wird die Frage aufgeworfen, welche Komponenten oder Faktoren unter natürlichen Bedingungen neben der Membrandeformation eine Abschnürung von Vesikeln von der Membran hervorrufen. Um diese Frage zu beantworten, wurden COPII-Experimente schrittweise mit steigender Komplexität der Untersuchungssysteme durchgeführt. Da mit steigender Komplexität auch die Auswertung der gewonnenen Daten erschwert wird, wurde zunächst nur eine Komponente des COPII-Experiments nach Bacia *et al.*, 2011 verändert, nämlich die Lipidzusammensetzung der Membran. Anstelle der MMM-Lipide (Matsuoka *et al.*, 1998) wurden GUVs verwendet, die aus aus Mikrosomen extrahierten Lipiden hergestellt wurden (vgl. 3.2.1), (**Abbildung 3.27**).

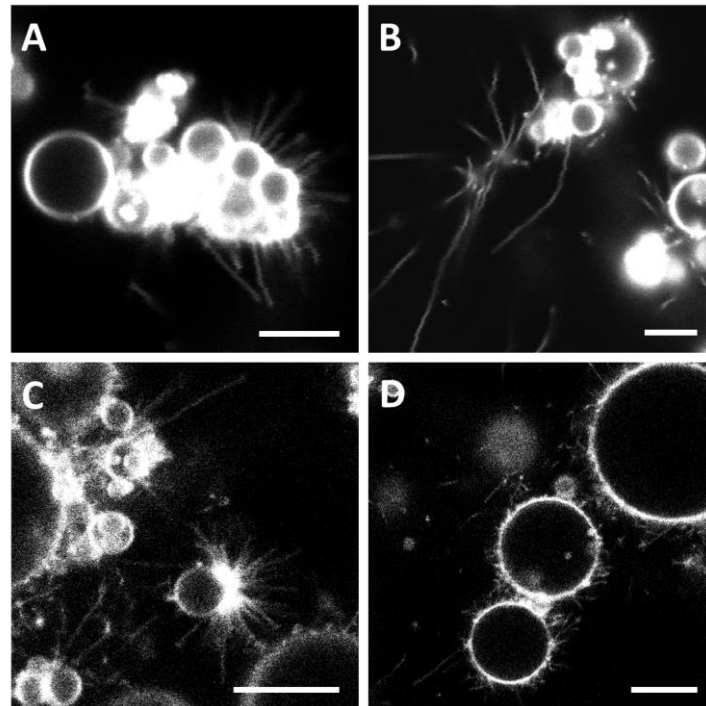


Abbildung 3.26: Referenzexperiment zur COPII-induzierten Membrankrümmung an MMM-GUVs. Rhodamin-PE markierte MMM-GUVs wurden entweder mit **(A)** und **(B)** $1\ \mu\text{M}$ Sar1pH77L, $2\ \text{mM}$ GTP, $320\ \text{nM}$ Sec23/24p, $540\ \text{nM}$ Sec13/31p, $1\ \mu\text{M}$ Sec12p Δ C oder mit **(C)** und **(D)** $1\ \mu\text{M}$ Sar1p, $2\ \text{mM}$ GMP-PNP, $320\ \text{nM}$ Sec23/24p, $540\ \text{nM}$ Sec13/31p, $1\ \mu\text{M}$ Sec12p Δ C inkubiert. Die Fluoreszenz von Rhodamin-PE wurde bei $561\ \text{nm}$ angeregt und die Detektion erfolgte unter Verwendung von PMTs im Bereich von $566\text{--}735\ \text{nm}$. Die Maßstabsbalken entsprechen $5\ \mu\text{m}$.

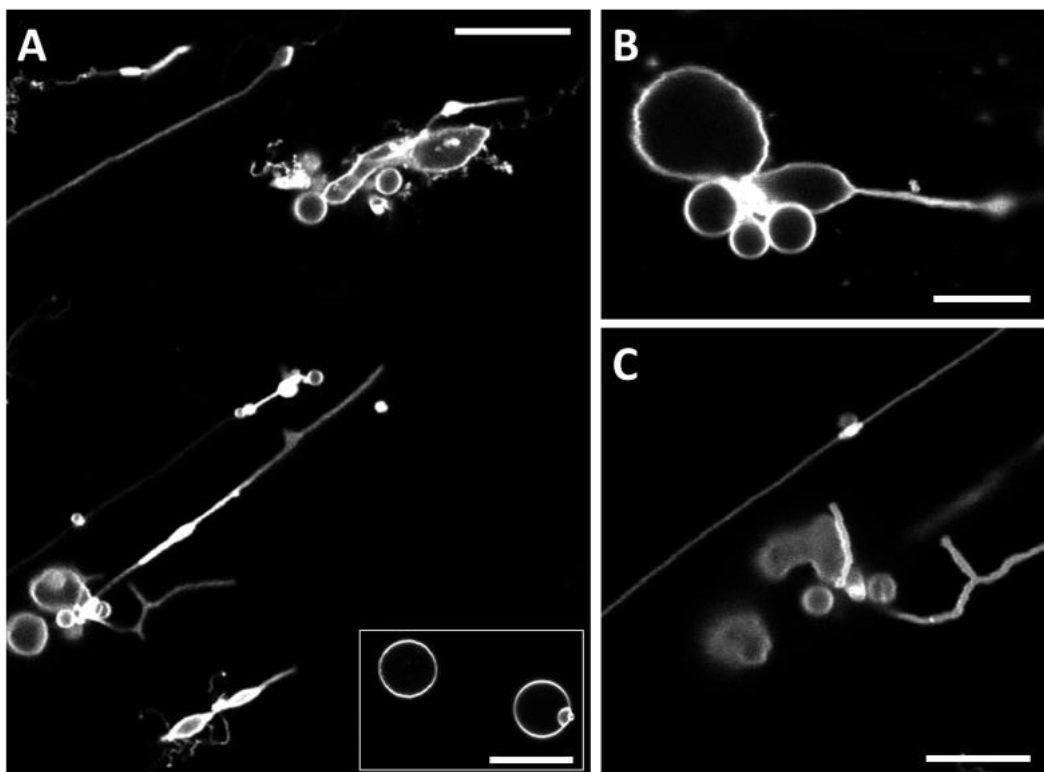


Abbildung 3.27: COPII-Experiment an GUVs aus extrahierten ER-Lipiden. **(A-C)** GUVs wurden mit $1\ \mu\text{M}$ Sar1p, $2\ \text{mM}$ GMP-PNP, $320\ \text{nM}$ Sec23/24p, $540\ \text{nM}$ Sec13/31p und $1\ \mu\text{M}$ Sec12p Δ C für mindestens $2\ \text{h}$ inkubiert. Das kleine Bild in A zeigt GUVs aus extrahierten Lipiden mit den gleichen Proteinen jedoch mit GTP statt GMP-PNP. Die Fluoreszenz von Rhodamin-PE wurde bei $561\ \text{nm}$ angeregt und die Detektion erfolgte mit PMTs im Bereich von $566\text{--}735\ \text{nm}$. Die Maßstabsbalken entsprechen A- $20\ \mu\text{m}$, B und C sowie im kleinen Bild in A- $10\ \mu\text{m}$.

Die GUVs wurden mit den oben genannten COPII-Proteinen unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen (GMP-PNP) inkubiert. Unter diesen Bedingungen kann eine Deformation der GUV-Membran zu sehr langen scheinbar flexiblen Schnüren unterschiedlicher Dicke von bis zu 1 μm Durchmesser beobachtet werden (**Abbildung 3.27**). An MMM-GUVs wurden diese Schnüre ebenfalls beobachtet, jedoch unterscheiden sie sich in Durchmesser und Struktur: Diese hatten einen Durchmesser, der unterhalb der Auflösungsgrenze der Fluoreszenzmikroskopie liegt, waren weniger lang als die gebildeten Schnüre an extrahierten Lipid-GUVs und waren eher starr (**Abbildung 3.26**; Bacia *et al.*, 2011; Daum *et al.*, 2014). Die Lipidzusammensetzung der GUVs, also das Membranreservoir für die Membrandeformation, übt somit einen Einfluss auf die durch die COPII-Proteine final generierte Struktur der Membran aus (**Abbildung 3.27**), (Daum *et al.*, 2014).

Unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen wird keine Veränderung der Membranstruktur beobachtet (**Abbildung 3.27**, kleines Bild in **A**). Diese Beobachtung deckt sich mit Studien an MMM-GUVs, bei denen unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen ebenfalls keine Tubulierung festgestellt wurde, sondern lediglich kleine Membranaggregate entstanden (Daum *et al.*, 2014). Eine Möglichkeit hierfür ist, dass sich unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen tatsächlich Vesikel abschnüren, die mit Durchmessern von ca. 60-100 nm mit der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie nicht auflösbar sind. Daher wurden zusätzlich Kryo-TEM Proben vorbereitet. Die Bildaufnahme erfolgte durch Dr. Dr. Gerd Hause (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) an einem Zeiss Libra 120 kV Transmissionselektronenmikroskop (**Abbildung 3.28**).

In Analogie zu den Fluoreszenzdaten wurden COPII-Experimente an extrahierten-Lipid-GUVs unter nicht-GTP-hydrolysierenden (GMP-PNP) und GTP-hydrolysierenden Bedingungen mit Hilfe von Kryo-TEM untersucht (**Abbildung 3.28**). Um einen Eindruck von GUVs aus extrahierten Mikrosomen-Lipiden in der Kryo-TEM zu gewinnen, sind in **Abbildung 3.28 A-C** Aufnahmen dieser ohne zusätzliche Proteine zu sehen. Zu erkennen sind Membranstrukturen, die zum Teil aus bei der Probenpräparation zerplatzten GUVs bestehen. In **Abbildung 3.28 B** überspannt eine solche Membran ein ganzes Loch im Kohlenstofffilm. In **Abbildung 3.28 C** wiederholt sich dieses Bild von Membranstrukturen allerdings auf dem Kohlenstoff, was zu einem schlechteren Kontrast führt. Die in den Aufnahmen zum Teil dunkleren Strukturen, sind ein Hinweis auf eine höhere Elektronendichte, also auf mehrere Membranschichten. Mit diesen Bildern als Referenz wurden anschließend COPII-Experimente durchgeführt, bei denen die oben genannten COPII-Proteine und GMP-PNP eingesetzt wurden (**Abbildung 3.28 D-G**). Geprägt wird die Probe von Membranschnüren und Tubuli mit unregelmäßigem Durchmesser aber sehr großer Länge, was sich mit den Fluoreszenzdaten deckt. In der Probe wurden vereinzelt Vesikel beobachtet, an deren Oberfläche keine zusätzliche Elektronendichte erkennbar ist, die auf einen möglichen Proteinmantel hindeuten würde. Weiterhin findet man Membranoberflächen mit einer

Elektronendichte, die höher ist als Elektronendichten einer einfachen Membran. Möglicherweise ist in diesem Bereich Sar1p gebunden (**Abbildung 3.28 E**). Es wurden also Vesikel und Tubuli ohne den bisher beschriebenen typischen COPII-Mantel beobachtet.

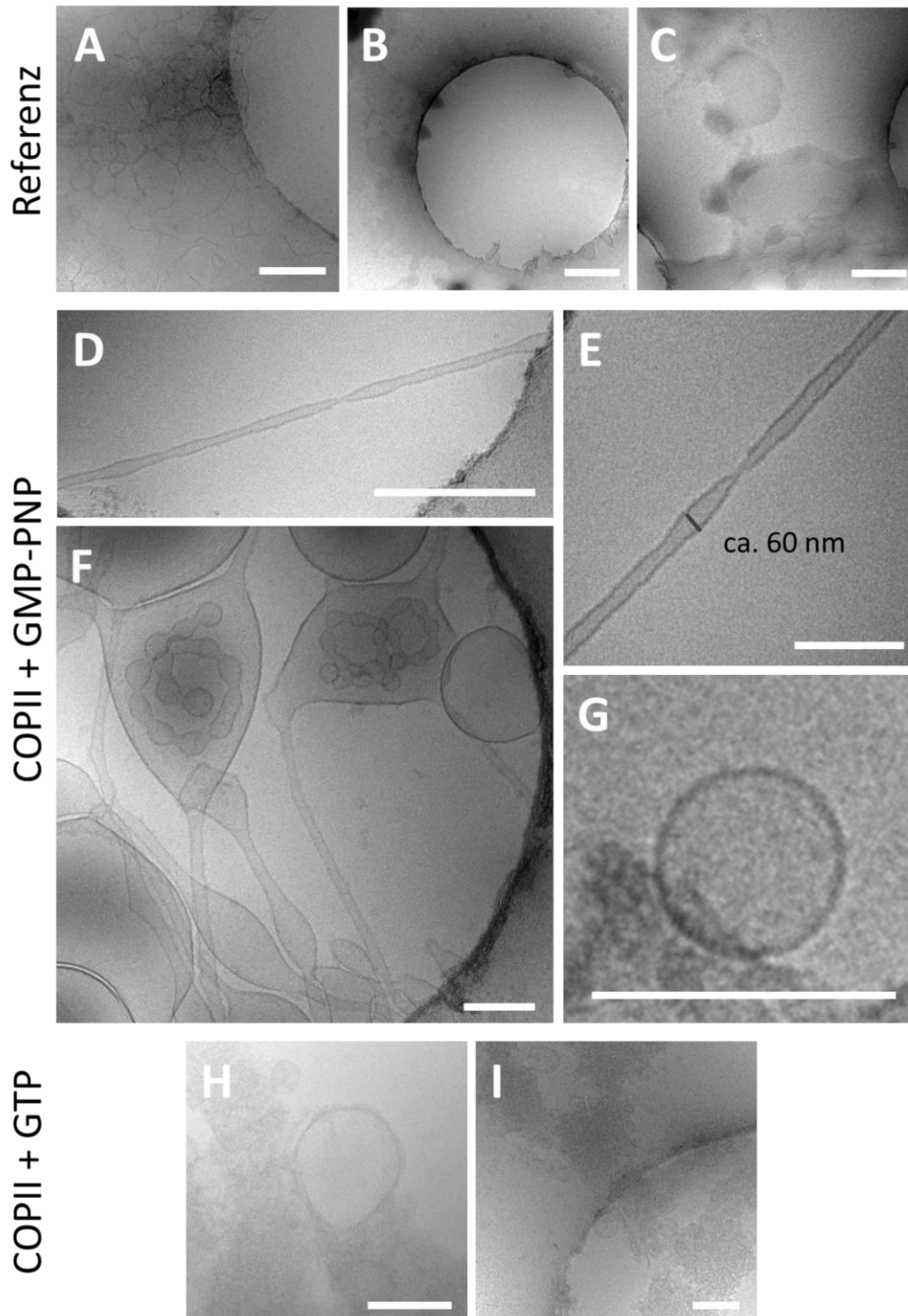


Abbildung 3.28: Kryo-TEM-Aufnahmen von einem COPII-Ansatz nach Bacia et al. (2011) an aus extrahierten Lipiden gebildeten GUVs. **(A-C)** Referenzbilder von GUVs aus extrahierten Lipiden ohne Protein. **(D-I)** GUVs, die für 2 h mit $1 \mu\text{M}$ Sar1p, 340 nM Sec23/24p, 520 nM Sec13/31p, $1 \mu\text{M}$ Sec12p ΔC und mit 2 mM GMP-PNP **(D-G)** bzw. mit 2 mM GTP **(H und I)** inkubiert wurden. Die Bilder wurden an einem Zeiss Libra 120 kV durch Dr. Dr. Gerd Hause aufgenommen. Maßstabsbalken in A-D entsprechen 500 nm und in E-I 200 nm . Die Ergebnisse resultieren aus 2 unabhängigen Experimenten.

Desweiteren wurde untersucht, ob sich unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen Vesikel bilden. In Anwesenheit von GTP wurde an der Vesikelmembran eine ungeordnete erhöhte Elektronendichte beobachtet, die wahrscheinlich durch gebundenes Protein verursacht wurde (**Abbildung 3.28 H**). In diesen Bereichen kann aber keine deutliche Struktur aus innerem Hüllprotein und äußerem Hüllkomplex beobachtet werden (Vergleiche (Zanetti *et al.*, 2013)). Im unteren, linken Bildbereich von **Abbildung 3.28 H** liegen viele unstrukturierte hohe Elektronendichten vor, die auf Aggregate von Proteinen hinweisen. In diesem Bereich befinden sich auch kleine Vesikel zum Teil mit Durchmessern von 100 nm. Vorangegangene Studien haben für COPII-generierte Vesikel ähnliche Durchmesser beobachtet: z.B. 57-89 nm (Shimoni *et al.*, 2000) oder ca. 100 nm (Daum *et al.*, 2014). In der Probe liegen immer wieder kleine Vesikel vor, die einen zusätzlichen Proteinmantel aufweisen (**Abbildung 3.28 I**).

Im nächsten Schritt sollte das System nicht nur die natürliche Lipidzusammensetzung aufweisen, sondern zusätzlich die Proteine der ER-Membranen enthalten. Dazu wurden mit MM1-43 markierte GERVs mit den COPII-Proteinen unter nicht-GTP-hydrolysierenden (Sar1pH77L) (**Abbildung 3.29 A**) und GTP-hydrolysierenden (**Abbildung 3.29 B**) Bedingungen mindestens 2 h inkubiert und dann mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Mithilfe der LSM-Analyse der Proben konnten keine auffälligen Veränderungen der Membranmorphologie in Anwesenheit der COPII-Proteine beobachtet werden.

Für die Untersuchung der COPII-Vesikelbildung an GERVs durch Kryo-TEM wurden zunächst Referenzaufnahmen von GERVs angefertigt (**Abbildung 3.30**). Wie im Fall von GUVs aus isolierten ER-Lipiden beobachtet man Membranstrukturen, die vermutlich zerplatzte GERVs darstellen (**Abbildung 3.30 B**). Neben diesen findet man wesentlich häufiger übereinanderliegende Vesikel verschiedener Größen und Formen (**Abbildung 3.30 A**). An den Membranoberflächen findet man zum Teil hohe Elektronendichten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ER-Membranproteinen oder Membran-assoziierten Proteinen zugeordnet werden können (**Abbildung 3.30, A und D**). Eine weitere Struktur, die man beobachtet, sind kleine Vesikel mit stecknadelförmiger Elektronendichte an ihrer Oberfläche. Bei diesen könnte es sich um das von der Zelle überexprimierte Genprodukt Sey1p handeln. Insgesamt betrachtet ist die Probe strukturell sehr inhomogen, was die Interpretation der Strukturen und vor allem der zu untersuchenden Strukturänderungen durch COPII-Proteine erschwert.

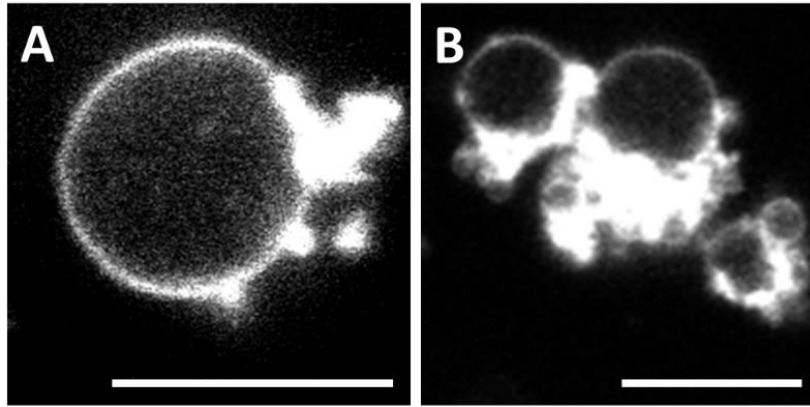


Abbildung 3.29: COPII-Experiment an GERVs. **(A)** 2 μM Sar1pH77L bzw. **(B)** 2 μM Sar1p, 680 nM Sec23/24p, 1,4 μM Sec13/31p sowie 2 mM GTP wurden für mindestens 2 h mit den gebildeten GERVs inkubiert. Die Bildaufnahme erfolgte mittels LSM. Die Fluoreszenz von MM1-43 wurde bei 488 nm angeregt und mittels PMTs im Bereich von 493-630 nm detektiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm .

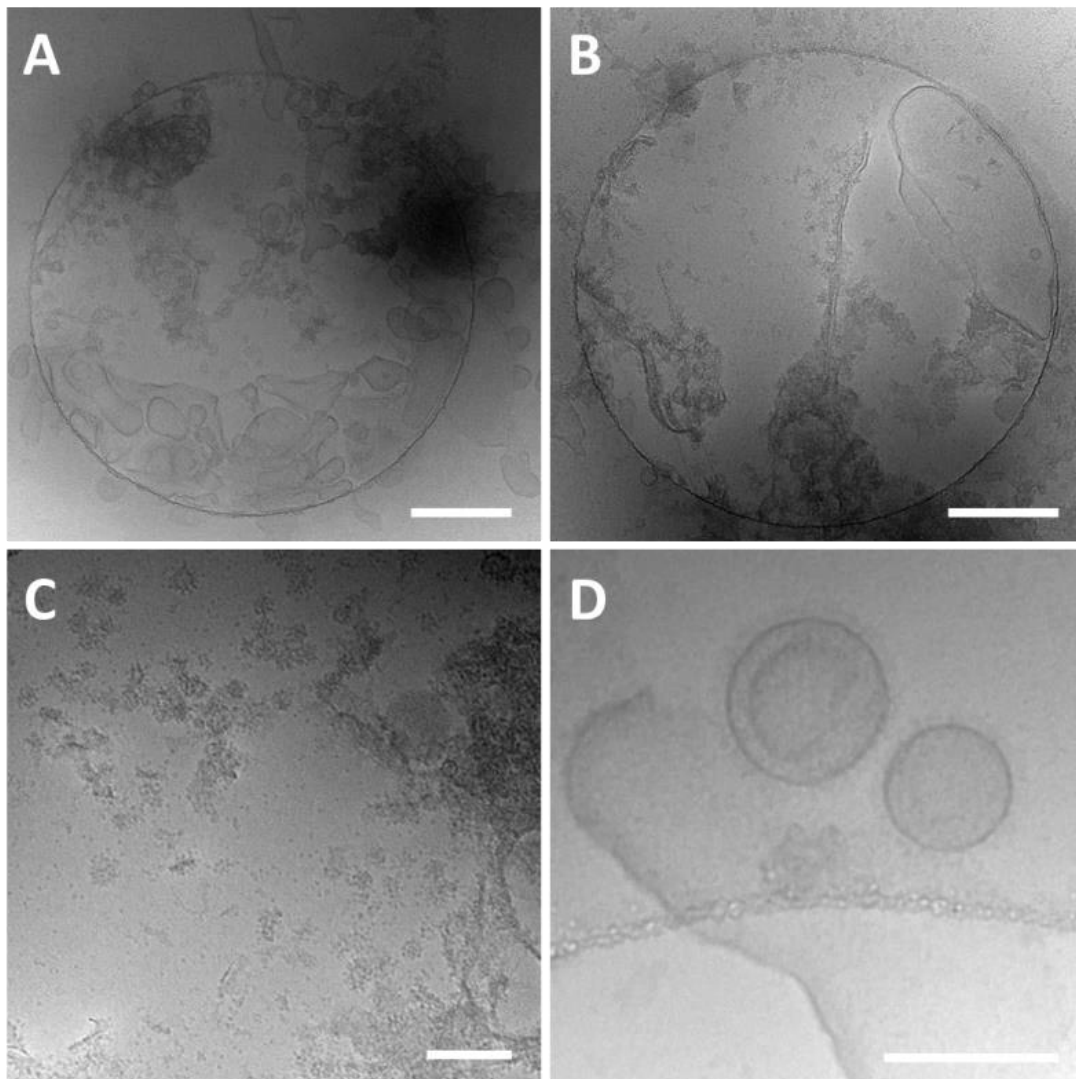


Abbildung 3.30: Kryo-TEM-Aufnahmen von GERVs. **(A-D)** Isolierte ER-Membranen wurden für eine Sey1p-vermittelte Membranfusion 4 h mit 5 mM GTP inkubiert und dann auf Kohlenstoff-beschichtete Kupfernetzchen übertragen und vitrifiziert. Die Bilder wurden an einem Zeiss Libra 120kV von Dr. Dr. Gerd Hause aufgenommen. Maßstabsbalken entsprechen in A und B 500 nm und in C und D 200 nm.

Ähnlich wie in der Referenzprobe wurde auch für GERVs mit COPII-Proteinen eine Vielfalt von Strukturen beobachtet. Da die Membranproben aufgrund der GERV-Herstellung durch Sey1p-vermittelte Membranfusion GTP enthielten, wurde Hydrolyse-gehemmtes Sar1p^{H77L} verwendet, um nicht-GTP-hydrolysierende Bedingungen zu realisieren. Unter diesen Bedingungen beobachtet man proteinbesetzte Ausstülpungen (**Abbildung 3.31 A und B**), Vesikel mit Stecknadelköpfchen (**Abbildung 3.31 D**), Vesikel von wenigen zehn bis zu mehreren hundert Nanometern Durchmesser und aggregiertes Protein (**Abbildung 3.31 A und B**). Die **Abbildung 3.31 C** zeigt einen Vesikel mit einer Elektronendichte an der Oberfläche, die sich von anderen Strukturen unterscheidet. Direkt an der Membran sowie in wenigen Nanometern Abstand liegen zwei Schichten erhöhter Elektronendichte vor (gelbe Pfeile). Dieses Elektronendichtemuster wurde zuvor beobachtet. Dabei handelte es sich bei der verdickten Membran um den inneren COPII-Mantel und bei der zweiten Elektronendichte, die von der Lipiddoppelschicht weiter entfernt ist, um den äußeren COPII-Mantel, also Sec13/31p (Zanetti *et al.*, 2013). Unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen kann scheinbar ein strukturierter COPII-Mantel an der GERV-Membran ausgebildet werden.

Bei einem weiteren Ansatz wurden durch Verwendung von nativem Sar1p GTP-hydrolysierende Bedingungen realisiert (**Abbildung 3.32**). Es sind Membranstrukturen, von möglicherweise geplatzten GERVs zu sehen, die mit kleinen und größeren Vesikeln übereinander liegen (**Abbildung 3.32 A**). Wie für die extrahierten Lipid-GUVs mit COPII-Proteinen und GTP beschrieben, gibt es auch hier Membranen mit Ausstülpungen, die proteinbesetzt sind (**Abbildung 3.32 D**, gelber Pfeil). Darüber hinaus sind aggregiertes Protein (**Abbildung 3.32 D**) und Vesikel mit z.B. 70 nm Durchmesser (oberhalb und seitlich der Proteinaggregate in **Abbildung 3.32 A und C**) sichtbar, bei denen es sich möglicherweise um COPII-Vesikel handeln könnte (Shimoni *et al.*, 2000).

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Cargoproteine die Rekrutierung der COPII-Proteine fördern (Miller *et al.*, 2002). Mit dieser Motivation wurde der COPII-Ansatz mit GERVs aus Membranen durchgeführt, die eine erhöhte Konzentration an Bet1p-mCherry oder mCherry-Emp24p beinhalten (**Abbildung 3.33**). Mit dem SNARE-Protein Bet1p-angereicherte GERVs zeigen in Anwesenheit der COPII-Proteine und GTP-hydrolysierenden Bedingungen einen sehr dicken, scheinbar unstrukturierten Mantel aus Proteinen (**Abbildung 3.33 B**). Diese Beobachtung wurde zuvor auch an MMM-GUVs mit COPII-Proteinen und GTP gemacht (Daum *et al.*, 2014). Unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen wurden in der Probe mit den mit Bet1p-angereicherten Membranen keine auffälligen Strukturen beobachtet (**Abbildung 3.33 A**). In der Probe mit dem Cargoprotein Emp24p wurden unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen Membranausstülpungen beobachtet, an deren Spitzen eine hohe Elektronendichte auf eine erhöhte Proteinkonzentration hindeutet (**Abbildung 3.33 C**). Desweiteren finden sich in allen Proben Vesikel von wenigen zehn bis zu mehreren hundert Nanometern

Durchmesser, Membranen mit proteinbesetzten Ausstülpungen sowie kleine Vesikel mit Stecknadelköpfchen.

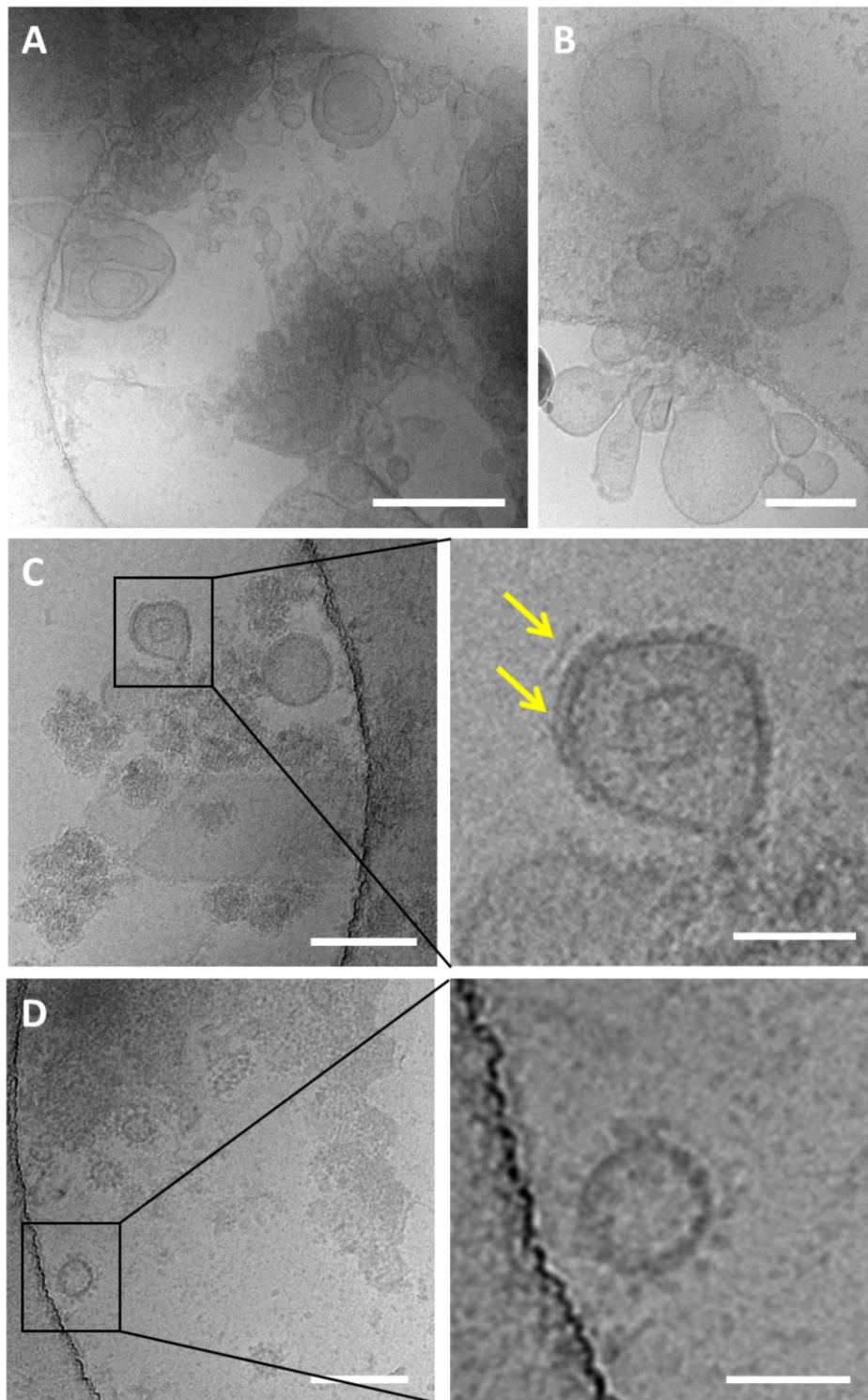


Abbildung 3.31: Kryo-TEM-Aufnahmen von einem COPII-Assay unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen an GERVs nach Bacia et al. (2011). (A) Überblick und (B-D) Detailaufnahmen von GERVs inkubiert mit $2\ \mu\text{M}$ Sar1pH77L, $680\ \text{nM}$ Sec23/24p, $1,4\ \mu\text{M}$ Sec13/31p und mit $2\ \text{mM}$ GTP für 3 h. Die Bilder wurden an einem Zeiss Libra 120 kV von Dr. Dr. Gerd Hause aufgenommen. Maßstabsbalken entsprechen in A 500 nm in B-D 200 nm und in den Vergrößerungen von C und D 100 nm. Die Ergebnisse wurden in zwei Wiederholungen reproduziert.

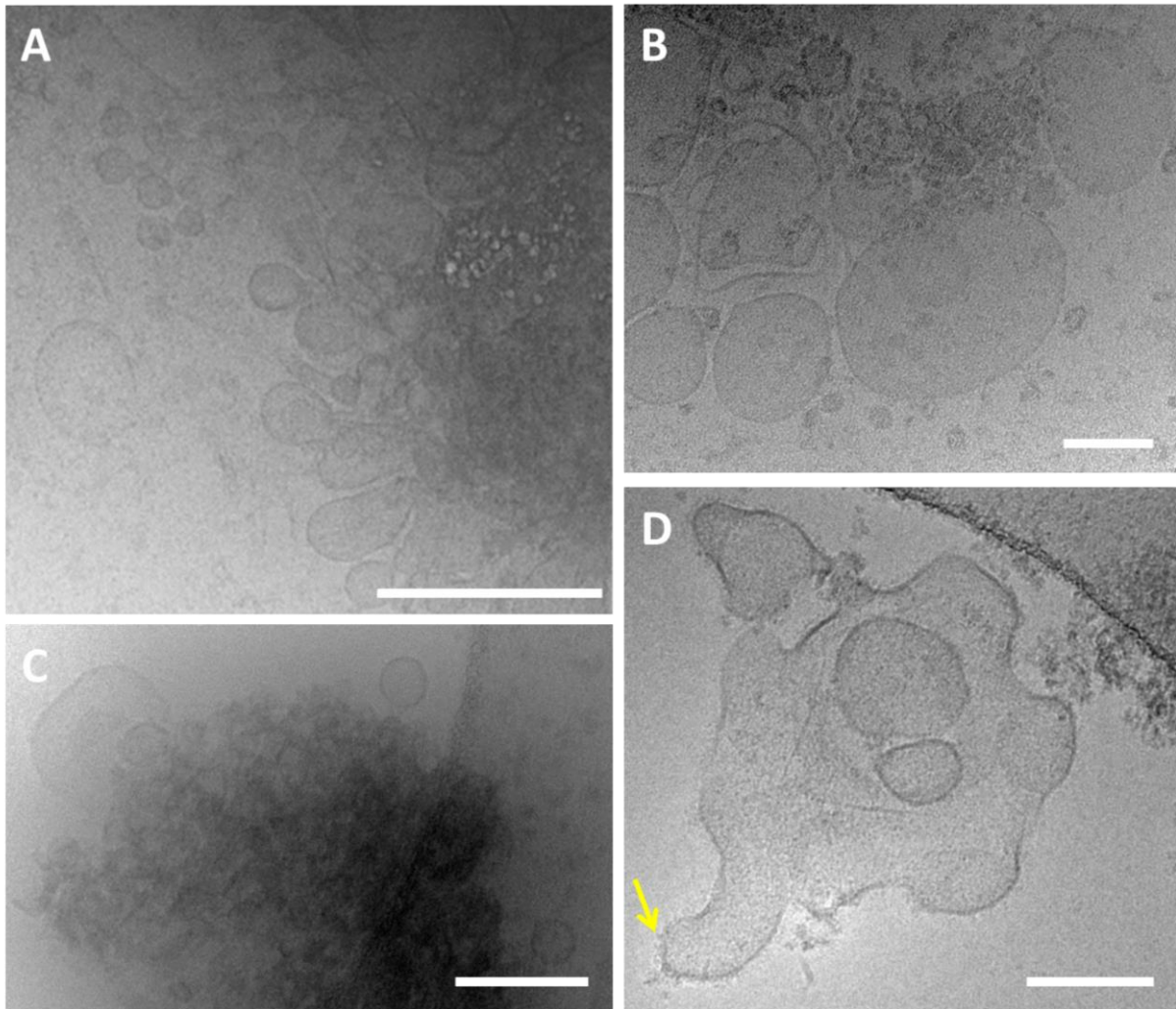


Abbildung 3.32: Kryo-TEM-Aufnahmen von einem COPII-Assay unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen an GERVs nach Bacia et al. (2011). **(A)** Überblick und **(B-D)** Detailaufnahmen von GERVs inkubiert mit $2 \mu\text{M}$ Sar1p, 680 nM Sec23/24p, $1,4 \mu\text{M}$ Sec13/31p und mit 2 mM GTP für 3 h. Die Bilder wurden an einem Zeiss Libra 120 kV von Dr. Dr. Gerd Hause aufgenommen. Maßstabsbalken entsprechen in A 500 nm und in B-D 200 nm. Die Ergebnisse wurden in zwei Wiederholungen reproduziert.

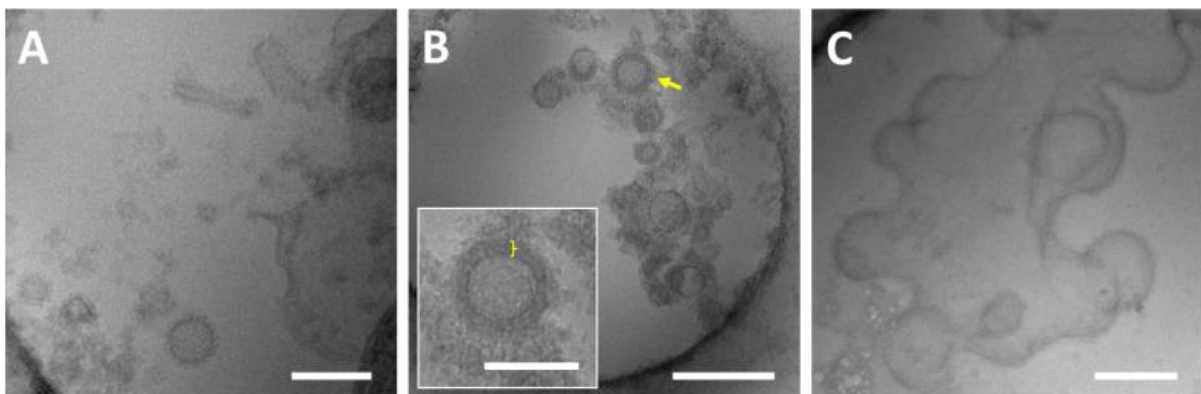


Abbildung 3.33: Kryo-TEM-Aufnahmen von einem COPII-Assay nach Bacia et al. (2011) an Bet1p-mCherry oder mCherry-Emp24p enthaltenden GERVs. **(A)** und **(B)** zeigen COPII-Ansätze an GERVs mit einer erhöhten Konzentration an Bet1p-mCherry. Es wurden (A) $2 \mu\text{M}$ Sar1pH77L bzw. (B) Sar1p sowie 680 nM Sec23/24p, $1,4 \mu\text{M}$ Sec13/31p und 2 mM GTP eingesetzt. **(C)** mCherry-Emp24p-Membranen mit $2 \mu\text{M}$ Sar1p, 680 nM Sec23/24pR722A, $1,4 \mu\text{M}$ Sec13/31p und 2 mM GTP. Die Proben wurden jeweils 3 h inkubiert, vitrifiziert und von Dr. Dr. Gerd Hause mit einem Zeiss Libra 120 kV analysiert. Maßstabsbalken entsprechen in A 200 nm, in B und C 500 nm und im kleinen Bild in B 250 nm.

4. Diskussion

Das ER ist ein zentrales Organell und bildet eine Schaltstelle für die Synthese und Modifikation von Membranproteinen und Lipiden und ihrer Verteilung in der Zelle. *In vivo* Studien sind aufgrund der vielfältigen Struktur in Form von Tubuli und Zisternen in der Zelle sehr komplex. Daher wurde in dieser Arbeit die erfolgreiche Entwicklung eines Untersuchungssystems basierend auf natürlichen ER-Membranen außerhalb der Zelle sowie dessen Anwendung für verschiedene Mikroskopie-basierte Studien etabliert. Die Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert.

4.1 Anreicherung von ER-Membranen

4.1.1 Sphäroplastenbildung durch Lyticase und Chitinase

Die Entwicklung des vorgestellten Untersuchungssystems setzt voraus, dass ER-Membranen aus Hefezellen angereichert werden können. Dazu muss ein schonender Abbau der Zellwand erreicht werden. Die Hefezellwand setzt sich maßgeblich aus β -1,3-Glucanen und den weiteren Komponenten β -1,6-Glucan, Chitin sowie glykosylierten Proteinen zusammen (Nguyen *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass Zellen, die auf Minimalmedium mit Raffinose als Kohlenstoffquelle wachsen, mehr Chitin in ihrer Zellwand einbauen als Zellen, die auf Glukose-haltigem Vollmedium wachsen (**Abbildung 3.3**). Diese Beobachtung wird durch früherer Arbeiten untermauert, die zeigen, dass die genaue Zusammensetzung der Hefezellwand von der Kohlenstoffquelle im Medium abhängig ist (Aguilar-Uscanga *et al.*, 2003).

Die Sphäroplasten aus WT-Zellen, angezogen auf Glukose-basiertem Medium, wurden mit dem β -1,3-Glucan-abbauenden Enzym Lyticase gebildet (**Abbildung 3.2 B**), (Wuestehube *et al.*, 1992; Zinser *et al.*, 1995). Dies gelang für auf Raffinose gewachsenen Zellen nicht (**Abbildung 3.2 C**). Um den Abbau der Zellwand auch von zusätzlichen Genen exprimierenden Zellen enzymatisch, also auf schonende Weise, zu realisieren, wurden diese Zellen mit einer Kombination aus dem Chitin-abbauenden Enzym Chitinase und dem β -1,3-Glucan-abbauenden Enzym Lyticase behandelt. Diese Enzymkombination führte zu einer effektiven Sphäroplastenbildung (**Abbildung 3.4**), sodass der weitere Reinigungsprozess (s. **Abbildung 3.1**) auch für Hefezellen, die mit Raffinose angezogen wurden, durchgeführt werden konnte.

4.1.2 Qualität der angereicherten ER-Membranen

Die gewonnenen ER-Membranen wurden bezüglich ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung untersucht. Die Lipidzusammensetzung von ER-Membranen wurde in vorangegangenen Studien mittels Dünnschichtchromatografie (Matsuoka *et al.*, 1998; Zinser *et al.*, 1991) und massenspektrometrisch charakterisiert (Schneiter *et al.*, 1999). In der Literatur wurden Ergosterol sowie eine breite Palette an Phospholipiden nachgewiesen. Der Phospholipidanteil setzt sich danach aus 51,3 % Phosphatidylcholin, 33,4 % Phosphatidylethanolamin, 7,5 % Phosphatidylinositide, 6,6 % Phosphatidylserin, 0,4 % Cardiolipin, 0,2 % Phosphatidsäure und 0,5 % andere Phospholipide zusammen (Zinser *et al.*, 1991). Die Fettsäureseitenketten von Hefelipiden bestehen vor allem aus 16 oder 18 C-Atomen und sind einfach ungesättigt, auch ein geringer Anteil an gesättigten Fettsäuren mit 14, 16 und 18 C-Atomen wurden beschrieben (Wagner *et al.*, 1994). In dieser Arbeit wurde die Lipidzusammensetzung der gewonnen Mikrosomenfraktion mittels Massenspektrometrie untersucht (**Tabelle 3.2**). Dabei wurden vor allem Fettsäureketten mit 16 bzw. 18 C-Atomen nachgewiesen, die entweder gesättigt oder einfach ungesättigt waren. Die extrahierten Lipide weisen also die für Hefelipide typischen Fettsäureketten auf. An Kopfgruppen wurden Phosphatidsäure sowie Phosphatidylethanolamin, -serin und -inositol nachgewiesen. Aufgrund des hier angewendeten Messbereichs von m/z-Werten von 500 bis 1000 wurden Ergosterol und Cardiolipin, die zu klein bzw. zu groß für diesen Bereich sind, nicht nachgewiesen. Nichtsdestoweniger wurden die erwarteten Kopfgruppen mit Ausnahme von Cardiolipin und die erwarteten Acylketten qualitativ nachgewiesen.

Die angereicherten ER-Membranen wurden zur Qualitätsbeurteilung intensiv auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht. Die Verteilung der Proteine der Organellmembranen während der verschiedenen Reinigungsstufen wurde dazu mittels Markerproteinen sowie massenspektrometrisch beurteilt.

Bei der Anreicherung von Organellmembranen liegt das Augenmerk auf der Abreicherung von Fremdorganellen—nicht auf der vollständigen Reinigung eines Organells. Eine Isolation von Organellen aus der Zelle in reiner Form ist nach heutigem Stand der Wissenschaft nicht realisierbar. Aufgrund der ähnlichen chemischen Zusammensetzung und Dichte verschiedener Organellen und der Fragmentierung der ER-Membran und Plasmamembran zu kleinen Vesikeln während des Aufschlusses kommt es immer zu Kreuzkontaminationen (Zinser *et al.*, 1995). Dennoch konnten die Isolationsprotokolle für die einzelnen Organellen und deren Nachweise optimiert werden. Die Beurteilung der Reinigungsqualität erfolgt dabei über Anreicherungsfaktoren, die für die verschiedenen Organellen sehr unterschiedlich ausfallen können. ER-Proteine sind beispielsweise in der Zelle relativ häufig. Eine Anreicherung führt zu einer größeren Anzahl, die relativ zur Ausgangsmenge aber nicht sehr stark erhöht ist. Nach Zinser und Daum liegt ein sehr guter

Anreicherungswert für Mikrosomen zwischen vier und sieben. Zum Vergleich kann die Plasmamembran betrachtet werden. Ihre Proteine machen lediglich 1-2 % der Gesamtproteinmenge aus. Wird diese angereichert, können Anreicherungsfaktoren bis zu 100 erreicht werden (Zinser *et al.*, 1995).

Die klassischen Markerprotein-basierten Nachweise der verschiedenen Organellmembranen geben Aufschluss über die Verteilung der Organellen in den verschiedenen Reinigungsfraktionen. Für die Untersuchung des Verbleibs der ER-Membranen wurden zwei Markerproteine, namentlich Sec61p (Junne *et al.*, 2010; Pichler *et al.*, 2001) und CytC Red (Zinser *et al.*, 1995), verwendet. Beide zeigen in der Mikrosomenfraktion ihre höchste Anreicherung (dreifach bzw. fünffach). In der OptiPrep-Fraktion liegt der Gehalt an Sec61p bei knapp dreifach und an CytC Red vierfach höher als in der Sphäroplastenfraktion. Basierend auf empirischen Studien kann die Aussage getroffen werden, dass für CytC Red ein für ER-Isolationen typischer Anreicherungsfaktor erzielt wurde (Zinser *et al.*, 1995).

Die Kernmembran wurde, wie in der Literatur beschrieben (Schimmang *et al.*, 1989), zu einem großen Teil im LSP abgetrennt. Die restlichen Membrananteile der Kernmembran, die auch in den Mikrosomen nachgewiesen werden konnten, wurden durch den OptiPrep-Gradienten entfernt (**Abbildung 3.5 C**).

Die Membranen der Plasmamembran, des Golgi-Apparats und der Vakuole gelangten wie die ER-Membran zunächst ins HSP, wurden aber effektiv durch den Saccharosegradienten abgetrennt (**Abbildung 3.5 B und D; Abbildung 3.6 C**). Verbleibende Signale des Golgi-Apparats und der Plasmamembran in den Mikrosomen wurden durch den OptiPrep-Gradienten in der finalen Fraktion weiter reduziert (**Abbildung 3.7**).

Mitochondrienmembranen wurden gemeinsam mit den ER-Membranen vor allem in der Mikrosomenfraktion nachgewiesen. Die Verunreinigung der Mikrosomen durch mitochondriale Membran wurde in der Literatur häufig beschrieben (Zinser *et al.*, 1995; Zinser *et al.*, 1991). Die Aktivität des Markerenzym SDH kann aber durch den OptiPrep-Gradienten in der finalen Fraktion um ca. 75 % verringert werden (**Abbildung 3.6 B**).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Markerprotein-basierten Analyse kommt man zu der Einschätzung, dass der OptiPrep-Gradient zur Verminderung der Kontamination durch Fremdmembranen beiträgt. Im finalen Produkt sind neben ER-Membranen noch mitochondriale Membranen enthalten. ER-Membranen und mitochondriale Membranen liegen in der Zelle in unmittelbar räumlicher Nähe vor und bilden über den ERMES-Komplex Kontaktstellen (Kornmann *et al.*, 2009). Es ist also möglich, dass mitochondriale Membranfragmente mit den ER-Membranen angereichert und entsprechend in der gleichen Fraktion detektiert werden. Auch kann anhand der Daten nicht ausgeschlossen werden, dass Membranen von Mitochondrien beim Aufschluss mit in die ER-Membranen, die bei der Aufschlussprozedur fraktioniert wurden, eingebaut oder von diesen umschlossen wurden.

Bei der Markerprotein-basierten Methode steht ein einzelnes Protein stellvertretend für ein gesamtes Organell. Diese Markerproteine sind spezifisch und empirisch bewährt (Pichler *et al.*, 2001; Zinser *et al.*, 1995; Zinser *et al.*, 1993). Dennoch drängt sich die Frage auf, ob die Beurteilung der Reinigung aufgrund der Verteilung einzelner Proteine hinreichend ist. Außerdem müssen, um die finale Fraktion auf den Gehalt verschiedener Organellen zu testen, zeit- und arbeitsintensiv Western Blots und Aktivitätsassays optimiert und durchgeführt werden. Die massenspektrometrische Analyse isolierter Organellen ermöglicht die Beschreibung der Verteilung von Proteinen in verschiedenen Organellen (Brunet *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2003). Die Zuordnung der Proteinverteilung ist allerdings von der Reinigungsqualität der Organellmembranen abhängig und sollte in bildgebenden Kontrollexperimenten an intakten Zellen, wie der Lokalisation von neu zugeordneten Proteinen als fluoreszierende Fusionsproteine, verifiziert werden (Vorgehensweise vgl. (Brunet *et al.*, 2003)). In der vorliegenden Arbeit wurde eine massenspektrometrische Untersuchung der Fraktionen zur Beurteilung der Reinigungsqualität getestet. Die Zuordnung der Proteine zum jeweiligen Organell erfolgte durch die Verwendung der Uniprot-Datenbank, die ihre Informationen aus den fundierten und verifizierten Daten der Swiss-Prot Datenbank zieht. Die Markerprotein-basierte sowie die massenspektrometrische Methode zur Beurteilung des Reinheitsgrades stützen sich in Bezug auf die Zuordnung von Proteinen zu bestimmten Organellen auf die bisher bekannte Literatur.

Die erhaltenen Daten zeigen, dass durch die Massenspektrometrie die Möglichkeit besteht, Reinigungsfraktionen auf ihre gesamte Proteinzusammensetzung zu untersuchen und eine Vielzahl von Membranproteinen und membranassoziierten Proteinen, die spezifisch für ein Organell sind, zu identifizieren. So wurden An- und Abreicherungs-faktoren für alle identifizierten Proteine bestimmt (**Abbildung 3.8**). Um An- und Abreicherungs-faktoren zu ermitteln, wurde, in Analogie zur Markerprotein-basierten Vorgehensweise, als Referenz die Sphäroplastenfraktion gewählt, da diese Fraktion alle Proteine, außer die der Zellwand, beinhaltet. In den Sphäroplasten sind sehr viele verschiedene Proteine enthalten, wobei viele in nur geringen Konzentrationen vorliegen und daher nicht nachweisbar sind. Unter Berücksichtigung der Qualitätskriterien (s. Abschnitt 2.2.8.6) wurden insgesamt 54 Proteine der Kernmembran, der Vakuolenmembran, der mitochondrialen und der Golgi-Apparat-Membran, der ER-Membran und der Plasmamembran identifiziert, deren Verteilung in den Fraktionen untersucht wurde. Endosomale und peroxisomale Proteine wurden nur vereinzelt und jeweils nur in einem Replikat detektiert. So wurden sie entsprechend der Qualitätskriterien nicht berücksichtigt.

Proteine des Kerns wurden laut Markerprotein-basierter Analyse im LSP abgetrennt (**Abbildung 3.5 C**). Die massenspektrometrische Methode detektiert drei der Kernmembran zugeordneten Proteine, namentlich Scp160p, Nsp1p und Scs2p. Einzelne werden in jeder Fraktion detektiert. In der Mikrosomenfraktion und der OptiPrep-Fraktion wurde Scs2p detektiert, das sowohl der Kernmembran

als auch der ER-Membran zugeordnet wird (Kagiwada *et al.*, 1998; Loewen *et al.*, 2003). Die Detektion von Scs2p in der OptiPrep-Fraktion ist somit kein Hinweis auf eine Kontamination der ER-Membran mit Kernmembran.

Das HSP, das die verschiedenen Organellmembranen enthalten soll, wird durch den Saccharosegradienten in zwei Fraktionen geteilt. Die S-Fraktion enthält laut Markerprotein-basierter Analyse vor allem Golgi-Apparat Membran, Vakuolenmembran und Plasmamembran. Dies wird durch den massenspektrometrischen Ansatz bestätigt. In der S-Fraktion sind Proteine der Membran vom Golgi-Apparat und der Vakuole stark konzentriert. Es werden auch viele ER-Membranproteine detektiert. Vermutlich ist ein kleiner Teil der ER-Membranen in dieser Fraktion enthalten. Ein Teil der Signale rührt aber sehr wahrscheinlich von ER-Membranproteinen, die auch im Golgi-Apparat vorhanden sind, da sie dort posttranskriptional modifiziert oder zwischen ER und Golgi-Apparat transportiert werden. Diese Argumentation gilt beispielsweise für die Signale von Emp24p und Erv46p (**Abbildung 3.8**).

Bei der zweiten Fraktion des Saccharosegradientens, der Mikrosomenfraktion, werden analog zwei Proteine detektiert, die auch der Golgi-Apparat-Membran zugeordnet werden. Bei diesen handelt es sich um Kes1p und Sar1p. Kes1p ist bei der Lipidverteilung zwischen ER und Golgi-Apparat beteiligt (LeBlanc *et al.*, 2013) und Sar1p könnte sich als Teil des COPII-Mantels zwischen ER und Golgi-Apparat bewegen (Oka *et al.*, 1991). Damit sind die dem Golgi-Apparat zugewiesenen Proteine, die in der Mikrosomenfraktion konzentriert sind, ebenfalls im und am ER vorkommende Proteine. Da keine weiteren Golgi-Apparat-Membranproteine detektiert wurden, spricht das Signal von Sar1p und Kes1p nicht für eine Kontamination der Mikrosomen durch Golgi-Apparat-Membran. Neben den gewünschten ER-Membranen enthält die Mikrosomenfraktion auch mitochondriale Membranproteine sowie jeweils ein Protein, das der Kern-, der Vakuolen- bzw. der Plasmamembran zugeordnet wird. Um diese Kontaminationen abzutrennen, wurde der Effekt eines OptiPrep-Dichtegradientens getestet. Dieser wurde zuvor erfolgreich zur Verringerung von Kreuzkontaminationen von ER-Membranpräparationen eingesetzt (Graham, 2002). Der Nutzen dieses Zentrifugationsschritt soll hier erneut, aber nun unter Berücksichtigung der massenspektrometrischen Daten, beurteilt werden. Anhand der massenspektrometrischen Untersuchung ist gezeigt worden, dass der OptiPrep-Gradient den Effekt des Saccharosegradientens verstärkt und Golgi-Apparat-Membranen und Vakuolenmembranen in der OptiPrep-Fraktion weiter reduziert wurden. Dieser Effekt des OptiPrep-Gradientens wurde auch bei der Isolation von ER-Membranen aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) beobachtet (Ge *et al.*, 2013).

Der Gehalt an mitochondrialer Membran ist aber, wie schon in der Mikrosomenfraktion, weiterhin hoch. Diese Beobachtung widerspricht den Daten des mitochondrialen Markerenzym SDH, nach dessen Verteilung kaum mitochondriale Membranen in der OptiPrep-Fraktion enthalten sind. Die SDH

wurde mittels des massenspektrometrischen Ansatzes nicht detektiert. Möglicherweise ist dieses Protein aufgrund seiner Eigenschaften nicht für die Detektion bei den verwendeten Einstellungen des Massenspektrometers geeignet. Dies erschwert eine Beurteilung der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Verteilung mitochondrialer Proteine, die durch die Aktivitätsassays und die Massenspektrometrie gewonnen wurden. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse zeigen, dass die finale OptiPrep-Fraktion neben ER-Membranproteinen mitochondriale Proteine enthält, deren Anteil durch den OptiPrep-Gradient kaum verringert wurde. Der OptiPrep-Gradient führt demnach, betrachtet man den Gehalt aller Organellen, zur Verringerung der Kreuzkontaminationen mit Ausnahme der mitochondrialen Membran.

Vergleicht man die Markerprotein-basierte Methode mit der massenspektrometrischen Methode fällt auf, dass die Ergebnisse für die Membranen des ERs, des Golgi-Apparates und der Vakuole sowie für die Plasmamembran sich gegenseitig untermauern. Der massenspektrometrische Ansatz weist aber daraufhin, dass mitochondriale Proteine die größte Kontamination der finalen ER-Membranen darstellen. Ist ein Markerprotein also gut gewählt und repräsentativ, dann gelangt man zu den gleichen Ergebnissen wie mit einer Methode, die alle Proteine umfasst. Ist man sich bezüglich der Auswahl eines einzelnen Markerproteins unsicher, ist es vorteilhaft, eine größere Anzahl von Proteinen wie mit der Massenspektrometrie zu berücksichtigen. Experimentell gesehen ist der massenspektrometrische Ansatz, nachdem er einmal etabliert ist, im Vergleich zu dem Markerprotein-basierten Ansatz mit einem geringeren Arbeitsaufwand verbunden. Es können mit einem Arbeitsschritt alle Fraktionen auf den Gehalt aller Organellen getestet werden. Allerdings ist die Laufzeit am Gerät aufgrund der Komplexität der Proben sehr hoch. Die gewonnenen Daten aber ermöglichen eine sehr detaillierte, umfassende Beurteilung der Reinigungsqualität.

Die hier gezeigte massenspektrometrische Untersuchung der Organellmembranen führt deutlich vor Augen, dass trotz optimierter Prozeduren (Wuestehube *et al.*, 1992; Zinser *et al.*, 1995) kein reines isoliertes Organell vorliegt. Allerdings ist die starke Anreicherung eines Organelles für die meisten Experimente ausreichend. Da durch den massenspektrometrischen Ansatz bekannt ist, welche Kontaminationen vorliegen, können mögliche Effekte dieser in den mit den Reinigungsfractionen gewonnenen Daten berücksichtigt werden.

4.2 ER-Membranen können zu GEMVs fusioniert werden

GEMVs weisen für Mikroskopie-basierte Studien Vorteile bezüglich ihrer Größe, der Handhabbarkeit, der, im entsprechenden molekularem Größenmaßstab betrachteten, planaren Membran, dem Existieren eines inneren und äußeren Milieus, der Zugänglichkeit der Membran sowie der modulierbaren Membranspannung auf und stellen damit ein sehr gut geeignetes

Untersuchungssystem für vielfältige Anwendungen dar. Mit dem Ziel eine solche Modellmembran, bestehend aus natürlichen ER-Membranen, zu gewinnen, wurden die isolierten ER-Membranen zu GERVs fusioniert. Dazu wurde das auf einem Vektor in die Hefe eingebrachte SEY1, das für die GTPase Sey1p kodiert, unter einem GAL-Promotor exprimiert. Um eine Fusion zu erreichen, wurde ein magnesiumhaltiger Puffer und das für eine Fusion notwendige GTP hinzu gegeben (Anwar *et al.*, 2012). Diese Bedingungen führten tatsächlich zur erfolgreichen Bildung sehr großer Vesikel (**Abbildung 3.10**). Die Fusion der Sey1p-enthaltenen Membranen erfolgte optimalerweise bei 5 mM GTP, allerdings auch zu geringem Teil ohne die Zugabe von GTP, was vermutlich daran liegt, dass bei der Anreicherung der Membranen auch GTP isoliert wurde (**Abbildung 3.15**). Nach Abschluss der Fusion sind die GERVs auch in Abwesenheit von GTP stabil (**Abbildung 3.16 D und F**). Dies ist optimal für Folgeexperimente, bei denen GTP störend wirkt.

In seltenen Fällen führte die Zugabe von GTP zu tubulären Strukturen (**Abbildung 3.12**). Große Vesikel stellen für zylindrische Lipide eine thermodynamisch günstige Lipiddoppelschichtstruktur dar (Israelachvili *et al.*, 1976). Dahingegen erfordert die Ausbildung von Tubuli, für die die Membran stark gekrümmt werden muss, die Verrichtung von Arbeit beispielsweise durch strukturgebende Proteine (Frolov *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009). Proteine, die in der Zelle spezifisch die tubuläre Struktur des ERs fördern, sind die Retikulons und Yop1 (Hu *et al.*, 2008). Da es sich bei den Membranen um natürliche ER-Membranen handelt, die auch diese Proteine beinhalten, kommt es neben der Ausbildung der GUV-Struktur auch zur Bildung von Tubuli (Dreier *et al.*, 2000), (**Abbildung 3.12**). Der Anteil an Membranen, der Tubuli bildet, ist im Vergleich zu den GERV-bildenden Membranen vernachlässigbar.

An den Membranen befinden sich Membranansammlungen, die nicht fusionieren (**Abbildung 3.10; Abbildung 3.11; Abbildung 3.13**). Diese Membranen könnten Kreuzkontaminationen anderer Organellen sein, in denen kein Sey1p angereichert wurde. Dies würde bedeuten, dass Kreuzkontaminationen nicht in die GERV-Membran eingebaut werden und GERVs nur aus ER-Membranen bestehen, auch wenn in der finalen Reinigungsfraktion Membranen anderer Organellen vorliegen. Unter Umständen könnte es sich bei den Membranansammlungen auch um ER-Membranen handeln, die aufgrund von Proteinaggregaten miteinander verklebt sind. Eine Reduktion der nicht fusionierenden Membranen kann daher vermutlich durch eine weitere Optimierung der ER-Membran-Anreicherung erfolgen. Die Optimierung der Reinigung durch weitere Gradienten wäre allerdings höchst aufwändig bei geringem Effekt auf die Membranqualität (Zinser *et al.*, 1995). Sollte eine weitere Reinigung der Membranen notwendig sein, so könnte man alternative Ansätze, wie die Anreicherung von Membranen auf Chromatographiesäulen, testen (Shaklee *et al.*, 2010). Eine andere Möglichkeit zur Reduktion von Aggregaten bietet das Waschen mit Hochsalzpuffern. Hierbei besteht allerdings die Gefahr der Veränderung der Membranstruktur. Der Nutzen für ein entsprechendes Experiment muss

daher gegen eine mögliche Verminderung der Membranqualität bei einem solchen Vorgehen abgewogen werden.

ER-Membranen, die die natürliche Menge Sey1p enthielten, fusionierten unter den verwendeten Bedingungen nicht zu GERVs (**Abbildung 3.11 A**). Dies bestätigt Studien der Gruppe um Lee et al., die nur bei erhöhter Sey1p-Konzentration eine spontane Fusion von Vesikeln beobachten. Diese Gruppe weist auch darauf hin, dass unter natürlichen Bedingungen eine Sey1p-vermittelte Membranfusion durch SNARE-Proteine gefördert wird (Anwar *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015). Dabei sind die SNARE-Proteine Ufe1, Sec20 und Sec22 bei der homotypischen ER-Fusion beteiligt. Allein die Zugabe der löslichen SNARE-Komponente Sec22 förderte die Fusion von Vesikeln (Lee *et al.*, 2015). Ein Hinweis darauf, dass SNARE-Proteine auch bei der Bildung von GERVs förderlich sein könnten, bieten die Bet1p-mCherry GERVs (**Abbildung 3.20 D, Abbildung 5.1**). Die Ausbeute und Qualität der Bet1p-mCherry GERVs ist sehr hoch. Zur Verbesserung der Fusionseffizienz sollte daher in Zukunft die Zugabe der löslichen Domäne von Sec22 in Betracht gezogen werden (vgl. (Lee *et al.*, 2015)).

Nichtsdestoweniger können Sey1p-vermittelt erfolgreich GUVs aus natürlichen ER-Membranen gebildet werden, die hier in Anlehnung an GPMVs als GERVs bezeichnet werden.

4.3 Anwendung konfokalmikroskopischer Techniken an GERVs

Zur Etablierung der GERVs als neues Untersuchungssystem von ER-Membranen wurden verschiedene Mikroskopie-basierte Techniken mit Fokus auf Proteine unterschiedlicher ER-Stoffwechselwege getestet.

Der Translocon-Komplex, der neu gebildete Peptide über die Membran ins ER transloziert, stand im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung im Mittelpunkt. Bei der Translokation bestimmter Proteine ist eine komplexe Folge von Interaktionen zwischen Ribosomen, Rezeptoren und innerhalb des Translocon-Komplexes notwendig (Itskanov *et al.*, 2019; Ziska *et al.*, 2019). Sec61p, Teil des Translocon-Komplexes, wurde erfolgreich mittels Immunfluoreszenz markiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie in der GERV-Membran visualisiert (**Abbildung 3.17 A und B**). In einem Kontrollexperiment wurde untersucht, ob die Bindung des sekundären Antikörpers an die GERV-Membran durch eine spezifische Interaktion mit dem primären Antikörper oder durch unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers an die Membran verursacht wurde. Ein Färbeversuch ohne den primären Antikörper führt zu einer gleichmäßigen Fluoreszenzverteilung im Puffer, also nicht zu einer unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers an die Membran oder zur Diffusion des Antikörpers über die Membran (**Abbildung 3.17 F**). Die Spezifität des primären Antikörpers gegen Sec61p wurde zusätzlich durch einen Western Blot, der nur ein Signal in Sec61p-Laufhöhe zeigt, bestätigt (**Abbildung 3.17 D**). GERV-Membranen enthalten also Sec61p und folglich den Translocon-

Komplex. Dies eröffnet die Möglichkeit z.B. die Translokation von neu gebildeten Peptiden durch Mikroskopie-Techniken zu untersuchen. Gleichzeitig zeigt dieses Experiment, dass GERVs für Immunfluoreszenzfärbungen und somit auch für Versuche mit häufigem Austausch von Puffersubstanzen geeignet sind.

Weiterhin wurde die genetische Manipulation der Zusammensetzung der GERV-Membran durch gezielte Expression von durch Vektoren eingebrachte Zielsequenzen erreicht. Hefezellen, die problemlos mit zwei Vektoren transfiziert werden können und so mindestens zwei zusätzliche Proteine synthetisieren können, können neben Sey1p auch Sec12p-sfGFP, Bet1p-sfGFP, Bet1p-mCherry oder mCherry-Emp24p in ihre ER-Membran einbauen (**Abbildung 3.18**). Im gegebenen Beispiel wurden *single-copy* Vektoren mit einem experimentell einfach zu handhabenden GAL-Promotor verwendet. *Single-copy* Vektoren wurden gewählt, um ein Zielgen in moderaten Mengen zu exprimieren (Mumberg *et al.*, 1995). Die Menge an synthetisierten Proteinen war ausreichend zur Visualisierung des ERs in der Zelle und der fluoreszierenden Fusionsproteine in GERVs (**Abbildung 3.18; Abbildung 3.20**). Gleichzeitig stört die Proteinkonzentration die Membranfusion nicht (**Abbildung 3.20**). Die Fluoreszenz von mCherry wurde häufig mittels sensitiver APDs aufgenommen, um bei einer geringeren Laserleistung anregen zu können und so den für Bleichen anfälligen Fluoreszenzfarbstoff mCherry zu schonen. Die Möglichkeit, Proteine durch Ausnutzung der Genexpressionsmaschinerie der Hefe in die ER-Membran zu integrieren, spart Aufwand und Zeit gegenüber der Vorgehensweise, bei der Proteine gereinigt und in GUV-Membranen rekonstituiert werden müssen (Bacia *et al.*, 2004b). Auf diese Weise entstehen durch die fluoreszierenden Fusionsproteine markierte GERVs, die für weitere Experimente zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Arbeit sind klassische ER-Membranproteine verwendet worden. Denkbar ist, dass das System auf nicht ER-ständige Proteine erweitert werden kann, indem das Signalpeptid KDEL an das Protein von Interesse angefügt wird (Pelham, 1989).

Die GERV-Membran kann auch mit mehreren fluoreszierenden Membranproteinen angereichert werden. Um mehrere verschiedene Proteine in der GERV-Membran anzureichern, können ER-Membranen aus verschiedenen Zelllinien miteinander fusioniert werden. Erfolgreich wurden Sec12p-sfGFP und Bet1p-mCherry, Sec12p-sfGFP und mCherry-Emp24p sowie Bet1p-sfGFP und Bet1p-mCherry enthaltene GERVs produziert. (**Abbildung 3.21; Abbildung 3.22; Abbildung 3.23 B**).

Außerdem wurden einfache Bindungsstudien mit löslichen fluoreszenzmarkierten Proteinen des COPII-Mantels, Sar1p und Sec13/31p, durchgeführt. Im GTP-gebundenen Zustand bindet Sar1p durch Ausklappen einer amphipathischen α -Helix an Membranen (Bi *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2001). Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sar1p auch an GERV-Membranen bindet. Diese Bindung scheint hinreichend stabil, sodass nach dem inneren COPII-Mantel, bestehend aus Sar1p und Sec23/24p, auch der äußere COPII-Mantel, also Sec13/31p, rekrutiert werden konnte (**Abbildung 3.25**).

Neben den Methoden, bei denen die GERV-Membran bzw. Proteine an oder in dieser visualisiert werden, wurde auch eine Methode zur Messung der Diffusion eines Beispielproteins in der natürlichen ER-Membran verwendet: die FCS. Diese Methode kann an verschiedenen Modellmembranen angewendet werden wie z.B. GUVs (Bacia *et al.*, 2004a; Bacia *et al.*, 2004b), an GPMVs (Sezgin *et al.*, 2012) oder an natürlichen Membranen wie der Plasmamembran (Honigmann *et al.*, 2014a; Honigmann *et al.*, 2014b). Es ist sogar möglich die Proteindiffusion von ER-Membranproteinen in ihrer natürlichen Umgebung zu messen, allerdings nur mit sehr hohem experimentellen und rechnerischen Aufwand und unter Anwendung verschiedener Korrekturen für die Messumgebung (Nehls *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2003). Gervs bieten dank der quasilplanaren Membranstruktur am Pol dieser eine für die FCS-Methodik und die FCS-Auswertung sehr gut handhabbare Messgrundlage. Zur Umsetzung der optimalen Fluorophorkonzentration für die FCS-Messung bei gleichzeitiger bildgebender Darstellbarkeit der Membran zur Auswahl der Messregion wurden die Membranen durch Fusion einer größeren Menge Bet1p-mCherry enthaltender ER-Membranen und einer geringeren Menge Bet1p-sfGFP enthaltender ER-Membranen hergestellt (**Abbildung 3.23**). FCS-Messungen von Bet1p-sfGFP führten zu einem Diffusionskoeffizienten von $0,28 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \pm 0,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Zum Vergleich wurde Bet1p-Alexa488 in MMM-GUVs rekonstituiert und die Diffusion dieses Proteins in Abwesenheit von anderen Proteinen gemessen (**Abbildung 3.24**). Der erhaltene Diffusionskoeffizient ist mit $2,4 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \pm 0,8 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ fast neun Mal höher. Bet1p-sfGFP ist um die Größe des GFP-Moleküls (26 kDa) größer als Bet1p-Alexa488. Dieser Größenunterschied beeinflusst die Diffusionseigenschaft des Transmembranproteins in der Membran—folgt man dem Modell von Saffmann und Delbrück—allerdings nur unwesentlich (Saffman *et al.*, 1975). Nach der Saffmann-Delbrück-Gleichung ist der membranverankerte Teil der Proteine, der für Bet1p-sfGFP und Bet1p-Alexa488 gleich groß ist, praktisch allein entscheidend für die Diffusionsgeschwindigkeit in der Membran. Vielmehr sind mögliche Interaktionen von Bet1p-sfGFP mit Lipiden und Proteinen der natürlichen Membran oder der eingeschränkte Raum für eine freie Diffusion Ursachen für die langsamere Diffusion von Bet1p-sfGFP in Gervs. Dieses Ergebnis passt gut zu Ergebnissen anderer Diffusionsstudien von ER-Membranproteinen in ihrer natürlichen Umgebung. Beispielsweise wurden für drei ER-lokalisierte GFP-Fusionsproteine in COS7-Zellen mittels *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Experimenten Diffusionskoeffizienten zwischen $0,26$ und $0,5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gemessen (Nehls *et al.*, 2000). Damit fügt sich der für Bet1p-sfGFP bestimmte Diffusionskoeffizient von $0,28 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1} \pm 0,1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ gut in die Größenordnung der bislang ermittelten Werte ein. Ein weiteres Beispiel aus der Literatur stärkt die hier gezeigte Diskrepanz zwischen der Diffusion eines Proteins in der natürlichen und der Modellmembran: Worch *et al.* fanden 2017 heraus, dass ein einfaches Transmembranprotein der Plasmamembran um den Faktor 5,5 langsamer in der natürlichen Membran als in der synthetischen Membran diffundiert (Worch *et al.*, 2017).

Diese Ergebnisse verdeutlichen wie wichtig Untersuchungen in natürlichen Membranen im Vergleich zu künstlichen Modellmembranen sind. Die Möglichkeit FCS-Messungen an Proteinen in GERVs durchzuführen, eröffnet auch die Möglichkeit die Heterogenität von ER-Membranen auf eine neue Weise zu betrachten. Weiterhin bietet die FCS eine Messgrundlage für Bindungsstudien mit sowohl löslichen Proteinen als auch Membranproteinen (Kruger *et al.*, 2017; Middleton *et al.*, 2010).

4.4 COPII-vermittelte Membrandeformation

Die COPII-Vesikelbildung ist notwendig für den Transport neuer Proteine und Lipide vom ER an ihren Bestimmungsort. Dieser komplexe Vorgang, bei dem eine Vielzahl von Proteinen zur Konzentrierung des Cargos und zur Vesikelbildung zeitlich und räumlich organisiert werden müssen, soll im Detail verstanden werden. Bislang konnte die Vesikelbildung mit natürlichen Membranen nachgeahmt werden, jedoch mit der Einschränkung, dass mechanischer Einfluss ausgeübt wurde (Matsuoka *et al.*, 1998). Verwendet man einen Assay an künstlichen Membranen mit geringem mechanischen Stress, so wird zwar eine Membrandeformation nachgewiesen, aber keine Vesikelabschnürung (Bacia *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollten beide Ansätze miteinander kombiniert werden, indem natürliche Membranen in einem System ohne mechanische Einflüsse verwendet wurden. Dazu wurde die Komplexität der GUV-Modellmembranen von extrahierten Mikrosomen-Lipiden bis hin zu GERVs gesteigert, mit dem Ziel, das Verständnis der COPII-Vesikelbildung voranzutreiben.

Die aus Mikrosomen extrahierten Lipide wurden erfolgreich für die Herstellung von GUVs eingesetzt (**Abbildung 3.9**). Diese GUVs wurden für COPII-Experimente nach Bacia *et al.*, 2011 verwendet. COPII-Experimente, bei denen fluoreszenzmarkierte GUVs aus extrahierten Mikrosomen-Lipiden mit den COPII-Proteinen Sar1p, Sec23/24p und Sec13/31p sowie Sec12p Δ C und GMP-PNP inkubiert wurden, zeigen in konfokalen Mikroskopieaufnahmen tubulierte Membranstrukturen (**Abbildung 3.27**). Dieses Ergebnis deckt sich mit Ergebnissen, die mit MMM-GUVs erzielt wurden (Bacia *et al.*, 2011; Daum *et al.*, 2014). Tatsächlich unterschieden sich aber die Tubuli von denen, die aus MMM-GUVs entstehen, dahingehend, dass sie einen größeren Durchmesser haben, sehr lang und nicht starr sind (**Abbildung 3.27**). Dies konnte durch Kryo-TEM-Aufnahmen derselben Proben bestätigt werden (**Abbildung 3.28**). Die Ursache für die veränderte Tubuli-Struktur liegt vermutlich in der veränderten Lipidzusammensetzung. Schon in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass starre Tubuli typisch für den MMM sind (Daum *et al.*, 2014), der für die COPII-Proteinbindung durch den Gehalt an negativ geladenen Lipiden und Ergosterol optimiert ist (Matsuoka *et al.*, 1998). Dies weist daraufhin, dass der COPII-Mantel mit den GUVs aus extrahierten Mikrosomen-Lipiden andere Wechselwirkungen eingeht als mit MMM-GUVs.

Um zu untersuchen, ob sich Vesikel gebildet haben, die mit der konfokalen Mikroskopie nicht darstellbar sind, da sie unterhalb der Auflösungsgrenze liegen, wurden die Proben auch mittels Kryo-TEM untersucht. Unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen (GMP-PNP), bilden sich sehr lange Tubuli, die in ihrer Länge von wenigen zehn Nanometern bis zu einigen Mikrometern liegen. In den durchgeführten Experimenten konnte keine gleichmäßige Struktur auf der Oberfläche dieser Tubuli detektiert werden, die für eine Anordnung des COPII-Mantels auf der Membran spräche (Zanetti *et al.*, 2013). Die ungleichmäßige Struktur der Tubuli könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass der COPII-Mantel weniger fest bindet und nicht so gleichmäßig organisiert ist wie auf MMM-GUVs. Unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen wurden tatsächlich kleine Vesikel sowie Membranen, die zum Teil mit Protein besetzt sind, detektiert. Es wurde kein sich wiederholendes Muster, also keine regelmäßige COPII-Struktur, beobachtet (vergleiche (Zanetti *et al.*, 2013)). Anstelle von regelmäßigen COPII-Strukturen traten an den Oberflächen von Membranen eher unregelmäßige Elektronendichten auf, die dennoch möglicherweise den COPII-Proteinen zugeordnet werden können (**Abbildung 3.28 H**), (Daum *et al.*, 2014). Eine genaue Aussage darüber, ob es sich bei den beobachteten Strukturen und Vesikeln um von COPII-Proteinen verursachte Effekte handelt, kann an dieser Stelle nicht abschließend getroffen werden.

Zuvor wurde gezeigt, dass die Membranzusammensetzung einen Einfluss auf die Bindung des COPII-Mantels nimmt. So ist es denkbar, dass auch Interaktionen von COPII-Proteinen mit Cargo oder Cargoadapterproteinen die Verweildauer des COPII-Mantels erhöht und so die Vesikelbildung fördert (Melville *et al.*, 2019). Auch andere Effekte von umliegenden Membranproteinen oder möglichen cytosolischen Faktoren sind denkbar. Für den Fall, dass neben Sec12p (d'Enfert *et al.*, 1991) weitere Membranproteine einen Einfluss auf die COPII-Vesikelbildung ausüben, wurde das Untersuchungssystem der GERVs eingesetzt.

Fluoreszenzaufnahmen von GERVs mit COPII-Proteinen zeigen ein sehr heterogenes Bild von Membranstrukturen und Aggregaten. Da GERV-Proben eine hohe Membran- und Proteinkonzentration aufweisen und so die COPII-vermittelte Membrandeformation in Konkurrenz zu weiteren Prozessen an der Membran steht, wurde die COPII-Proteinkonzentration verdoppelt (**Abbildung 3.29**). Aber auch bei diesen Proben konnte im LSM keine Veränderung an den Membranstrukturen im Vergleich zu GERV-Proben ohne COPII-Proteine beobachtet werden. Ausgehend von den fluoreszenzbasierten konfokalen Aufnahmen kann keine Aussage über den Effekt der natürlichen ER-Membran auf die COPII-Vesikelbildung gewonnen werden.

Daher wurden Kryo-TEM-Aufnahmen von COPII-Experimenten an GERVs durchgeführt. Diese Daten sind schwer zu analysieren, da GERV-Präparationen in der Kryo-TEM ein sehr heterogenes Bild liefern und die spezifische Information zur molekularen Spezies, wie sie die Fluoreszenz bietet, in der Kryo-TEM fehlt. Im direkten Vergleich zwischen GERVs mit und ohne COPII-Proteinen unter nicht-GTP-

hydrolysierenden (GMP-PNP) Bedingungen erkennt man aber Elektronendichten an großen Vesikeln, bei denen es sich wahrscheinlich um regelmäßige Strukturen eines COPII-Mantels handelt (**Abbildung 3.31 C**). Unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen (GTP) fallen Membranstrukturen mit proteinbesetzten Ausstülpungen auf (**Abbildung 3.32 D**). Folglich liegt wahrscheinlich eine Bindung von COPII-Proteinen an die GERV-Membran vor. Eine Deformation der Membran kann aber aufgrund der Heterogenität der Proben nicht eindeutig den COPII-Proteinen zugeordnet werden.

Da Experimente von Dr. Sebastian Daum in der Arbeitsgruppe zeigen, dass das SNARE-Protein Bet1p die Bindung von COPII-Proteinen an die Membran fördert, wurden Experimente mit GERVs mit angereichertem Bet1p und Emp24p durchgeführt. Bei einem Einzelerperiment wurde beobachtet, dass ein erhöhter Gehalt des SNARE-Proteins Bet1p die Bildung von unstrukturierten Proteinanordnungen um ein Vesikel in Anwesenheit von GTP fördert (**Abbildung 3.33 B**), sodass es sich bei diesen Vesikeln tatsächlich um abgeschnürte COPII-Vesikel handeln könnte.

GERVs sind ein für die COPII-Vesikelbildung interessantes Untersuchungssystem, da sie ein großes Membranreservoir bieten, annähernd planare Bereiche aufweisen und aus natürlichen Membranen bestehen. Die hier gezeigten Experimente sind aber erst der Anfang einer Reihe von Versuchen von COPII-Proteinen an GERV-Membranen. Studien mittels Kryo-TEM gestalten sich bezüglich der Auswertung aufgrund der hochdiversen Strukturen, die durch die Komplexität der Probe aus natürlichen Membranen bedingt sind, als schwierig. Es finden sich Hinweise auf Vesikel mit Proteinmantel, aber keinen Nachweis, ob es sich bei diesem um einen COPII-Mantel handelt. Dieser Problematik könnte durch den Einsatz der korrelativen Mikroskopie begegnet werden (Sartori *et al.*, 2007): Fluoreszenzmarkierte COPII-Proteine könnten dann zunächst visualisiert werden und im Anschluss könnten die Effekte auf die ER-Membran in der Kryo-TEM beobachtet werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

ER-Membranen bilden diverse Strukturen in Zellen: Zisternen um den Zellkern, Tubuli in der Zelle verteilt und fenestrierte Zisternen an der Plasmamembran (West *et al.*, 2011). Jeder der Bereiche hat hochspezifische Aufgaben, von der Biosynthese von Zellbausteinen bis zum Stoffaustausch an Organell-Kontaktstellen oder durch Vesikelbildung. Da die ER-Membran einem ständigen Wandel durch Aufbau, Abbau und Umstrukturierung unterliegt (Voeltz *et al.*, 2002), ist die Auswertung mikroskopischer Beobachtungen in lebenden Zellen kompliziert und beinhaltet viele, häufig schwer zu bestimmende Einflussfaktoren. Erschwert werden Experimente am ER lebender Zellen auch dadurch, dass es sich um eine innenliegende Membran handelt und das Einbringen von Reaktanden in die Zelle, z.B. durch Permeabilisierung, unerwünschte Nebeneffekte haben kann (Fiskum *et al.*, 1980). Daher wurde in dieser Arbeit ein Modellsystem entwickelt, das diese Membranen in eine für die Mikroskopie geeignete Morphologie überführt: Giant Endoplasmic Reticulum vesicles (GERVs). Diese sind leicht zu handhaben und weisen ein inneres und äußeres Milieu auf. Sie sind bzgl. ihrer Membranspannung manipulierbar und haben, beschränkt man sich auf einen kleinen Bereich, quasiplanare Membranflächen, die von außen für Effektormoleküle zugänglich sind.

Um GUVs aus ER-Membranen zu bilden, wurden ER-Membranen aus Hefezellen, die Sey1p in ihrer ER-Membran anreichern, isoliert. Dazu wurde das bestehende Protokoll nach Wuestehube und Schekman (1992) für auf Minimalmedium wachsende Zellen, die verstärkt Chitin in ihrer Zellwand anreichern, modifiziert. Zum Aufschluss dieser Zellen ist es notwendig, die Zellwand nicht nur mit Lyticase zu verdauen, sondern mit einer Kombination aus Lyticase und Chitinase. Weiterhin wurde die Reinigungsprozedur um einen zehnstufigen OptiPrep-Gradienten erweitert. Zwar enthielt die finale OptiPrep-Fraktion Kontaminationen durch mitochondriale Membran, jedoch konnte durch den Einsatz des OptiPrep-Gradientens eine verbesserte Abreicherung von Golgi-Apparat-Membran, Vakuolenmembran und Plasmamembran erreicht werden. Im Zusammenhang mit der Qualitätsprüfung gereinigter Organellmembranen wurde zusätzlich zu der Markerprotein-basierten Reinigungscharakterisierung in Zusammenarbeit mit Jun.-Prof. Carla Schmidt, ZIK HALOmem, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, eine massenspektrometrische Analyse der Reinigungsfractionen etabliert, die eine detailliertere Übersicht der Proteinzusammensetzung der verschiedenen Reinigungsfractionen liefert.

Mit den gewonnenen ER-Membranen konnte in der vorliegenden Arbeit ein erster Grundstein für ein ER-Membranmodell zur Verwendung für Mikroskopie-basierte Techniken gelegt werden. ER-Membranen, in denen die GTPase Sey1p angereichert ist, lassen sich zu sehr großen Vesikeln, den GERVs, fusionieren. Dies erfolgt in Abhängigkeit von GTP. Nach der Bildung der GERVs sind diese aber

auch in Abwesenheit von GTP über mindestens zwei Stunden stabil. GERVs konnten auf verschiedene Weise visualisiert und für Bindungsstudien und Diffusionsexperimente eingesetzt werden. Einzelne Proteine der GERV-Membran können durch Immunfluoreszenzfärbungen detektiert und dargestellt werden, wie am Beispiel von Sec61p gezeigt. Die gebildeten GERVs sind auch bei häufigem Pufferaustausch, wie es bei immunologischen Färbungen der Fall ist, stabil und daher für Experimente dieser Art geeignet. Weiterhin konnte in dieser Arbeit ein Ansatz zur Anreicherung von Fusionskonstrukten in der ER-Membran etabliert werden. Durch genetische Manipulation der Hefe können in der GERV-Membran neben Sey1p weitere Proteine gezielt eingebaut und angereichert werden, z.B. solche, die fluoreszieren. Der Vorteil von fluoreszierenden Fusionskonstrukten ist, dass sich mit ihnen die ER-Membran auch ohne weitere Markierung visualisieren lässt. Es sind auch andere Fusionskonstrukte, z.B. mit Affinitätstags, denkbar. Außerdem kann beispielsweise mittels FCS die Diffusion der fluoreszierenden Fusionskonstrukte in der natürlichen Membran gemessen werden und so in Zukunft Bindungsstudien zur Bestimmung von Bindungsparametern wie Stöchiometrie und Affinität durchgeführt werden. Einfache, rein qualitative, Bindungsstudien können auch mittels Fluoreszenzmikroskopie realisiert werden, bei der die Bindung an der Membran anhand der Rekrutierung des Fluoreszenzsignals an die Membran, detektiert wird, wie am Beispiel von Sar1p-Alexa488 sowie Sec13/31p-Alexa488 gezeigt wurde. Dies sind nur erste Beispiele für die Verwendung von GERVs. Sie bergen ein großes Potential für weitere Studien molekularer Prozesse am ER.

Im Rahmen der Arbeit wurde auch die COPII-Vesikelbildung mit aus extrahierten ER-Lipiden geformten GUVs sowie mit GERVs untersucht. Experimente an GUVs aus extrahierten ER-Lipiden zeigen unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen die Ausbildung von sehr langen, flexiblen Tubuli und unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen proteinbesetzte Membranen und Vesikel. Ob es sich bei den Vesikeln um Artefakte oder echte COPII-abgeschnürte Vesikel handelt, konnte nicht beurteilt werden. Experimente, die an GERV-Membranen durchgeführt wurden, zeigen unter nicht-GTP-hydrolysierenden Bedingungen Elektronendichten an einigen Membranen, die auf einen geordneten COPII-Mantel hindeuten, wie er bereits an MMM-GUVs beobachtet wurde (Daum *et al.*, 2014; Zanetti *et al.*, 2013). Unter GTP-hydrolysierenden Bedingungen fallen Membranstrukturen mit proteinbesetzten Ausstülpungen auf. Da die GERV-Proben in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen sehr heterogen sind, können die beobachteten Effekte nicht eindeutig den COPII-Proteinen zugeordnet werden. Dies könnte durch die Kopplung der Elektronenmikroskopie mit der spezifischen Fluoreszenzmikroskopie in Form einer korrelativen Mikroskopie erreicht werden.

Insgesamt konnte erfolgreich ein Untersuchungssystem aus natürlichen ER-Membranen für Mikroskopie-basierte Studien entwickelt und die Funktionalität des Untersuchungssystems anhand von Anwendungsbeispielen untermauert werden. Aufgrund der Komplexität der ER-Proben sind

zukünftig Studien zur Zusammensetzung dieser notwendig, um die Qualität der gebildeten GERVs noch besser zu beschreiben. Desweiteren könnte untersucht werden, ob die Sey1p-haltigen ER-Membranfraktionen nur mit ebenfalls Sey1p-haltigen Membranfraktionen fusionieren (homotypische Fusion), oder auch mit anderen Membranfraktionen (heterotypische Fusion). Auch sollte der Effekt einer Erhöhung der SNARE-Proteinkonzentration auf die Fusion der Sey1p-angereicherten ER-Membran genauer untersucht werden.

In Zukunft könnten GERVs eingesetzt werden, um Funktionen von ER-Membranproteinen detailliert aufzuklären. Zum Beispiel ermöglichen GERVs Bindungsstudien von ER-interagierenden Proteinen. Diese könnten durch fluoreszenzmarkierte Proteine visualisiert werden. Desweiteren sind umfangreiche Untersuchungen von Protein-Proteininteraktionen oder der Mobilität von Membranproteinen bzw. Membran-assoziierten Proteinen durch die FCS möglich. Im Zusammenhang mit Lipiden ist die Untersuchung des Austauschs dieser zwischen dem ER und anderen Organellen über Kontaktstellen spannend. Zur Untersuchung könnten die beiden bereits etablierten GUV-Systeme aus natürlichen Membranen, GPMVs und GERVs, kombiniert werden. Weiter kann das GERV-System in der angestrebten Entwicklung einer Glykosylierungs-Plattform für rekombinant hergestellte Proteine interessant sein (Rexer *et al.*, 2018). So könnten *in vitro* synthetisierte Proteine außerhalb einer Zelle direkt in der ER-Membran glykosyliert werden.

Weiterhin könnten mit GERVs ein Ausgangspunkt für weitere Modellmembranen wie unterstützte oder porenüberspannende Lipiddoppelschichten sein. Es gelang bereits, Plasmamembran von Fibroblasten in unterstützte Lipiddoppelschichten zu überführen (Simonsson *et al.*, 2011). Gelänge dies auch mit GERVs, ständen natürliche ER-Membranen beispielsweise auch für TIRF-basierte Experimente bereit (Tabata *et al.*, 2009). GERVs könnten auch zur Bildung von porenüberspannenden Membranen eingesetzt werden und ständen so wiederum weiteren Analysetechniken zur Verfügung (Steinem, 2019).

Das vorliegende Untersuchungssystem steht folglich für ein breites Spektrum von Anwendungen bereit. Es kann in Zukunft dazu beitragen, Prozesse am ER detailliert aufzuklären, indem es die Lücke zwischen *in vitro* und *in vivo* Studien füllt.

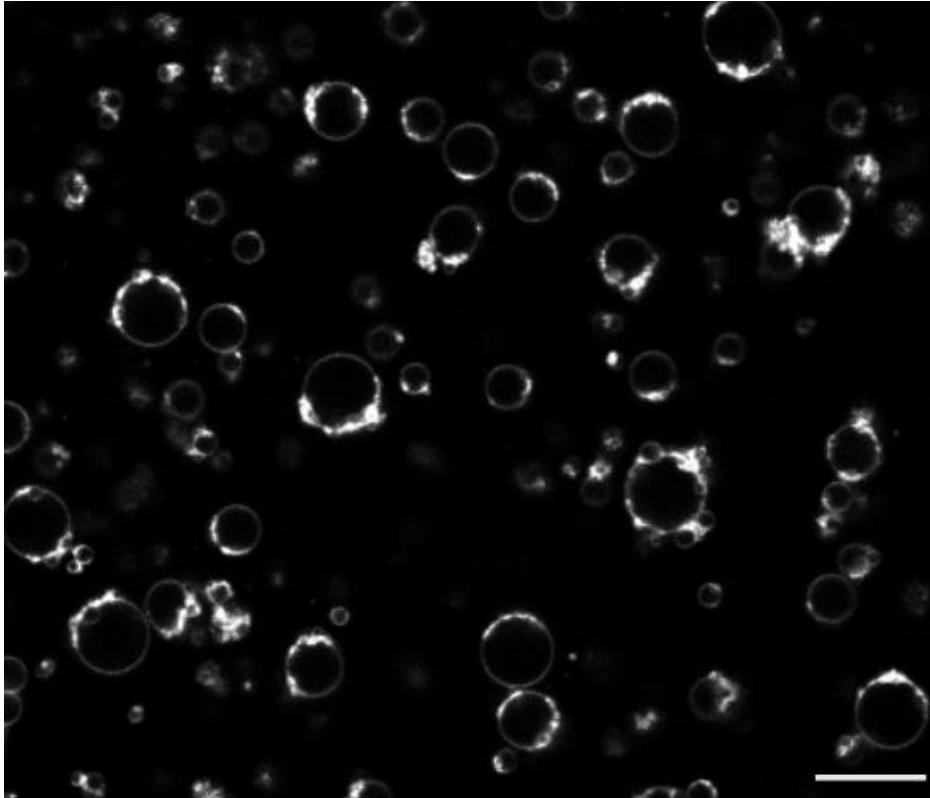


Abbildung 5.1: Repräsentative konfokale Darstellung einer Giant Endoplasmic Reticulum vesicle (GERV)-Probe. GERVs wurden aus mit Sey1p und Bet1p-mCherry angereicherten ER-Membranen in Anwesenheit von 5 mM GTP gebildet. Dargestellt ist die Fluoreszenz des Membranmarkers MM1-43 bei Anregung bei 488 nm. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

6. Literaturverzeichnis

Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch F Microsc Anat* **9**, 413-468.

Abeijon, C. und Hirschberg, C.B. (1992). Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* **17**, 32-36.

Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 2430-2437.

Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S. und Molinari, M. (2010). N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* **35**, 74-82.

Aguilar-Uscanga, B. und Francois, J.M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* **37**, 268-274.

AhYoung, A.P., Jiang, J., Zhang, J., Khoi Dang, X., Loo, J.A., Zhou, Z.H. und Egea, P.F. (2015). Conserved SMP domains of the ERMES complex bind phospholipids and mediate tether assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3179-3188.

Aimon, S., Callan-Jones, A., Berthaud, A., Pinot, M., Toombes, G.E. und Bassereau, P. (2014). Membrane shape modulates transmembrane protein distribution. *Dev Cell* **28**, 212-218.

Aimon, S., Manzi, J., Schmidt, D., Poveda Larrosa, J.A., Bassereau, P. und Toombes, G.E. (2011). Functional reconstitution of a voltage-gated potassium channel in giant unilamellar vesicles. *PLoS One* **6**, e25529.

Akada, R., Kawahata, M. und Nishizawa, Y. (2000). Elevated temperature greatly improves transformation of fresh and frozen competent cells in yeast. *Biotechniques* **28**, 854-856.

Akashi, K., Miyata, H., Itoh, H. und Kinosita, K., Jr. (1996). Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys J* **71**, 3242-3250.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5. Auflage (New York: Garland Science Taylor & Francis Group).

Amthauer, R., Kodukula, K., Brink, L. und Udenfriend, S. (1992). Phosphatidylinositol-glycan (PI-G)-anchored membrane proteins: requirement of ATP and GTP for translation-independent COOH-terminal processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6124-6128.

Andersen, J.S. und Mann, M. (2006). Organellar proteomics: turning inventories into insights. *EMBO Rep* **7**, 874-879.

Angelova, M.I. und Dimitrov, D.S. (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discuss Chem Soc* **81**, 303-311.

Antonny, B., Gounon, P., Schekman, R. und Orci, L. (2003). Self-assembly of minimal COPII cages. *EMBO Rep* **4**, 419-424.

- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L. und Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* 3, 531-537.
- Anwar, K., Klemm, R.W., Condon, A., Severin, K.N., Zhang, M., Ghirlando, R., Hu, J., Rapoport, T.A. und Prinz, W.A. (2012). The dynamin-like GTPase Sey1p mediates homotypic ER fusion in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* 197, 209-217.
- Arumugam, S., Chwastek, G., Fischer-Friedrich, E., Ehrig, C., Monch, I. und Schwille, P. (2012). Surface topology engineering of membranes for the mechanical investigation of the tubulin homologue FtsZ. *Angew Chem Int Ed Engl* 51, 11858-11862.
- Baba, M. und Osumi, M. (1987). Transmission and scanning electron microscopic examination of intracellular organelles in freeze-substituted Kloecker and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *Journal of Electron Microscopy Technique* 5, 249-261.
- Bacia, K., Futai, E., Prinz, S., Meister, A., Daum, S., Glatte, D., Briggs, J.A. und Schekman, R. (2011). Multibudded tubules formed by COPII on artificial liposomes. *Sci Rep* 1, 17.
- Bacia, K., Scherfeld, D., Kahya, N. und Schwille, P. (2004a). Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophys J* 87, 1034-1043.
- Bacia, K., Schuette, C.G., Kahya, N., Jahn, R. und Schwille, P. (2004b). SNAREs prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles. *J Biol Chem* 279, 37951-37955.
- Bacia, K. und Schwille, P. (2003). A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* 29, 74-85.
- Bagatolli, L.A. und Gratton, E. (1999). Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys J* 77, 2090-2101.
- Baker, D., Hicke, L., Rexach, M., Schleyer, M. und Schekman, R. (1988). Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport. *Cell* 54, 335-344.
- Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V. und Sligar, S.G. (2002). Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Letters* 2, 853-856.
- Bernales, S., McDonald, K.L. und Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 4, e423.
- Bhattacharya, N., J, O.D. und Stagg, S.M. (2012). The structure of the Sec13/31 COPII cage bound to Sec23. *J Mol Biol* 420, 324-334.
- Bi, X., Corpina, R.A. und Goldberg, J. (2002). Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* 419, 271-277.
- Bian, X., Klemm, R.W., Liu, T.Y., Zhang, M., Sun, S., Sui, X., Liu, X., Rapoport, T.A. und Hu, J. (2011). Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3976-3981.
- Blume, A. und Kerth, A. (2013). Peptide and protein binding to lipid monolayers studied by FT-IRRA spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1828, 2294-2305.

- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* *14*, 115-132.
- Brunet, S., Thibault, P., Gagnon, E., Kearney, P., Bergeron, J.J. und Desjardins, M. (2003). Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol* *13*, 629-638.
- Bykov, Y.S., Schaffer, M., Dodonova, S.O., Albert, S., Plitzko, J.M., Baumeister, W., Engel, B.D. und Briggs, J.A. (2017). The structure of the COPI coat determined within the cell. *Elife* *6*.
- Carvalho, K., Ramos, L., Roy, C. und Picart, C. (2008). Giant unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate: characterization and functionality. *Biophys J* *95*, 4348-4360.
- Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N. und Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* *13*, 2513-2526.
- Cox, J.S. und Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* *87*, 391-404.
- Cuevas Arenas, R., Klingler, J., Vargas, C. und Keller, S. (2016). Influence of lipid bilayer properties on nanodisc formation mediated by styrene/maleic acid copolymers. *Nanoscale* *8*, 15016-15026.
- Czabany, T., Athenstaedt, K. und Daum, G. (2007). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochim Biophys Acta* *1771*, 299-309.
- Czogalla, A., Grzybek, M., Jones, W. und Coskun, U. (2014). Validity and applicability of membrane model systems for studying interactions of peripheral membrane proteins with lipids. *Biochim Biophys Acta* *1841*, 1049-1059.
- d'Enfert, C., Wuestehube, L.J., Lila, T. und Schekman, R. (1991). Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER. *J Cell Biol* *114*, 663-670.
- Dahlin, A., Zach, M., Rindzevicius, T., Kall, M., Sutherland, D.S. und Hook, F. (2005). Localized surface plasmon resonance sensing of lipid-membrane-mediated biorecognition events. *J Am Chem Soc* *127*, 5043-5048.
- Daum, S., Kruger, D., Meister, A., Auerswald, J., Prinz, S., Briggs, J.A. und Bacia, K. (2014). Insights from reconstitution reactions of COPII vesicle formation using pure components and low mechanical perturbation. *Biol Chem* *395*, 801-812.
- David, C., Koch, J., Oeljeklaus, S., Laernsack, A., Melchior, S., Wiese, S., Schummer, A., Erdmann, R., Warscheid, B. und Brocard, C. (2013). A combined approach of quantitative interaction proteomics and live-cell imaging reveals a regulatory role for endoplasmic reticulum (ER) reticulon homology proteins in peroxisome biogenesis. *Mol Cell Proteomics* *12*, 2408-2425.
- Dimitrov, D.S. und Angelova, M.I. (1987). Lipid swelling and liposome formation on solid surfaces in external electric fields. *Progress in Colloid and Polymer Science* *73*, 48-56.
- Dreier, L. und Rapoport, T.A. (2000). In vitro formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *J Cell Biol* *148*, 883-898.

- Du, X., Kumar, J., Ferguson, C., Schulz, T.A., Ong, Y.S., Hong, W., Prinz, W.A., Parton, R.G., Brown, A.J. und Yang, H. (2011). A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J Cell Biol* 192, 121-135.
- Epad, R.F., Martinou, J.C., Montessuit, S., Epand, R.M. und Yip, C.M. (2002). Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 744-749.
- Fath, S., Mancias, J.D., Bi, X. und Goldberg, J. (2007). Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* 129, 1325-1336.
- Feng, S. (1999). Interpretation of Mechanochemical Properties of Lipid Bilayer Vesicles from the Equation of State or Pressure–Area Measurement of the Monolayer at the Air–Water or Oil–Water Interface. *Langmuir* 15, 998-1010.
- Fichtlscherer, F., Wellein, C., Mittag, M. und Schweizer, E. (2000). A novel function of yeast fatty acid synthase. Subunit alpha is capable of self-pantetheinylation. *Eur J Biochem* 267, 2666-2671.
- Fine, A. (2011). In *Imaging: A Laboratory Manual*, Yuste, R., ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Fiskum, G., Craig, S.W., Decker, G.L. und Lehninger, A.L. (1980). The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3430-3434.
- Fohr, K.J., Warchol, W. und Gratzl, M. (1993). Calculation and control of free divalent cations in solutions used for membrane fusion studies. *Methods Enzymol* 221, 149-157.
- Frauenfeld, J., Gumbart, J., Sluis, E.O., Funes, S., Gartmann, M., Beatrix, B., Mielke, T., Berninghausen, O., Becker, T., Schulten, K., *et al.* (2011). Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat Struct Mol Biol* 18, 614-621.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J. und Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358-362.
- Fritz, M., Zimmermann, R.M., Barmann, M. und Gaub, H.E. (1993). Actin binding to lipid-inserted alpha-actinin. *Biophys J* 65, 1878-1885.
- Frolov, V.A., Shnyrova, A.V. und Zimmerberg, J. (2011). Lipid polymorphisms and membrane shape. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004747.
- Futai, E., Hamamoto, S., Orci, L. und Schekman, R. (2004). GTP/GDP exchange by Sec12p enables COPII vesicle bud formation on synthetic liposomes. *EMBO J* 23, 4146-4155.
- Garcia-Saez, A.J. und Schwille, P. (2010). Surface analysis of membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1798, 766-776.
- Garg, S., Ruhe, J., Ludtke, K., Jordan, R. und Naumann, C.A. (2007). Domain registration in raft-mimicking lipid mixtures studied using polymer-tethered lipid bilayers. *Biophys J* 92, 1263-1270.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. und Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press 571-607.
- Ge, L., Melville, D., Zhang, M. und Schekman, R. (2013). The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife* 2, e00947.

- Gluck, J.M., Wittlich, M., Feuerstein, S., Hoffmann, S., Willbold, D. und Koenig, B.W. (2009). Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* *131*, 12060-12061.
- Graham, J.M. (2002). OptiPrep Density Gradient Solutions for Nonmammalian Organelles. *The Scientific World Journal* *2*, 1444-1448.
- Grandbois, M., Clausen-Schaumann, H. und Gaub, H. (1998). Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A2. *Biophys J* *74*, 2398-2404.
- Harada, Y., Li, H., Li, H. und Lennarz, W.J. (2009). Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 6945-6949.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. und Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* *141*, 929-942.
- Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S. und Fesik, S.W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* *371*, 168-170.
- Hell, S.W. (2007). Far-field optical nanoscopy. *Science* *316*, 1153-1158.
- Hennesthal, C. und Steinem, C. (2000). Pore-Spanning Lipid Bilayers Visualized by Scanning Force Microscopy. *Journal of the American chemical society* *122*, 8085-8086.
- Hernandez-Rocamora, V.M., Reija, B., Garcia, C., Natale, P., Alfonso, C., Minton, A.P., Zorrilla, S., Rivas, G. und Vicente, M. (2012). Dynamic interaction of the Escherichia coli cell division ZipA and FtsZ proteins evidenced in nanodiscs. *J Biol Chem* *287*, 30097-30104.
- Herth, W. (1980). Calcofluor White and Congo Red Inhibit Chitin Microfibril Assembly of Poterioochromonas: Evidence for a Gap between Polymerization and Microfibril Formation. *The Journal of Cell biology* *87*, 442-450.
- Hiroki, O. und Ohya, Y. (2016). Fluorescent Labeling of Yeast Cell Wall Components. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P. und Tabak, H.F. (2005). Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* *122*, 85-95.
- Honigmann, A., Mueller, V., Ta, H., Schoenle, A., Sezgin, E., Hell, S.W. und Eggeling, C. (2014a). Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nat Commun* *5*, 5412.
- Honigmann, A., Sadeghi, S., Keller, J., Hell, S.W., Eggeling, C. und Vink, R. (2014b). A lipid bound actin meshwork organizes liquid phase separation in model membranes. *Elife* *3*, e01671.
- Hoppert, M. (2003). *Microscopic Techniques in Biotechnology*. 1. Auflage (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).
- Horger, K.S., Estes, D.J., Capone, R. und Mayer, M. (2009). Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength. *J Am Chem Soc* *131*, 1810-1819.
- Hu, J., Shibata, Y., Voss, C., Shemesh, T., Li, Z., Coughlin, M., Kozlov, M.M., Rapoport, T.A. und Prinz, W.A. (2008). Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science* *319*, 1247-1250.

- Hu, J., Shibata, Y., Zhu, P.P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W.A., Rapoport, T.A. und Blackstone, C. (2009). A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell* **138**, 549-561.
- Huang, M., Weissman, J.T., Beraud-Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., Aridor, M., Wilson, I.A. und Balch, W.E. (2001). Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *J Cell Biol* **155**, 937-948.
- Huber, L.A., Pfaller, K. und Vietor, I. (2003). Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res* **92**, 962-968.
- Israelachvili, J.N., Mitchell, D.J. und Ninham, B.W. (1976). Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers *Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **72**, 1525-1568.
- Itskanov, S. und Park, E. (2019). Structure of the posttranslational Sec protein-translocation channel complex from yeast. *Science* **363**, 84-87.
- Junne, T., Kocik, L. und Spiess, M. (2010). The hydrophobic core of the Sec61 translocon defines the hydrophobicity threshold for membrane integration. *Mol Biol Cell* **21**, 1662-1670.
- Kagiwada, S., Hosaka, K., Murata, M., Nikawa, J. und Takatsuki, A. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *J Bacteriol* **180**, 1700-1708.
- Kennedy, E.P. und Weiss, S.B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* **222**, 193-214.
- Kiessling, V., Crane, J.M. und Tamm, L.K. (2006). Transbilayer effects of raft-like lipid domains in asymmetric planar bilayers measured by single molecule tracking. *Biophys J* **91**, 3313-3326.
- Kim, K.T., Moon, Y., Jang, Y., Lee, K.T., Lee, C., Jun, Y. und Lee, S. (2017). Molecular mechanisms of atlastin-mediated ER membrane fusion revealed by a FRET-based single-vesicle fusion assay. *Sci Rep* **7**, 8700.
- Knoblach, B., Sun, X., Coquelle, N., Fagarasanu, A., Poirier, R.L. und Rachubinski, R.A. (2013). An ER-peroxisome tether exerts peroxisome population control in yeast. *EMBO J* **32**, 2439-2453.
- Knowles, T.J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y.P., Dafforn, T. und Overduin, M. (2009). Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. *J Am Chem Soc* **131**, 7484-7485.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S. und Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **325**, 477-481.
- Kouzayha, A. und Besson, F. (2005). GPI-alkaline phosphatase insertion into phosphatidylcholine monolayers: phase behavior and morphology changes. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 1315-1321.
- Kruger, D., Ebenhan, J., Werner, S. und Bacia, K. (2017). Measuring Protein Binding to Lipid Vesicles by Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. *Biophys J* **113**, 1311-1320.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Leber, R., Zinser, E., Zellnig, G., Paltauf, F. und Daum, G. (1994). Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1421-1428.
- LeBlanc, M.A., Fairn, G.D., Russo, S.B., Czyz, O., Zarembek, V., Cowart, L.A. und McMaster, C.R. (2013). The yeast oxysterol binding protein Kes1 maintains sphingolipid levels. *PLoS One* 8, e60485.
- Lee, C. und Chen, L.B. (1988). Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell* 54, 37-46.
- Lee, M., Ko, Y.J., Moon, Y., Han, M., Kim, H.W., Lee, S.H., Kang, K. und Jun, Y. (2015). SNAREs support atlastin-mediated homotypic ER fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 210, 451-470.
- Lee, M.C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M. und Schekman, R. (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* 122, 605-617.
- Li, S., Hu, P.C. und Malmstadt, N. (2011). Imaging molecular transport across lipid bilayers. *Biophys J* 101, 700-708.
- Liebe, S. und Menzel, D. (1995). Actomyosin-based motility of endoplasmic reticulum and chloroplasts in *Vallisneria mesophyll* cells. *Biol Cell* 85, 207-222.
- Lin, W.C., Blanchette, C.D., Ratto, T.V. und Longo, M.L. (2006). Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study. *Biophys J* 90, 228-237.
- Loewen, C.J., Roy, A. und Levine, T.P. (2003). A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J* 22, 2025-2035.
- Lomakin, I.B., Xiong, Y. und Steitz, T.A. (2007). The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell* 129, 319-332.
- Magde, D., Elson, E.L. und Webb, W.W. (1972). Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review letters* 29, 705-708.
- Magde, D., Elson, E.L. und Webb, W.W. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* 13, 29-61.
- Majd, S. und Mayer, M. (2005). Hydrogel stamping of arrays of supported lipid bilayers with various lipid compositions for the screening of drug-membrane and protein-membrane interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 6697-6700.
- Manford, A.G., Stefan, C.J., Yuan, H.L., Macgurn, J.A. und Emr, S.D. (2012). ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev Cell* 23, 1129-1140.
- Marsh, D. (2006). Comment on interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure–area measurement of the monolayer at the air–water or oil–water interface. *Langmuir* 22, 2916-2919.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R. und Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93, 263-275.
- McMaster, C.R. und Bell, R.M. (1994). Phosphatidylcholine biosynthesis via the CDP-choline pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Multiple mechanisms of regulation. *J Biol Chem* 269, 14776-14783.

- Meister, A., Nicolini, C., Waldmann, H., Kuhlmann, J., Kerth, A., Winter, R. und Blume, A. (2006). Insertion of lipidated Ras proteins into lipid monolayers studied by infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS). *Biophys J* *91*, 1388-1401.
- Melville, D., Gorur, A. und Schekman, R. (2019). Fatty-acid binding protein 5 modulates the SAR1 GTPase cycle and enhances budding of large COPII cargoes. *Mol Biol Cell* *30*, 387-399.
- Middleton, E.R. und Rhoades, E. (2010). Effects of curvature and composition on alpha-synuclein binding to lipid vesicles. *Biophys J* *99*, 2279-2288.
- Miller, E.A., Antonny, B., Hamamoto, S. und Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* *21*, 6105-6113.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L. und Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* *114*, 497-509.
- Mills, A., Le, H.T., Coulton, J.W. und Duong, F. (2014). FhuA interactions in a detergent-free nanodisc environment. *Biochim Biophys Acta* *1838*, 364-371.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Deleu, M., Brasseur, R. und Dufrene, Y.F. (2008). Atomic force microscopy of supported lipid bilayers. *Nat Protoc* *3*, 1654-1659.
- Morales-Pennington, N.F., Wu, J., Farkas, E.R., Goh, S.L., Konyakhina, T.M., Zheng, J.Y., Webb, W.W. und Feigenson, G.W. (2010). GUV preparation and imaging: minimizing artifacts. *Biochim Biophys Acta* *1798*, 1324-1332.
- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H. und Yura, T. (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* *1*, 803-817.
- Mori, K., Ma, W., Gething, M.J. und Sambrook, J. (1993). A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* *74*, 743-756.
- Mossessova, E., Bickford, L.C. und Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* *114*, 483-495.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P. und Latge, J.P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* *275*, 14882-14889.
- Mumberg, D., Muller, R. und Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* *156*, 119-122.
- Murphy, D.B. (2001). *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Auflage (New York: Wiley-Liss, Inc.).
- Nair, P.M., Salaita, K., Petit, R.S. und Groves, J.T. (2011). Using patterned supported lipid membranes to investigate the role of receptor organization in intercellular signaling. *Nat Protoc* *6*, 523-539.
- Nehls, S., Snapp, E.L., Cole, N.B., Zaal, K.J., Kenworthy, A.K., Roberts, T.H., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E. und Lippincott-Schwartz, J. (2000). Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nat Cell Biol* *2*, 288-295.

- Neufeld, E.B., Cooney, A.M., Pitha, J., Dawidowicz, E.A., Dwyer, N.K., Pentchev, P.G. und Blanchette-Mackie, E.J. (1996). Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem* *271*, 21604-21613.
- Nguyen, T.H., Fleet, G.H. und Rogers, P.L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol* *50*, 206-212.
- Nikawa, J., Akiyoshi, M., Hirata, S. und Fukuda, T. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression. *Nucleic Acids Res* *24*, 4222-4226.
- Nomarski, M.G. (1955). Microinterferometre differentiel a ondes polarisees *J Phys Rad* *16*, 9-13.
- Notredame, C., Higgins, D.G. und Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* *302*, 205-217.
- Novick, P., Field, C. und Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* *21*, 205-215.
- Oka, T., Nishikawa, S. und Nakano, A. (1991). Reconstitution of GTP-binding Sar1 protein function in ER to Golgi transport. *J Cell Biol* *114*, 671-679.
- Oluwole, A.O., Danielczak, B., Meister, A., Babalola, J.O., Vargas, C. und Keller, S. (2017). Solubilization of Membrane Proteins into Functional Lipid-Bilayer Nanodiscs Using a Diisobutylene/Maleic Acid Copolymer. *Angew Chem Int Ed Engl* *56*, 1919-1924.
- Papahadjopoulos, D., Vail, W.J., Pangborn, W.A. und Poste, G. (1976). Studies on membrane fusion. II. Induction of fusion in pure phospholipid membranes by calcium ions and other divalent metals. *Biochim Biophys Acta* *448*, 265-283.
- Pautot, S., Lee, H., Isacoff, E.Y. und Groves, J.T. (2005). Neuronal synapse interaction reconstituted between live cells and supported lipid bilayers. *Nat Chem Biol* *1*, 283-289.
- Pelham, H.R. (1989). Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* *5*, 1-23.
- Peter J. Wood, R.G.F. (1984). Specific interaction of Aniline Blue with 1,3-beta-D-Glucan Carbohydrate Polymers *4*, 49-72.
- Petrasek, Z., Hoegge, C., Mashaghi, A., Ohrt, T., Hyman, A.A. und Schwille, P. (2008). Characterization of protein dynamics in asymmetric cell division by scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* *95*, 5476-5486.
- Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S.D., Zellnig, G., Perktold, A. und Daum, G. (2001). A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem* *268*, 2351-2361.
- Politano, T.J., Froude, V.E., Jing, B. und Zhu, Y. (2010). AC-electric field dependent electroformation of giant lipid vesicles. *Colloids Surf B Biointerfaces* *79*, 75-82.
- Preuss, D., Mulholland, J., Kaiser, C.A., Orlean, P., Albright, C., Rose, M.D., Robbins, P.W. und Botstein, D. (1991). Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast* *7*, 891-911.

- Prinz, W.A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J.A., Silver, P.A. und Rapoport, T.A. (2000). Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **150**, 461-474.
- Pryer, N.K., Salama, N.R., Schekman, R. und Kaiser, C.A. (1993). Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. *J Cell Biol* **120**, 865-875.
- Pucadyil, T.J. und Schmid, S.L. (2008). Real-time visualization of dynamin-catalyzed membrane fission and vesicle release. *Cell* **135**, 1263-1275.
- Puhka, M., Vihinen, H., Joensuu, M. und Jokitalo, E. (2007). Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *J Cell Biol* **179**, 895-909.
- Quercioli, F. (2011). In: Quercioli, F., ed. (Berlin Heidelberg: Springer Verlag).
- Rajakumari, S., Grillitsch, K. und Daum, G. (2008). Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Prog Lipid Res* **47**, 157-171.
- Rapoport, T.A., Li, L. und Park, E. (2017). Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **33**, 369-390.
- Rawle, R.J., van Lengerich, B., Chung, M., Bendix, P.M. und Boxer, S.G. (2011). Vesicle fusion observed by content transfer across a tethered lipid bilayer. *Biophys J* **101**, L37-39.
- Raychaudhuri, S. und Prinz, W.A. (2008). Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15785-15790.
- Rexer, T.F.T., Schildbach, A., Klapproth, J., Schierhorn, A., Mahour, R., Pietzsch, M., Rapp, E. und Reichl, U. (2018). One pot synthesis of GDP-mannose by a multi-enzyme cascade for enzymatic assembly of lipid-linked oligosaccharides. *Biotechnol Bioeng* **115**, 192-205.
- Rigler, R., Mets, Ü., Widengren, J. und Kask, P. (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysical Journal* **22**, 169-175.
- Rossanese, O.W., Soderholm, J., Bevis, B.J., Sears, I.B., O'Connor, J., Williamson, E.K. und Glick, B.S. (1999). Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**, 69-81.
- Saffman, P.G. und Delbruck, M. (1975). Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3111-3113.
- Saheki, Y., Bian, X., Schauder, C.M., Sawaki, Y., Surma, M.A., Klose, C., Pincet, F., Reinisch, K.M. und De Camilli, P. (2016). Control of plasma membrane lipid homeostasis by the extended synaptotagmins. *Nat Cell Biol* **18**, 504-515.
- Salamon, Z. und Tollin, G. (1996). Surface plasmon resonance studies of complex formation between cytochrome c and bovine cytochrome c oxidase incorporated into a supported planar lipid bilayer. II. Binding of cytochrome c to oxidase-containing cardiolipin/phosphatidylcholine membranes. *Biophys J* **71**, 858-867.

- Sartori, A., Gatz, R., Beck, F., Rigort, A., Baumeister, W. und Plitzko, J.M. (2007). Correlative microscopy: bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *J Struct Biol* **160**, 135-145.
- Schauder, C.M., Wu, X., Saheki, Y., Narayanaswamy, P., Torta, F., Wenk, M.R., De Camilli, P. und Reinisch, K.M. (2014). Structure of a lipid-bound extended synaptotagmin indicates a role in lipid transfer. *Nature* **510**, 552-555.
- Schiller, J. und Ziv, N.E. (2011). In *Imaging: A laboratory Manual*, Yuste, R., ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R. und Hurt, E.C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J* **8**, 4015-4024.
- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrastnik, C., Eder, S., Daum, G., *et al.* (1999). Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol* **146**, 741-754.
- Schote, U. und Seelig, J. (1998). Interaction of the neuronal marker dye FM1-43 with lipid membranes. Thermodynamics and lipid ordering. *Biochim Biophys Acta* **1415**, 135-146.
- Schuck, S., Prinz, W.A., Thorn, K.S., Voss, C. und Walter, P. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol* **187**, 525-536.
- Schuster, B., Pum, D., Braha, O., Bayley, H. und Sleytr, U.B. (1998). Self-assembled alpha-hemolysin pores in an S-layer-supported lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* **1370**, 280-288.
- Schwieger, C., Meister, A., Daum, S., Blume, A. und Bacia, K. (2017). Binding of the GTPase Sar1 to a Lipid Membrane Monolayer: Insertion and Orientation Studied by Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy. *Polymers* **9**, 612.
- Sezgin, E., Levental, I., Grzybek, M., Schwarzmann, G., Mueller, V., Honigsmann, A., Belov, V.N., Eggeling, C., Coskun, U., Simons, K., *et al.* (2012). Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1777-1784.
- Shaklee, P.M., Semrau, S., Malkus, M., Kubick, S., Dogterom, M. und Schmidt, T. (2010). Protein incorporation in giant lipid vesicles under physiological conditions. *Chembiochem* **11**, 175-179.
- Shamu, C.E. und Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J* **15**, 3028-3039.
- Shen, S.H., Chretien, P., Bastien, L. und Slilaty, S.N. (1991). Primary sequence of the glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica*. Expression and purification of the enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**, 1058-1063.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M. und Rapoport, T.A. (2010). Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* **143**, 774-788.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K. und Rapoport, T.A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell* **126**, 435-439.

- Shimomura, O., Johnson, F.H. und Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.
- Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L. und Schekman, R. (2000). Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **151**, 973-984.
- Shindiapina, P. und Barlowe, C. (2010). Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **21**, 1530-1545.
- Sidrauski, C. und Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**, 1031-1039.
- Simonsson, L., Gunnarsson, A., Wallin, P., Jonsson, P. und Hook, F. (2011). Continuous lipid bilayers derived from cell membranes for spatial molecular manipulation. *J Am Chem Soc* **133**, 14027-14032.
- Steinem, C. (2019). Pore-Spanning Membranes: A Versatile Tool to Investigate Dynamic Processes of Lipid Bilayers. *Biophys J* **116**, 7a.
- Steinem, C., Janshoff, A., Ulrich, W.P., Sieber, M. und Galla, H.J. (1996). Impedance analysis of supported lipid bilayer membranes: a scrutiny of different preparation techniques. *Biochim Biophys Acta* **1279**, 169-180.
- Storm, G. und Crammelin, D.J.A. (1998). Liposomes: Quo vadis? *Pharmaceutical science and technology today* **1**, 19-31.
- Tabak, H.F., van der Zand, A. und Braakman, I. (2008). Peroxisomes: minted by the ER. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 393-400.
- Tabata, K.V., Sato, K., Ide, T., Nishizaka, T., Nakano, A. und Noji, H. (2009). Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *EMBO J* **28**, 3279-3289.
- Tamm, L.K. und McConnell, H.M. (1985). Supported phospholipid bilayers. *Biophys J* **47**, 105-113.
- Terrettaz, S., Stora, T., Duschl, C. und Vogl, H. (1993). Protein binding to supported lipid membranes: investigation of the cholera toxin-ganglioside interaction by simultaneous impedance spectroscopy and surface . *Langmuir* **9**, 1361-1369.
- Toomre, D.K., Langhorst, M.F. und Davidson, M.W. Introduction to spinning disc confocal microscopy. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>. (Stand: 26.09.2019)
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M. und Rapoport, T.A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* **124**, 573-586.
- Voeltz, G.K., Rolls, M.M. und Rapoport, T.A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* **3**, 944-950.
- Voet, D. und Voet, J.G. (2011). *Biochemistry*. 4. Auflage (John Wiley & Sons, Inc.).
- Wagner, S. und Paltauf, F. (1994). Generation of glycerophospholipid molecular species in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Fatty acid pattern of phospholipid classes and selective acyl turnover at sn-1 and sn-2 positions. *Yeast* **10**, 1429-1437.

- Walther, T.C. und Farese, R.V., Jr. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791, 459-466.
- Wang, Q., Navarro, M.V., Peng, G., Molinelli, E., Goh, S.L., Judson, B.L., Rajashankar, K.R. und Sonderrmann, H. (2009). Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12700-12705.
- Waterman-Storer, C.M. und Salmon, E.D. (1998). Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr Biol* 8, 798-806.
- Weinberger, A., Tsai, F.C., Koenderink, G.H., Schmidt, T.F., Itri, R., Meier, W., Schmatko, T., Schroder, A. und Marques, C. (2013). Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles. *Biophys J* 105, 154-164.
- Weiss, M., Hashimoto, H. und Nilsson, T. (2003). Anomalous protein diffusion in living cells as seen by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 84, 4043-4052.
- West, M., Zurek, N., Hoenger, A. und Voeltz, G.K. (2011). A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol* 193, 333-346.
- Wilfling, F., Thiam, A.R., Olarte, M.J., Wang, J., Beck, R., Gould, T.J., Allgeyer, E.S., Pincet, F., Bewersdorf, J., Farese, R.V., Jr., *et al.* (2014). Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *Elife* 3, e01607.
- Worch, R., Petrasek, Z., Schwille, P. und Weidemann, T. (2017). Diffusion of Single-Pass Transmembrane Receptors: From the Plasma Membrane into Giant Liposomes. *J Membr Biol* 250, 393-406.
- Wuestehube, L.J. und Schekman, R.W. (1992). Reconstitution of transport from endoplasmic reticulum to Golgi complex using endoplasmic reticulum-enriched membrane fraction from yeast. *Methods Enzymol* 219, 124-136.
- Yan, L., Sun, S., Wang, W., Shi, J., Hu, X., Wang, S., Su, D., Rao, Z., Hu, J. und Lou, Z. (2015). Structures of the yeast dynamin-like GTPase Sey1p provide insight into homotypic ER fusion. *J Cell Biol* 210, 961-972.
- Zanetti, G., Prinz, S., Daum, S., Meister, A., Schekman, R., Bacia, K. und Briggs, J.A. (2013). The structure of the COPII transport-vesicle coat assembled on membranes. *Elife* 2, e00951.
- Zigoneanu, I.G., Yang, Y.J., Krois, A.S., Haque, E. und Pielak, G.J. (2012). Interaction of alpha-synuclein with vesicles that mimic mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1818, 512-519.
- Zinser, E. und Daum, G. (1995). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 493-536.
- Zinser, E., Paltauf, F. und Daum, G. (1993). Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J Bacteriol* 175, 2853-2858.
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F. und Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173, 2026-2034.
- Ziska, A., Tatzelt, J., Dudek, J., Paton, A.W., Paton, J.C., Zimmermann, R. und Hassdenteufel, S. (2019). The signal peptide plus a cluster of positive charges in prion protein dictate chaperone-mediated Sec61 channel gating. *Biol Open* 8.

7. Anhang

A1 Geräteübersicht und Materialliste

Tabelle A1: Liste der Geräte

| Gerät | Hersteller | Sitz des Herstellers |
|--|--|---|
| Agarosegelelektrophorese Apparatur | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Äkta prime plus | GE Healthcare | Chalfont St Giles, UK |
| Äkta purifier | GE Healthcare | Chalfont St Giles, UK |
| Avanti®J30-I Rotor: JLA 9.100 Rotor: JS24.15 Rotor: JA 30.50 | Beckman Coulter | Brea, Kalifornien, USA |
| Bead-Beater | BioSpec | Bartlesville, Oklahoma, USA |
| Blotting-Apparatur | Hoefer | Holliston, Massachusetts, USA |
| Zentrifuge 5804R | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Feinwaage | Mettler-Toledo | Columbus, Ohio, USA |
| Funktionsgenerator | Voltcraft, Conrad Electronic AG | Wollerau, Schweiz |
| Funktionsgenerator digital (DDS4025) | Peak tech | Ahrensburg, Deutschland |
| Heraeus Fresco21 | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| Gaulin-Homogenisator | A.P.V. Schröder GmbH (jetzt: SPX Corporation) | Lübeck, Deutschland (Charlotte, NC, USA) |
| Gelelektrophorese-Apparatur | Hoefer | Holliston, Massachusetts, USA |
| Heraeus Fresco21centrifuge | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| HPLC Typ Dionex Ultimate 3000 BioRS-System | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| Laser-Scanning-Mikroskop Aufbau: Observer Z1 mit LSM710 und Confocor3 Modul | Carl Zeiss | Jena, Deutschland |
| Leica EM GP –Grid Plunger | Leica | Wetzlar, Deutschland |

| | | |
|---|---|---|
| <i>Luminescent Image Analyzer-LAS-4000</i> (FUJI Scanner) | Fujifilm | Minato, Japan |
| Multimode Microplate Reader Infinite 200 PRO series | Tecan | Männedorf, Schweiz |
| Optima Max-XP Ultrazentrifuge Rotor: TLA 100 Rotor: MSL 50 | Beckman Coulter | Brea, Kalifornien, USA |
| Osmometer Vapro5520 | Elitech | Puteaux, Frankreich |
| peqSTAR 96X-Universal Gradient | peqLab | Erlangen, Deutschland |
| pH-Meter766 | Knick | Berlin, Deutschland |
| PlasmaCleaner | Harrick Plasma | Ithaca, New York, USA |
| Potter-Elvehjem Homogenisator | WHEATON | Millville, USA |
| Programmierbarer Überkopfschüttler | Grant instruments | Cambridge, UK |
| Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer | Thermo Fisher Scientific | Waltham, Massachusetts, USA |
| Reinstwasseranlage GenPur | TKA (Thermo Fisher Scientific) | Niederelbert, Deutschland (Waltham, Massachusetts, USA) |
| Rotationsverdampfer und Rotavac Ventil-Pumpe | Heidolph | Schwabach, Deutschland |
| Schüttelinkubator Multitron | Infors HT | Bottmingen, Schweiz |
| <i>Spinning Disc</i> Mikroskop Aufbau: Observer Z1 Yokogawa CSU-X1 <i>spinning disc</i> CCD Kamera DIC-Prisma | Carl Zeiss Yocogawa Electric Carl Zeiss Carl Zeiss | Jena, Deutschland Musashina, Japan Jena, Deutschland Jena, Deutschland |
| Taumelschüttler | Heidolph | Schwabach, Deutschland |
| Thermomixer comfort | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| UV-Transilluminator bioview | biostep | Burkhardtsdorf, Deutschland |
| Ultraspec10 | Amersham Bioscience | Amersham, United Kingdom |
| <i>Vibracell</i> | Bioblock Scientific | Illkirch Cedex, Frankreich |
| Vortex-Genie® 2 | Scientific Industries | Portland, USA |
| Waagen | Sartorius | Göttingen, Deutschland |
| Zeiss Libra 120 kV Elektronenmikroskop | Carl Zeiss | Jena, Deutschland |

Zetasizer series nanoS

Malvern instruments

Worcestershire, UK

Tabelle A.2: Liste der verwendeten Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller | Sitz des Herstellers |
|---|-------------------|----------------------------|
| Acetonitril | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Agar-Agar | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Agarose NEEO Ultra-Qualität | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Albumin Fraktion V Rinderserumalbumin (BSA) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Ammoniumdihydrogenphosphat (NH_2PO_4) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Ammoniumheptamolybdat x 4 H ₂ O | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Ampicillin (Amp) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| <i>Aniline blue solution</i> | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Bradford Reagenz | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Brilliant Blau Coomassie G-250 | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Brilliant Blau R250 Coomassie | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Bromphenolblau | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Calciumchlorid-Hexahydrat ($\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| <i>Fluorescent Brightener 28</i> <i>(Calcofluor White M2R)</i> | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Chloroform (CHCl_3) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Chloramphenicol | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| <i>Quick Coomassie Stain</i> | Serva | Heidelberg, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| dNTP-Mix | Life Technologies | Carlsbad, Kalifornien, USA |
| Essigsäure, glazial | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol 99 % (reinst.) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol 96 % (vergällt) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |

| | | |
|--|----------------|--------------------------|
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- tetraessigsäure (EGTA) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Ficoll 400 | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Galaktose | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Gelatine | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Glukose | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Glycerin | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Glycin | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Guanosindiphosphat (GDP) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Guanosintriphosphat (GTP) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Hefeextrakt | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Hefe-Stickstoff-Basismedium | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| <i>L</i> -Histidin (<i>L</i> -His) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Imidazol | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Isopropyl- β - <i>D</i> -thiogalaktopyranosid (IPTG) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumacetat (KOAc) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumhydroxid (KOH) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| <i>L</i> -Leucin (<i>L</i> -Leu) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Leupeptin | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| <i>L</i> -Glutathion reduziert (GSH) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Lithiumacetat (LiAc) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Lysozym | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Magnesiumacetat (Mg(Ac) ₂) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Magnesiumsulfat (MgSO ₄) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |

| | | |
|---|-------------------|-----------------------------|
| Malachitgrünes Oxalatsalz | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| β -Mercaptoethanol (β -ME) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Methanol (CH ₃ OH) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Milchpulver | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| <i>n</i> -Octylglucopyranosid (<i>n</i> -OG) | Glycon | Luckenwalde, Deutschland |
| OptiPrep (Iodixanol) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Pepstatin A | Merck | Darmstadt, Deutschland |
| Pepton aus Casein | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Perchlorsäure (HClO ₄) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Phosphorsäure (H ₃ PO ₄) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Polyethylenglycol (PEG) 4000 | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Polyvinylalkohol (PVA) | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Protease Inhibitor „complete EDTA free“ | Roche | Rotkreuz, Risch, Schweiz |
| Raffinose | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Rapigest | Carl Roth GmbH | Milford, Massachusetts, USA |
| RotiphoreseGel 30 | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Saccharose | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| <i>Salmon Sperm DNA</i> | Life Technologies | Carlsbad, Kalifornien, USA |
| 37 %ige Salzsäure | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Sorbitol | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| <i>Supplemental Dropout</i> | Sigma Aldrich | St. Louis, Missouri, USA |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |
| Trichloressigsäure (TCA) | Carl Roth GmbH | Karlsruhe, Deutschland |

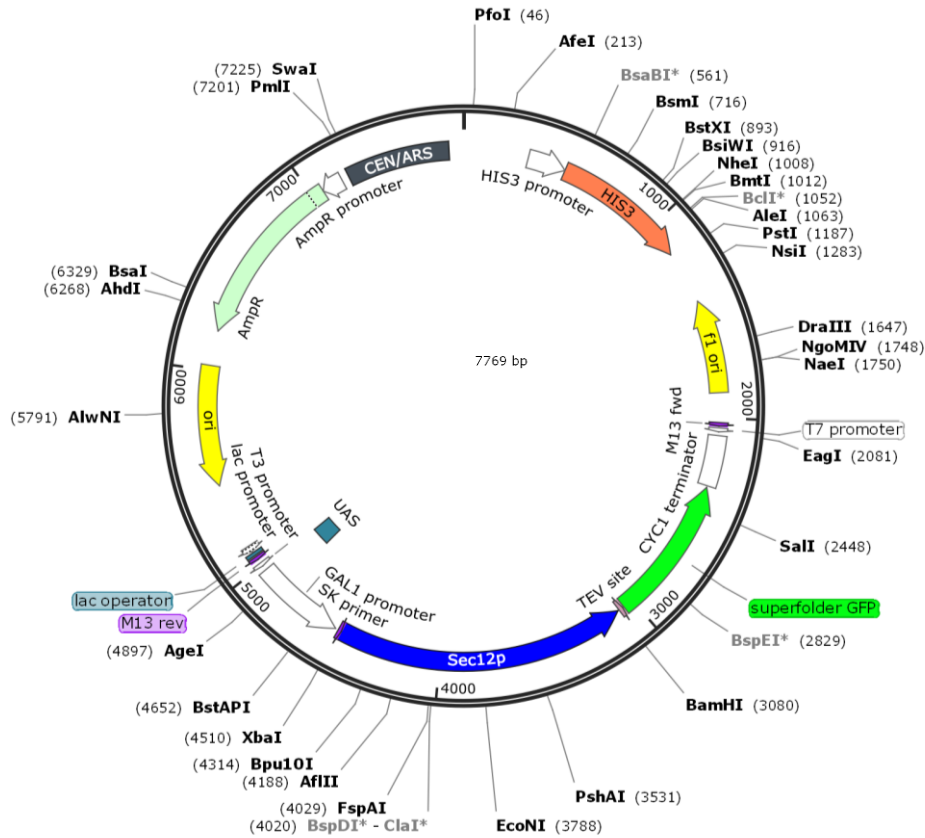


Abbildung A2: p413GAL1 single copy Vektor mit Histidin-Auxotrophie kodierend für Sec12p-sfGFP_A206K.

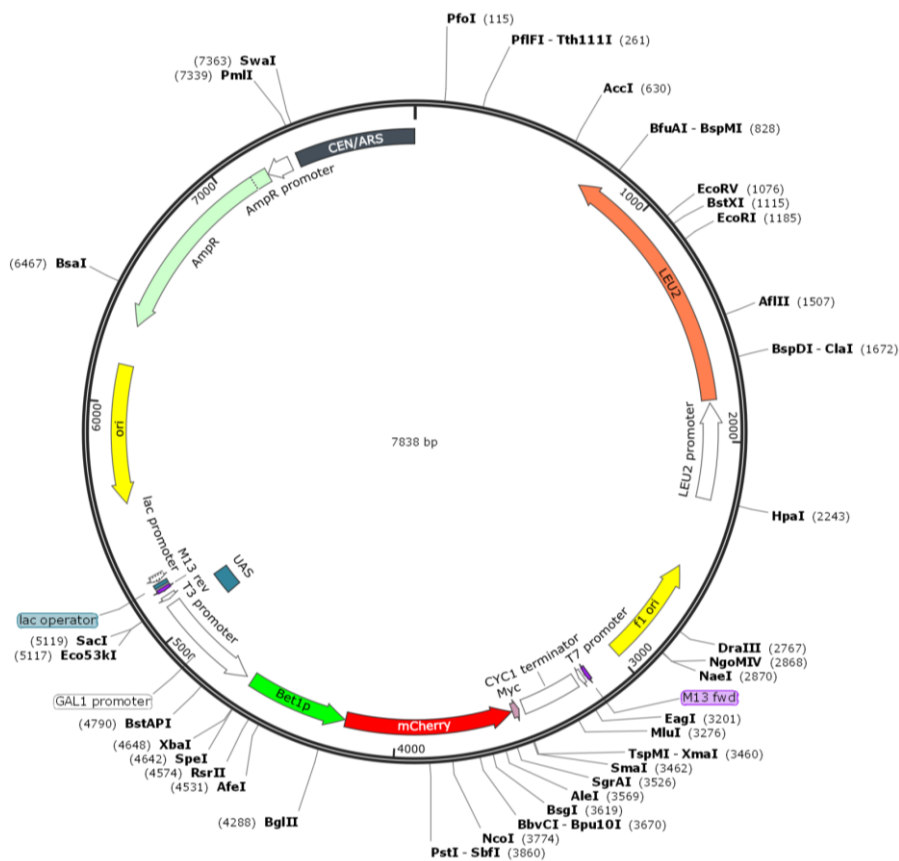


Abbildung A3: p415GAL1 single copy Vektor mit Leucin-Auxotrophie kodierend für Bet1p-mCherry.

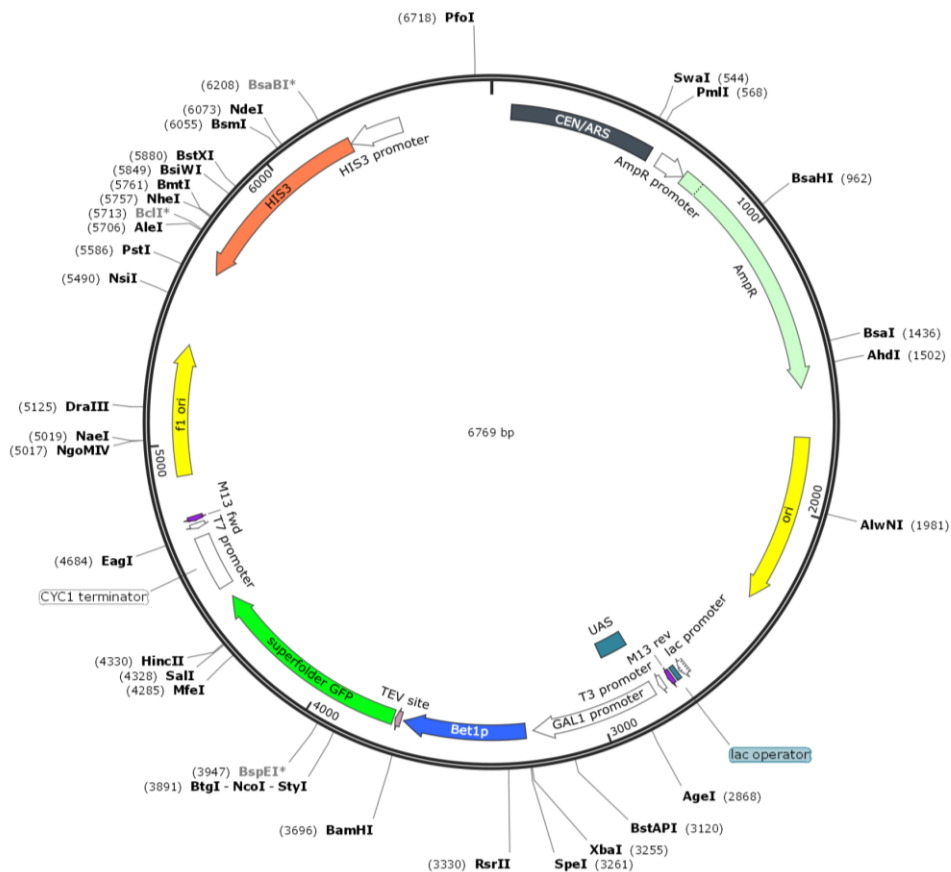


Abbildung A4: p413GAL1 single copy Vektor mit Histidin-Auxotrophie kodierend für Bet1p-sfGFP_A206K.

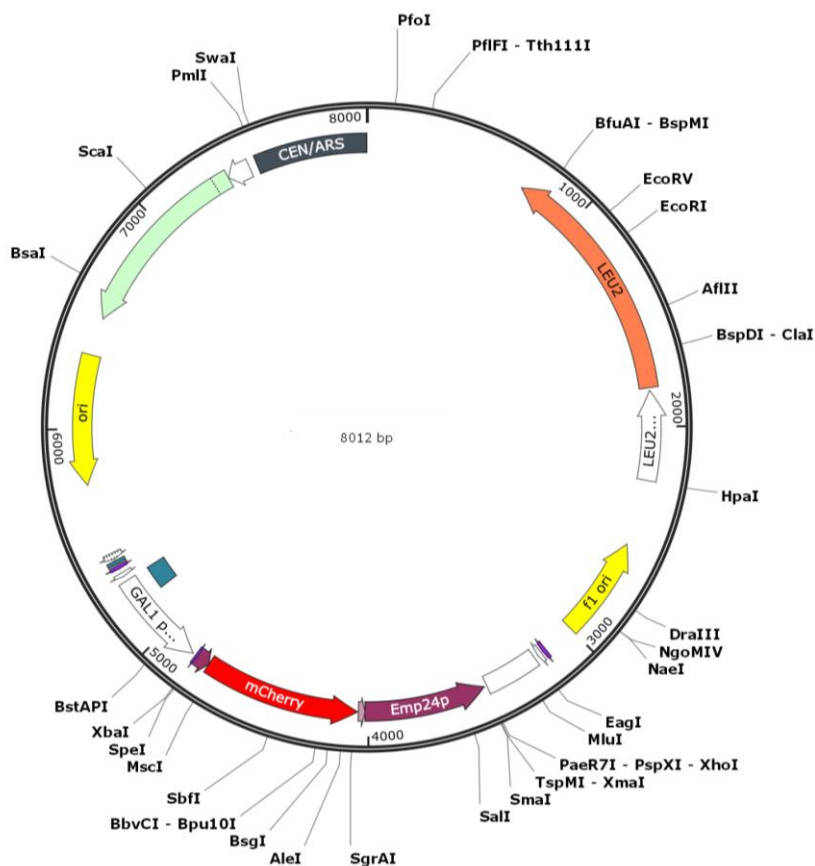


Abbildung A5: p415GAL1 single copy Vektor mit Leucin-Auxotrophie kodierend für Emp24p-mCherry.

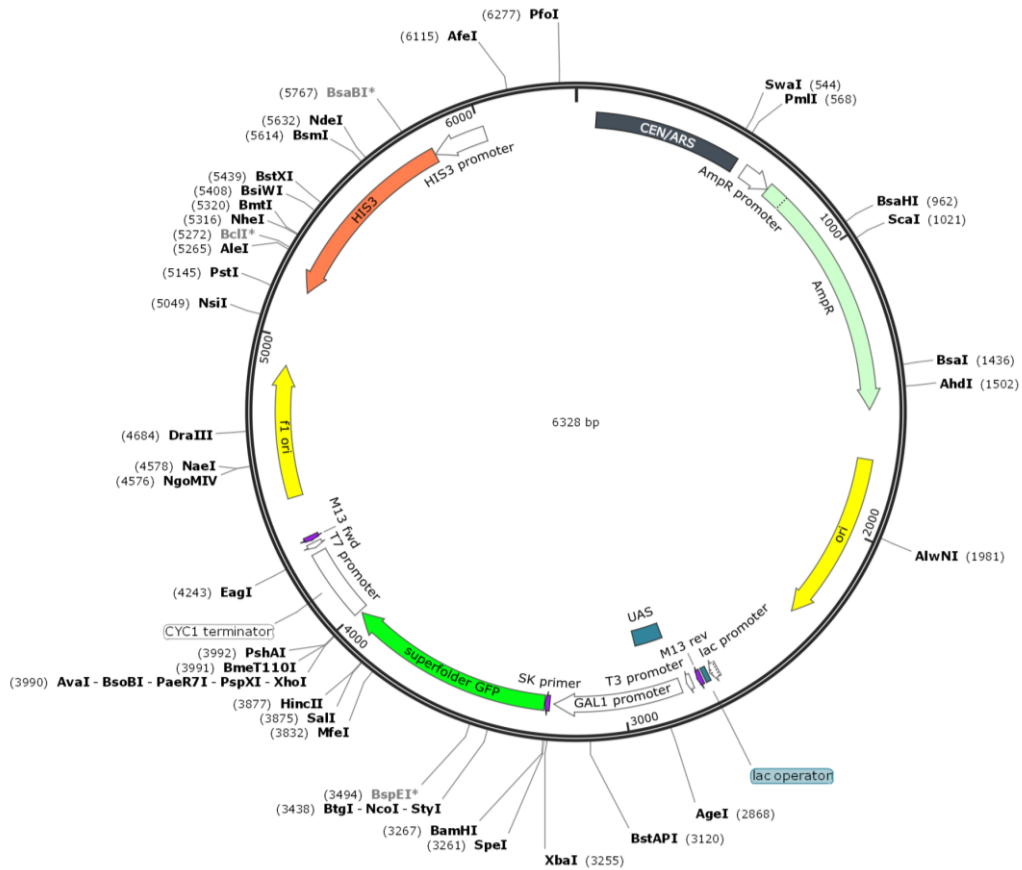


Abbildung A6: p413GAL1 single copy Vektor mit Histidin-Auxotrophie kodierend für sfGFP_A206K.

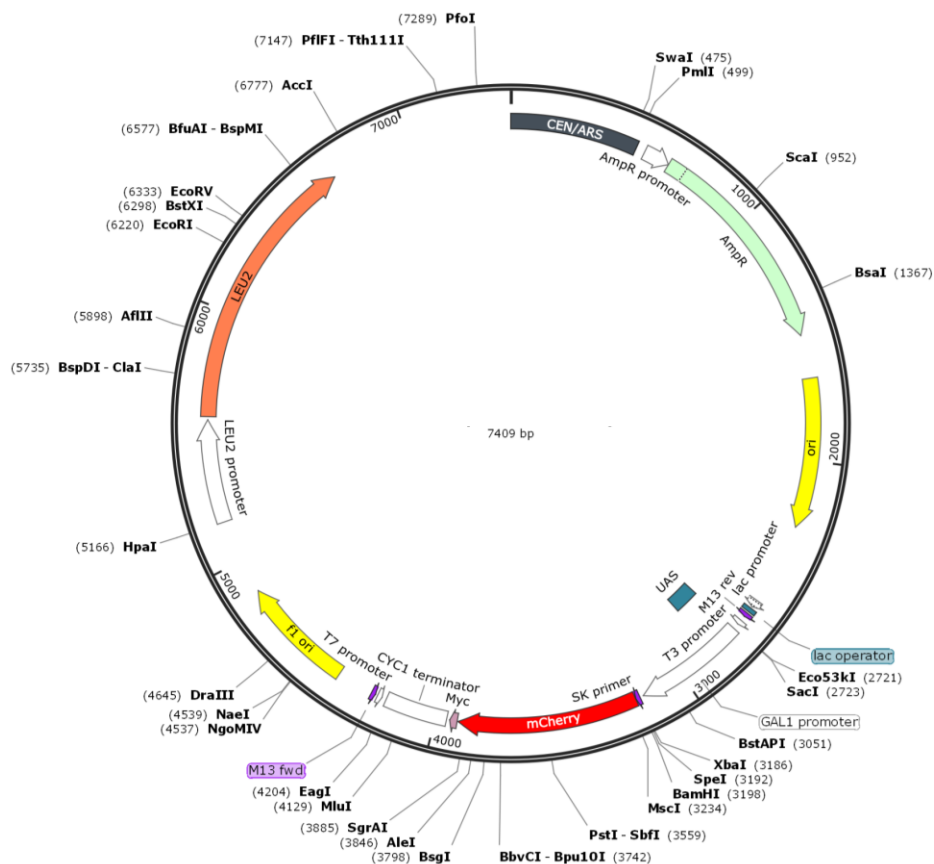


Abbildung A7: p415GAL1 single copy Vektor mit Leucin-Auxotrophie kodierend für mCherry.

A3 Fusionsversuche von ER-Membranen

A3.1 Methoden zur Membranfusion

A3.1.1 Elektroformation auf ITO-Gläschen

Mikrosomen wurden bei 50.000 x g, 4 °C pelletiert (Optima MAX-XP, Beckman Coulter) und in ddH₂O zu einer Konzentration von 1 mg ml⁻¹ resuspendiert. Diese Lösung wurde auf ITO-Gläschen aufgetropft und über Nacht bei 4 °C unter Vakuum eingetrocknet. Die Elektroformation sowie das Aufkonzentrieren der GUVs wurde wie unter 2.2.16 beschrieben durchgeführt (Angelova *et al.*, 1986; Daum *et al.*, 2014).

A3.1.2 Elektroformation an Platindrähten

Zur Elektroformation an Platindrähten wurde die wässrige Mikrosomensuspension auf Platindrähte getropft und bei 4°C unter Vakuum eingetrocknet. Die Drähte wurden so in eine mit 500 mOsm kg⁻¹ Saccharoselösung gefüllte Küvette gehängt, dass sie einander nicht berührten. Es wurden Frequenzen von 10 oder 100 Hz bei einer Spannung von 3 V (Spitze-Spitze-Wert) für 4,5 oder 9 h angelegt (Aimon *et al.*, 2011; Bagatolli *et al.*, 1999). Dann wurde zur Aufkonzentrierung der Membranen die Mikrosomen-Saccharoselösung zu der dreifachen Menge Glukoselösung der gleichen Osmolarität gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

A3.1.3 Quellen auf verschiedenen Medien

Es wurden Deckgläschen der Größe 24 x 24 mm von Menzel (#1,5) mit Agarose, mit in HKM-Puffer gelöstem PVA oder mit in wässriger Saccharoselösung gelöstem PVA beschichtet. Für die Beschichtung mit Agarose wurde eine 1 % (m/v) Agaroselösung hergestellt und eine Heizplatte auf 40 °C erwärmt. Die Deckgläschen wurden auf der Heizplatte vorgewärmt und dann mit 400 µl der erhitzten Agaroselösung gleichmäßig benetzt (Horger *et al.*, 2009). Für PVA-Deckgläschen wurden 50 mg ml⁻¹ PVA in HKM bei 90°C unter Rühren gelöst. Für die PVA-Deckgläschen mit Saccharose wurden 50 mg ml⁻¹ PVA in wässriger Saccharoselösung (20 % (m/v)) bei 90°C unter Rühren gelöst (Weinberger *et al.*, 2013). Die Deckgläschen wurden in die entsprechende Lösung getaucht und auf einem 60 °C heißen Heizblock getrocknet.

Zur Vorbereitung des Quellvorgangs wurden die Mikrosomen in 2 µl großen Tropfen auf die Deckgläschen gegeben und über Nacht bei 4 °C unter Vakuum oder über Ammoniumsulfat getrocknet. Für den Quellvorgang selber wurden die getrockneten Mikrosomen mit HKM-Puffer überschichtet.

A3.1.4 Ca²⁺ induzierte Fusion

Zur Untersuchung der Fusion von Mikrosomen durch zweiwertige Kationen wurden diese mit 0, 2, 7,5 und 10 mM CaCl₂ versetzt (Fohr *et al.*, 1993; Papahadjopoulos *et al.*, 1976).

Die Fusion wurde mikroskopisch mittels DIC untersucht.

A3.2 Ergebnisse

Die verschiedenen unter A3.1 beschriebenen Methoden sind an künstlichen Lipidmischungen sowie an Mikrosomen getestet worden. Im Fall der Mikrosomen führte keine der Varianten unter den getesteten Bedingungen zur Bildung von GUVs (**Abbildung A8**).

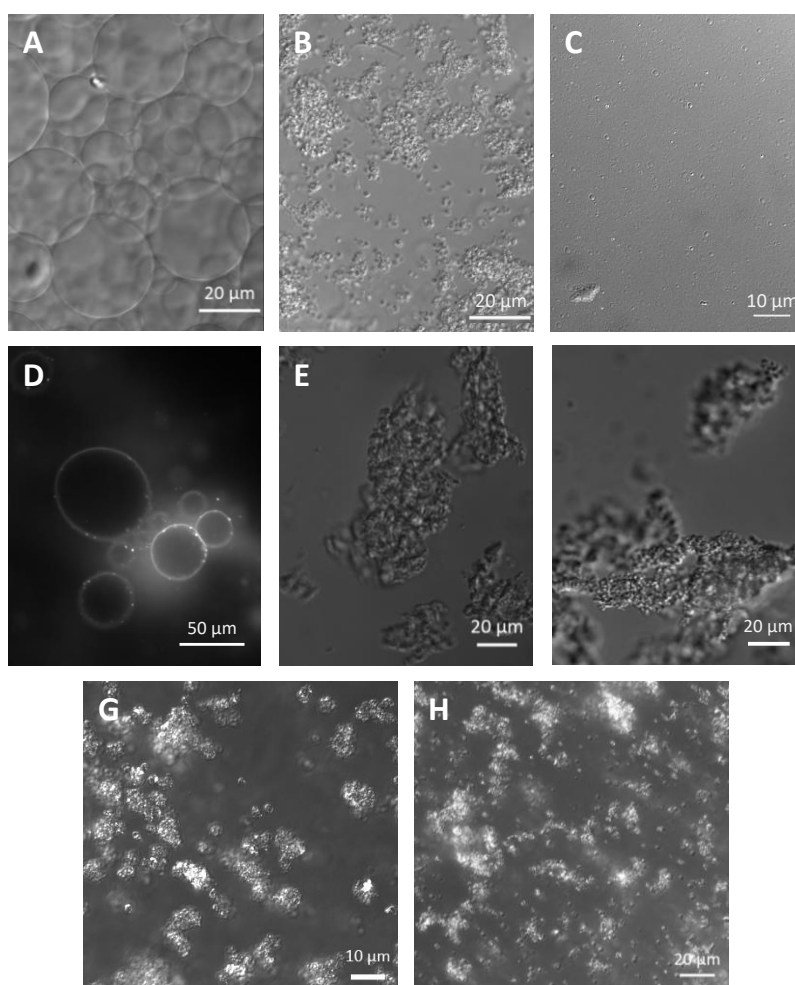


Abbildung A8: Übersicht zu Fusionsversuchen mit Mikrosomen im Vergleich zu synthetischen Lipidmischungen. **(A)** zeigt als Referenz das Ergebnis einer Elektroformation von MMM-Lipid auf ITO-beschichteten Deckgläschen. In **(B)** sind Mikrosomen nach Elektroformation auf ITO-beschichteten Deckgläschen und in **(C)** an Platindrähten gezeigt. **(D)** zeigt eine konfokale Fluoreszenzaufnahme des Ergebnisses des Quellens von MMM-Liposomen, die mit Rhodamin-PE markiert waren, auf Agarose-beschichteten Deckgläschen als Referenz. **(E)** zeigt Mikrosomen zwei Stunden nach Start des Quellvorgangs auf Agarose bzw. **(F)** auf PVA. G und H zeigen Mikrosomen mit **(G)** 10 mM bzw. mit **(H)** 100 mM CaCl₂ nach Inkubation für 3 h. Bilder in A-C sowie E-H wurden unter DIC-Einstellungen am SD-Mikroskop aufgenommen. D wurde mittels konfokaler SD-Mikroskopie mit Anregung des Rhodamin-PE-Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 561 nm aufgenommen.

Danksagung

Diese Stelle möchte ich nutzen, um mich für die erfahrene Unterstützung zu bedanken.

Zunächst möchte ich Prof. Kirsten Bacia meinen großen Dank aussprechen für das in mich gesetzte Vertrauen, das vorgestellte Thema zu bearbeiten. Vielen Dank für die Möglichkeit an Konferenzen und Workshops teilzunehmen.

Bei Frau Prof. Claudia Steinem möchte ich mich für die Übernahme der Begutachtung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Dr. Sebastian Daum möchte ich für die Unterstützung im Labor, die Bereitstellung von gereinigtem Sec13/31p und Bet1p-2C, für die Vitrifizierung von Cryo-EM Proben, die Diskussionen zu Western Blots und Klonierungen sowie der Wahrung der S1-Sicherheit und das Eröffnen neuer Blickwinkel danken. Ein extra Dankeschön geht an den Sprach- und Formulierfuchs in dir.

Ein großes Dankeschön gilt der AG Schmidt für die Kooperation zur Charakterisierung der isolierten Organellen. Insbesondere gilt mein Dank Jun.-Prof. Carla Schmidt für das Lesen der Arbeit und die Bereitschaft und Energie für diese Kooperation, Julian Bender für die gute Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der Proteinzusammensetzung der gereinigten Membranen und Susann Kostmann für die Aufarbeitung der Proben für die Massenspektrometrie sowie die Unterstützung im Labor. Danke auch an Tommy Hoffmann für die massenspektrometrische Analyse der extrahierten Lipide.

Vielen Dank an die Graduiertenförderung Sachsen-Anhalt für das gewährte Stipendium.

Diese Stelle möchte ich auch nutzen um dem „Tierstall“ zu danken. Die AGs Bacia und Schmidt haben den Laboralltag mit Leben gefüllt: Claudia, Sebastian, Carolin, Andrea, JanE, Daniela, Jan, Stefan, Anna, Carla, Sabine, Tommy, Julian, Marie, Melissa, Susann und Christian. Insbesondere danke ich Carolin Haupt für die Unterstützung im Labor, das Vorleben der sauberen Labororganisation sowie das Lesen der Doktorarbeit. Auch Andrea Scrima danke ich sehr für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Claudia Müller für die seelisch-moralische Unterstützung und die Versorgung mit Essbarem, wenn der Magen nach einem langen Labortag wieder bis zu den Knien hing, bedanken. Auch möchte ich mich bedanken, dass du mich auch mal von der Arbeit abgehalten hast! Und auch Sabine: Es war schön eine Doktorandenfreundin zu haben, mit der man Freud und Leid teilen konnte, Danke!

Danke an meinen Bachelorstudenten Paul Czyczykowski, der uns allen die Dramaturgie des Laboralltags vor Augen geführt hat.

Vielen Dank...

...AG Breunig, im Besonderen Frau Dr. Renate Langhammer für den Hefestamm BY4745, die Vektoren p413GAL und p415GAL sowie die InFusion Klonierungen und die Diskussionen über Hefen und ihre Genetik.

...Dr. Dr. Gerd Hause für die elektronenmikroskopischen Studien der verschiedenen ER-Proben,- vor allem für die Ausdauer bei den vielen unübersichtlichen Proben.

...Prof. Milton Stubbs für die Möglichkeit die HPLC zu verwenden, die Bereitstellung des pWaldo Vektors mit der sfGFP-Sequenz und für interessante Diskussionen.

...AG Heilmann, insbesondere Dr. Mareike Heilmann für die Bereitstellung des pESC-TRP-mCherry Vektors.

...AG Spieß im Besonderen Tina Junne vom Biozentrum-Universität Basel für den Anti-Sec61 Antikörper.

...AG Schekman, im Besonderen Dr. Bob Lesch für den Lyticase-Stamm und das Lyticase-Reinigungsprotokoll.

...Prof. Eugene Futai von der Tohoku Universität für die Bereitstellung von Alexa488 markiertem Sec13/31p.

...AG Goody, insbesondere Dr. Matthias P. Müller vom MPI Dortmund für die Unterstützung bei der Auftrennung von Nukleotiden mittels HPLC.

...Frau Dr. Annette Meister für die Diskussion der EM-Aufnahmen.

...Robin Grimmer für die technische Unterstützung beim Bau der Mikroskopiekammern.

...Claudia Fox für die Unterstützung bei den bürokratischen Notwendigkeiten.

Unterstützung habe ich nicht nur von Kollegen erfahren, sondern auch von meiner Familie und meinen Freunden. Mein herzlicher Dank gilt Carla. Danke fürs Zuhören, die Diskussionen, für die moralische Unterstützung. Ich danke dir auch für die schöne Zeit außerhalb des Labors, für deine Großzügigkeit und Hilfsbereitschaft! Danke Sarina für das freiwillige Lesen von Teilen der Arbeit und die moralische Unterstützung über die Jahre hinweg.

Vielen Dank an meine Familie in Bad Sassendorf und Dresden! Ihr habt meine Launen ertragen und mir den Rücken auf jede erdenkliche Weise freigehalten. Mein herzlicher und ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Robin. Danke für deine bedingungslose Unterstützung, deine Durchhalteparolen, deine Flüche, deine Witze und die Kraft, die du mir gegeben hast.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Mona Grimmer, geb. Groß
geboren am 22.09.1988 in Soest

Ausbildung

| | |
|-----------|---|
| 2012-2014 | Masterabschluss in Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Masterarbeit: " <i>In vitro</i> Proteinrekonstitution des transmembranen Guaninnukleotid-Austauschfaktors Sec12p" |
| 2009-2012 | Bachelorabschluss in Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Bachelorarbeit: "Untersuchungen zu Protein-Protein Interaktionen einer Phosphoinositidkinase" |
| 1999-2008 | Allgemeine Hochschulreife, Aldegrevener Gymnasium, Soest |

Arbeitserfahrung

| | |
|-------------------|---|
| 11/2014 - 04/2015 | wissenschaftliche Mitarbeiterin ZIK HALOmem, AG Bacia |
| 05/2015 - 11/2018 | Promotionsstudentin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, AG Bacia |

Weiterbildung

| | |
|---------|---|
| 03/2016 | Fortbildung in „ <i>Good Manufacturing Practice</i> “ |
| 09/2017 | Fortbildung zur Gentechnischen Sicherheit nach §15 GenTSV |
| 06/2014 | EMBO Practical Course: " <i>The application of transient kinetic methods to biological macromolecules</i> " |

Auslandserfahrung

| | |
|-----------------|---------------------------------|
| 01/2008-06/2008 | AuPair Aufenthalt, Cork, Irland |
|-----------------|---------------------------------|

Publikation

02/2020 Grimmer M., Bacia K., 2020. Giant Endoplasmic Reticulum vesicles, a novel model membrane tool. Sci. Rep. 10, 3100. (<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59700-1>)

Stipendium

05/2015-11/2017 Stipendium der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalts

Konferenzbeiträge

Groß, M., Daum, S., Bacia, K. (2015), Reconstitution and functional analysis of transmembrane proteins in the formation of COPII-coated transport vesicles. Heraeus Seminar on „Advanced Microscopy of Membrane Biophysics“. Bad Honnef, Deutschland

Groß, M., Daum, S., Bacia, K. (2015), Functional reconstitution of the Sar1 guanine nucleotide exchange factor Sec12 in artificial model membranes. 59th Annual Meeting of the Biophysical Society. Baltimore, USA.

Grimmer, M., Müller, M. P., Goody, R. S., Bacia, K. (2017), Exploring the kinetics of COPII GTPase Sar1. 61st Annual Meeting of the Biophysical Society. New Orleans, USA.

Grimmer, M., Daum, S., Bacia, K. (2018), Natural ER membrane interaction of COPII proteins. Heraeus Seminar "Physical Approaches to membrane asymmetry". Bad Honnef, Germany.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät II der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und nicht an anderer Stelle eingereicht wurde. Mit der Vorlage dieser Arbeit bewerbe ich mich das erste Mal um die Erlangung des Doktorgrades.

Dresden, den 20.10.2020

Mona Grimmer