

**„Untersuchungen zur Interaktion
von COP-I-Vesikeln mit dem Dsl/SNARE-Komplex“**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften - Dr. rer. nat.

vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Sabrina Zink

geb. am 02.04.1980 in Lutherstadt Wittenberg

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Neurobiologie des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie in Göttingen angefertigt.

Gutachter/in

- 1) Prof. Dr. R.B. Klösgen
- 2) Prof. Dr. E. Hartmann
- 3) Dr. habil. H.D. Schmitt

Datum der öffentlichen Verteidigung: 18.09.2009 in Halle (Saale)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Zink, S., Wenzel, D., Wurm, C., Schmitt, H.D. A link between vesicle recognition and tethering. (eingereicht)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der vesikelvermittelte Proteintransport und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	1
1.2 Die Bildung von Vesikeln	2
1.3 Die Fusion von Vesikeln mit der Zielmembran	3
1.3.1 <i>Tethering</i> -Komplexe	4
1.3.2 SNARE-Proteine	5
1.4 Der anterograde Proteintransport zwischen ER und Golgi-Apparat.....	6
1.4.1 Der COP-II-Komplex und die Bildung von COP-II-Vesikeln.....	7
1.5 Der retrograde Proteintransport zwischen Golgi-Apparat und ER	8
1.5.1 Der COP-I-Komplex und die Bildung von COP-I-Vesikeln.....	8
1.5.2 Der Dsl/SNARE-Komplex	10
1.6 Interaktionen zwischen dem COP-I- und dem Dsl/SNARE-Komplex.....	12
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme	15
2.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	15
2.1.3 Plasmide	17
2.1.4 Oligonukleotide.....	19
2.1.5 Antikörper	20
2.1.6 Enzyme und Kits	20
2.1.7 Chemikalien und Medienzusätze.....	21
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.9 Geräte und nicht gesondert erwähnte Hilfsmittel.....	23
2.2 Methoden zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen.....	24
2.3 Methoden zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> -Hefekulturen	25
2.4 Methoden zur DNA-Präparation	26
2.4.1 Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	26
2.4.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit.....	26
2.5 Methoden zur Modifikation und Analyse der DNA	26
2.5.1 Restriktion	26
2.5.2 Ligation.....	26
2.5.3 Dephosphorylierung	26
2.5.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA.....	27
2.5.5 Isolierung der DNA aus präparativen Gelen.....	27
2.5.6 Sequenzierung	27
2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.5.8 Klonierung von PCR-Produkten	28
2.6 Transformationsmethoden.....	28
2.6.1 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.6.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	29
2.6.3 Herstellung chemisch-kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	29
2.6.4 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	30

2.7 Methoden zur Hefegenetik.....	30
2.7.1 Kreuzung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	30
2.7.2 Sporulation diploider <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	30
2.7.3 Tetradenanalyse.....	31
2.7.4 Phänotypische Untersuchungen mittels Wachstumstests	31
2.7.5 Aufnahme von Wachstumskurven.....	31
2.8 Biochemische Methoden	32
2.8.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	32
2.8.2 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	33
2.8.2.1 Färbung mit Coomassie brilliant blue	33
2.8.2.2. Silberfärbung.....	33
2.8.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot-Analyse).....	34
2.8.4 Messung der Proteinkonzentration.....	34
2.8.5 Glasperlen-Aufschluss von Hefezellen.....	34
2.8.6 TAP-Aufreinigung von Protein-Komplexen	35
2.8.7 Affinitätsreinigungen aus <i>S. cerevisiae</i> -Extrakten	37
2.8.8 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	37
2.8.9 Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen	38
2.8.10 Isolierung von COP-I-Vesikeln aus <i>S. cerevisiae</i> Zellen.....	38
2.8.11 Fraktionierung von COP-I-Vesikeln im Sucrosegradienten	39
2.9 Zellbiologische Methoden	40
2.9.1 Fixierung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	40
2.9.2 Immunfluoreszenz von Hefezellen	40
2.9.3 Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen	41
2.9.4 Zeitraffer-Aufnahmen von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Vorstellung der <i>tandem affinity purification</i> -Methode	43
3.2 Aufreinigung des Dsl/SNARE-Komplexes zur Identifizierung neuer Untereinheiten	44
3.3 Wachstumstests verschiedener α -COP-Mutanten	47
3.4 Die Zusammensetzung des COP-I-Komplexes in α -COP-Mutanten.....	48
3.5 Die S1188F-Mutante zeigt temperaturabhängige Effekte	50
3.6 Die Domäne um das konservierte Tryptophan 870 in α -COP bindet auch COP-I-Untereinheiten	51
3.7 Mutationen des Dsl/SNARE-Komplexes stören die Interaktion mit dem COP-I-Komplex.....	53
3.8 Kombinationen von mutierten Dsl1p und α -COP verursachen schwere Wachstumsdefekte ..	54
3.9 Bestätigung der <i>in vivo</i> -Resultate durch GST-Bindungsexperimente	56
3.10 Bestätigung der α -COP/Dsl1p-Interaktion durch die Yeast-2-Hybrid-Methode	57
3.11 Das Ausschalten von <i>DSL1</i> führt zu dramatischen Effekten in der Zelle	59
3.12 Die Bildung eines Vesikelclusters durch Verlust von Dsl1p	61
3.13 Charakterisierung der COP-I-Vesikelcluster	62
3.14 Die Ausbildung des Phänotyps und der Wachstumsstop fallen zeitlich eng zusammen.....	64
3.15 Die Akkumulation der Vesikel ist nicht die Folge einer erhöhten COP-I-Produktion	65
3.16 Die Vesikelcluster sind nicht mobil.....	66
3.17 Andere Mutationen können ebenfalls eine Vesikelakkumulation verursachen.....	66
3.18 Mutationen in α - und δ -COP können den Phänotyp aufheben.....	68
3.19 Lokalisation des Vesikelclusters in der Zelle	69
3.20 Auch COP-II-Untereinheiten befinden sich in den Vesikelakkumulationen.....	71
3.21 Aufreinigung von COP-I-Vesikeln	73

3.22 Charakterisierung der gereinigten Vesikel im Western-Blot.....	74
3.23 Weitere Aufreinigung der COP-I-Vesikel durch Trennung im Sucrosegradienten.....	77
4. Diskussion	80
4.1 Der Dsl/SNARE-Komplex und seine Untereinheiten.....	80
4.2 Mögliche Funktion der α -COP/ α -COP-Interaktion	80
4.3 Identifikation der Dsl1p/ α -COP-Interaktionsdomänen	81
4.4 Akkumulation von COP-I-Vesikeln am ER in Dsl1p-Mangelzellen.....	83
4.5 Sind die akkumulierten Strukturen funktionelle COP-I-Vesikel?	84
4.6 Was ist die Ursache für die Anhäufung von COP-II-Membranen im Zentrum von COP-I-Vesikelclustern?	84
4.7 Welche Rolle spielt die Dsl1p/ α -COP-Interaktion im vesikelvermittelten Proteintransport?	85
4.8 Die Struktur des Dsl/SNARE-Komplexes.....	88
5. Zusammenfassung.....	89
6. Literaturverzeichnis	90
7. Anhang	100
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	100
7.2 Ergebnisse der Massenspektrometrie-Analyse des Dsl/SNARE-Komplexes.....	102
Danksagung.....	104
Publikationsliste.....	105
Lebenslauf	106

1. Einleitung

1.1 Der vesikelvermittelte Proteintransport und *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die Entwicklung eines komplexen Membransystems ermöglichte eukaryotischen Zellen die Abgrenzung von umgebenden Strukturen und die Organisation der vielfältigen intrazellulären biochemischen Prozesse. Dabei entwickelten sich morphologisch verschiedene Kompartimente / Organellen (Mellman und Warren 2000). Um die Proteinzusammensetzung der Organellen, aber auch die Biogenese der Plasmamembran, der Lysosomen und der Endosomen, die Sekretion bestimmter Moleküle (Exocytose) und die Aufnahme externer Moleküle (Endocytose) aufrechtzuerhalten, sind Transportprozesse innerhalb der Zelle notwendig (Rothman 1994). Die Arbeiten von Jamieson und Palade (1967) und Palade (1975) haben gezeigt, dass Proteine in spezialisierten, membranumschlossenen sekretorischen Vesikeln durch wiederholte Abschnürung bzw. Fusion vom endoplasmatischen Retikulum (ER) durch den Golgi-Apparat zu ihrem endgültigen Ziel, der Plasmamembran gelangen. Dabei erfahren sie vor allem im Golgi-Apparat vielfältige Modifikationen. Die Bildung vesikulärer Strukturen erfordert die Abschnürung am Donorkompartiment und die Fusion mit dem Akzeptorkompartiment. Diesen Prozessen liegen dabei stets bestimmte Prinzipien zugrunde. Zunächst werden die Komponenten, die für den Transport benötigt oder selbst transportiert werden, in die Vesikeln eingebaut, weshalb eine vorausgehende Sortierung notwendig ist. Ebenfalls wichtig für einen reibungslosen Ablauf ist die korrekte Andockung des Vesikels an das einzig richtige Akzeptororganell. Dafür stehen verschiedene Moleküle zur Verfügung, die zielspezifische Proteinkomplexe bilden, um die Erkennung und die Fusion des Vesikels mit dem richtigen Kompartiment sicherzustellen. Durch diese Mechanismen und den darin involvierten Komponenten kann garantiert werden, dass die Ordnung innerhalb der Zelle und die Verteilung der Moleküle, ihrer Funktion entsprechend, aufrechterhalten wird (Bennett und Scheller 1993, Mellman und Warren 2000).

Der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (in dieser Arbeit später auch als Hefezellen bezeichnet) repräsentiert einfache eukaryotische Zellen, welche leicht zu manipulieren und deshalb ideal sind, um verschiedenste Vorgänge und Mechanismen in höheren Zellen zu untersuchen. Zu den weiteren Vorteilen zählen die Tatsache, dass das Genom komplett sequenziert ist, die hohe Wachstumsrate, die unkomplizierte Mutantenisolierung und Stammkonstruktion, ein variables DNA-Transformationssystem und nicht zuletzt die Existenz von Stamm-Sammlungen, von denen Hefestämme mit verschiedenen Deletionen oder Markern zu beziehen sind (Sherman 2002). Als

Modellorganismus für den Proteintransport sind sie zudem unschätzbar, da die beteiligten Komponenten von *Saccharomyces cerevisiae* bis hin zum Menschen konserviert sind (Ferro-Novick und Jahn 1994).

Abb. 1 zeigt einen schematischen Überblick über die intrazellulären, vesikelvermittelten Transportprozesse in einer Hefezelle.

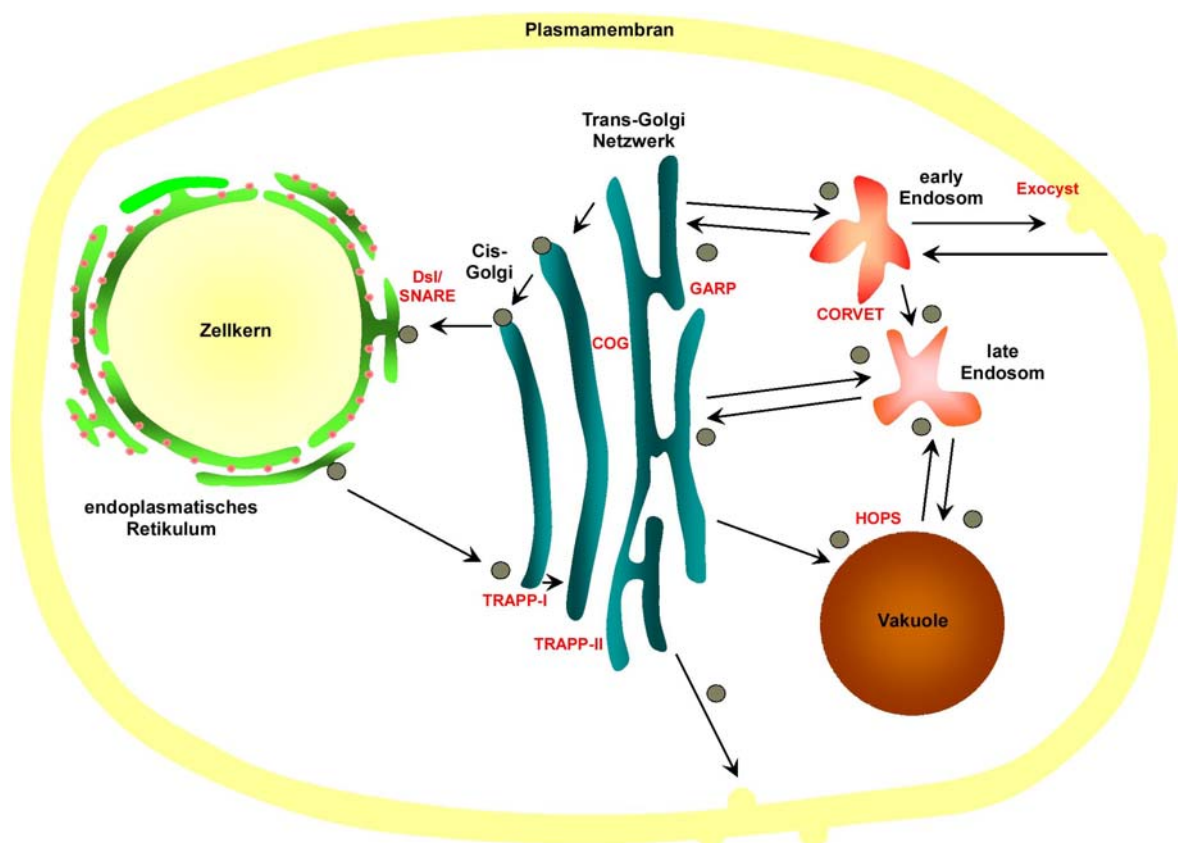


Abb. 1: Schematischer Überblick über die wichtigsten Vesikeltransportprozesse in einer Hefezelle. Rot angegeben sind die jeweils zuständigen *Tethering*-Komplexe.

1.2 Die Bildung von Vesikeln

Die Bildung eines Transportvesikels wird durch die so genannten Hüll- oder Coatproteine initiiert. Hüllproteine sind dynamische Moleküle, die durch GTPasen vom Cytosol an die Donormembran rekrutiert und zu gitterartigen Strukturen zusammengesetzt werden. Dort sorgen sie für eine Deformation der flachen Membran und tragen so zur Bildung des Vesikels bei. Zusätzlich sind die Hüllkomplexe bei der Auswahl der Cargoproteine von entscheidender Bedeutung, was vor allem durch die Signalerkennung der cytoplasmatischen Domäne von Transmembranproteinen bewerkstelligt wird. Es gibt drei wichtige Arten von Transportvesikeln, die sich jeweils in ihrer Hülle unterscheiden. Die Clathrin-umhüllten Vesikel entstehen hauptsächlich an der Plasmamembran oder

dem Trans-Golgi-Netzwerk und sind für den Transport zu den Endosomen zuständig. Für die Vesikel im frühen sekretorischen Transport dagegen stehen COP-I- oder COP-II-Hüllkomplexe zur Verfügung (Kirchhausen 2000, Bonifacino und Glick 2004, Cai et al. 2007a). Auf diese Strukturen wird in den folgenden Kapiteln noch näher eingegangen.

Nach der Abschnürung von der Donormembran werden die Hüllkomponenten abgelöst und die Vesikel durch Diffusion oder Motor-vermittelten Transport zu ihrem Zielorganell gebracht (Kirchhausen 2000, Bonifacino und Glick 2004, Cai et al. 2007a).

Abb. 2 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte des vesikelvermittelten Transports.

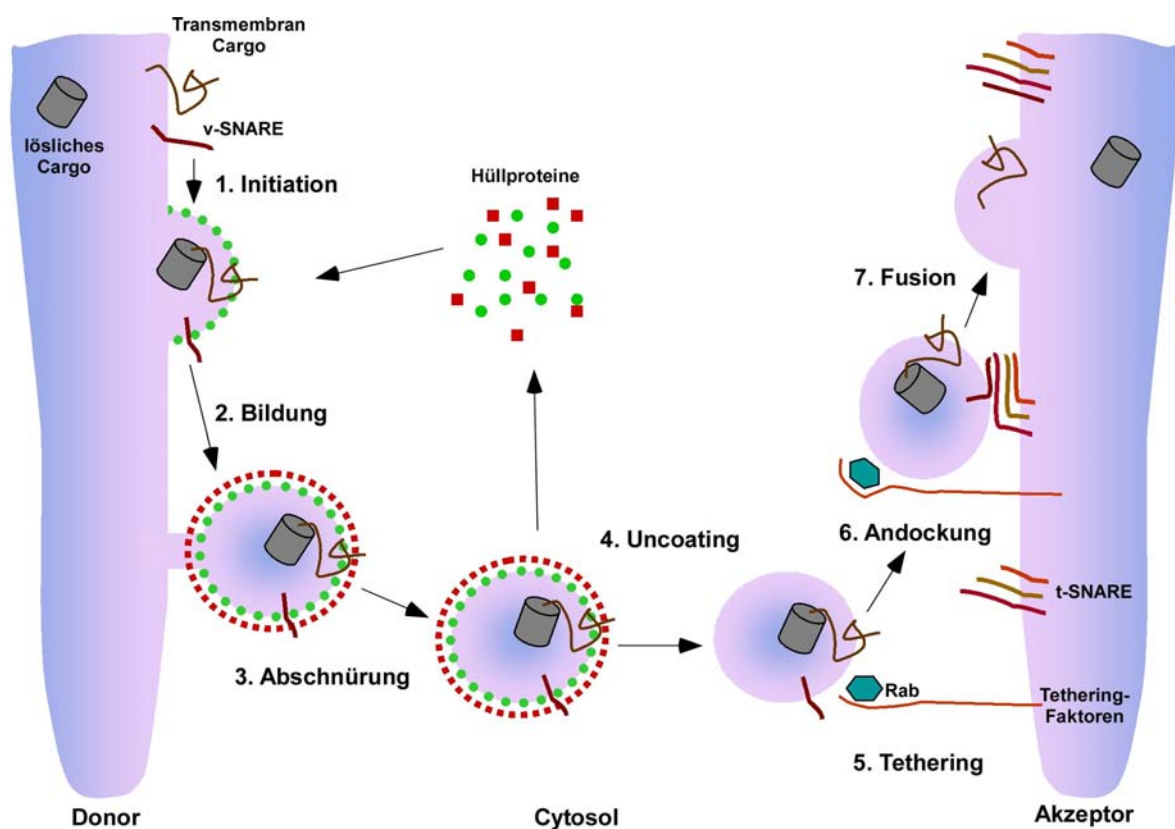


Abb. 2: Schema der einzelnen Schritte im vesikelvermittelten Proteintransport.

1.3 Die Fusion von Vesikeln mit der Zielmembran

Nach dem Abfall der Hüllkomplex-Komponenten, im weiteren Verlauf auch *Uncoating* genannt, folgt mit dem ersten Kontakt zwischen Vesikel und der Zielmembran, dem so genannten *Tethering*, der nächste Schritt. Für diesen spielen besondere Proteinkomplexe, die *Tethering-Faktoren/-Komplexe* (siehe nächstes Kapitel), eine bedeutende Rolle (Barlowe 1997, Cao et al. 1998). Zusammen mit den Rabs, kleine GTPasen der Ras-Superfamilie, sind sie besonders wichtig für die Spezifität der Vesikel in Bezug auf die Erkennung der richtigen Zielmembran.

Der letzte Schritt führt dann zum Andocken und schließlich zur Fusion des Vesikels mit dem Akzeptorkompartiment. Für diesen Prozess sind die SNARE-Proteine maßgeblich verantwortlich, die durch Wechselwirkungen untereinander den SNARE-Komplex bilden und damit die Energie zur Fusion zweier Lipiddoppelschichten zur Verfügung stellen (siehe auch Kapitel 1.3.2) (Hanson et al. 1997, Lin und Scheller 1997, Jahn und Scheller 2006, Cai et al 2007a).

1.3.1 *Tethering*-Komplexe

Die für den ersten Kontakt zwischen Vesikel und Zielmembran verantwortlichen *Tethering*-Faktoren können strukturell in zwei Gruppen eingeteilt werden. 1) Lange *coiled-coil* Proteine und 2) Komplex-bildende *Tethering*-Faktoren, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind.

Die Proteine der ersten Gruppe sind in der Lage Homodimere zu formen, die eine beachtliche Länge erreichen können. Sie stellen lang ausgestreckte, stabförmige Moleküle dar, und können somit gut als Verbindungen zwischen Vesikel und Membran fungieren, wie es beispielsweise schon mit Hilfe der Elektronenmikroskopie am Golgi-Apparat beobachtet wurde. Aufgrund ihrer Struktur ist es gut vorstellbar, dass sie einseitig in der Zielmembran verankert sind und gleichzeitig nach den passenden Vesikeln suchen. Es kommt dabei auch zu Interaktionen mit SNARE-Proteinen und kleinen GTPasen. Ein bekanntes Beispiel aus der Hefe ist *Uso1p* als *Tethering*-Faktor für ER-abgeleitete Vesikel am Golgi-Apparat (Whyte and Munro 2002, Sztul und Lupashin 2006).

Tab. 1: Übersicht über die Komplex-bildenden *Tethering*-Komplexe aus Hefe mit entsprechenden Untereinheiten (UE)

Name	UE	Name	UE	Name	UE
TRAPP-I	Trs20p	TRAPP-II	Trs20p	COG	Cog1p
	Trs23p		Trs23p		Cog2p
	Bet5p		Bet5p		Cog3p
	Trs31p		Trs31p		Cog4p
	Trs33p		Trs33p		Cog5p
	Bet3p		Bet3p		Cog6p
	Trs85p		Trs85p		Cog7p
Exocyst	Sec3p		Trs65p		
	Sec5p		Trs120p		
	Sec6p		Trs130p		
	Sec8p	HOPS	Vps18p	CORVET	Vps18p
	Sec10p		Vps11p		Vps11p
	Sec15p		Vps16p		Vps16p
	Exo70p		Vps33p		Vps33p
Exo84p	Vps41p		Vps8p		
	Vam6p	Vps3p			
GARP	Vps51p	Dsl/SNARE	Dsl1p		
	Vps52p		Dsl3p		
	Vps53p		Tip20p		
	Vps54p				

Eine wesentlich größere Gruppe bilden die aus mehreren Untereinheiten aufgebauten *Tethering*-Faktoren. Zum jetzigen Zeitpunkt sind acht dieser Komplexe bekannt, die im Folgenden kurz vorgestellt werden. Ihre Funktionsbereiche sind in der Hefezelle in Abb. 1 rot dargestellt.

Der TRAPP-I-(transport protein particle)-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten, TRAPP-II besitzt dagegen noch drei zusätzliche Untereinheiten. Sie befinden sich am Golgi-Apparat, aber während TRAPP-I für das *Tethering* von ER-abgeleiteten COP-II-Vesikeln zuständig ist, fungiert TRAPP-II im späten sekretorischen Transportweg.

Ein anderer Golgi-ansässiger *Tethering*-Faktor ist der COG-(conserved oligomeric Golgi)-Komplex, der für die Funktion und Struktur des Golgi-Apparats essentiell ist. Er ist aus acht Untereinheiten, Cog1p bis Cog8p, aufgebaut, die zwei lappenartige Strukturen bilden. Der COG-Komplex spielt eine wichtige Rolle im Golgi-internen retrograden Transport, interagiert aber auch mit zahlreichen anderen Faktoren.

Ein weiterer *Tethering*-Faktor, der GARP-(Golgi associated retrograde protein)-Komplex, besteht aus vier Untereinheiten und ist im retrograden Transport von den Endosomen zum späten Golgi involviert.

Die *Tethering*-Komplexe HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) und CORVET (class C core vacuole/endosome tethering) besitzen einen gemeinsamen Kernkomplex aus vier Proteinen. Der HOPS-Komplex wird dabei für die homotypische Fusion der Vakuole benötigt, während der CORVET-Komplex an den Endosomen sitzt. Durch den Austausch zweier zusätzlicher Untereinheiten können beide Komplexe ineinander umgewandelt werden.

Der Exocyst ist für das *Tethering* im letzten Teil des sekretorischen Weges verantwortlich. Entsprechend führen Mutationen des Exocysts zu einer Akkumulation von Vesikeln, die dafür bestimmt sind mit der Plasmamembran zu fusionieren. Er besteht aus acht konservierten Untereinheiten, von denen zwei (Sec3p und teilweise Exo70p) an der Plasmamembran lokalisiert sind, während die anderen mit dem Vesikel zu den Orten der Exocytose gelangen (Whyte and Munro 2002, Kümmel und Heinemann 2008).

Der letzte und in dieser Arbeit untersuchte *Tethering*-Komplex ist der Dsl/SNARE-Komplex, welcher für das *Tethering* am endoplasmatischen Retikulum zuständig ist (Kraynack et al. 2005). Eine genaue Beschreibung der Struktur, Zusammensetzung sowie Funktionsweise erfolgt in Kapitel 1.5.2.

1.3.2 SNARE-Proteine

Für die Vesikelfusion mit der Ziellmembran spielt eine weitere Gruppe von Proteinen eine entscheidende Rolle: die SNARE-(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)-Proteine. Charakteristisch für diese strukturell einfachen Proteine ist ein SNARE-Motiv aus

60-70 Aminosäuren, das über eine Linkerregion mit einer C-terminalen Transmembrandomäne verbunden ist. Der N-Terminus variiert dagegen in den verschiedenen SNARE-Proteinen. Trotz dieser strukturellen Gemeinsamkeiten gibt es zahlreiche unterschiedliche Modifikationen wie Palmitoylierungen oder zusätzliche Domänen. In *Saccharomyces cerevisiae* sind 25 SNARE-Proteine bekannt, während es in Menschen 36 und in *Arabidopsis thaliana* sogar 54 sind. Das Prinzip der Vesikelfusion beruht auf der Präsenz von SNAREs in den zu fusionierenden Membranen und der Assoziation der SNARE-Motive zu Komplexen. Diese bestehen aus vier verflochtenen parallelen α -Helices, wobei jede Helix, von einigen Ausnahmen abgesehen, von einem anderen SNARE-Protein stammt. Die im Zentrum dieser Struktur interagierenden Aminosäuren bilden Ebenen, die mit Ausnahme der zentralen „0“-Ebene stark hydrophob sind. In dieser „0“-Ebene treffen ausnahmslos drei hochkonservierte Glutaminreste (Q) und ein Argininrest (R) zusammen. Daher werden die SNARE-Proteine, je nach ihrer Position im 4-Helix-Bündel, in Qa-, Qb-, Qc- oder R-SNAREs eingeteilt (siehe Abb. 3)

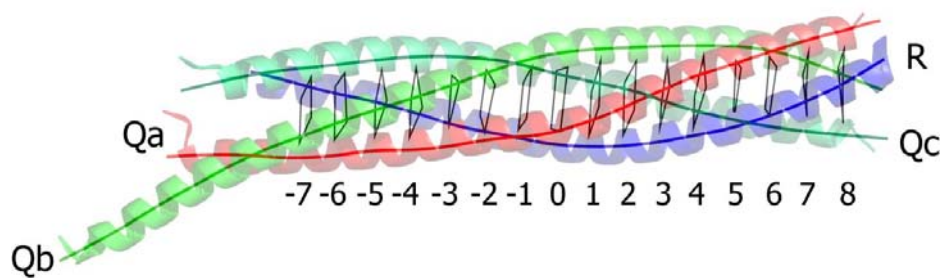


Abb. 3: Schematische Darstellung des SNARE-Komplexes mit den entsprechenden Ebenen, zur Verfügung gestellt von D. Fasshauer (MPI für biophysikalische Chemie, Abteilung Neurobiologie, Forschungsgruppe Strukturelle Biochemie).

Obwohl nicht endgültig bewiesen, gilt es als sicher, dass der Fusionsmechanismus zweier Membranen auf der Assoziation der SNARE-Motive zum SNARE-Komplex beruht. Dabei kommt es zum „*Zippering*“ der Helices vom N- zum C-Terminus, einem Reißverschlussartigen Prozess, der das Überwinden der Energiebarriere für die Fusion der nah aneinander gebrachten Membranen ermöglicht (Jahn und Scheller 2006).

1.4 Der anterograde Proteintransport zwischen ER und Golgi-Apparat

Nach der Translokation erfolgt der erste Schritt im sekretorischen Transportweg mit dem Austritt der Proteine an bestimmten Orten des endoplasmatischen Retikulums, den so genannten „*ER exit sites*“, an denen üblicherweise keine Ribosomen sitzen. Dieser Prozess wird durch den COP-II-Hüllkomplex vermittelt, dessen Konzentration in diesen Regionen relativ hoch ist. Die Selektion der zu

befördernden Moleküle, im Folgenden auch Cargo genannt, erfolgt unter anderem durch den Hüllkomplex, da es zahlreiche direkte Interaktionen zwischen entsprechenden Komponenten gibt. Nach der Initiation der Vesikelbildung durch COP-II-Proteine werden die Vesikel abgeschnürt und zum Golgi-Apparat transportiert. Dort erfolgt das *Tethering* mit Hilfe des TRAPP-I-Komplexes bzw. Uso1p. Die beteiligten SNARE-Proteine sind Bet1p, das in die Vesikelmembran integriert ist, und Sed5p, Bos1p sowie Sec22p, die in der Golgi-Membran an der Bildung des SNARE-Komplexes beteiligt sind (Barlowe 1998, Bonifacino und Glick 2004, Castillon et al. 2009).

1.4.1 Der COP-II-Komplex und die Bildung von COP-II-Vesikeln

Der COP-II-Hüllkomplex besteht aus dem Subkomplex Sec23p+Sec24p, dem Subkomplex Sec13p+Sec31p und der kleinen GTPase Sar1p. Alle Untereinheiten sind essentiell und hochkonserviert in eukaryotischen Zellen. Sar1p bildet zusammen mit Sec23p+Sec24p den Membran-zugewandten Teil des Komplexes, während Sec13p+Sec31p die Membran-abgewandte Schicht darstellt (Barlowe et al. 1994, Bonifacino und Glick 2004).

Tab. 2: Übersicht über den COP-II-Komplex und seine Untereinheiten (UE)

COP-II	UE in Säugern	UE in Hefen	Größe
Sec13 Komplex	hSec13	Sec13p	34 kDa
	hSec31	Sec31p	150 kDa
Sec23 Komplex	hSec23	Sec23p	85 kDa
	hSec24	Sec24p	105 kDa
GTPase	Sar1	Sar1p	21 kDa

Das Transmembranprotein Sec12p rekrutiert als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) die GTPase Sar1p in ihrer GTP-gebundenen (aktiven) Form an die ER-Membran. Anschließend erfolgt durch die Rekrutierung des Effektor-Subkomplexes aus Sec23p+Sec24p die Bildung des so genannten „Prä-Budding-Komplexes“. Es wird angenommen, dass die durch den Prä-Budding-Komplex verursachte Membranwölbung durch den Sec23p+Sec24p-Subkomplex stabilisiert wird. Sec24p ist hauptsächlich an der Cargo-Erkennung beteiligt, da die meisten ER-Exportsignale in den cytosolischen Domänen der Transmembranproteine direkt an dieses Molekül binden. Die GTP-Hydrolyse-Aktivität von Sar1p wird dabei durch das GTPase-aktivierende-Protein (GAP) Sec23p stimuliert. Dieser Effekt wird durch die nachfolgende Rekrutierung des Sec13p+Sec31p Subkomplexes (aus jeweils zwei Sec13p und zwei Sec31p Molekülen) um circa das zehnfache erhöht. Nach der GTP-Hydrolyse kommt es zur Sar1p~GDP-Ablösung, welche schließlich zum Abfall der Hüllproteine (*Uncoating*) führt, bevor die Fusion mit der Golgi-Membran stattfindet. Dieser Ablauf

macht deutlich, dass die Sar1p-Hydrolyse hier der entscheidende Prozess ist, der bestimmt, wann das *Uncoating* nach der Vesikelbildung erfolgt (Kirchhausen 2000, Bonifacino und Glick 2004).

1.5 Der retrograde Proteintransport zwischen Golgi-Apparat und ER

Nach erfolgtem anterogradem Transport der Proteine zum Golgi-Apparat stellt sich für die Zelle ein neues Problem dar: Wie kommen die Moleküle dieser Maschinerie, wie zum Beispiel SNAREs oder Cargo-Rezeptoren, wieder zum endoplasmatischen Retikulum zurück, um für eine neue Runde im Vesikeltransport zur Verfügung zu stehen? Die Lösung: dem Vorwärtstransport entsprechend gibt es einen retrograden Transport in die Gegenrichtung, der durch COP-I-umhüllte Vesikel vermittelt wird. Diese sind zum Recycling verschiedener Klassen von Proteinen sowie Lipiden in der Lage. Neben der Initiation der Vesikelbildung ist der COP-I-Komplex, wie auch der COP-II-Komplex, für die Cargo-Erkennung von entscheidender Bedeutung. Nach der Bildung und anschließenden Abschnürung des Vesikels erfolgt der Transport zum ER, wo der Dsl/SNARE-Komplex für den *Tethering*-Prozess verantwortlich ist. Die mit diesem Komplex assoziierten Q-SNAREs Sec20p, Ufe1p und Use1p interagieren für die Fusion mit Sec22p, welches auf dem Vesikel sitzt und als R-SNARE fungiert. (Andag et al. 2001, Reilly et al. 2001, Duden 2003, Eugster et al. 2004).

1.5.1 Der COP-I-Komplex und die Bildung von COP-I-Vesikeln

Der COP-I-Komplex besteht im Wesentlichen aus der kleinen ras-ähnlichen GTPase Arf1/2p und dem Coatomer, einem sehr stabilen cytosolischen 700 kDa Komplex aus sieben äquimolaren Untereinheiten. Diese sind in Tab. 3 aufgeführt. Die Genprodukte werden in dieser Arbeit stets mit den entsprechenden Säugernamen bezeichnet.

Tab. 3: Übersicht über den COP-I-Komplex und seine Untereinheiten (UE)

COP-I	UE in Säugern	UE in Hefen	Größe
Coatomer	α -COP	Ret1p	140 kDa
	β -COP	Sec26p	107 kDa
	β' -COP	Sec27p	102 kDa
	γ -COP	Sec21p	97 kDa
	δ -COP	Ret2p	57 kDa
	ϵ -COP	Sec28p	35 kDa
	ζ -COP	Ret3p	20 kDa
GTPase	ARF1	Arf1/2p	20 kDa

Alle Untereinheiten sind von der Hefe bis zum Menschen konserviert und in Hefe mit Ausnahme von ϵ -COP essentiell (Duden 2003). Untersuchungen von Duden et al. (1998) identifizierten ϵ -COP als strukturelle Komponente des COP-I-Komplexes, die wichtig zur Stabilisierung von α -COP bzw. des

gesamten Komplexes ist. Sowohl α -COP als auch β' -COP besitzen N-terminal eine konservierte WD40-Domäne, ein siebenfach wiederholtes konserviertes Sequenzmotiv aus 44-60 Aminosäureresten. Es wird allgemein angenommen, dass diese Regionen eine β -Propeller-Struktur ausbilden (Eugster et al. 2004).

Der COP-I-Komplex bindet als Einheit an die Golgi-Membranen, *in vitro* Studien zeigten jedoch, dass er bei hohen Salzkonzentrationen zerfällt, wobei bestimmte Teilkomplexe gebildet werden: α -, β' - und ε -COP; β - und δ -COP sowie γ - und ζ -COP. Diese Interaktionen zwischen den Untereinheiten konnten auch beim Zusammenbau *in vivo* beobachtet werden, ein Prozess der circa ein bis zwei Stunden dauert (Lowe und Kreis 1995, 1996). Die Untereinheiten β -, δ -, γ - und ζ -COP zeigen eine geringe aber signifikante Sequenzähnlichkeit zu den Untereinheiten des Adaptorkomplexes der Clathrinhülle, so dass Ähnlichkeiten in Struktur bzw. Funktion wahrscheinlich sind (Kirchhausen 2000, Duden 2003).

Der erste Schritt zur Bildung von COP-I-Vesikeln besteht in der Assoziation der aktiven GTPase Arf1/2p mit der Golgi-Membran und der anschließenden Rekrutierung des COP-I-Komplexes. Nach der Initiation kommt es zur Ausbildung und Abschnürung der Vesikel. Ähnlich den zuvor beschriebenen COP-II-Vesikeln und Sar1p scheint die Hydrolyse von Arf1/2-GTP das *Uncoating* bzw. den Abfall der Hüllproteine zu bestimmen, damit das Vesikel rechtzeitig für die Fusion mit dem endoplasmatischen Retikulum vorbereitet ist (Duden 2003).

Die Aktivierung der GTPase Arf1/2p durch Bindung von GTP ist für die Assoziation mit der Membran notwendig. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung im Protein, durch die eine Myristoyl-Seitenkette exponiert wird. In der inaktiven GDP-Form ist diese Seitenkette in einer „Myristoyl-Bindetasche“ versteckt und Arf1/2p bleibt als lösliches Protein im Cytosol (Lippincott-Schwartz und Liu 2006, Liu et al. 2009). Der GDP-GTP-Austausch an Arf1/2p für den retrograden Vesikeltransport wird in Hefen durch Gea1p und Gea2p vermittelt, zwei Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) mit sich überschneidenden Funktionen (Spang et al. 2001). Die nächsten, den GTP-Hydrolyse-Kreislauf vervollständigenden Faktoren, sind die GTPase-aktivierenden Proteine (ArfGAP) Gcs1p und Glo3p. Diese katalysieren die Hydrolyse von GTP, deaktivieren somit Arf1p und leiten damit das *Uncoating* der Vesikel ein (Dogic et al. 1999, Poon et al. 1999).

Wie schon beim COP-II-Komplex beschrieben, spielt auch der COP-I-Komplex für die Auswahl der Cargomoleküle eine entscheidende Rolle. Proteine mit einem Dilysin-Motiv (KKXX oder KKKXX) binden über die WD40-Domänen in α - und β' -COP direkt an den COP-I-Komplex. Diese Proteine sind zum größten Teil ER-lokalisiert, recyceln allerdings ständig zwischen ER und Golgi-Apparat (Letourneur et al. 1994, Eugster 2004). Luminale ER-Proteine mit HDEL-Motiv (die Chaperone BiP

und PDI) werden dagegen im Golgi-Apparat von HDEL-Rezeptoren (in Hefe Erd2p) erkannt. Diese mehrfach membranspannenden Proteine werden zusammen mit den ER-Proteinen als Rezeptor-Ligand-Komplex in die COP-I-Vesikel aufgenommen (Majoul et al. 2001). Bei diesem Prozess, sowie bei der Interaktion mit Vesikel-assoziierten SNARE-Proteinen, scheinen die oben beschriebenen Arf-GAPs eine entscheidende Rolle zu spielen (Rein et al. 2002). Membranproteine mit einem auf Arginin (R)-basierendem ER-Lokalisationssignal dagegen binden hauptsächlich an β - und δ -COP (Michelsen et al. 2007).

1.5.2 Der Dsl/SNARE-Komplex

Der für den ersten Kontakt von COP-I-Vesikeln mit dem endoplasmatischen Retikulum zuständige *Tethering*-Faktor ist der Dsl/SNARE-Komplex.

Tab. 4: Übersicht über die Untereinheiten (UE) des Dsl/SNARE-Komplexes

Dsl/SNARE-Komplex	UE	Größe	UE im Syntaxin-18-Komplex
Membranproteine	Dsl1p	88 kDa	ZW10
	Dsl3p / Sec39p	82 kDa	?
	Tip20p	81 kDa	RINT-1
SNAREs	Sec20p	44 kDa	BNip1
	Ufe1p	41 kDa	Syntaxin 18
	Use1p	28 kDa	p31/Use1

Er ist aus den drei großen ER-Membran-assoziierten Proteinen Dsl1p, Dsl3p und Tip20p aufgebaut. Dieser Komplex interagiert dabei mit dem SNARE-Proteinen Sec20p, Ufe1p und Use1p, welche ebenfalls am ER lokalisiert sind (Kraynack et al. 2005). Der Dsl/SNARE-Komplex ist sehr stabil und seine essentiellen Komponenten sind von der Hefe bis zum Menschen konserviert (siehe Tab. 4). Das zu Dsl1p orthologe Protein in tierischen Zellen, ZW10 (Zeste White 10), ist während der Mitose als Checkpoint-Protein im Einsatz, dient aber auch als Verbindungselement von Dynactin und Dynein zu den mitotischen Kinetochoren (Kops et al. 2005, Varma et al. 2006). RINT-I, das Ortholog von Tip20p, wird für den ER-Golgi-Transport benötigt und bildet zusammen mit ZW10 einen Komplex, welcher das SNARE-Protein Syntaxin 18 enthält, weshalb er auch den Namen Syntaxin-18-Komplex trägt (Hirose et al. 2004, Arasaki et al. 2006).

Dsl1p besitzt zahlreiche Binderegionen, über die verschiedene Wechselwirkungen laufen (siehe Abb. 4). Die Interaktion mit Tip20p wird dabei direkt über die N-terminalen α -Helices beider Proteine vermittelt (Tripathi et al. 2009), während Dsl3p an den C-Terminus von Dsl1p bindet. Zusätzlich gibt es in Dsl1p aber auch einige bekannte Interaktionen mit dem COP-I-Komplex, auf die im folgenden

Kapitel näher eingegangen wird. Die Regionen für die Wechselwirkungen mit dem Dsl/SNARE-Komplex überlappen allerdings nicht mit der Bindedomäne für die COP-I-Untereinheiten, so dass gleichzeitige Interaktionen möglich sind, die für das *Tethering* von COP-I-Vesikeln am ER notwendig sind (Andag et al. 2001, Reilly et al. 2001, Andag und Schmitt 2003, Kraynack et al. 2005).

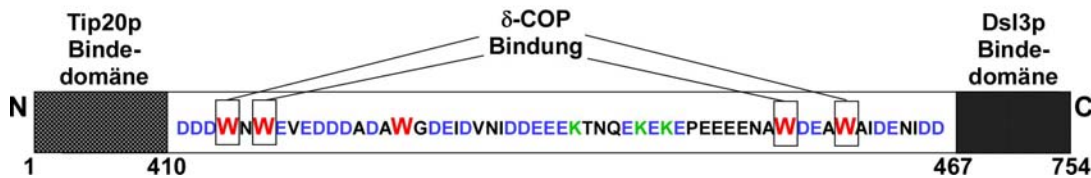


Abb. 4: Schematische Darstellung von Dsl1p mit den verschiedenen Bindedomänen. Zentrale saure Domäne: saure Aminosäuren: blau (bzw. rot), neutrale Aminosäuren: schwarz, basische Aminosäuren: grün

Die strukturelle Aufklärung der Komplexkomponenten zeigte außerdem eine signifikante Ähnlichkeit zu Untereinheiten des Exocyst, was auf einen gemeinsamen evolutionären Vorfahren von Exocyst, COG- und Dsl/SNARE-Komplex hinweist. Zusätzlich konnten im Dsl/SNARE-Komplex zwei unabhängige Binderegionen für verschiedene SNARE-Proteine nachgewiesen werden, was wiederum die bereits beschriebene Funktion des Komplexes für SNARE-Komplex-Stabilität bestätigt (Kraynack et al. 2005, Tripathi et al. 2009). Dabei war die Tip20p-Sec20p-Interaktion seit längerem gut charakterisiert (Sweet and Pelham 1993, Cosson et al. 1997).

Die Funktionen der beiden größten Untereinheiten Dsl3p und Dsl1p scheinen eng verwandt zu sein, denn sie wirken untereinander als *multicopy*-Suppressoren. Beide Proteine sind für eine stabile Interaktion des SNARE-Proteins Use1p mit dem zentralen Subkomplex aus Tip20p, Ufe1p und Sec20p notwendig (Kraynack et al. 2005). Dabei scheint die Interaktion zu Use1p direkt von Dsl3p auszugehen (Tripathi et al. 2009).

Die drei SNARE Proteine Sec20p (Qb), Ufe1p (Qa) und Use1p (Qc) bilden zusammen mit dem COP-I-Vesikel-assoziierten R-SNARE Sec22p den SNARE-Komplex am ER, welcher für den retrograden Transport vom Golgi zum endoplasmatischen Retikulum benötigt wird (Lewis und Pelham 1996, Lewis et al. 1997, Spang und Schekman 1998, Dilcher et al. 2003, Jahn und Scheller 2006).

Sec20p ist ein integrales Membranglycoprotein vom Typ II mit einem HDEL-Retentionssignal, das den rezeptorvermittelten Rücktransport von ER-assoziierten Proteinen ermöglicht (Sweet und Pelham 1993). Use1p besitzt im Gegensatz zu anderen SNARE-Proteinen in der zentralen Ebene seines SNARE-Motivs keine Glutamin sondern ein Aspartat, was aber funktionell keinen Unterschied macht (Dilcher et al 2003). Kamena et al. (2008) konnten zeigen, dass Ufe1p genetisch und

biochemisch mit der GTPase Ypt1p interagiert. Dieses Protein der Rab-Familie ist für das Andocken und die anschließende Fusion von COP-II-Vesikel mit dem Golgi verantwortlich, sowie für die Erhaltung der Golgi-Morphologie und Proteinzusammensetzung. Da bisher noch keine GTPase für das Andocken und die Fusion von COP-I-Vesikeln am ER bekannt ist, weisen die dort erzielten Ergebnisse auf eine zweite Rolle von Ypt1p im retrograden Transport hin.

1.6 Interaktionen zwischen dem COP-I- und dem Dsl/SNARE-Komplex

Mittlerweile sind einige Wechselwirkungen zwischen dem Dsl/SNARE-*Tethering*-Komplex und dem COP-I-Komplex nachgewiesen. Es konnten sowohl genetische Interaktionen (VanRheenen et al. 2001) als auch Yeast-2-Hybrid-Interaktionen zwischen Dsl1p und δ -COP gezeigt werden (Reilly et al. 2001). Die Bindung wird dabei in beiden Proteinen durch Regionen geringer Komplexität im zentralen Teil der Sequenz vermittelt. In Dsl1p werden dafür die Tryptophanreste an den Positionen 413, 415, 455 und 459 in der Aspartat- und Glutamat-reichen zentralen Region benötigt (siehe Abb. 4). Gleichzeitig scheint diese saure Domäne auch für die Interaktion mit α -COP zuständig zu sein. Daher wird angenommen, dass δ -COP-Mutanten mit Defekten in der Dsl1p-Interaktion lebensfähig sind, weil diese durch die Wechselwirkung mit α -COP kompensiert werden können. Die exakte Binderegion innerhalb von δ -COP konnte dagegen bisher noch nicht genau identifiziert werden (Andag und Schmitt 2003).

Das Phänomen der Bindung zwischen Hüllprotein-Komplex und entsprechendem *Tethering*-Faktor wurde bereits für andere Transportprozesse beobachtet. Von Cai et al. (2007b) konnte gezeigt werden, dass eine der TRAPP-I-Untereinheiten (Bet3p, siehe auch Tab. 1) die COP-II-Untereinheit Sec23p (siehe Tab. 2) bindet und somit das *Tethering* der Vesikel über die Hüllproteine vermitteln kann. Ähnliches wurde auch für den coiled-coil *Tethering*-Faktor Grh1p mit COP-II und für den COG-Komplex mit COP-I gezeigt (Zolov und Lupashin 2005, Behnia et al. 2007).

Eine Zusammenfassung der Interaktionen innerhalb des Dsl/SNARE-Komplexes und mit dem COP-I-Komplex sind in der Abb. 5 gezeigt.

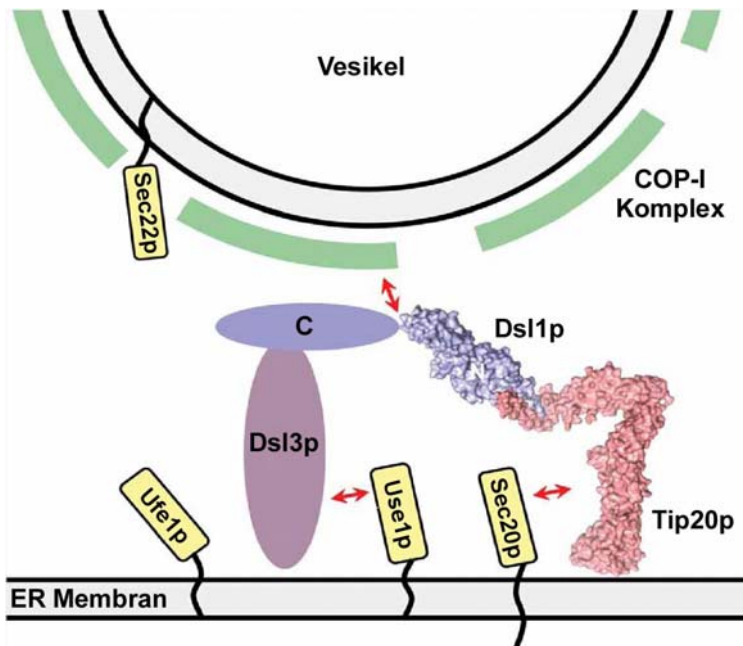


Abb. 5: Schematisches Modell der Interaktion zwischen dem Dsl/SNARE-Komplex und einem Vesikel mit COP-I-Hülle. Modifiziert von Tripathi et al. 2009.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung der Interaktion zwischen Dsl1p und -COP, da diese Interaktion zwar schon bekannt (Andag und Schmitt 2003), aber bisher noch nicht genauer untersucht worden war. Im Besonderen sollten die Binderegionen in beiden Proteinen charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden Mutantenstämme hergestellt, die Defekte im Dsl/SNARE- oder COP-I-Komplex tragen. Die Auswirkungen dieser Mutationen sollten anschließend mit verschiedenen Methoden analysiert werden, wie beispielsweise in Interaktionsstudien (Affinitätsreinigungen, GST-Bindungsexperimente, Yeast-2-Hybrid-Versuche) aber auch mit Hilfe der Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abb. 6).

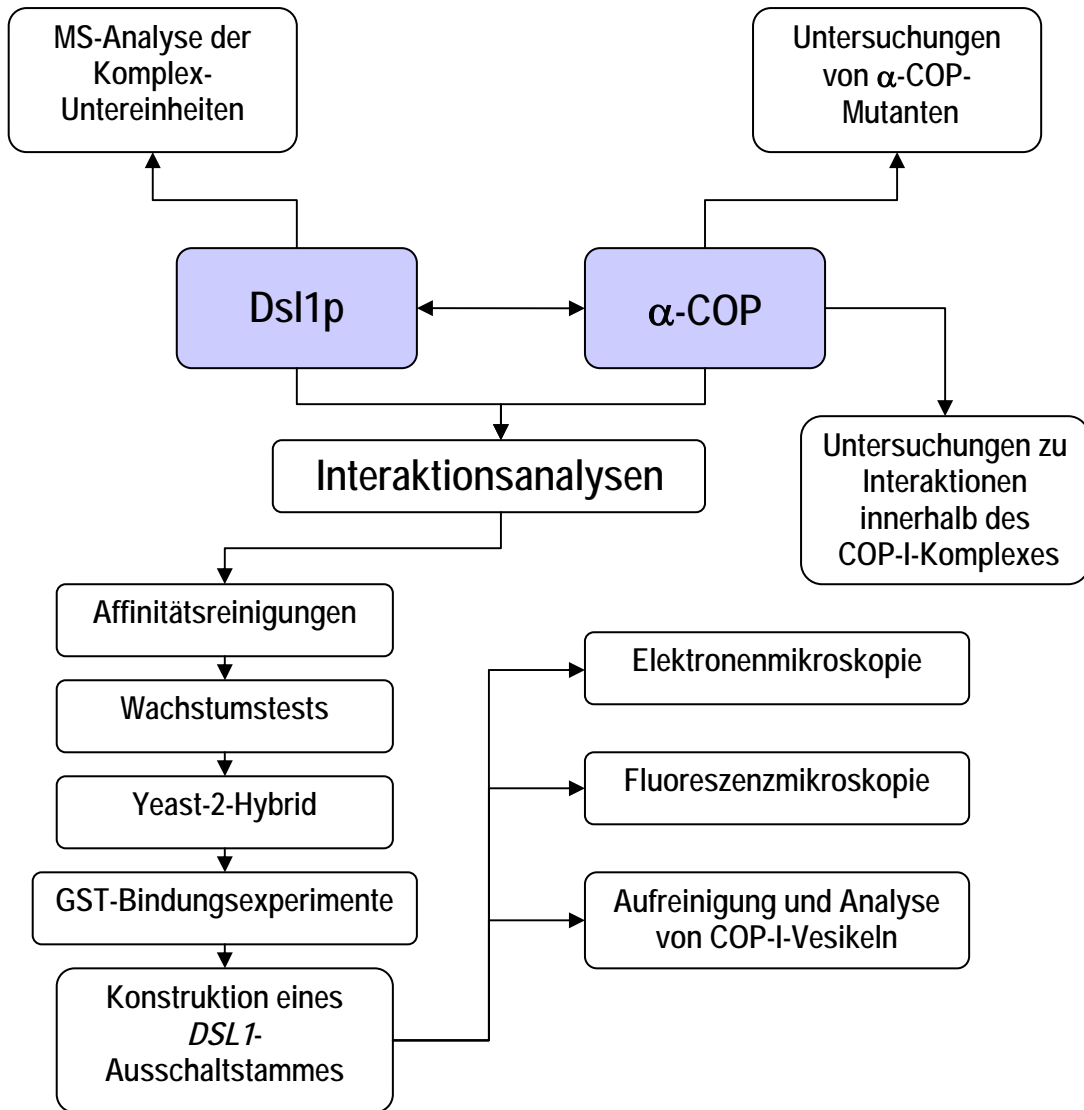


Abb. 6: Fließschema zum Aufbau der Dissertation

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 5: verwendete *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Merkmale	Quelle
BL21-DE3	<i>hsdS gal</i> (λ clts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7-1</i>)	Stratagene
DH5 α	F' <i>endA1 hsdR17</i> ($r_K^+ m_K^+$) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 (<i>m80lacZ</i> Δ M15)	Gibco BRL
TOP10F'	F'(<i>lacIq Tn10</i>) <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
XL1-blue	F:: <i>Tn10/proA+B+lacI^q</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi-, hsdR17</i> ($r_K^+ m_K^+$) <i>supE44 relA1 lac</i>	Stratagene

2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tab. 6: verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Merkmale	Quelle
GTDs1	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1</i> GAL-TAP- <i>DSL1</i>	im Labor vorhanden
cop1 Δ (1)	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 lys2 cop1</i> Δ ::KanMX mit versch. Versionen von pRS313- <i>RET1</i> (=COP1)	im Labor vorhanden
Sec27T	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 cop1</i> ::KanMX pRS313- <i>COP1 SEC27</i> -TAP-HygB	im Labor vorhanden
Sec27T Δ 19C	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 cop1</i> ::KanMX pRS313- <i>cop1-Δ19C SEC27</i> -TAP-HygB	im Labor vorhanden
Sec27T SF	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 cop1</i> ::KanMX pRS313-- <i>cop1-S1188F SEC27</i> -TAP-HygB	im Labor vorhanden
COP1T	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 met15 COP1</i> -TAP- <i>URA3</i>	im Labor vorhanden
cop1 Δ 19T	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 cop1-Δ19C</i> -TAP- <i>URA3</i>	im Labor vorhanden
WT (BY4741)	<i>MATα his3-1 leu2-0 met15-0 ura3-0</i>	Euroscarf
GTDs1 (Plasmid)	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2</i> pRS315-GAL-TAP- <i>DSL1</i>	dieses Arbeit
GTDs1_W425A (PI)	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2</i> pRS315-GAL-TAP- <i>dsl1-W425A</i>	dieses Arbeit
GTDs1_5xWA (Plasmid)	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2</i> pRS315-GAL-TAP- <i>dsl1-5xWA</i>	diese Arbeit

GD1	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 trp1 GAL-DSL1</i>	im Labor vorhanden
GD1 Δ 19C	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 GAL-DSL1 cop1-Δ19C</i>	im Labor vorhanden
GD1 SF	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 met15 GAL-DSL1 cop1-S1188F</i>	im Labor vorhanden
GD1 ϵ -COP Δ	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 GAL-DSL1 sec28Δ</i>	im Labor vorhanden
GD1 δ -COP ^{ts}	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 trp1 GAL-DSL1 ret2-1</i>	im Labor vorhanden
GD1 β' -COP ^{ts}	<i>MATα ura3 leu2 his3 GAL-DSL1 sec27-1</i>	im Labor vorhanden
GD1 ζ -COP ^{ts}	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 trp1 GAL-DSL1 ret3-1</i>	im Labor vorhanden
cop1 Δ (2)	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 trp1 cop1Δ::KanMX mit versch. Versionen von pRS313-RET1(=COP1)</i>	im Labor vorhanden
PJ69-4A	<i>MATα trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James et al. 1996
α -COP ^{GFP}	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 COP1-GFP-HIS5</i>	Huh et al. 2003
β' -COP ^{GFP}	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 SEC27-GFP-HIS5</i>	Huh et al. 2003
δ -COP ^{GFP}	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 RET2-GFP-HIS5</i>	Huh et al. 2003
ϵ -COP ^{GFP}	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 SEC28-GFP-HIS5</i>	Huh et al. 2003
GD1 α -COP ^{GFP}	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 trp1 GAL-DSL1 COP1-GFP- HIS5</i>	im Labor vorhanden
GD1 β' -COP ^{GFP}	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 GAL-DSL1 SEC27-GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
GD1 δ -COP ^{GFP}	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 GAL-DSL1 RET2-GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
GD1 ϵ -COP ^{GFP}	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 GAL-DSL1 SEC28-GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
ϵ -COP ^{GFP} dsl1-22	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 met15 dsl1-22 SEC28-GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
ϵ -COP ^{GFP} dsl3-2	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 dsl3Δ::KanMX pRS313-dsl3-2 SEC28-GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
ϵ -COP ^{GFP} tip20-8	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 tip20-8 SEC28-GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
β' -COP ^{GFP} ufe1-1	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 ufe1Δ::TRP1 pUT18-ufe1-1 SEC27-GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
β' -COP ^{GFP} sec20-1	<i>MATα ura3 leu2 lys2 trp1 met15 his3 sec20-1 SEC27- GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
β' -COP ^{GFP} sec22-3	<i>MATα ura3 leu2 his3 his4 lys2 sec22-3 SEC27-GFP-HIS5</i>	im Labor vorhanden
ϵ -COP ^{GFP} dsl1_5xWA	<i>MATα ura3 leu2 met15 dsl1-5xWA SEC28-GFP::HIS5</i>	im Labor vorhanden
β' -COP ^{GFP} Gal-ARF1	<i>MATα ura3 leu2 his3 met15 arf1::KanMX arf2 ::URA3 SEC27-GFP-HIS5 pGAL-ARF1::LEU2</i>	im Labor vorhanden

β' -COP ^{GFP} sec12-4	MAT α ura3 leu2 his3 lys2- trp1 sec12-4 SEC27-GFP:: <i>HIS5</i>	im Labor vorhanden
β' -COP ^{GFP} ϵ -COP Δ	MAT α ura3 leu2 his3 lys2 sec28 Δ ::KanMX SEC27-GFP- <i>HIS5</i>	im Labor vorhanden
GD1 β' -COP ^{GFP} Δ 19C	MAT α ura3 leu2 his3 lys2 GAL- <i>DSL1</i> cop1- Δ 19C SEC27- GFP:: <i>HIS5</i>	im Labor vorhanden
GD1 β' -COP ^{GFP} ϵ -COP Δ	MAT α ura3 leu2 his3 trp1 GAL- <i>DSL1</i> sec28 Δ ::KanMX SEC27-GFP- <i>HIS5</i>	im Labor vorhanden
GD1 β' -COP ^{GFP} δ -COP ^{Is}	MAT α ura3 leu2 his3 lys2 trp1 GAL- <i>DSL1</i> ret2-1 SEC27- GFP- <i>HIS5</i>	im Labor vorhanden
GD1 β' -COP ^{GFP} Sec7 ^{DsRed}	MAT α ura3 leu2 his3 trp1 met15 lys2 GAL- <i>DSL1</i> SEC7- DsRed- <i>TRP1</i> SEC27-GFP- <i>HIS3</i>	im Labor vorhanden
GD1 ϵ -COP ^{RFP} Sec63p ^{GFP}	MAT α ura3 leu2 his3 met15 GAL- <i>DSL1</i> SEC28-RFP- KanMX SEC63-GFP- <i>HIS5</i>	im Labor vorhanden
GD1 ϵ -COP ^{RFP} Sec13p ^{GFP}	MAT α ura3 leu2 his3 met15 GAL- <i>DSL1</i> SEC13-GFP- <i>HIS5</i> SEC28-RFP-KanMX	im Labor vorhanden
GD1 ϵ -COP ^{RFP} Sec31p ^{GFP}	MAT α ura3 leu2 his3 met15 GAL- <i>DSL1</i> SEC31-GFP- <i>HIS5</i> SEC28-RFP-KanMX	im Labor vorhanden

2.1.3 Plasmide

Tab. 7: verwendete Plasmide

Plasmid	Charakterisierung	Quelle
pBS1761	<i>K. lactis</i> <i>TRP1</i> ampR GAL-TAP (für N-term. tagging)	Puig et al. 2001
pRS306-dsl1'-GAL- TAP-'dsl1	<i>URA3</i> , ampR (für pop-in/pop-out integration)	im Labor vorhanden
pRS306-dsl1'-GAL- 'dsl1	<i>URA3</i> , ampR (für pop-in/pop-out integration)	im Labor vorhanden
pTM2	<i>URA3</i> , TPI Promoter, 2 μ , <i>TIP20myc</i>	M. Lewis
pGal-DSL3	pRS314:: <i>Gal-DSL3</i> , <i>TRP1</i>	H.D.Schmitt
pSEC20	pRS323:: <i>SEC20</i> ; <i>HIS3</i>	U. Andag
pSZ23	pTL45:: <i>UFE1</i> , <i>kanR</i> , <i>ampR</i>	diese Arbeit
pUSE1	pRS325:: <i>USE1</i> , <i>LEU2</i>	G. Fischer von Mollard
pUC19	<i>E. coli</i> cloning vector, ampR, <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1)	Fermentas
pRS315-DSL1	pRS315:: <i>DSL1</i> , CEN6, <i>LEU2</i> , ampR	Andag et al. 2001
pRS315-dsl1_5xWA	pRS315:: <i>dsl1_5xWA</i> , CEN6, <i>LEU2</i> , ampR	im Labor vorhanden
pRS315-dsl1_W425A	pRS315:: <i>dsl1_W425A</i> , CEN6, <i>LEU2</i> , ampR	im Labor vorhanden
pGTDSL1	pRS315:: <i>GAL-TAP-DSL1</i> , CEN6, <i>LEU2</i> , ampR	im Labor vorhanden

pGTW425A	pRS315::GAL-TAP- <i>ds1</i> -W425A, CEN6, <i>LEU2</i> , ampR	im Labor vorhanden
pGT5xWA	pRS315::GAL-TAP- <i>ds1</i> -5xWA, CEN6, <i>LEU2</i> , ampR	im Labor vorhanden
pCOP1	pRS313:: <i>COP1</i> (= <i>RET1</i>)CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pS1188F	pRS313:: <i>cop1</i> -S1188F CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pΔ19C	pRS313:: <i>cop1</i> -Δ19C CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pΔ132C	pRS313:: <i>cop1</i> -Δ132C CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pW870A	pRS313:: <i>cop1</i> -W870A CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pW870A/SF	pRS313:: <i>cop1</i> -W870A/SF CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pW870A/Δ19	pRS313:: <i>cop1</i> -W870A/Δ19 CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pΔ5C	pRS313:: <i>cop1</i> -Δ5C CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pR1198A	pRS313:: <i>cop1</i> -R1198A CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pR1198E	pRS313:: <i>cop1</i> -R1198E CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
p2xRA	pRS313:: <i>cop1</i> -R1198A/R1200A CEN6, <i>HIS3</i> , ampR	im Labor vorhanden
pCR2.1	<i>LacZα</i> , ampR, kanR, TOPO TA Klonierungsvektor	Invitrogen
pCR-BluntII	<i>LacZα</i> , zeoR, kanR, Blunt End Klonierungsvektor	Invitrogen
pGEX-TT	GST, ampR, pGEX-2T mit Polylinkerregion von pEG	Invitrogen
pSZ48	pGEX-TT:: <i>α</i> -COP_WT	diese Arbeit
pSZ49	pGEX-TT:: <i>α</i> -COP_L872R	diese Arbeit
pSZ53	pGEX-TT:: <i>α</i> -COP_W870A; zusätzliche <i>SacII</i> RS	diese Arbeit
pSZ54	pGEX-TT:: <i>α</i> -COP_W870Y; zusätzliche <i>NdeI</i> RS	diese Arbeit
pGBDU-C1	<i>URA3</i> , 2μ, ampR, <i>GAL4</i> -BD (Bindedomäne)	James et al. 1996
pBR2	pGBDU-C1:: <i>DSL1</i> , <i>GAL4</i> -BD- <i>DSL1</i>	Reilly et al. 2001
pSZ66	pCR2.1(TOPO):: <i>SEC28</i> (δ-COP)	diese Arbeit
pSZ67	pBR2:: <i>SEC28</i> (δ-COP) (aus pSZ67)	diese Arbeit
pGAD-C1	<i>LEU2</i> , 2μ, ampR, <i>GAL4</i> -AD (Aktivierungsdomäne)	James et al. 1996
pSZ63	pCR-BluntII (TOPO):: <i>RET1</i>	diese Arbeit
pSZ65	pGAD-C1:: <i>RET1</i> _WT (aus pSZ63)	diese Arbeit

pSZ59	pCR-BluntII (TOPO):: <i>ret1_Δ19</i>	diese Arbeit
pSZ60	pCR2.1(TOPO):: <i>ret1_S1188F</i>	diese Arbeit
pSZ61	pGAD-C1:: <i>ret1_Δ19</i> (aus pSZ59)	diese Arbeit
pSZ62	pGAD-C1:: <i>ret1_S1188F</i> (aus pSZ60)	diese Arbeit
pRS306- <i>dsl1'</i> -GAL- <i>dsl1</i>	<i>URA3</i> , <i>ampR</i> , GAL- <i>dsl1</i>	im Labor vorhanden
pYM38	<i>kanMX4</i> , <i>ampR</i> , <i>kanR</i> , RedStar fusion protein	Euroscarf

2.1.4 Oligonukleotide

Tab. 8: verwendete Oligonukleotide

Bez.	Sequenz	Zweck
Dsl1upXba	CGT CTA GAG TAA CGA ATT TGA CGT TTG TAT TC	TAPtag
Dsl1upBgl	AGA AAG ATC TTT CAT GAG GTC AAT AAT AAC G	TAPtag
Dsl1-Cla-ATG	CGA TCG ATA TGG AGT CTC TTT TTC CTA ACA A	TAPtag
Dsl1-co-rev	CAA TGT TGG CCA TGC GAA GAG GAT	TAPtag
α-COP_wt_for	GAT CCG ATG AAG ATA TTG GCG AAG ATG AAG GCG CGT GGG ATC TGG GCG ATG AAG ATC TGG ATG TGG GCG AAG AAT A	GST-Peptid
α-COP_wt_rev	AGC TTA TTC TTC GCC CAC ATC CAG ATC TTC ATC GCC CAG ATC CCA CGC GCC TTC ATC TTC GCC AAT ATC TTC ATC G	GST-Peptid
L872R_for	GAT CCG ATG AAG ATA TTG GCG AAG ATG AAG GCG CGT GGG ATC GCG GCG ATG AAG ATC TGG ATG TGG GCG AAG AAT A	GST-Peptid
L872R_rev	AGC TTA TTC TTC GCC CAC ATC CAG ATC TTC ATC GCC GCG ATC CCA CGC GCC TTC ATC TTC GCC AAT ATC TTC ATC G	GST-Peptid
W870A_for	CGG ATC TGG GCG ATG AAG ATC TGG ATG TGG GC	GST-Peptid
W870A_rev	CGG CGC CTT CAT CTT CGC CAA TAT CTT CAT C	GST-Peptid
W870Y_for	ATG ATC TGG GCG ATG AAG ATC TGG ATG TGG GC	GST-Peptid
W870Y_rev	ATG CGC CTT CAT CTT CGC CAA TAT CTT CAT C	GST-Peptid
WxWxxxA_f	GAT CCG CCG TAT CCA AAG ATG ATG ATT GGA ATT GGG AAG TAG AGG ATG ATG ATG CCG ATG CAG CGG GTG ATG AAA TTG ATG TAA ATA TCG ATG ACG AGG AAG AAA AAA CAT A	GST-Peptid
WxWxxxA_r	AGC TTA TGT TTT TTC TTC CTC GTC ATC GAT ATT TAC ATC AAT TTC ATC ACC CGC TGC ATC GGC ATC ATC ATC CTC TAC TTC CCA ATT CCA ATC ATC ATC TTT GGA TAC GGC G	GST-Peptid
AxAxxxW_f	GAT CCG CCG TAT CCA AAG ATG ATG ATG CGA ATG CGG AAG TAG AGG ATG ATG ATG CCG ATG CAT GGG GTG ATG AAA TTG ATG TAA ATA TCG ATG ACG AGG AAG AAA AAA CAT A	GST-Peptid

AxAxxxW_r	AGC TTA TGT TTT TTC TTC CTC GTC ATC GAT ATT TAC ATC AAT TTC ATC ACC CCA TGC ATC GGC ATC ATC ATC CTC TAC TTC CGC ATT CGC ATC ATC ATC TTT GGA TAC GGC G	GST-Peptid
Sec28-YM5	AAA ATT CGA TGA ATT AGT GAG GAA ATA TGA TAC GTC CAA CCG TAC GCT GCA GGT CGA C	RFPtag
Sec28-YM3	CTT TGT TAA TTA TAC TTT ATA TGA TTT TGT TCA AGC CAT GAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	RFPtag

2.1.5 Antikörper

Tab. 9: verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
polyklonaler anti-COP-I-Antikörper	R. Duden
polyklonaler anti-ε-COP-Antikörper	R. Duden
polyklonaler anti-δ-COP-Antikörper	S. Schröder-Köhne
polyklonaler Dsl1p-Antikörper	Eurogentec, B. Kraynack
polyklonaler Glo3p-Antikörper	A. Spang
polyklonaler Arf1p-Antikörper	A. Spang
polyklonaler Sec22p-Antikörper	R. Ossig (Labor)
polyklonaler Rer1p-Antikörper	J. Böhm (Labor), Böhm et al. 1997
Peroxidase-konjugiertes-Ziege-Anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch
Cy3-Ziege-Anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch
Atto/647N-Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	Abteilung Nanobiophotonik, MPIbpc

2.1.6 Enzyme und Kits

Tab. 10: verwendete Enzyme und Kits

Enzyme und Kits	Lieferant
AcTEV™ Protease	Invitrogen
β-Glucuronidase-Acrylsulfatase (<i>Helix pomatia</i>)	Roche
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	Roche
Calmodulin Sepharose™ 4B	GE Healthcare
ECL-Western-Blotting detection reagents	Perkin Elmer
Glutathion Sepharose™ 4B	GE Healthcare
IgG Sepharose™ 6 Fast Flow	GE Healthcare

Lytikase	Sigma
NucleoBond® PC100	Macherey-Nagel
Nucleospin® Extract II	Macherey-Nagel
Nucleospin® Plasmid	Macherey-Nagel
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega
PowerScript DNA-Poylmerase lang	PAN
Protease Inhibitor Tabletten complete, EDTA frei	Roche
Restriktionsendonukleasen	NEB, Roche, Fermentas
T4-DNA-Ligase	NEB
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fermentas
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

2.1.7 Chemikalien und Medienzusätze

Es wurden handelsübliche Chemikalien der Qualitätsstufe p.A. der Firmen Merck AG, Carl Roth GmbH + Co. KG und Sigma-Aldrich Chemie GmbH verwendet. Andere Chemikalien sowie Medienzusätze mit den entsprechenden Lieferanten sind in Tab. 11 aufgelistet.

Tab. 11: verwendete Chemikalien und Medienzusätze

Chemikalien und Medienzusätze	Lieferant
1kb DNA Größenstandard N3232L	NEB
5-Fluoroorotic Acid (5-FOA)	Appllichem
Agarose low EEO	Appllichem
Aminosäuren, Basen	Appllichem, Calbiochem, Serva
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Bacto™ Agar	Difco
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coomassie® Brilliant blue R250	Fluka
D-(+)-Glukose Monohydrat	Merck
D-(+)-Galaktose	Fluka
DAKO Fluorescent Mounting Medium	Dako Diagnostika

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Farbmarkierter Proteingrößenstandard (Protein Marker V)	peqlab
Farbmarkierter Proteingrößenstandard (PageRuler™)	Fermentas
GelGreen 10.000X in DMSO	Biotium
Hefeextrakt	Roth
Kanamycin Sulfat	Roth
LDS Probenpuffer NuPAGE®	Invitrogen
Pepton aus Casein	Appllichem
Protein Assay Dye Reagent	Biorad
Poly-L-Lysin-Lösung	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	Difco; Formedium™
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tab. 12: verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Lieferant
10-Loch-Objekträger	ICN Biomedicals
Allgemeine Glaswaren	Schütt
Deckgläschen 20x20mm, 24x60mm	Roth
Gel Blotting Papier GB005	Whatman
Gradienten-Tris/HCl-Fertiggele, 4-15%	BIORAD
Nitrocellulose Membranen Protrans BA83	Whatman
Objekträger Menzel-Gläser Superfrost 76x26mm	Thermo Scientific
Petrischalen	Greiner Bio One
Poly-Prep®Chromatographie Säulen	BIORAD
Polypropylenröhrchen	Greiner Bio One
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt, neoLab

2.1.9 Geräte und nicht gesondert erwähnte Hilfsmittel

Gelsysteme und Zubehör

PAGE-Kammern Mini-Protean II und Zubehör	BIORAD
Blotting-Apparatur	BIORAD
Geltrockner Model 583	BIORAD

Zentrifugen

Zentrifuge J6-MI	Beckman
Zentrifuge 5415D; 5702R	Eppendorf
Zentrifuge Fresco21; Biofuge15	Heraeus
Zentrifuge RC5B Plus	Sorvall
Ultrazentrifuge TL-100; Otima L-70K	Beckman
Ultrazentrifuge Discovery™ M150SE	Thermo Scientific (Sorvall)
Vakuumzentrifuge SC110A	Savant

Rotoren

TLA55; Ti70; JS4.2	Beckman
A-4-38; F-45-24-11	Eppendorf
SS34; S55S	Thermo Scientific (Sorvall)
75003424	Heraeus

Mikroskope + Zubehör

Epifluoreszenzmikroskop DM6000B	Leica
Plan-Apo 100x1.4 NA Öl-immersionsobjektiv	Leica
GFP Filter (Anr.: 470/40 nm, Emm.:525/50nm)	Leica
N3 Filter (Anr.: 546/12 nm, Emm.: 600/40 nm)	Leica
(Abb. 26, Abb. 31, Kapitel 3.17)	
Axioplan Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Plan-Apo 100x1.4 NA Objektiv	Zeiss
Bandpass Filtersätze 13 + 20	Zeiss
(Abb. 24, Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30, Abb. 32)	
Konfokal-Mikroskop TCS SP5 (Laserabtastung)	Leica
Plan-Apo 63x1.4 NA Öl-immersionsobjektiv	Leica
(Abb. 25 A)	
TCS STED Mikroskop	Leica
(Abb. 25 B)	

Waagen

Grobwaage BP3100S; PT610

Sartorius

Feinwaage AT200

Mettler Toledo

Sonstiges

BioPhotometer

Eppendorf

Brutschrank B5060; BK5060E

Heraeus

Gradient Master ip 107

Biocomp

Inkubationsschüttler

Infors HT

Lumi-Imager

Roche

Magnetrührer MR2000

Heidolph

Mikromanipulator

Singer

Netzteil

Renner GmbH

Pipetten

Gilson

Schüttler GFL3016, Rocky

Schütt

Rotationsplattform 34528

Schütt

Thermocycler PTC-100

MJ Research

Thermomixer 5436

Eppendorf

Tiefkühlschrank -20° C

Bauknecht; Liebherr

Tiefkühlschrank -80° C

NUNC

UV-Tisch TI-1

Biometra

Vortex Genie 2

Bender & Hobein

2.2 Methoden zur Anzucht von *E. coli*-Kulturen

<u>LB (L-Broth)-Medium:</u>	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	10 g/l	Trypton
<u>Antibiotika:</u>	100 mg/l	Ampicillin
	30 mg/l	Kanamycin

Alle Medien wurden 20 min bei 120° C autoklaviert. Festmedien wurden zusätzlich 2 % Agar zugesetzt.

Zum Animpfen einer Flüssigkultur wurde eine Einzelkolonie mit der Impföse in 5 ml LB-Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37° C und 150 rpm in einem Schüttler. Das Wachstum auf LB-Agarplatten erfolgte ebenfalls bei 37° C.

Die Selektion von *E. coli*-Transformanden erforderte zusätzlich die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium.

2.3 Methoden zur Anzucht von *S. cerevisiae*-Hefekulturen

<u>YEPD (YEPGAL):</u>	10 g/l	Hefeextrakt
	20 g/l	Pepton
	20 g/l	Glukose(Galaktose)
<u>SD-Minimalmedium:</u>	1,7 g/l	Yeast Nitrogen Base
	5 g/l	Ammoniumsulfat
	20 g/l	Glukose

Folgende Aminosäuren und Basen wurden dem SD-Minimalmedium je nach Bedarf zugesetzt:

20 mg/l Adeninsulfat	20 mg/l Uracil
20 mg/l L-Histidin-HCl	30 mg/l L-Leucin
20 mg/l L-Lysin-HCl	20 mg/l L-Tryptophan
20 mg/l L-Methionin	

Sporulationsmedium: 10 g/l Kaliumazetat

Zum besseren Wachstum wurde dem Sporulationsmedium zusätzlich 25 % der üblichen Menge an Aminosäuren und Basen (siehe oben) zugefügt.

Alle Medien wurden 20 min bei 120° C autoklaviert. Festmedien wurden zusätzlich 2 % Agar zugesetzt.

Für die Anzucht von Hefestämmen wurde jeweils eine Einzelkolonie im entsprechenden Voll- oder Minimalmedium angeimpft oder auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und bei 25° C oder 30° C inkubiert. Flüssigkulturen wurden für eine gleichmäßige Belüftung bei 150 rpm geschüttelt. Die Selektion auf bestimmte Aminosäure-Prototrophien wurde in SD-Minimalmedium mit der entsprechenden Aminosäure-Zusammensetzung durchgeführt.

2.4 Methoden zur DNA-Präparation

2.4.1 Plasmidisolierung aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® *Plasmid DNA Purification* Kits von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers. Für die präparative Plasmidisolierung wurde das NucleoBond® PC100 *Plasmid Purification* Kit von Macherey-Nagel ebenfalls nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit

Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Eine Absorption von $OD_{260} = 1,0$ entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA (Sambrook et al. 1989). Die Bildung des Quotienten A_{260}/A_{280} mit einem Wert $\geq 1,8$ zeigte eine hohe Reinheit der DNA an, wohingegen Werte $< 1,8$ oder > 2 eine Kontamination mit Proteinen oder aromatischen Substanzen bzw. eine Kontamination mit RNA anzeigen.

2.5 Methoden zur Modifikation und Analyse der DNA

2.5.1 Restriktion

Der Restriktionsverdau von DNA für nachfolgende Klonierungen oder andere analytische/präparative Zwecke erfolgte mit TypII Restriktionsendonukleasen der Firmen New England Biolabs (NEB), Roche oder Fermentas in den entsprechenden Puffern und nach Herstellerangaben. Für einen Restriktionsansatz wurde meist 1 µg DNA zusammen mit 1-2 Units des Enzyms eingesetzt und für 2 h bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

2.5.2 Ligation

Für die Ligation linearisierter DNA Moleküle wurde die T4-DNA-Ligase von New England Biolabs (NEB) verwendet. Dazu wurde die Insert-DNA in 3-5-fachem molaren Überschuss zur Vektor-DNA zusammen mit 1 x ATP-Reaktionspuffer und 1 Unit T4-DNA-Ligase eingesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 2.6.1 und 2.6.2).

2.5.3 Dephosphorylierung

Um eine Religation linearisierter DNA-Fragmente mit glatten oder kompatiblen Enden zu verhindern wurden diese Moleküle mit alkalischer Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, Roche)

behandelt. Die Inkubation der linearisierten DNA mit 1 Unit Enzym erfolgte für 15 min bei 37° C und nachfolgender Aufreinigung über eine Agarose-Gelelektrophorese.

2.5.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

TA-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH7,2
 20 mM Natriumazetat
 1 mM EDTA

DNA-Auftragspuffer 6 x: 10 % Glycerin
(in TA-Puffer) 0,25 % Bromphenolblau
 0,25 % Xylencyanol

Elektrophoretische Auftrennungen (analytisch und präparativ) der DNA erfolgten je nach Größe der Fragmente in 1-2 %igen Agarosegelen. Nach Aufkochen der Agarose in TA-Puffer und dem Gießen des Gels in entsprechenden Gelkammern wurden die mit 6 x Auftragspuffer versetzten DNA-Proben auf das Gel aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 80 Volt (kleine Gele) bzw. 100 Volt (große Gele) aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Anfärbung des Gels in einem Ethidiumbromid-Bad (10 µg/ml in dH₂O) oder in einem „GelGreen“-Bad (0,3 µg/ml in 0,1 M NaCl-Lösung) um die DNA-Fragmente anzufärben und nachfolgend durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar zu machen.

2.5.5 Isolierung der DNA aus präparativen Gelen

Um die DNA aus einem präparativen Gel zu isolieren, wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung und der möglichst kurzzeitigen Färbung des Gels, die Banden unter längerwelligem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Skalpell die zu isolierende Bande ausgeschnitten. Danach konnte die DNA mit dem NucleoSpin® Extract II Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück präpariert werden.

2.5.6 Sequenzierung

Für Sequenzierungen wurden die Dienste der Firma MWG (www.eurofinsdna.com) in Anspruch genommen, indem die lyophilisierten DNA-Proben verschickt und die gewünschten Primer online bestätigt wurden.

2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglichte eine schnelle DNA-Amplifikation unter Verwendung einer *Taq*-, einer *Pfu*- oder einer PowerScript-DNA-Polymerase und den dazugehörigen Reaktionspuffern. Sowohl die *Pfu*-DNA-Polymerase als auch die PowerScript DNA-Poylmerase bieten eine höhere Genauigkeit als die *Taq*-

Polymerase durch ihre zusätzliche 3'-Exonucleaseaktivität und Proofreading-Funktion. Nach der Reaktion wurden 5 µl des Ansatzes auf ein Gel aufgetragen um den Erfolg der PCR zu dokumentieren.

Standard-Reaktionsansatz:

10 x PCR-Reaktionspuffer	5 µl
dNTPs (5mM)	2-5 µl
MgCl ₂ (50mM)	1-5 µl
Primer 1 forward (100µM)	0,5-1 µl
Primer2 reverse (100µM)	0,5-1 µl
Vektor-DNA (Matrize)	0,2-0,5 µg
dH ₂ O	ad 50 µl
DNA-Polymerase	1-3 U

Standard-Programm:

Denaturierung: 95° C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung: 95° C	1 min	30 Zyklen
Hybridisierung: 55-68° C	0,5 min	
Polymerisation: 68-72° C	1 min/1000 bp (<i>Taq</i> , Powerscript)	
	2 min/1000 bp (<i>Pfu</i>)	
Polymerisation: 72° C	10 min	1 Zyklus

2.5.8 Klonierung von PCR-Produkten

Die weiterführende Klonierung von PCR-Produkten erfolgte über das TOPO TA Cloning®-Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

2.6 Transformationsmethoden

2.6.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

RF-I-Puffer:

90 mM Kaliumazetat	0,5 mM LiCl
100 mM RbCl	15 % Glycerin (w/v)
50 mM MnCl ₂	pH 5,8 (sterilfiltriert)
10 mM CaCl ₂	

RF-II-Puffer:

10 mM MOPS
75 mM CaCl ₂
15 % Glycerin (w/v)
pH 7,0 (sterilfiltriert)

Für die Herstellung transformationsfähiger *E. coli*-Zellen wurde eine frische Übernachtvorkultur mit LB-Medium verdünnt (~1:300) und bei 37° C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wachsen gelassen. Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum, bei 4° C oder auf Eis durchgeführt. Die Zellernte erfolgte für 10 min bei 4 000 rpm (Rotor JS4.2). Nach der Resuspension des Zellpellets in 90 ml RF-I-Puffer wurden die Zellen 90-120 min auf Eis inkubiert und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 4° C, 4 000 rpm, Rotor JS4.2) in 12 ml RF-II-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 50 µl oder 300 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt.

2.6.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation erfolgte durch Zugabe von 1-10 ng Plasmid-DNA zu den gefrorenen Zellen. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock (1-2 min, 42° C) und der Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37° C. Nachfolgend wurden die Zellen zentrifugiert (2 min, RT, 6 000 rpm, Rotor F-45-24-11), in 100 µl dH₂O aufgenommen und auf Selektivmedium ausgestrichen.

2.6.3 Herstellung chemisch-kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8.0

1 mM EDTA

Lithiumazetat-Lösung:

0,2 M Lithiumazetat in TE-Puffer

Die Herstellung chemisch-kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte nach der Lithiumazetat-Methode nach Ito et al. (1983). Eine frische Übernachtkultur wurde ungefähr 1:10 mit dem entsprechenden Medium verdünnt und bis zur späten exponentiellen Phase (OD₆₀₀ von 0,7-1,2) bei 30° C wachsen gelassen. Nach der Zellernte (5 min, RT, 4 000 rpm, Rotor A-4-38) erfolgte ein Waschschrift mit 20 ml TE-Puffer und eine Aufnahme der Zellen in 1 ml 0,1 M Lithiumazetat-Lösung. Die Suspension wurde danach 30-60 min unter Schütteln bei 30° C inkubiert und anschließend in 100 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.

2.6.4 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

PEG-Lösung:

40 % (w/v) PEG 6000

0,1 M Lithiumazetat-Lösung

Für die nachfolgende Transformation wurden jeweils ca. 1 ng Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30° C im Schüttler wurde die Suspension mit 700 µl PEG-Lösung gut durchmischt und für weitere 60 min bei 30° C inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock (10 min, 42° C) und die Zellernte (5 min, 4 000 rpm, Rotor F-45-24-11). Die so in 100 µl dH₂O aufgenommenen Hefezellen konnten nun auf Selektivmedium ausgestrichen werden. Nach 2-5 Tagen bei 30° C wurden die gewachsenen Kolonien zur Überprüfung erneut auf Selektiv-Agarplatten ausgestrichen.

2.7 Methoden zur Hefegenetik

2.7.1 Kreuzung von *S. cerevisiae*-Zellen

Die meisten im Laboralltag benutzten *S. cerevisiae*-Stämme liegen in der haploiden Form vor. Die Kreuzung dieser Zellen beruht auf den verschiedenen Paarungstypen *MATa* und *MATα*, da nur Zellen der entgegengesetzten Typen in der Lage sind zu einer diploiden Zygote zu verschmelzen. Eine kontrollierte Kreuzung erfolgte durch linearen Ausstrich und gleichzeitiger Vermischung der entsprechenden Stämme auf einer Vollmedium-Agarplatte mit der Impföse. Die bei 30° C gewachsenen Zellen wurden am nächsten Tag für eine Selektion auf Minimalmedium-Agarplatten abgestempelt und wiederum über Nacht bei 30° C inkubiert. Die Kolonien, die die Marker beider Elternstämme aufwiesen, wurden als diploide Zellen identifiziert.

2.7.2 Sporulation diploider *S. cerevisiae*-Zellen

Unter Nährstoff-Mangelbedingungen beginnen diploide *S. cerevisiae*-Zellen in den meiotischen Zellzyklus einzugehen, was zu vier haploiden Sporen führt. Diese sind gemeinsam in einem Ascus eingekapselt und werden auch als Tetrade bezeichnet. Für diesen Prozess wurde eine frische 5 ml Übernachtkultur des entsprechenden diploiden Stammes abzentrifugiert (5 min, RT, 2 500 rpm, Rotor A-4-38), die Zellen in 5 ml Vollmedium resuspendiert und weitere 3 h bei 30° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in dH₂O gewaschen (5 min, RT, 2 500 rpm, Rotor A-4-38) und in einer sehr geringen Menge Wasser resuspendiert, um diese Suspension als Tropfen auf eine Kaliumazetat-Agarplatte zu geben. Nach 3-5 Tagen bei 30° C wurde die Ausbildung der Tetraden per Lichtmikroskopie überprüft.

2.7.3 Tetradenanalyse

Um die vier Tetraden trennen zu können, wurden Zellen von der Kaliumazetat-Agarplatte mit der Impföse abgenommen, in 500 µl dH₂O resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl Glucuronidase-Acrylsulfatase 15-30 min bei RT inkubiert. Von den abgesetzten Zellen konnte nun etwas Material an den Rand einer Vollmedium-Agarplatte ausgestrichen werden. Nach einer kurzen Trocknungszeit erfolgte die Trennung der vier Sporen einzelner Tetraden mit Hilfe des Mikromanipulators, wobei sie jeweils in definierten Abständen auf der Platte abgelegt werden konnten, um eine spätere Identifikation zu ermöglichen. Zum Auskeimen der Sporen wurden die Platten für 2-4 Tage bei 30° C bzw. bei 25° C (temperatursensitive Mutanten) inkubiert und anschließend auf Selektivplatten abgestempelt, um den Phänotyp bzw. die Marker bestimmen zu können.

2.7.4 Phänotypische Untersuchungen mittels Wachstumstests

Um das Wachstumsverhalten von Hefestämme bei verschiedenen Bedingungen zu testen, wurden zunächst die erforderlichen Agarplatten-Typen hergestellt (SD-Minimalmedium, Zugabe anderer Substanzen wie G418, ...). Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wurde in 500 µl sterilem dH₂O gelöst und davon drei serielle Verdünnungen angelegt (1:10, 1:100, 1:1000). Von diesen Zellsuspensionen wurden dann jeweils 5 µl auf die Agarplatten aufgetropft und das Wachstum bei 25° C oder 30° C verfolgt. Für Temperatursensitivitätstests erfolgte die Inkubation zusätzlich bei 37° C. Zur bildlichen Darstellung der Platten wurden sie mit Hilfe des Lumi-Imagers und der LumiAnalyst 3.0 Software aufgenommen.

2.7.5 Aufnahme von Wachstumskurven

Für die Aufzeichnung von Wachstumskurven wurden die entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme von Vorkulturen (Galaktose-Medium) als Doppelprobe in Glukose-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Das Wachstum dieser Kultur bei 30° C wurde dann in einem Schüttelinkubator (150 rpm) verfolgt. Nach 9 h wurden die Kulturen 1:10 verdünnt um den Eintritt in die stationäre Phase zu verhindern.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Elektrophorese-Laufpuffer:

0,19 M Glycin
25 mM Tris Base
0,1 % SDS (w/v)

Lämmli-Auftragspuffer 2 x:

0,1 M Tris/HCl pH 6,8
2 % SDS
2 % β -Mercaptoethanol
20 % Glycerin
0,002 % Bromphenolblau

30 % Acrylamid-Stammlösung:

29,2 % Acrylamid (w/v)
0,8 % Bisacrylamid (w/v)

Trenngel:

	<u>8 %</u>	<u>10 %</u>	<u>12 %</u>
H ₂ O	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml
30% Acrylamid-Stammlösung	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8.8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10 % SDS	50 μ l	50 μ l	50 μ l
10 % APS	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	3 μ l	2 μ l	2 μ l

Sammelgel:

H ₂ O	1,4 ml
30 % Acrylamid-Stammlösung	330 μ l
0,5 M Tris/HCl pH 6.8	250 μ l
10 % SDS	20 μ l
10 % APS	20 μ l
TEMED	2 μ l

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli 1970 werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Dazu wurden die Proben (im Lämmli-Puffer) in die Taschen des zuvor vorbereiteten Gels (selbst gegossen mit Mini-Protean II System oder fertige Gele nach Herstellerangaben, BIORAD) gegeben und anschließend eine konstante Stromstärke von 20-30 mA eingestellt bis der Farbmarker Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreichte.

2.8.2 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

2.8.2.1 Färbung mit Coomassie brilliant blue

<u>Färbelösung:</u>	<u>Entfärbelösung 1:</u>	<u>Entfärbelösung 2:</u>
50 % Methanol	25 % Isopropanol	5 % Methanol
10 % Essigsäure	10 % Essigsäure	12,5 % Essigsäure
0,2 % Coomassie® Brilliant blue R250		

Um die nun aufgetrennten Proteine auf dem SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde es in der Färbelösung geschwenkt bis es eine tiefblaue Farbe angenommen hatte. Dann wurde das Gel zweimal für jeweils ca. 30 min in Lösung 1 und für einige Stunden in Lösung 2 entfärbt bis die Banden gut sichtbar und der Hintergrund entfernt waren. Anschließend konnte das Gel für 1,5 h bei 75° C getrocknet werden.

2.8.2.2. Silberfärbung

Eine Silberfärbung nach Blum et al. (1987) kann bei Proteinkonzentrationen notwendig werden, die mit der Coomassie-Färbung nicht mehr nachgewiesen werden können.

Für alle folgenden Schritte wurde das Gel auf einem Schüttler in jeweils 50 ml der nachstehenden Lösungen bei RT geschwenkt.

Fixieren:	50 % Methanol 12 % Essigsäure 25 µl Formaldehyd (37 %)	1 h
Waschen:	50 % Ethanol	3 x 10 min
Imprägnieren:	10 mg Natriumthiosulfat	1 min
Waschen:	H ₂ O	3 x 20 sek
Silberbehandlung:	100 mg Silbernitrat 37,5 µl Formaldehyd (37 %)	20 min
Waschen	H ₂ O	2 x 20 sek
Entwickeln	3 g Natriumcarbonat 200 µg Natriumthiosulfat 25 µl Formaldehyd (37 %)	nach Bedarf
Waschen	H ₂ O	2 x 2 min
Stoppen	50 % Methanol 12 % Essigsäure	10 min

Anschließend konnte das Gel für 1,5 h bei 75° C getrocknet werden.

2.8.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot-Analyse)

<u>Transferpuffer:</u>	<u>Waschpuffer A:</u>	<u>Waschpuffer B:</u>
150 mM Glycin	10 mM Tris/HCl	0,2 % SDS (w/v)
20 mM Tris Base	0,9 % NaCl (w/v)	0,9 % NaCl (w/v)
20 % Methanol (w/v)	0,05 % Tween 20	0,5 % Triton X-100

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine immunologisch nachweisen zu können, mussten sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden (Burnette 1981) und so spezifischen Antikörpern zugänglich gemacht werden. Dazu wurde das SDS-Gel mit der Nitrozellulose und Chromatographiepapier übereinander geschichtet und in eine spezielle Western-Blot-Apparatur (BIORAD) gegeben. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke (100 mA) für 2 h oder über Nacht bei 25 mA. Die Membran wurde in einer 5 %igen Milchpulver-Lösung in Waschpuffer A für eine Stunde geblockt und anschließend mit einem entsprechenden primären Antikörper (in 5 % Milchpulver) für 1,5 h (RT) oder über Nacht (4° C) inkubiert. Nach drei Waschschrritten á 10 min (Waschpuffer A – Waschpuffer B – Waschpuffer A) wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe eines sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers markiert (1 h, RT). Anschließend folgten wiederum drei Waschschrritte und die Detektion der immunreaktiven Proteine mit Hilfe des ECL Systems nach Angaben des Herstellers. Die resultierende Chemilumineszenz wurde im Lumi-Imager mit der LumiAnalyst 3.0 Software aufgenommen und ausgewertet.

2.8.4 Messung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode von Bradford (1976) unter Benutzung des „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ nach Herstellerangaben angewandt. Die Proben konnten dann bei 595 nm photometrisch erfasst und die Konzentration im Vergleich zu Rinderserumalbumin (BSA)-Standard bestimmt werden.

2.8.5 Glasperlen-Aufschluss von Hefezellen

B88-Puffer:

250 mM Sorbitol

150 mM Kaliumazetat

20 mM HEPES

5 mM Magnesiumazetat

(1 % Triton X-100) pH 7,0

Vor Gebrauch wurden Protease-Inhibitor-Tabletten (Complete EDTA frei, Roche) zugegeben. Für einen Glasperlen-Aufschluss wurde eine 5 ml Übernachtskultur 1:10 mit dem entsprechenden Medium verdünnt und für zwei bis 4 h im Schüttler bei 30° C inkubiert. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4° C oder auf Eis. Nach der Zellernte (5 min, 4 000 rpm, Rotor A-4-38) wurde das Pellet in 30 ml dH₂O gewaschen, in 400 µl kaltem B88-Puffer resuspendiert und in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zusammen mit ca. 300 µl Glasperlen wurden die Zellen nun auf einem Vortex-Genie2 für 2 x 5 min aufgeschlossen und die Zelltrümmer danach in einer 5-minütigen Zentrifugation bei 13 000 rpm (Rotor 75003424) pelletiert. Der Überstand (Extrakt) konnte nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden und erneut für 15 min bei 13 000 rpm (Rotor 75003424) zentrifugiert werden. Dieser Zellextrakt wurde für weitere Versuche verwendet.

2.8.6 TAP-Aufreinigung von Protein-Komplexen

Die TAP-Methode ist eine relativ neue Methode zur Aufreinigung ganzer Proteinkomplexe aus Hefen. Dabei spielt der TAPtag, der an verschiedenen Matrizen binden kann, eine entscheidende Rolle. Nähere Erläuterungen können in Kapitel 3.1 nachgelesen werden.

Das Protokoll für TAP-Aufreinigungen nach Rigaut et al. (1999) wurde leicht modifiziert.

NP40-Puffer:

15 mM Na₂HPO₄
10 mM NaH₂PO₄
150 mM NaCl
2 mM EDTA
1 % NP40
pH 7,2

IPP300-Puffer:

25 mM Tris/HCl pH 8,0
300 mM NaCl
0,1 % NP40

IPP150-Puffer:

25 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl
0,1 % NP40

Vor Gebrauch wurden Protease Inhibitoren und 1 mM DTT zugegeben.

TEV Cleavage Puffer (TEV CP):

25 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
1 mM DTT
0,1 % NP40

Calmodulin-Bindungspuffer (CBP):

25 mM Tris/HCl pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM Mg-Azetat
1 mM Imidazol
2 mM CaCl₂
10 mM β-Mercaptoethanol

Für CBP 0,1 % NP40 und CBP 0.02 % NP40 wurden zum Calmodulin-Bindungspuffer die entsprechenden Mengen an NP40 gegeben.

Calmodulin Elutions Puffer (CEP):

25 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

1 mM Mg-Azetat

1 mM Imidazol

20 mM EGTA

10 mM β -Mercaptoethanol

0,02 % NP40

Eine 500-1000 ml Kultur eines *S. cerevisiae*-Stammes, welcher ein TAP-Fusionsprotein exprimiert, wurde abzentrifugiert (20 min, 4° C 4000 rpm, Rotor JS4.2) und das Zellpellet in 10-20 ml NP40-Puffer aufgenommen. Alle weiteren Schritte wurden bei 4° C oder auf Eis durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte nach Zugabe von ca. 1/3 Volumen Glasperlen durch 5 x 2-minütiges Vortexen der Suspension mit zwischenzeitlichem Herunterkühlen. Der Überstand der nun folgenden Zentrifugation (5 min, 4 000 rpm, Rotor A-4-38) wurde abgenommen und die Glasperlen nochmals mit 10 ml NP40-Puffer gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden für 1,5 h bei 40 000 rpm zentrifugiert (Rotor Ti70). Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde dem Überstand 500 μ l äquilibrierte Sepharose (6 Fast Flow) zugegeben und für 30 min auf einer rotierenden Plattform inkubiert. Die Abtrennung der Sepharose vom Überstand erfolgte für 1 min bei 1 000 rpm (Rotor A-4-38). Für den ersten Reinigungsschritt musste die NaCl-Konzentration im Überstand auf 300 mM eingestellt werden und danach 400 μ l äquilibrierte IgG-Sepharose (6 Fast Flow) zugegeben werden. Die 2-3-stündige Inkubation erfolgte wiederum auf einer rotierenden Plattform. Die IgG-Sepharose wurden in Poly-Prep® *Chromatography*-Säulen aufgefangen, während der Überstand verworfen wurde. Danach erfolgten 4 Waschschrte: 2 x 10 ml IPP300-Puffer, 1 x 10 ml IPP150-Puffer, 1 x 10 ml TEV-CP. Zur weiteren Aufreinigung wurden sowohl 1 ml TEV-CB als auch ca. 20 μ l AcTEV™ Protease zu der Sepharose gegeben und die Säule gut verschlossen für eine Übernacht-Inkubation auf der rotierenden Plattform. Der Überstand konnte nun in eine neue Säule überführt werden und die IgG-Sepharose wurde mit 1 ml TEV-CP gewaschen und beide Überstände vereinigt. Für den letzten Aufreinigungsschritt erfolgte die Zugabe von 3 Volumina CBP (6 ml), 3 μ l/ml 1 M CaCl₂ (6 μ l) und 200 μ l äquilibrierte Calmodulin-Sepharose (4B) und eine Inkubation von 1 h auf der rotierenden Plattform. Nach weiteren drei Waschschrten (2 x 1 ml CBP 0.1 % NP40, 1 x 1 ml

CBP 0.02 % NP40) konnte die Calmodulin-Sepharose in Lämmli-Puffer aufgenommen werden und die gebundenen Proteine mit SDS-PAGE analysiert werden. Für weitere Versuche mit den aufgereinigten Proteinen wurden der Sepharose stattdessen 1 ml CEP zugefügt und das Eluat nach 10 min Inkubationszeit aufgefangen.

2.8.7 Affinitätsreinigungen aus *S. cerevisiae*-Extrakten

Diese Experimente beruhen ebenfalls auf der Fähigkeit des TAPtags, an IgG- oder Calmodulin-Sepharose binden zu können. Gibt es im Stamm ein TAP-Fusionsprotein, welches an die Sepharose bindet, so werden andere Proteine, die ihrerseits an das Fusionsprotein binden, ebenfalls aus dem Extrakt isoliert.

Nach einem Glasperlen-Aufschluss (siehe Kapitel 2.8.5) wurden gleiche Mengen der Hefeextrakte auf ca. 50 µl je Stamm äquilibrierte IgG- oder Calmodulin-Sepharose gegeben und auf ein Volumen von ca. 600 µl mit B88-Puffer (siehe Kapitel 2.8.5) aufgefüllt. Anschließend wurde dieser Ansatz für 1-3 h bei 4° C auf dem Drehrad inkubiert. Nach sechs Waschschrinen in je 1 ml B88-Puffer wurde die Sepharose in 40 µl Lämmli-Puffer aufgenommen, 5 min bei 95° C inkubiert und mit SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.8.8 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde der Vektor pGEX-TT (Smith and Johnson 1988) verwendet. Dieser ermöglicht eine Expression der Konstrukte als Fusion mit der 26 kDa Glutathion-S-Transferase unter Kontrolle eines *tac* Promoters, der durch Zugabe von IPTG induziert werden kann.

Die verwendeten Fragmente von *DSL1* oder α -COP wurden durch Ligation von passenden Oligonukleotiden, die jeweils zu *Bam*HI (5') und *Hind*III (3') passende Überhänge tragen, hergestellt. Die Bindung der Oligonukleotide aneinander (*annealing*) erfolgte durch Zugabe von Ligase-Puffer und zwei Reaktionsschritten, bei 95° C für 5 min und bei 58° C ebenfalls für 5 min. Die so vorbereiteten Fragmente konnten dann in den Vektor pGEX-TT ligiert werden.

Nach erfolgreicher Klonierung und Transformation des Vektors in einen *E. coli*-Expressionsstamm wurde eine Übernachtvorkultur angelegt. Damit konnte nun ca. 50 ml LB/Amp-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37° C inkubiert werden. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) und einer weiteren 37° C-Inkubation für 4 h. Die Zellen wurden geerntet (15 min, 4° C, 4 000 rpm, Rotor JS4.2), in 10 ml B88-Puffer (siehe Kapitel 2.8.5) aufgenommen und zur späteren Verwendung bei -20° C eingefroren.

Für die Proteinaufreinigung wurde dieses Zellpellet langsam auf Eis aufgetaut und durch Ultraschall-Behandlung (3 x 10 sek, dazwischen Kühlung auf Eis) lysiert. Das Zellysate wurde im Folgenden von den Zelltrümmern getrennt (30 min, 4° C, 10 000 rpm, Rotor SS34) und anschließend mit 500 µl äquilibrierter Glutathion-Sepharose™ (4B) für 3 h bei 4° C unter Rotieren inkubiert. Nach drei Waschschritten (je 15 min, 10 ml B88) konnte die mit dem GST-Protein beladene Sepharose in dem gleichen Volumen B88-Puffer aufgenommen und in 50 µl Aliquots aufgeteilt werden. Diese wurden nun in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für spätere Versuche bei -80° C gelagert. Jeweils ein Aliquot wurde in 40 µl Lämmli-Puffer aufgenommen, 5 min bei 95° C inkubiert und per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf erfolgreiche Expression und Aufreinigung hin überprüft.

2.8.9 Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen

Um *in vitro*-Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen bzw. -domänen zu testen, wurden Zellextrakte der entsprechenden *S. cerevisiae*-Stämme hergestellt (siehe Kapitel 2.8.5) und in gleichen Konzentrationen auf die zu testenden GST-Fusionsproteine auf Glutathion-Sepharose geladen (siehe Kapitel 2.8.8). Einer Inkubation von 2 h bei 4° C auf dem Drehrad folgten sechs Waschschrritte in 1 ml B88-Puffer. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose in 40 µl 2 x Lämmli-Puffer aufgenommen, für 5 min bei 95° C inkubiert und mit SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

2.8.10 Isolierung von COP-I-Vesikeln aus *S. cerevisiae* Zellen

C88-Puffer:

250 mM Sorbitol

150 mM Kaliumazetat

20 mM HEPES pH 6,8

3 mM Calciumazetat

1,5 mM Magnesiumazetat

Alle Puffer wurden ohne Detergenzien angesetzt!

Zum Aufreinigen von COP-I-Vesikeln wurde der Stamm β' -COP^{TAP}/GD1 verwendet und das Affinitätsreinigungs-Protokoll (siehe Kapitel 2.8.7) leicht modifiziert. Die Wahl der Affinitätsmatrix bedingte hier auch die Wahl des verwendeten Puffers. Für eine Aufreinigung über IgG-Sepharose wurde B88-Puffer (siehe Kapitel 2.8.5) benutzt, für Calmodulin-Sepharose C88-Puffer.

Eine in 50 ml Glukose-Medium gewachsene Übernachtskultur wurde in sterilem H₂O gewaschen, die Zellen resuspendiert und mit ihnen 500 ml Galaktose-Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30° C unter Schütteln. Die Zellen wurden anschließend für 20 min bei 4° C und

4 000 rpm (Rotor A-4-38) geerntet und in 10-15 ml B88- oder C88-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von ca. 1/3 Volumen Glasperlen erfolgte der Zellaufschluss durch 5 x 2-minütiges Schütteln auf dem Vortexer und zwischenzeitliche Abkühlung im Eisbad. Der Zellextrakt konnten nun durch Zentrifugation (5 min, 4° C, 2 500 rpm, Rotor A-4-38) von den Glasperlen abgetrennt werden. Die Glasperlen wurden noch einmal mit 10 ml Puffer gewaschen und die Überstände beider Zentrifugationsschritte vereinigt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 30 min bei 15 000 rpm und 4° C (Rotor SS34) zur Pelletierung der Zelltrümmer. Um die Vesikel zu isolieren wurden dem jetzt klaren Extrakt ca. 500 µl äquilibrierter IgG- oder Calmodulin-Sepharose zugegeben und für 2-4 h auf einer rotierenden Plattform bei 4° C inkubiert. Nach der Bindung der COP-I-Vesikel wurde die Sepharose 5 x in kaltem B88- oder C88-Puffer gewaschen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 2 x Lämmli-Puffer (Western-Blot-Analyse, siehe Kapitel 2.8.1 und 2.8.3) oder in B88-/C88-Puffer (Elektronenmikroskopie) aufgenommen.

Für eine weitere Fraktionierung mittels Sucrosegradienten (siehe Kapitel 2.8.11) wurden stets an Calmodulin-Sepharose gebundene Vesikel verwendet. Dafür wurde die Sepharose/Vesikel-Suspension in Poly-Prep® *Chromatography* Säulen gegeben und fünfmal mit je 5 ml kaltem B88- oder C88-Puffer gewaschen. Zum Eluieren erfolgte eine 10-minütige Inkubation in kaltem 1 ml C88-Puffer + 15 mM EGTA. Dieses Vesikel enthaltende Eluat konnte nun für die weiteren Versuche verwendet werden.

2.8.11 Fraktionierung von COP-I-Vesikeln im Sucrosegradienten

Für eine weitere Aufreinigung bzw. Abtrennung monomerer COP-I-Komplexe (auch Coatomer genannt) von kompletten umhüllten Vesikeln wurden die Präparationen mit Hilfe eines Sucrosegradienten fraktioniert. Dafür wurden die zuvor isolierten Vesikel mit verschiedenen Zusätzen (je nach Versuchsansatz) für 1 h oder 10 min bei 30° C inkubiert. Zwischenzeitlich konnte der 10-50 %ige kontinuierliche Sucrosegradient mit Hilfe des „Gradient Master ip 107“ nach Angaben des Herstellers (für TLS55 Zentrifugenröhrchen; passend für TLA55 und S55S Rotoren) vorbereitet werden. Anschließend wurde der Vesikelansatz vorsichtig auf den Gradienten pipettiert und für 2 h bei 55 000 rpm und 4° C zentrifugiert (Ultrazentrifugen TL-100 oder Discovery™ M150SE, Rotoren TLA55, S55S). Das Fraktionierung erfolgte dann in 100 µl-Schritten, von denen jeweils 30 µl abgenommen, mit 10 µl 4 x LDS Probenpuffer (NuPAGE®) versetzt und für 5 min bei 95° C inkubiert wurden. Diese Proben konnten nun durch SDS-PAGE/Western-Blot analysiert werden.

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 Fixierung von *S. cerevisiae*-Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Fixierung der Hefezellen erfolgte nach einem Protokoll des Koshland Labors (www.ciwemb.edu/labs/koshland/Protocols/Microscopy/gfpfix.html).

Paraformaldehyd-Lösung:

4 g Paraformaldehyd
3,4 g Sucrose
ad 100 ml H₂O

Sorbitol-Puffer:

1 M Sorbitol
50 mM KPO₄
pH 6,5

Zur Herstellung der Lösung wurde das Paraformaldehyd in dem warmen H₂O mit Hilfe einiger Tropfen NaOH gelöst. Danach erfolgte die Zugabe der Sucrose und anschließend konnte die Lösung sterilfiltriert und bei 4° C gelagert werden.

Für die Fixierung wurden ca. 0,5 ml einer Hefe-Kultur geerntet (4 min, RT, 2 000 rpm, Rotor F-45-24-11) und das Pellet in 100 µl Paraformaldehyd-Lösung aufgenommen. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen in Sorbitol-Puffer gewaschen und konnten so für einige Zeit aufbewahrt und mikroskopisch untersucht werden.

2.9.2 Immunfluoreszenz von Hefezellen

Diese Methode wurde nach dem Protokoll von Tanja Neumann (Dissertation: „Untersuchung von Proteinkomponenten der ER-Golgi-Recycling-Maschinerie von Hefe“, Georg-August-Universität Göttingen, 2000) durchgeführt.

PBS/Sorbitol:

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄
10 % Sorbitol (w/v)
pH 7,0

Lytikase-Lösung:

10 µl Lytikase
1,4 µl β-Mercaptoethanol
in PBS/Sorbitol

Block-Lösung:

1 % BSA (w/v)
0,5 % Triton X-100 (v/v)
in PBS/Sorbitol

Fixativ:

3,5 % Paraformaldehyd
in PBS/Sorbitol

DAPI-Stocklösung:

1 mg/ml DAPI

Eine *S. cerevisiae*-Übernachtskultur wurde ca. 1:10 im entsprechenden Medium verdünnt und eine Stunde bei 30° C geschüttelt. Anschließend wurden 3.5 OD₆₀₀-Einheiten geerntet (4 min, RT, 2 000 rpm, Rotor F-45-24-11), in 400 µl Fixativ resuspendiert und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen in 1 ml PBS/Sorbitol erfolgte die Sphäroblastierung durch Zugabe von 100 µl Lytikase-Lösung für eine Stunde bei 30° C. Der Zellwand-Abbau konnte dabei am Mikroskop nachvollzogen werden. Das Ernten der Sphäroblasten erfolgte nun bei 500 rpm für 2 min (Rotor F-45-24-11) und nach drei Waschschritten in 1 ml PBS/Sorbitol wurden sie in 50 µl PBS/Sorbitol aufgenommen.

Die Beschichtung der 10-Loch-Objektträger erfolgte mit je 25 µl Poly-L-Lysin für 10 min. Anschließend wurde die restliche Lösung abgesaugt und nach Eintrocknung der Chemikalie folgten drei Waschschrritte (20 µl je well, 3 min).

Zur Anheftung der Sphäroblasten an den Objektträger wurden je Loch 15 µl der Suspension gegeben, für 15 min inkubiert und anschließend der Überschuss abgesaugt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 10-minütige Zugabe der Block-Lösung (20 µl/Loch) abgesättigt, gefolgt vom Absaugen der überschüssigen Lösung. Nun wurde der gewünschte primäre Antikörper (1:500 in Block-Lösung, 20 µl/Loch) auf die angehefteten Zellen gegeben und für 2 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 20 µl PBS/Sorbitol pro Loch für je 3 min erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper (1:100 in Block-Lösung, 20 µl/Loch) für 30 min wiederum bei RT in einer Feuchtkammer. Anschließend folgten zehn Waschschrritte mit 20 µl PBS/Sorbitol pro Loch für je 3 min. Während des siebten Schrittes wurde der Waschlösung zusätzlich 1 µg/ml DAPI zugefügt, um die Zellkerne anzufärben. Nach Zugabe von je einem Tropfen „DAKO“-Fluoreszenzmedium folgte die Abdeckung mit einem Deckgläschen (24 x 60 mm). Nach dieser Behandlung konnten die Zellen mehrere Tage bei 4° C gelagert und unter dem Mikroskop untersucht werden.

2.9.3 Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen

Für mikroskopische Aufnahmen wurden die fixierten (siehe Kapitel 2.9.1) oder unfixierten Zellen zusammen mit „DAKO“-Fluoreszenzmedium auf Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach kurzer Trocknungszeit konnten die so vorbereiteten Zellen untersucht werden.

Mikroskopische Untersuchungen wurden bei 25° C Raumtemperatur durchgeführt. Bei Aufnahmen mit dem Epifluoreszenzmikroskop DM6000B (Leica) bzw. mit dem Axiophot Fluoreszenzmikroskop wurden die in Kapitel 2.1.9 angegebenen Objektive und Filter verwendet. Bilder wurden mit einer CCD Kamera (AxioCam MRm) und der MRGrab Software (Zeiss) aufgenommen und anschließend lediglich hinsichtlich Glättungen und/oder Kontraststreckungen mit der Software ImageJ (NIH),

Adobe Photoshop oder MetaMorph bearbeitet. Mit dem Konfokalmikroskop TCS SP5 (Leica) und dem TCS STED Mikroskop (Leica) wurden GFP Fusionsproteine mit einem Argonlaser (488 nm) angeregt und die Fluoreszenz bei 500-625 nm detektiert.

2.9.4 Zeitraffer-Aufnahmen von *S. cerevisiae*-Zellen

Für Zeitraffer-Aufnahmen von *S. cerevisiae*-Zellen wurde diese in eine, mit frischem Medium gefüllte, Durchflussskammer transferiert. Zum Inhibieren der Zellbewegungen wurden die Zellen in 1 %iger (w/v) *Low-melting Point Agarose* eingebettet. Für den Zeitraffereffekt wurde alle 5 sek für insgesamt 30 min ein Bild am Epifluoreszenz-Mikroskop (Plan-Apo 100x1.4 NA) aufgenommen (25° C) und anschließend wie vorher beschrieben bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Vorstellung der *tandem affinity purification*-Methode

Die so genannte TAP-(*tandem affinity purification*)-Methode erlaubt die schnelle Aufreinigung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen ohne vorherige Kenntnisse über Zusammensetzung, Aktivität oder Funktion des Komplexes (Rigaut et al. 1999, Puig et al. 2001). Für diese Technik ist es notwendig, gentechnisch eine Fusion des zu untersuchenden Gens mit TAPtag-kodierenden Sequenzen herzustellen (am 5'-Ende oder am 3'-Ende). Dabei unterscheiden sich die *Tags* in ihrer Zusammensetzung nur wenig (Abb. 7). Es gibt auch die Möglichkeit entsprechende Stämme kommerziell zu erwerben (Open Biosystems).



Abb. 7: Schematische Darstellung des C- und N-terminalen TAPtags. Abkürzungen: CBP: calmodulin binding peptide, TEV: TEV protease cleavage site, ProtA: Protein A, EK: Enterokinase

In der Abb. 8 wird das Prinzip einer TAP-Aufreinigung schematisch dargestellt.

Der Protein A-Anteil des TAPtags ermöglicht die Bindung des Komplexes an eine IgG-Matrix. Der anschließende Einsatz einer TEV-Protease hat den Zweck, weiterhin unter nativen Bedingungen zu arbeiten und dabei den gesamten Komplex von der IgG-Sepharose lösen zu können. Das Calmodulin-Bindepeptid (CBP) erlaubt im Folgenden eine effiziente Bindung an eine Calmodulin-Matrix und im Anschluss die spezifische Elution von der Affinitätssäule ebenfalls unter milden Bedingungen (Rigaut et al. 1999, Puig et al. 2001). Zwischen den einzelnen Affinitätsreinigungen finden immer wieder intensive Waschschriffe statt, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen.

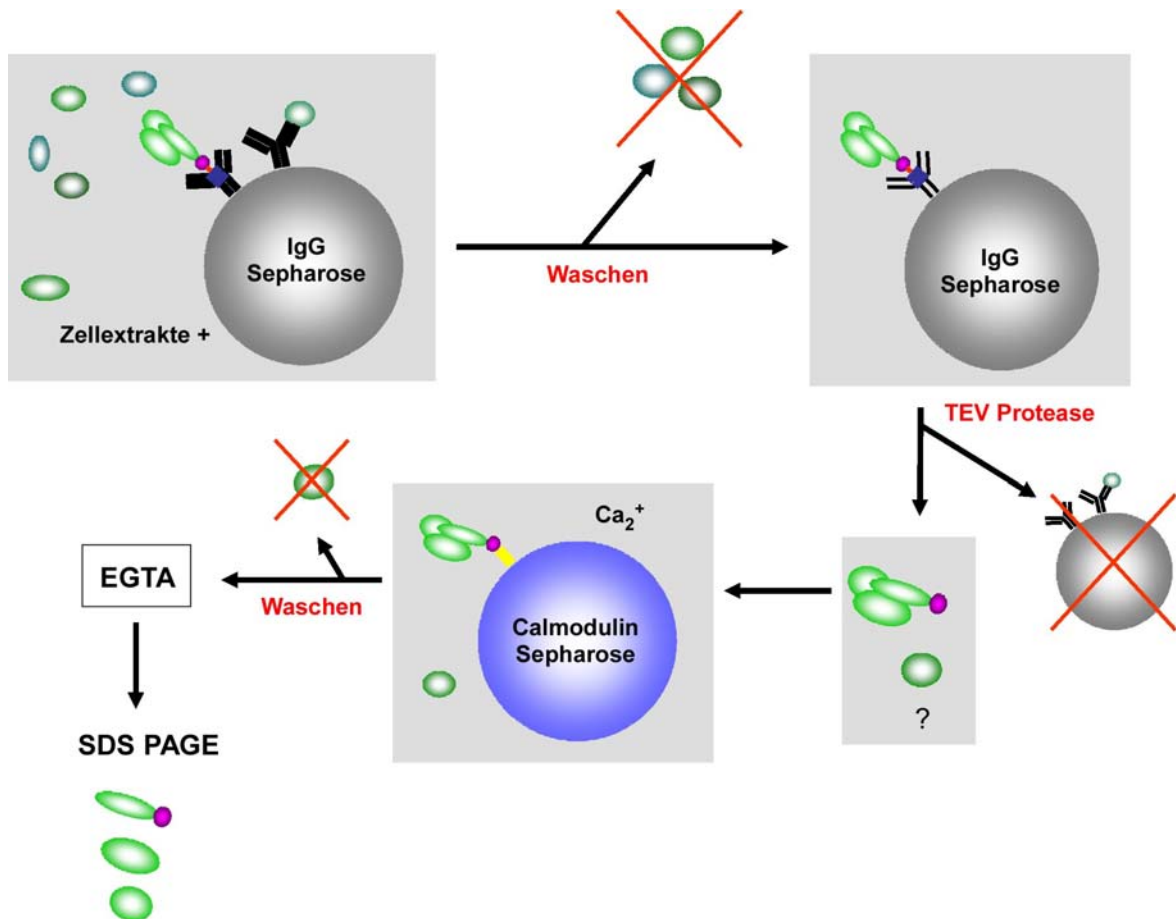


Abb. 8: Prinzip einer TAP-Aufreinigung mit zwei aufeinander folgenden Affinitätsreinigungsschritten.

3.2 Aufreinigung des Dsl/SNARE-Komplexes zur Identifizierung neuer Untereinheiten

Der Dsl1/SNARE-Komplex besteht aus den bisher bekannten Untereinheiten Dsl1p, Dsl3p und Tip20p, die mit den SNARE-Proteinen Sec20p, Use1p und Ufe1p assoziiert sind. Um noch nicht bekannte Untereinheiten des Komplexes zu identifizieren, sollte der Dsl/SNARE-Komplex über die TAP-Methode aufgereinigt und anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert werden. Um einen entsprechenden Stamm zu konstruieren, wurde die GAL-TAP-Kassette aus pBS1761 (1,3 kb *Bam*HI/*Xho*I-Fragment) (Puig et al. 2001) in den integrierbaren Vektor pRS306 (Sikorski und Hieter 1989) kloniert. Mit den Primern *Dsl1upXba*, *Dsl1upBgl*, *Dsl1-Cla-ATG* und *Dsl1-co-rev* wurden die 5' flankierenden Sequenzen von *DSL1* amplifiziert und die PCR-Produkte 5' und 3' an die GAL-TAP-Kassette kloniert (pRS306-dsl1'-GAL-TAP-'dsl1). Anschließend wurde dieses Plasmid mit *Bam*HI geschnitten und in Wildtyp-Hefezellen transformiert damit es zu einer direkten Integration in die homologen kodierenden Regionen von *DSL1* ins Genom kommen konnte. Die Transformanden wurden anschließend auf Ura-Platten (*URA3* in Vektorsequenz) selektiert. In einem zweiten Schritt wurden mit Hilfe von 5-FOA die Zellen ausgewählt, die den Vektor bereits verloren hatten, da durch

die Behandlung mit dieser Chemikalie Hefestämme mit intaktem *URA3* Gen nicht länger lebensfähig sind. Im resultierenden Stamm, GTD1, wird TAP-Dsl1p bei Wachstum in Galaktose-Medium stark überproduziert.

Für eine Analyse in der Massenspektrometrie war es notwendig den Komplex in einem Coomassie-gefärbten Gel sichtbar zu machen. Um das zu ermöglichen, wurden in den Stamm GTD1 *multicopy*-Plasmide (pTM2, pGal-DSL3, pSEC20, pSZ23 und pUSE1) aller bereits bekannten Untereinheiten, außer Dsl1p, transformiert. Die daraus resultierende Überproduktion der Proteine erhöhte gleichzeitig die Möglichkeit für unbekannte Bindungspartner eine Interaktion zum Komplex einzugehen. Die Aufreinigung mit Hilfe der TAP-Markierung wurde erfolgreich durchgeführt und der Komplex konnte nach der SDS-PAGE sowohl über eine Silberfärbung als auch über eine Coomassie-Färbung detektiert werden (Abb. 9).

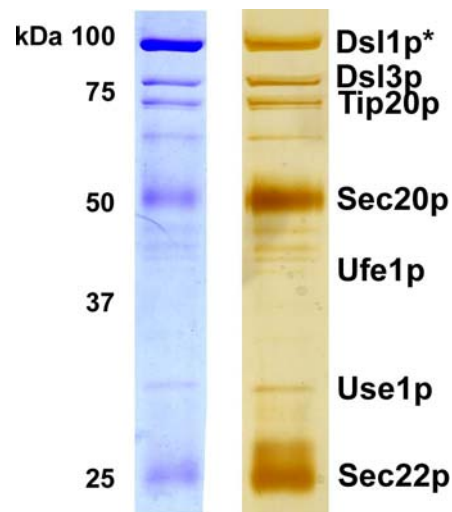


Abb. 9: Aufreinigung des Dsl/SNARE-Komplexes mit Hilfe der TAP-Methode. Auftrennung erfolgte über 12 %ige SDS-Gele. Rechts: Coomassie-Färbung, Links: Silberfärbung. Sec20p und Sec22p-Banden werden durch die schweren bzw. leichten Ketten von IgG überlagert. * N-terminaler TAPtag

Um die Proben für die Massenspektrometrie vorzubereiten, wurde wiederum eine SDS-PAGE durchgeführt, wobei ganz besonders auf Sauberkeit geachtet wurde, um jegliche Kontamination auszuschließen. Nach der Coomassie-Färbung und Entfärbung wurde das Gel in der Arbeitsgruppe Bioanalytische Massenspektrometrie des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie weiter bearbeitet und analysiert. Ein Teil der Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt.

Mass	Score	
88016	1898	ER-localized peripheral membrane protein required for Golgi-ER retrograde traffic, Dsl1p NTAP-tag (Cloning vector pMK33-NTAP) hypothetical protein mhp132 (Mycoplasma hyopneumoniae) TPR repeat (Anabaena variabilis)
20092	213	
85014	41	
96831	40	
82344	677	Protein of unknown function proposed to be involved in protein secretion; Dsl3p/Sec39p
81116	1216	peripheral membrane protein required for fusion of COP-I vesicles with the ER, Tip20p 51aa protein with 3 functional units, keptid unit, Factor X unit, calmodulin binding unit
5741	35	
24420	91	casein alphaS1
8980	36	ferredoxin (Aquifex aeolicus VF5)
60064	355	IGHG1 protein (Homo sapiens)
35862	253	Ig gamma-2 chain C region
43855	146	membrane glycoprotein v-SNARE involved in retrograde transport Golgi to ER, Sec20p positive regulator of sigma-B activity (Bacillus halodurans)
30834	32	
20911	46	hypothetical protein (Porphyra pulchra)
	34	hypothetical protein (Arabidopsis thaliana)
40513	71	t-SNARE required for ER membrane fusion and vesicular traffic, Ufe1p beta-isopropylmalate dehydrogenase (Saccharomyces cerevisiae)
38957	35	
28089	599	essential SNARE protein localized to the ER, involved in retrograde traffic, Use1p
28576	479	immunoglobulin kappa light chain VLJ region (Homo sapiens)
28007	141	protein component of the small 40S ribosomal subunit, nearly identical to Rps0Bp
25023	106	protein component of the small 40S ribosomal subunit; at least basic of the non-acidic ribosom
23502	322	anti-TNF-alpha antibody light chain Fab fragment (Homo sapiens)
23037	97	Ig kappa chain V-III (KAU cold agglutinin) - human
16696	81	calmodulin

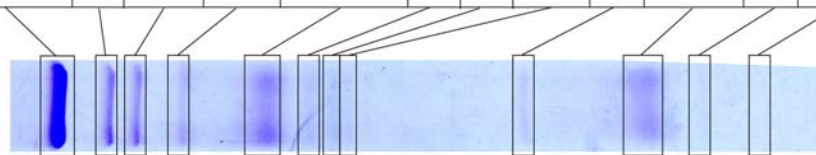


Abb. 10: Auszug aus Originaldaten der Massenspektrometrie. Schon bekannte Untereinheiten des Komplexes sind fett geschrieben. Abbaubanden der Proteine werden nicht mit angezeigt. Der komplette Datensatz kann in Tab. 14 (Anhang) nachgelesen werden.

Wie aus Abb. 10 ersichtlich konnten alle 6 bekannten Untereinheiten des Dsl/SNARE-Komplexes detektiert werden, was gleichzeitig eine gute Kontrolle des Experiments darstellt. Neben Kontaminationen (positiver Regulator der sigma-B Aktivität aus *Bacillus halodurans*,...), degradierten Proteinen (Dsl1p, NTAP-tag...), Überresten der Affinitätsreinigungen (IgG Ketten, Calmodulin,...) und

ubiquitär vorkommenden Hefeproteinen (Komponente der kleinen 40S Ribosomen-Untereinheit,...) konnten jedoch keine neuen Untereinheiten des Komplexes identifiziert werden (siehe auch Tab. 14 im Anhang).

3.3 Wachstumstests verschiedener α -COP-Mutanten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, waren und sind Interaktionen zwischen Dsl1p- und COP-I-Komplex Gegenstand vieler Publikationen (Reilly et al. 2001, Andag et al. 2001, Andag and Schmitt 2003). Um die Relevanz und Bedeutung dieser Wechselbeziehungen näher zu beleuchten, wurden zunächst verschiedene α -COP-Mutanten, welche bereits im Labor verfügbar waren, analysiert, um sie für spätere Interaktionsstudien auszuwählen.

Für einfache Wachstumstests wurde zunächst ein Stamm mit einer α -COP-Deletion und einem Wildtyp α -COP (*URA*-Plasmid) mit bestimmten *HIS*-Plasmiden transformiert, welche die im Folgenden beschriebenen Mutationen tragen. Bei Duden et al. 1998 und Eugster et al. 2000 wird die α -COP-Mutante *ret1-3* besprochen, bei deren Produkt am C-Terminus des Proteins Serin durch Phenylalanin substituiert wurde (Position 1188). Dies führt zu Instabilitäten im COP-I-Komplex und war somit Anlass, C-terminal verkürzte Varianten ($\Delta 19C$, $\Delta 132C$, $\Delta 5C$) und Punktmutationen (R1198A, R1198E, R1198A/R1200A) herzustellen und zu testen. Zusätzlich wurde auch eine Variante mit einer Tryptophan-Alanin-Substitution an Position 870 getestet. Sequenzvergleiche mit Hilfe der *Saccharomyces Genome Database* (www.yeastgenome.org) hatten gezeigt, dass die Region um das Tryptophan 870 der zentralen COP-I-Bindedomäne in Dsl1p gleicht (siehe Tab. 13). In beiden Regionen finden sich hauptsächlich saure Aminosäuren und die konservierten Tryptophane, die jedoch nicht zur WD40-Region gehören.

Tab. 13: Sequenzvergleich der angegebenen Proteine/Domänen. Rot: basische Aminosäuren. Schwarz: neutrale Aminosäuren. Blau: saure Aminosäuren.

Protein	Bereich	Sequenz
α -COP	1183-1201	RIAMISKIGAPASGLRIRV>
δ -COP	242-275	RAGHSATGGMKLGGGAGRRRAGAAPRPSAISSASS
α -COP	848-891	EQEEPLGEEFNDEDIGEDGAWDLGDELDVGEELPEEVEQGE
Dsl1p	410-438	DDDWNNEVEDDDADAW--GDE-IDV--NI-DDEEE
Dsl1p	448-467	EPEEEENAWDEAWAIDENIDD

Die Transformanden wurde auf 5-FOA-Platten gegeben, um auf den Verlust des Wildtyp-Plasmids zu selektieren. Nachdem die Zellen nun lediglich die *HIS3*-Plasmide enthielten, wurden sie als zehnfache Verdünnungen auf Platten getropft und ihr Wachstum bei 30° C bzw. 37 ° C beobachtet. Wie in Abb. 11 zu sehen, sind alle Zellen bei 30° C lebensfähig. Dagegen weisen sowohl die C-terminalen Deletionen ($\Delta 19C$, $\Delta 132C$, $\Delta 5C$) als auch bestimmte Punktmutanten (S1188F, W870A) bzw. Doppelmutanten einen Wachstumsdefekt bei 37°C auf. Diese Temperatursensitivität weist auf die große Bedeutung dieser Regionen in α -COP hin.

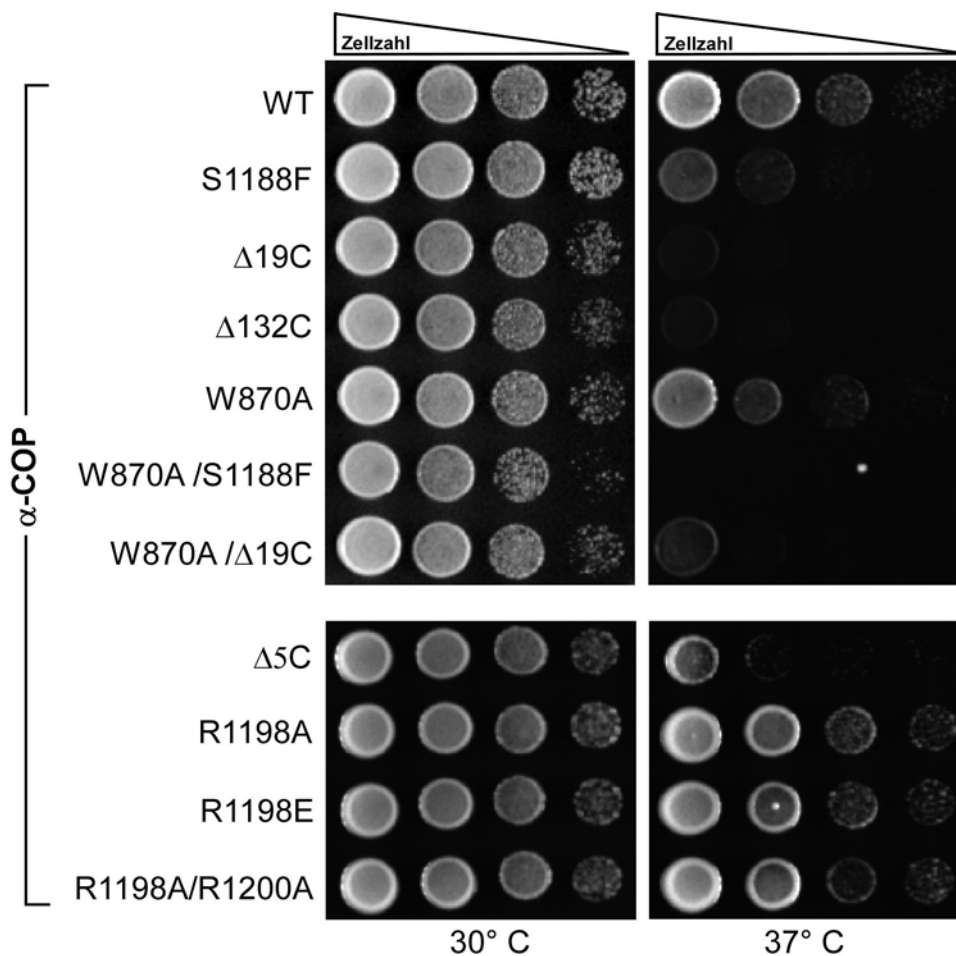


Abb. 11: Wachstumstests verschiedener α -COP-Mutanten. Jeweils 5 μ l der zehnfachen seriellen Verdünnungen wurden auf Vollmediums-Platten getropft und für zwei Tage bei 30° C oder 37° C inkubiert.

3.4 Die Zusammensetzung des COP-I-Komplexes in α -COP-Mutanten

Laut Duden et al. 1998 weist der COP-I-Komplex auch in Zellen mit der S1188F-Mutation in α -COP (*ret1-3*) die gleiche Zusammensetzung auf wie in Wildtyp-Zellen. Allerdings zeigen sie, wie auch einige andere Mutanten, einen ausgeprägten Wachstumsdefekt bei 37°C (Abb. 11). Daher wurden

diese Stämme ausgewählt, um die Zusammensetzung und Stabilität des COP-I-Komplexes zu analysieren. Die zuerst durchgeführte Untersuchung der Zellextrakte geschah durch Detektion der größeren COP-I-Untereinheiten im Western-Blot (Abb. 12). Sie verdeutlichte, dass sich die neu hergestellte $\Delta 19C$ -Mutation stark auf die Stabilität von α -COP auswirkt. Die entsprechenden Spuren (3+6) weisen mehrere Abbaubanden des Proteins auf. Die weiteren getesteten Stämme zeigten dagegen keine oder kaum Unterschiede zum Wildtyp.

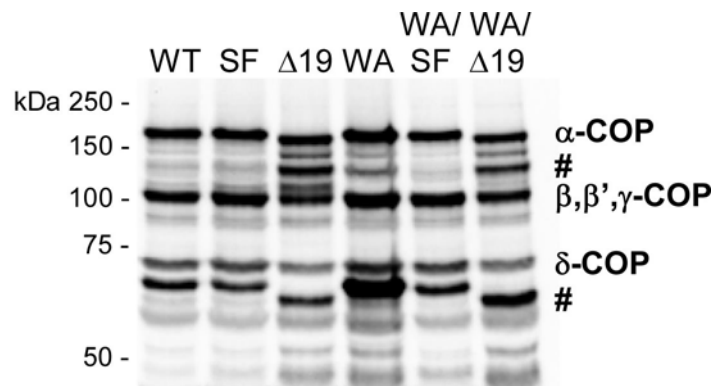


Abb. 12: Stabilität der großen COP-I-Untereinheiten in α -COP-Mutanten. Hefeextrakte der entsprechenden Stämme wurden über eine 8 % SDS-PAGE getrennt. Im anschließenden Western-Blot erfolgte die Detektion der größeren COP-I-Untereinheiten mit COP-I-Antikörper (1:2000).

Um nun die Zusammensetzung des COP-I-Komplexes genauer zu untersuchen, wurden durch Kreuzungen und Transformationen Stämme konstruiert, welche neben α -COP-Mutationen auch je eine COP-I-Untereinheit (β' -COP) mit fusioniertem TAPtag enthielten. Zusätzlich wurden sowohl eine vollständige Version von α -COP direkt mit dem TAPtag versehen, als auch eine $\Delta 19C$ -Version. Mit dieser Markierung und entsprechenden Affinitätsreinigungen (siehe Kapitel 2.8.7) konnte der Hüllproteinkomplex aus den Extrakten der unten angegebenen Stämme isoliert und im Western-Blot analysiert werden. Zur Detektion aller Untereinheiten wurden hier SDS-Gradientengele benutzt, die eine wesentlich bessere Auftrennung sowohl großer als auch kleiner Proteine ermöglichen (Abb. 13). Wie auch schon in Abb. 12 deutlich wurde, zeigen die Mutanten S1188F und $\Delta 19C$ auch hier keine dramatischen Unterschiede in den größeren COP-I-Untereinheiten (α -, β -, β' -, γ - und δ -COP) verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 13 A). Im Gegensatz dazu führt die C-terminale Deletion von α -COP ($\Delta 19C$) zu dem Verlust der ε -COP-Untereinheit, während sich die S1188F-Punktmutante wie der Wildtyp verhielt. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, wenn statt β' -COP die Untereinheit β -COP als TAP-Fusionsprotein benutzt wurde (Daten nicht gezeigt). Abb. 13 B, in der α -COP selbst mit

dem TAPtag versehen ist, bestätigt ebenfalls das Ergebnis den Stamm $\Delta 19C$ und ϵ -COP betreffend. Zusätzlich kann man hier sehen, dass, obwohl ϵ -COP grundsätzlich vorhanden ist (siehe Input), keine Bindung an den COP-I-Komplex stattfindet.

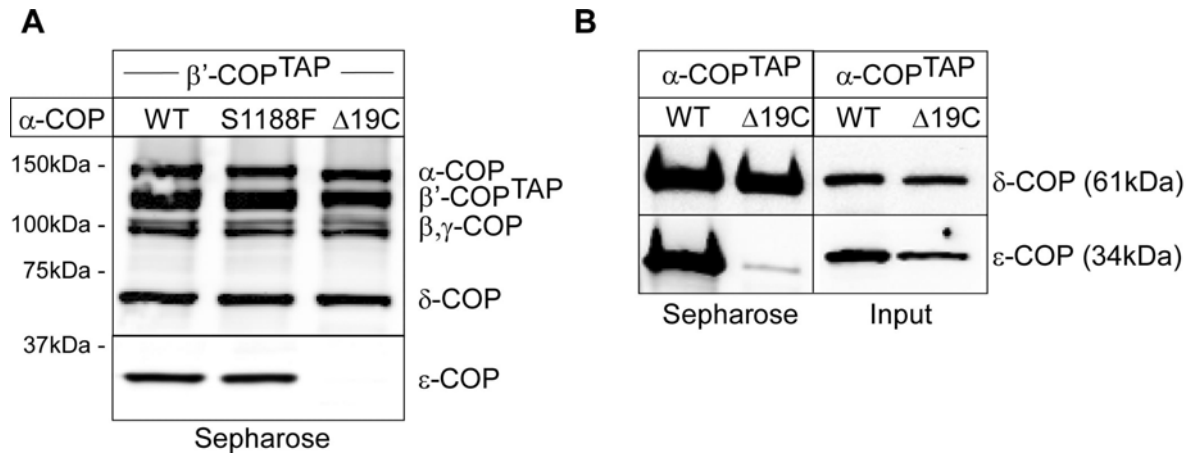


Abb. 13: COP-I-Komplex der über den TAPtag an β' -COP oder α -COP in Wildtyp-, S1188F- oder $\Delta 19C$ -Stämmen aufgereinigt wurde. Zellextrakte wurden mit IgG-Sepharose inkubiert und die gebundenen Proteine über SDS-Gradientengele aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit (A) COP-I-Antikörpern (1:2000) oder (B) δ -COP- und ϵ -COP-Antikörpern (1:2000) detektiert. B): Neben der Sepharose wurde zusätzlich 1/20 der eingesetzten Proteinkonzentration (=Input) aufgetragen.

3.5 Die S1188F-Mutante zeigt temperaturabhängige Effekte

Um zu testen, ob die Punktmutante S1188F tatsächlich Effekte auf den COP-I-Komplex hat, wie von Duden et al. (1998) und Eugster et al. (2000) beschrieben, wurde der vorangegangene Versuch in Abhängigkeit von der Temperatur wiederholt. Dafür wurden die drei Stämme (Wildtyp, $\Delta 19C$ und S1188F) für 0, 4 und 8 Stunden bei 37° C inkubiert und die Zellextrakte wiederum in Affinitätsreinigungen mit anschließendem Western-Blot analysiert. Für einen besseren Überblick wurden die relativen Proteinmengen bestimmt und in einem Diagramm dargestellt, wie in Abb. 14 zu sehen ist.

Im Wildtyp sind zu den drei Zeitpunkten alle der hier untersuchten Untereinheiten zu finden. Die aus diesen Proben resultierenden Proteinkonzentrationen für δ -COP und ϵ -COP wurden für die weitere Analyse der Mutanten auf 100 % gesetzt. Wie zuvor schon gesehen, sind in $\Delta 19C$ Zellen die größeren Untereinheiten im COP-I-Komplex vorhanden, allerdings fehlt ϵ -COP. Das ist auch nach einer 37° C Inkubation für 4 oder 8 Stunden der Fall, wie die Quantifizierungen zeigen. In der S1188F-Mutante zeigt sich für die großen Komplex-Komponenten ein ähnliches Bild, wie aus dem Western-Blot und der Quantifizierung von δ -COP deutlich wird. Der relative Proteingehalt weist zu

den getesteten Zeitpunkten keine bzw. kaum Veränderungen auf. Der Gehalt an ϵ -COP nimmt jedoch mit der Zeit ab und liegt nach 4 Stunden bei 37° C bei ca. 70 % und nach 8 Stunden bei ca. 50 %. Der S1188F-Stamm zeigt ähnliche Defekte wie $\Delta 19C$, wie die Instabilität von α -COP und den Verlust der ϵ -COP Untereinheit.

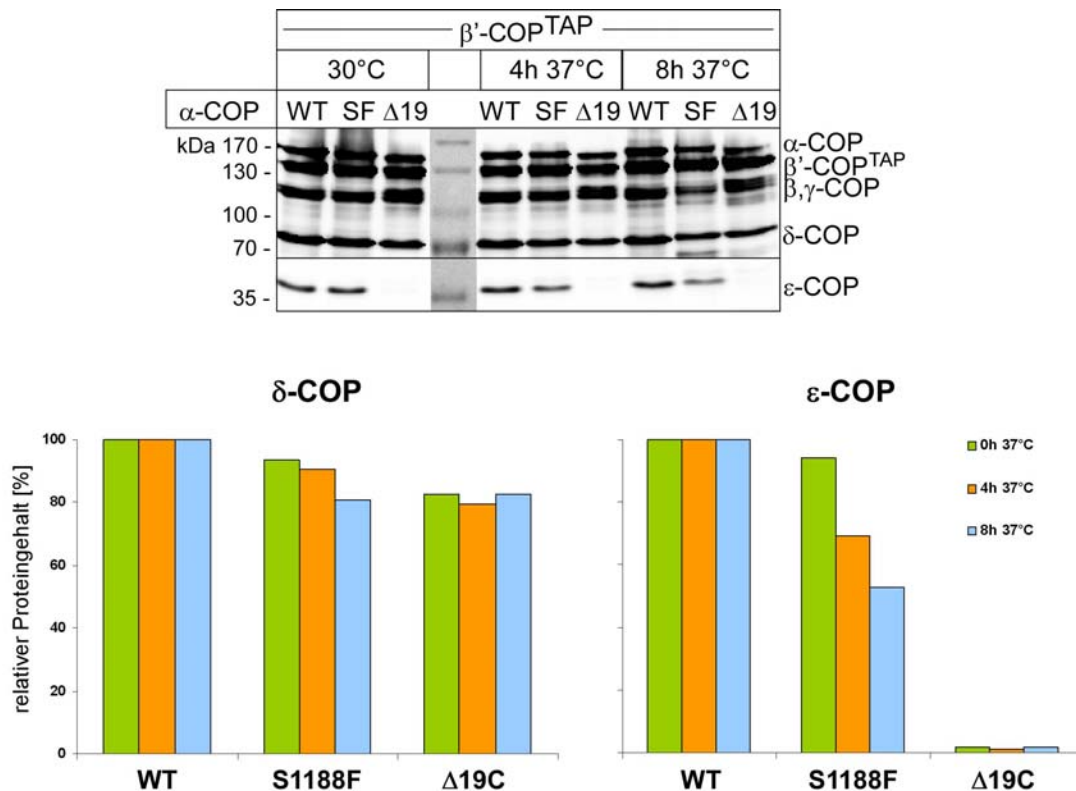


Abb. 14: Temperaturabhängiger Verlust von ϵ -COP aus dem COP-I-Komplex in S1188F-Zellen. Oben: Western-Blot nach 12 % SDS-PAGE der affinitätsgereinigten Extrakte aus den angegebenen Stämmen, welche zuvor für 0, 4 oder 8 h bei 37° C inkubiert wurden. Detektion der Proteine erfolgte mit COP-I-Antikörpern (1:2000). Unten: Quantifizierung der detektierten δ -COP- und ϵ -COP-Proteinbanden vom Wildtyp, S1188F und $\Delta 19C$ mit Lumi-Imager Software. Wildtyp-Konzentrationen wurde jeweils auf 100% gesetzt.

3.6 Die Domäne um das konservierte Tryptophan 870 in α -COP bindet auch COP-I-Untereinheiten

Wie schon kurz in Kapitel 3.3 (Tab. 13) besprochen, weist die zentrale Domäne von α -COP große Ähnlichkeit mit den COP-I-Binderegionen in Dsl1p auf, was auf eine Interaktion von α -COP mit anderen COP-I-Untereinheiten hinweisen könnte. Daher wurde diese Domäne in *in vitro* GST-Bindungsexperimenten näher untersucht. Für die Klonierung wurden die in Tab. 8 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Damit ergeben sich für die weitere Expression die in der folgenden Abbildung gezeigten GST-Fusionsproteine.

Wie in Kapitel 2.8.9 beschrieben, wurden bei diesem Versuch Extrakte zweier verschiedener Hefestämme zusammen mit den GST-Peptiden inkubiert und die daran gebundenen Proteine im Western-Blot detektiert. Hierbei wurden neben einem Wildtyp-Stamm auch eine $\Delta 19C$ -Mutante untersucht, um die Relevanz des C-Terminus auf intramolekulare Interaktionen beobachten zu können.

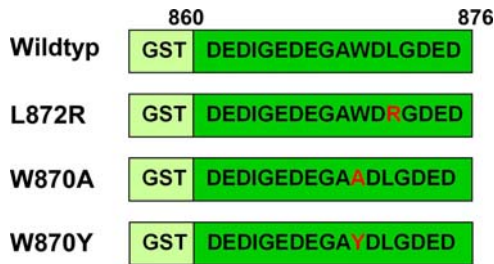


Abb. 15: Grafische Darstellung der verwendeten GST-Fusionsproteine.

Die Abb. 16 zeigt, dass nur das Wildtyp GST-Fusionsprotein in der Lage ist, COP-I-Untereinheiten (δ - und ϵ -COP) aus einem Wildtyp-Stamm zu binden. COP-I-Antikörper konnten dabei nicht verwendet werden, da sie durch ihre Bindung an die GST-Peptide für ein sehr hohes Hintergrundsignal sorgten. Mutationen in der Region um das Tryptophan 870 scheinen die Bindungskapazität der Domäne zu stören, da bei Versuchen mit entsprechenden Peptiden kein bzw. kaum δ - oder ϵ -COP detektiert werden kann. COP-I-Untereinheiten aus einem α -COP $_{\Delta 19C}$ -Stamm dagegen können selbst vom Wildtyp-Peptid nicht gebunden werden (Abb. 16 rechts).

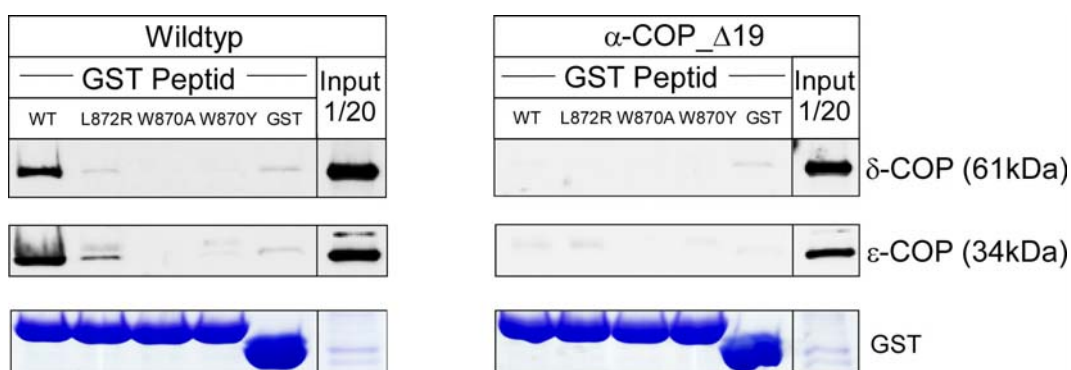


Abb. 16: Die möglichen intramolekularen Interaktionen werden sowohl durch Mutationen der zentralen Region als auch durch C-terminale Mutationen in α -COP gestört. Western-Blot / SDS-Gel von GST-Bindungsexperimenten. Obere Felder: 10 % SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot. Detektion der gebundenen Proteine mit δ -COP- und ϵ -COP-Antikörpern (1:2000). Unteres Feld: 12 % SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zum sichtbar machen der GST-Peptide als Kontrolle.

In beiden Fällen gelten die mit „Input“ bezeichneten Spuren und die Coomassie-gefärbten GST-Banden als Ladekontrolle. Sie sollen zeigen, dass die gebundenen Proteine nicht das Resultat unspezifischer Bindungen oder falscher Beladung sind. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der beiden hier untersuchten α -COP-Domänen (C-Terminus und Bereich um W870) und deren Rolle in einer intramolekularen Interaktion, die allerdings noch genauere Untersuchungen benötigt.

3.7 Mutationen des Dsl/SNARE-Komplexes stören die Interaktion mit dem COP-I-Komplex

Wie bereits in einigen Veröffentlichungen gezeigt, ist die zentrale Domäne in Dsl1p für die Interaktion mit verschiedenen Untereinheiten des COP-I-Komplexes verantwortlich (Andag et al. 2001, Reilly et al 2001, Andag and Schmitt 2003). Eine entscheidende Rolle spielen dabei vor allem die fünf Tryptophane W413, W415, W425, W455 und W459, welche teilweise bereits untersucht wurden (Andag and Schmitt 2003). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Einzelmutanten (*DSL1_W413A*, *DSL1_W455A*) als auch Doppelmutanten (*DSL1_W413A_W455A*) eine verminderte Bindung zu δ -COP sowie Wachstumsdefekte aufzeigen. Da bisher keine weiteren Untersuchungen dieser sauren Domäne bezüglich der COP-I-Bindung erfolgt sind, wurden hier weitere Mutanten hergestellt und in Interaktionsexperimenten getestet.

Um Hefestämme herzustellen, die ein Dsl1p produzieren in dem alle fünf zentralen Tryptophane durch Alanine ersetzt sind, wurde eine gezielte Mutagenese über PCR und Ligationen durchgeführt. Die entsprechenden mutierten Gene konnten dann in das zuvor schon für den TAPtag benutzte Plasmid pRS306-dsl1'-GAL-TAP-'dsl1 über geeignete Restriktionsschnittstellen kloniert werden.

Die so konstruierten Plasmide pGTDSL1, pGTW425A und pGT5xWA wurden in einen Wildtyp-Stamm transformiert. Somit trug dieser Stamm neben einem genomischen *DSL1* entweder ein weiteres Wildtyp *DSL1* oder *dsl1*-Allele, bei deren Produkt entweder das Tryptophan 425 mit Alanin ausgetauscht ist oder in dem die Tryptophane 413, 415, 425, 455 und 459 durch Alaninreste ersetzt sind. Bei allen plasmidkodierten Kopien war das Gen an einen TAPtag fusioniert und konnte über einen Galaktose-induzierbaren Promotor reguliert werden. Die auf Leu-Medium gewachsenen Transformanden konnten dann in Galaktose-Medium angezogen und mit den gewonnenen Extrakten Affinitätsreinigungen durchgeführt werden. In anschließenden Western-Blot-Analysen der an Dsl1p^{TAP} gebundenen COP-I-Untereinheiten wurden hier exemplarisch δ - und ϵ -COP detektiert (Abb. 17A). Abb. 17 B zeigt die Quantifizierung als Ergebnis dreier unabhängiger Versuche. Die *dsl1_W425A* Mutante zeigt eine zu 58 % (δ -COP) bzw. 34 % (ϵ -COP) verminderte Interaktion zu den COP-I-Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp. Die 5xWA-Variante dagegen hebt die Bindung weitgehend auf (23 % für δ -COP, 6 % für ϵ -COP), was die Bedeutung der fünf Tryptophane für diese Interaktion zwischen COP-I-Komplex und Dsl1p bestätigt.

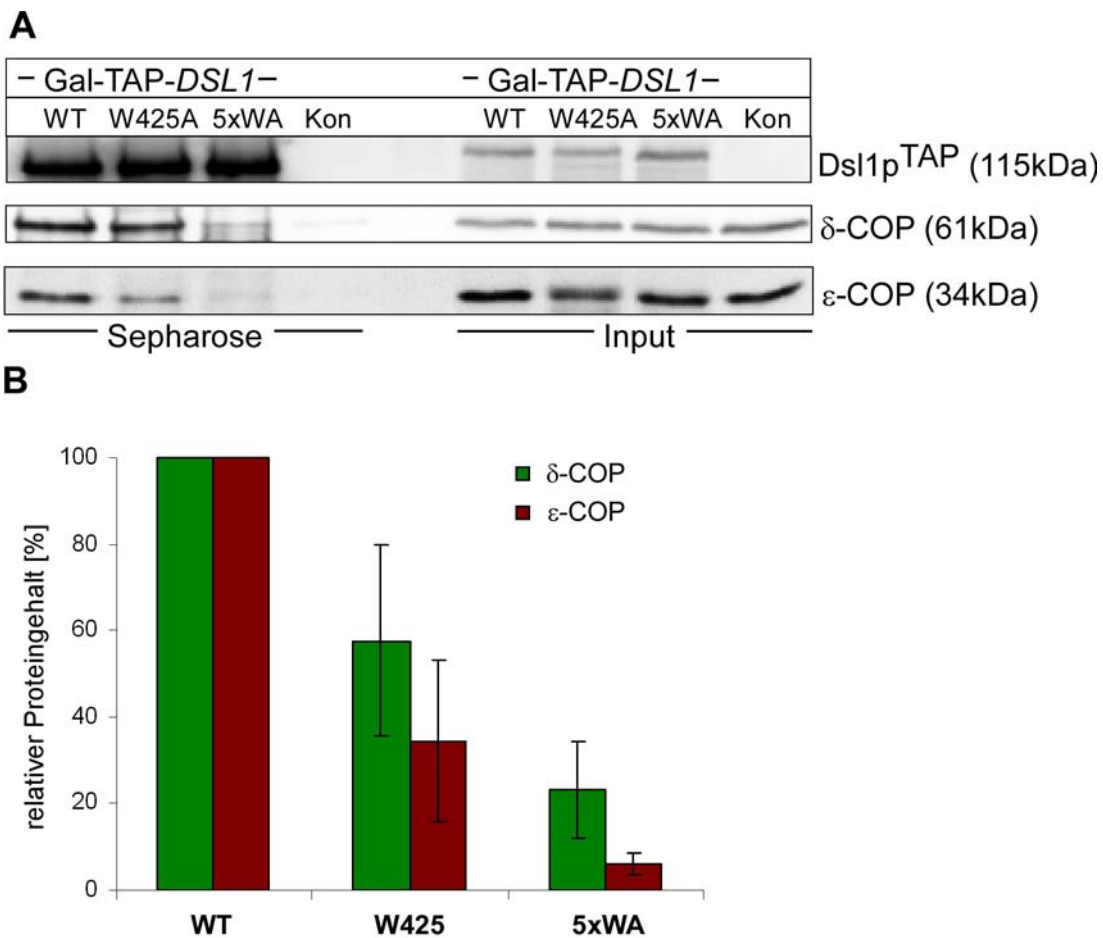


Abb. 17: Affinitätsreinigungs-Versuche zur Bindung von COP-I-Untereinheiten an GAL-TAP-*DSL1*, GAL-TAP-*dsl1_W425A* und GAL-TAP-*dsl1_5xWA*. A) 10% SDS-PAGE und anschließender Western-Blot. Detektion der gebundenen Proteine mit δ -COP- und ϵ -COP-Antikörpern (1:2000). B) Quantifizierung der Banden erfolgte mit Lumi-Imager Software. Detektiertes Dsl1p und die jeweiligen Wildtyp-Banden wurden als 100 % Wert angenommen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

3.8 Kombinationen von mutiertem Dsl1p und α -COP verursachen schwere Wachstumsdefekte

Um die Bedeutung dieser Tryptophan-Reste weiter zu untersuchen, wurden Stämme getestet, die neben einem Galaktose-induzierbaren genomischen *DSL1* auch Wildtyp *DSL1* und *dsl_5xWA* auf einem Plasmid tragen. So konnte bei Wachstum auf Glukose der Effekt der plasmid-kodierten Gene analysiert werden, da die Expression des genomischen *DSL1* unterdrückt werden konnte. Daneben trugen diese Stämme auch verschiedene Mutationen in diversen COP-I-Untereinheiten um näher auf spezifische synthetische Effekte, das Wachstum betreffend, eingehen zu können. Es handelt sich dabei um die folgenden Mutationen: α -COP_S1188F (Duden et al. 1998 und Eugster et al. 2000), α -COP_ Δ 19C, δ -COP^{ts} (*ret2-1*), ϵ -COP Δ (*sec28\Delta*), β '-COP^{ts} (*sec27-1*) und ζ -COP^{ts} (*ret3-1*). Alle

diese Stämme wurden in zehnfachen seriellen Verdünnungen auf Galaktose- und Glukose-Platten gegeben und das Wachstum nach zwei bzw. drei Tagen bei 25° C dokumentiert.

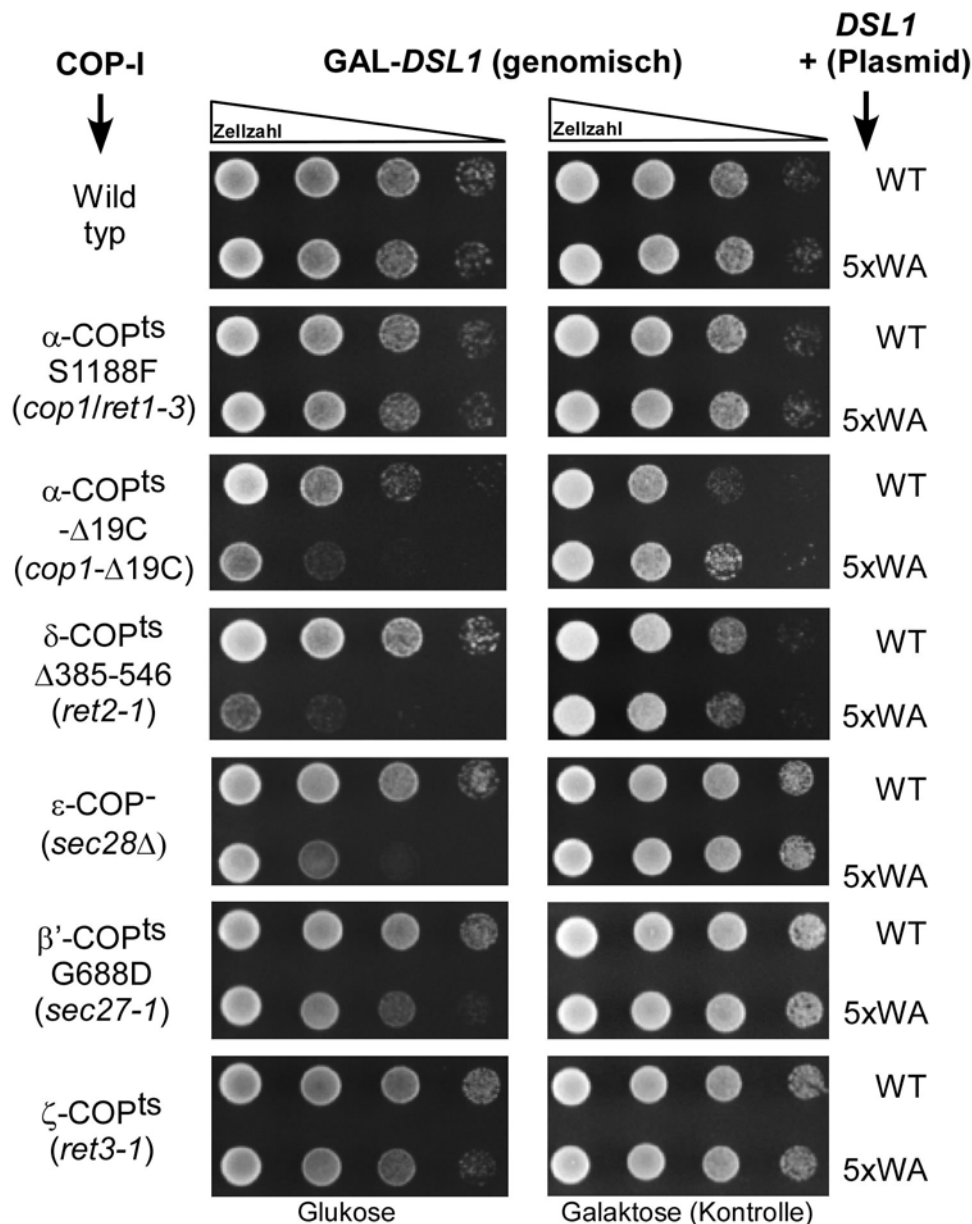


Abb. 18: Wachstumstests von *S. cerevisiae*-Stämmen mit Kombinationen aus COP-I- und *DSL1*-Allelen. Je 5 μ l der zehnfachen seriellen Verdünnungen wurden auf Glukose- oder Galaktose-Platten getropft und anschließend für zwei Tage bei 25° C inkubiert. Galaktose-Platten dienten wegen der Anwesenheit des GAL-Promotor vor *DSL1* (im Genom) als Kontrolle. Auf Glukose dagegen wird nur das *DSL1*-Allel vom Plasmid (WT oder 5xWA) exprimiert.

Die ersten Felder der Abb. 18 zeigen, dass Zellen mit Wildtyp *DSL1* und auch mit *ds1_5xWA* lebensfähig sind, solange keine weiteren Mutationen vorliegen. Das steht allerdings im Widerspruch zu Daten von Andag und Schmitt (2003), die die Doppelmutante *ds1_W413A/W455A* als letal

beschrieben hatten. Spätere Kontrollsequenzierungen offenbarten jedoch zusätzliche Defekte im dort verwendeten plasmidkodierten Gen und damit ein falsches Ergebnis. Wie zu erwarten, scheint keine der untersuchten COP-I-Mutationen zusammen mit Wildtyp *DSL1* einen verschlimmernden Effekt auf das Wachstum zu haben. Die Mutationen α -COP_S1188F, β' -COP^{ts} oder ζ -COP^{ts} in Kombination mit *dsl1_5xWA* haben ebenfalls nur geringe Auswirkungen auf das Wachstum der Stämme. Dagegen führen die Kombinationen von *dsl1_5xWA* mit α -COP_Δ19C, δ -COP^{ts} oder ε -COPΔ (Felder 3, 4 und 5) zu schwerwiegenden Wachstumsdefekten.

Diese genetischen Interaktionen, welche hier eindeutig durch die Wachstumsstörungen einiger bestimmter Kombinationen identifiziert wurden, bestätigen somit die bereits gezeigten biochemischen Wechselwirkungen.

3.9 Bestätigung der *in vivo*-Resultate durch GST-Bindungsexperimente

Um die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche zu verifizieren und gleichzeitig die für die Interaktion wichtigen Domänen näher zu charakterisieren, wurden *in vitro* GST-Bindungsexperimente durchgeführt. Dafür wurden die in Tab. 8 aufgeführten Oligonukleotide WxWxxxA_for/rev und AxAxxxW_for/rev als Fusionen an GST-kodierenden Sequenzen exprimiert. Das erste Peptid Dsl1p_WxWxxxA diente als Kontrolle, da es durch die beiden Tryptophane an den Positionen 413 und 415 vorzugsweise an δ -COP bindet, durch die Tryptophan-Alanin-Substitution an Position 425 jedoch nicht an α -COP. Mit dem GST-Peptid Dsl1p_AxAxxxW dagegen sollte die Bindung zu α -COP funktionieren, da das Tryptophan 425 im Unterschied zu denen an den Positionen 413 und 415 intakt ist (Andag und Schmitt 2003).

Wie in Kapitel 2.8.9 bereits beschrieben, wurden bei diesem Versuch Extrakte verschiedener Hefestämme zusammen mit den GST-Peptiden inkubiert und die gebundenen Proteine per Western-Blot detektiert. Hierfür wurden Stämme mit verschiedenen α -COP-Allelen benutzt, um neben dem zuständigen Motiv in Dsl1p auch die α -COP-Interaktionsdomäne zu bestimmen. Daher wurden der Wildtyp (WT) und die Mutanten α -COP_S1188F, die Δ19C und die Δ5C verwendet.

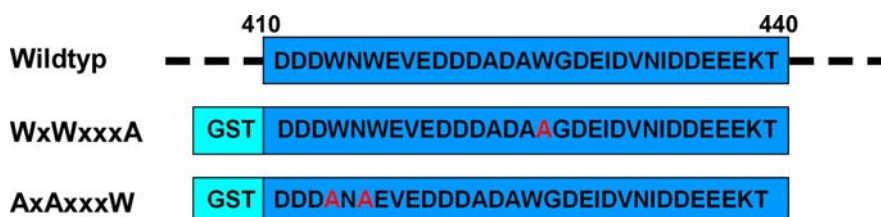


Abb. 19: Grafische Darstellung der verwendeten GST-Fusionsproteine.

Wie in den ersten drei Spuren der Abb. 20 zu erkennen ist, bindet der COP-I Komplex sehr effizient an ein von Dsl1p abgeleitetes Peptid der Region 410-440 mit intakter δ -COP-Bindestelle (WxWxxxA). Außer ζ -COP konnten alle Untereinheiten des Komplexes detektiert werden. Das gilt sowohl für den Wildtyp als auch für die S1188F- und die Δ 19C-Mutante. Das Peptid mit intakter α -COP-Binderegion (AxAxxxW) ist ebenfalls in der Lage den Wildtyp und den S1188F COP-I Komplex zu binden (Spur 4 und 6). Im Gegensatz dazu führt eine Deletion der letzten 19 Aminosäuren in α -COP zu einem fast vollständigen Verlust der Interaktion zwischen Dsl1p und dem Komplex (Spur 5 und 8). Deletiert man dagegen lediglich 5 Aminosäuren (Δ 5C, Spur 9) hat das keinen Effekt auf die Bindung.

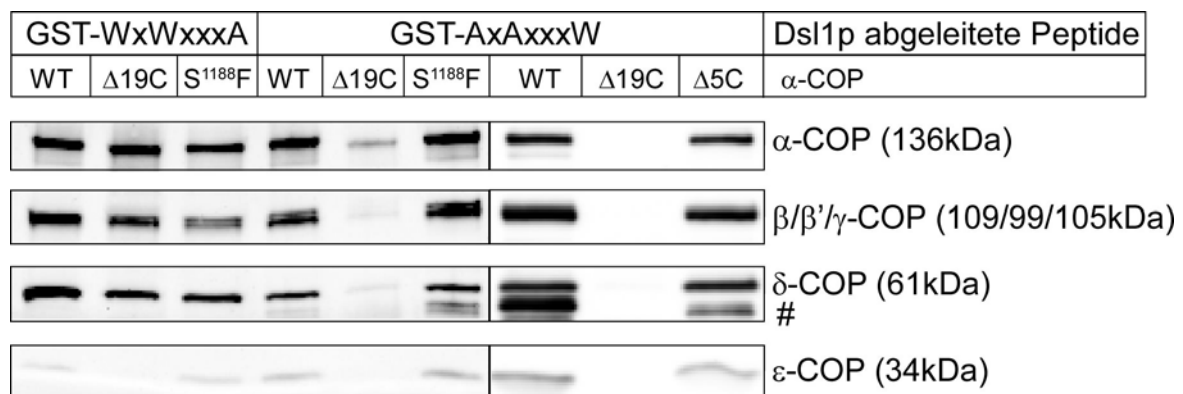


Abb. 20: GST-Bindungsexperimente mit Dsl1p-Peptiden und verschiedenen α -COP-Stämmen. SDS-PAGE und anschließender Western-Blot, bei dem die gebundenen Proteine mit COP-I-Antikörpern (1:2000) detektiert wurden.

#: α -COP-Abbaubande.

Dieses Resultat zeigt wieder deutlich, dass Dsl1p über die Tryptophan-Motive in der Lage ist, mit einigen der COP-I-Untereinheiten zu interagieren. Gleichzeitig deutet es auf den C-Terminus, genauer die Aminosäurereste 1183-1196 der α -COP Untereinheit, als wichtigste Interaktionsdomäne hin.

3.10 Bestätigung der α -COP/Dsl1p-Interaktion durch die Yeast-2-Hybrid-Methode

Die Interaktion zwischen Dsl/SNARE-Komplex und COP-I-Komplex, welche die Untereinheiten Dsl1p und δ -COP betrifft, wurde zuerst durch die Yeast-2-Hybrid-Methode gefunden (Reilly et al. 2001, Andag und Schmitt 2003). Um die vorhergehenden Ergebnisse durch weitere *in vivo* Daten bestätigen zu können, sollte die Wechselwirkung zwischen Dsl1p und α -COP ebenfalls mit dieser Methode untersucht werden. Da laut Duden et al. (1998) ϵ -COP zur Stabilisierung des COP-I-

Komplexes benötigt wird, ist es vorstellbar, dass diese Untereinheit auch bei der α -COP/Dsl1p-Interaktion eine entscheidende Rolle spielt. Aus diesem Grund wurde auch ε -COP in diesen Versuch mit einbezogen.

Mit einem Yeast-2-Hybrid-Assay ist es möglich, Wechselwirkungen zwischen Proteinen *in vivo* darzustellen. Dafür notwendig ist die Rekonstitution eines funktionierenden GAL4-Transkriptionsfaktors aus zwei verschiedenen Domänen, eine zum Binden an die DNA (DNA Bindedomäne BD) und eine zur Aktivierung der Transkription (Aktivierungsdomäne AD). Die zu untersuchenden Gene werden jeweils an diese Regionen in den entsprechenden Plasmiden (pGAD-C1 und pGBU-C1) kloniert und anschließend in einen passenden Stamm cotransformiert (PJ69-4A, *gal4* Δ). Kommt es zu einer Interaktion zwischen den entsprechenden Proteinen, wird der GAL4-Transkriptionsfaktor durch das Zusammenbringen der zwei Domänen wirksam. Als Folge dessen kann das Reportergen, welchem eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor vorgeschaltet ist, abgelesen werden (James et al. 1996). In diesem Versuch wurde dafür *ADE2* verwendet, so dass bei erfolgreicher Wechselwirkung der Stamm auf entsprechenden Platten ohne Adenin wachsen kann.

Da das bei Reilly et al. (2001) und Andag und Schmitt (2003) verwendete Plasmid pBR2 (*DSL1* an GAL4-Bindedomäne) schon im Labor verfügbar war, konnte es für den hier gezeigten Versuch direkt verwendet werden. Wildtyp α -COP, aber auch die bereits untersuchten S1188F- und Δ 19C-Mutanten sollten als AD-Fusionsproteine hergestellt werden. Für die Klonierungen wurden die Gene per PCR amplifiziert und das Produkt in TOPO-Plasmide transformiert. Anschließend erfolgte über *Bam*HI- und *Sal*I-Restriktionsschnittstellen die Klonierung in pGAD-C1. Zusätzlich wurde *SEC28* (ε -COP) ebenfalls über PCR und TOPO-Klonierung in PBR2 eingefügt.

Die Kontrollspalten 1, 3 und 5 (SD-leu-ura) der Abb. 21 zeigen die erfolgreichen Transformationen der Plasmide (Leu⁺ und Ura⁺) in den Stamm PJ69-4A. Exprimiert man die „nackten“ Vektoren (Binde- und Aktivierungsdomäne ohne Fusionsprotein) zusammen mit Fusionsprotein-tragenden Vektoren kommt es zu keinen Wechselwirkungen (für BD: Spalte 2, für AD: oberste Reihe in Spalte 2, 4 und 6). Zwischen *DSL1* WT und α -COP WT ist eine schwache aber spezifische Interaktion zu beobachten, da nur diese Kombination zum Wachstum des Stammes führt (Spur 4, Reihe 2), nicht jedoch die Kombination von *DSL1* WT und C-terminal mutiertem α -COP (Δ 19C und S1188F) (Spur 4, Reihen 3 und 4). Ein zusätzliches ε -COP ist in der Lage, zumindest die Wirkung der S1188F Mutation wieder aufzuheben und damit eine Wechselwirkung zwischen α -COP/Dsl1p zu erlauben (Spur 6, Reihe 4).

Das hier erzielte Resultat bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse zur Interaktion zwischen α -COP und Dsl1p und die Bedeutung der C-terminalen Aminosäurereste von α -COP ($\Delta 19C$) sowie ε -COP.

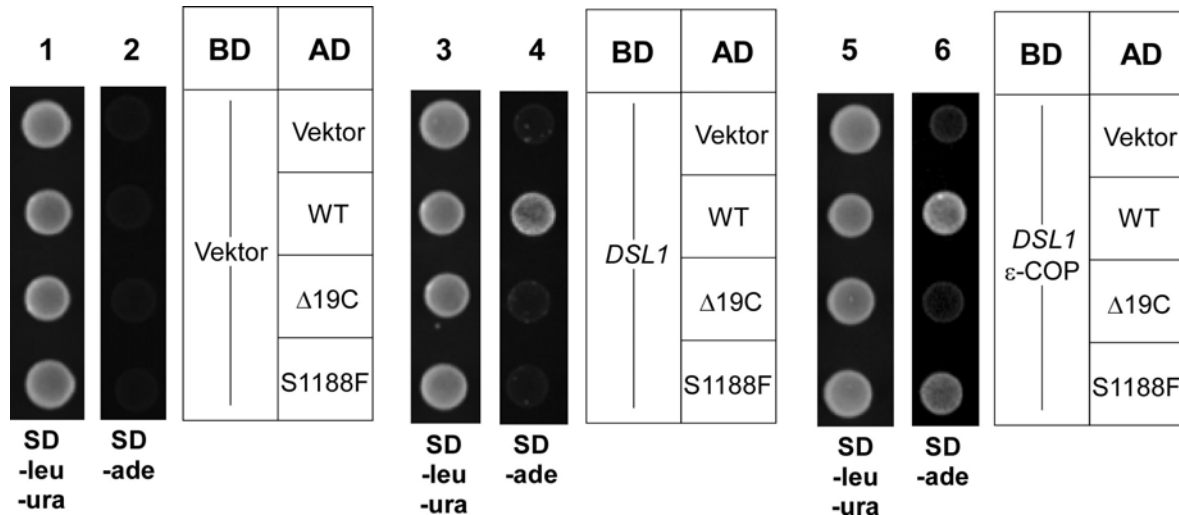


Abb. 21: Wachstumstest für Yeast-2-Hybrid-Interaktionen. 5 μ l des mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Stammes wurde auf SD-leu-ura (Kontrolle) und SD-ade Platten aufgetropft. Die Auswertung erfolgte nach zwei Tagen (SD-leu-ura) bzw. nach sieben Tagen (SD-ade) bei 25° C. Wachstum auf SD-ade bedeutet Interaktion der entsprechenden Proteine.

3.11 Das Ausschalten von *DSL1* führt zu dramatischen Effekten in der Zelle

In früheren Arbeiten (Andag et al. 2001) wurde bereits eine *dsl1-22*-Mutante auf ihre Beziehungen zum COP-I-Komplex hin untersucht. Unter anderem wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie analysiert, ob in diesem Stamm ER-Membranen oder Vesikel akkumulieren. Das geschah auf Grundlage der Erkenntnisse von Kaiser und Schekman (1990). Danach häufen sich in Mutanten mit Defekten in der Vesikelentstehung Membranen an, während es in Fusions-Mutanten zu einer Ansammlung von Vesikeln kommt. Im *dsl1-22*-Stamm wurde eine Akkumulation von ER-Membranen beobachtet, was eventuell durch sekundäre Effekte im Vorwärtstransport verursacht wird. Da diese Mutation allerdings nur die 30 C-terminalen Aminosäurereste betraf und keine der Interaktionsdomänen zu COP-I-Untereinheiten, sollten weitere *dsl1*-Mutanten auf eine Akkumulation von Vesikeln hin untersucht werden.

Als erstes wurde dafür ein neuer Stamm konstruiert, in dem das *DSL1* Gen mit Hilfe eines durch Galaktose induzierbaren Promotors ausgeschaltet werden konnte. Dafür wurde der *GAL*-Promotor und die TAP-Sequenz mit Hilfe der *AgeI*- und *ClaI*-Restriktionsschnittstellen aus einem pRS206-*dsl1'*-*GAL*-TAP-*dsl1'* Integrationsplasmid (siehe Kapitel 2.8.1) entfernt und durch eine *GAL*-

Promotor-Sequenz ohne TAP-Sequenz ersetzt. Um dieses Plasmid in einen Hefestamm einzuführen, wurde es mit *Bam*HI in der *DSL1*-Sequenz geschnitten und anschließend transformiert. Nach erfolgter Integration in die homologen Regionen mussten entsprechende Zellen auf Galaktose-Medium ohne Uracil selektiert werden, da das essentielle *DSL1* Gen nur auf Galaktose exprimiert wird. Nach einigen Kontrollversuchen, in denen die korrekte Integration bestätigt wurde (Bsp.: Western-Blot), konnten die entsprechenden Transformanden (= Stamm GD1) für die weiteren Experimente genutzt werden.

Um *DSL1* auszuschalten und etwaige Effekte beobachten zu können, wurde der so konstruierte Stamm GD1 über Nacht in Glukose-Vollmedium bei 30° C angezogen. Die Zellen konnten anschließend fixiert und ultradünne Cryoschnitte angefertigt werden, die unter dem Elektronenmikroskop untersucht wurden (nach Orth et al. 2007). Beispielhafte Aufnahmen solcher Zellen werden in der Abb. 22 gezeigt.

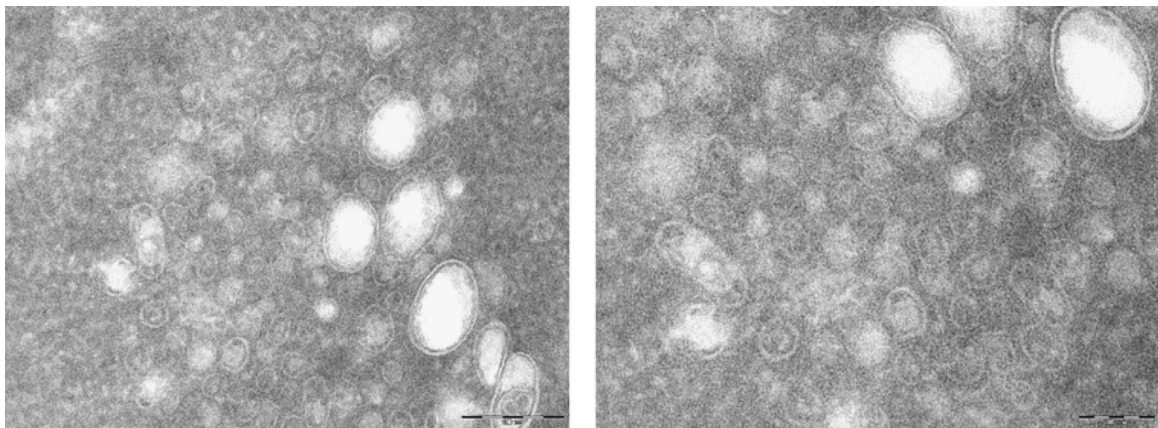


Abb. 22: EM-Cryoschnitte von Zellen mit über Nacht ausgeschaltetem *DSL1*. Größenbalken: 200 nm

Der Verlust von Dsl1p führt zu einer massiven Akkumulation von Vesikeln, wie in Abb. 22 zu sehen ist. Für eine nähere Charakterisierung wurden anschließend Immunogold-Färbungen mit COP-I Antikörpern (10nm) und zusätzlich Emp47p-Antikörpern (5nm) durchgeführt (Abb. 23). Emp47p gilt als Cargomolekül der COP-I Vesikel (Schröder et al. 1995).

Die Abb. 23 zeigt erneut die Vesikelakkumulation in Dsl1p-Mangelzellen. Die Emp47p-Antikörper-Markierung macht zudem deutlich, dass es sich bei diesen Strukturen tatsächlich um Vesikel handelt, die überraschenderweise noch ihre COP-I-Hülle tragen. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob der *Tethering*-Faktor Dsl1p etwas mit dem Abfall der Hüllproteine, dem *Uncoating*-Prozess, zu tun haben könnte.

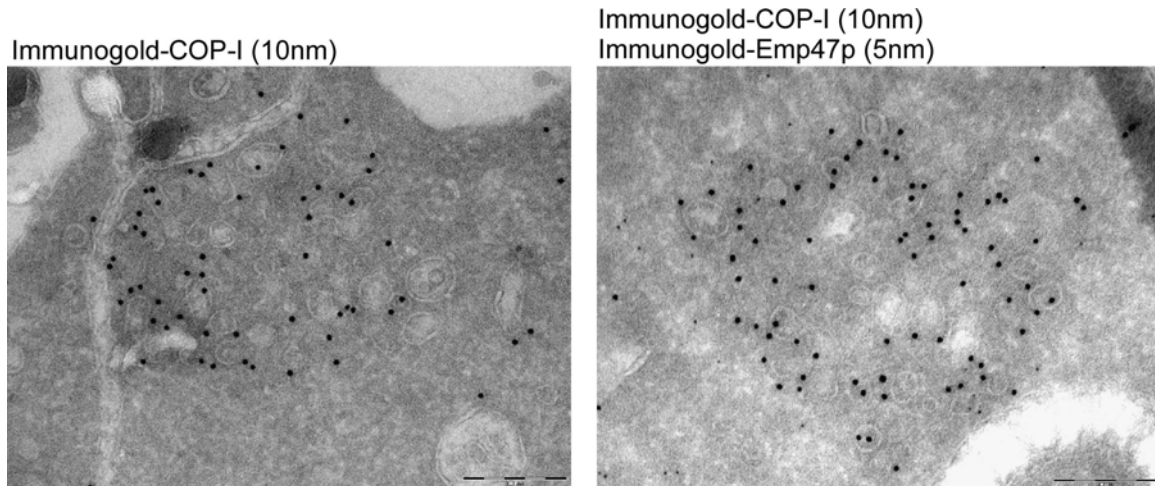


Abb. 23: EM-Bilder der Immunogold-Antikörper-Färbung von Cryoschnitten mit Zellen, deren *DSL1* Gen ausgeschaltet wurde. Links: anti-COP-I (10nm Gold). Rechts: anti-COP-I (10 nm) und anti-Emp47p (5 nm) Größenbalken: 200 nm.

3.12 Die Bildung eines Vesikelclusters durch Verlust von Dsl1p

Dieser Phänotyp der Vesikelakkumulation sollte in weiteren Versuchen näher untersucht werden. Dafür wurde der GD1 Stamm mit Hefestämmen gekreuzt, welche eine GFP-Markierung an je einer der COP-I-Untereinheiten tragen. Das Grün-fluoreszierende-Protein, GFP, aus *Aequorea victoria* gehört zur Familie der Fluoreszenzproteine. Die Produktion von GFP in Fusion mit anderen Proteinen resultiert in einer sichtbaren Fluoreszenz, so dass die räumliche und auch zeitliche Verteilung des Proteins leicht beobachtet werden kann. Die Anregungsmaxima für GFP liegen bei 396 nm bzw. bei 475 nm (Violett, Blau), die zu einer Emission bei 508 nm (grün) führen (Tsien 1998, Giepmans et al. 2006).

Die Zellen einer Übernachtskultur (Glukose-Medium) wurden auf einen Objektträger gegeben, mit „DAKO“-Fluoreszenzmedium überschichtet und mit einem Deckgläschen verschlossen. Danach konnten sie unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

Die Aufnahmen in der Abb. 24 bestätigen die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie, in denen eine Clusterbildung der COP-I-Vesikel bereits deutlich wurde (Abb. 22). Werden verschiedene Untereinheiten des COP-I Komplexes durch die Markierung mit GFP sichtbar gemacht, kann man eine starke Anhäufung dieser Strukturen beobachten. Dieser Phänotyp zeigt sich durch die sehr stark markierten Strukturen in den „*DSL1* aus“ Zellen der Abb. 24 unten. Dagegen zeigen die Wildtyp-Zellen lediglich eine schwache Markierung über die gesamte Zelle verteilt. Dieses Resultat bestätigt somit die Akkumulation, zeigt aber auch eine Aggregation von Vesikeln mit COP-I-Hülle an einem bestimmten Ort der Zellen ohne Dsl1p.

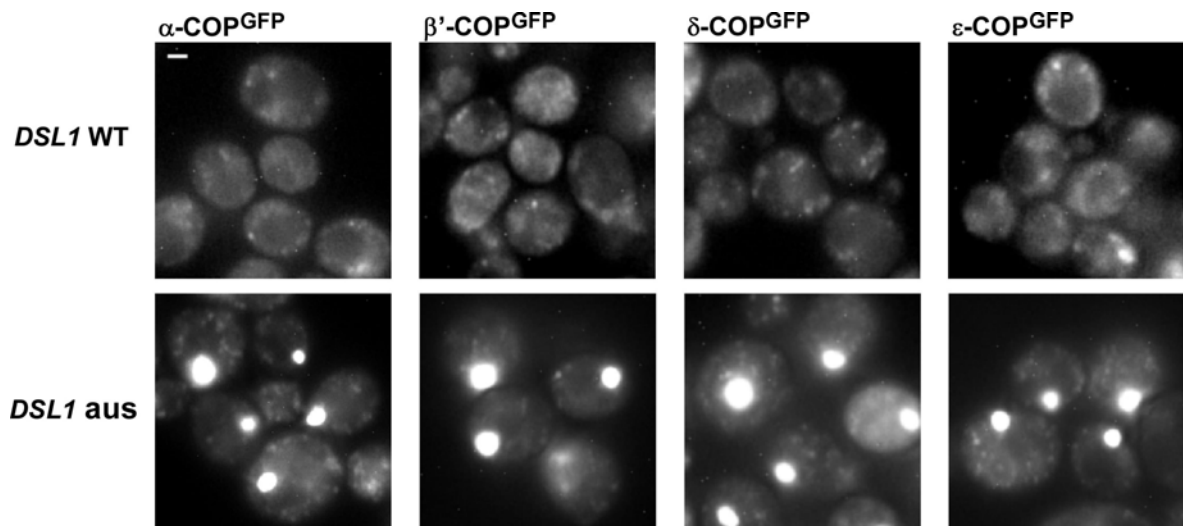


Abb. 24: Fluoreszenzaufnahmen von *DSL1* Wildtyp- (oben) und Ausschaltstämmen (unten). Verschiedene COP-I-Untereinheiten tragen die GFP-Markierung. Größenbalken: 1 μm .

3.13 Charakterisierung der COP-I-Vesikelcluster

Um einen besseren Blick auf die angestauten Vesikel oder Vesikelcluster werfen zu können, wurden sie mit dem Fluoreszenz- und STED-Mikroskop untersucht. Beide Mikroskopie-Techniken ermöglichen eine höhere Auflösung verschiedener Strukturen in der Zelle.

Nur durch die Lichtmikroskopie kann das Innere lebender Zellen beobachtet werden, die Auflösung ist jedoch auf Grundlage des Abbe'sche Gesetz (1873) praktisch durch die Lichtwellenlänge auf ca. 250 nm begrenzt. Mit der STED Mikroskopie, erfunden durch Stefan W. Hell (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abteilung NanoBiophotonik), wurden Aufnahmen mit einer Auflösung kleiner als 20 nm ermöglicht. Die „stimulierte Emissions-Löschung“ (Stimulated Emission Depletion; STED) arbeitet dabei mit zwei synchronisierten Laserpulsen: nach der Fluoreszenzanregung der Moleküle durch einen „blauen“ Laserpuls folgt ein „roter“ Laserpuls, welcher in der Mitte des Brennflecks ein Minimum besitzt. Durch diesen wird die Fluoreszenz im Randbereich des Fokus gelöscht, je intensiver dabei dieser Löschpuls desto kleiner wird der übrig bleibende Fluoreszenzfleck. Theoretisch kann also der Brennfleck trotz der Lichtbeugung beliebig verkleinert werden (Hell und Wichmann 1994, Klar et al. 2000, Hein et al. 2008).

Die Zellen eines β' -COP^{GFP}/GD1 Stammes, die für die Aufnahmen der Abb. 25 verwendet wurden, wurden in beiden Fällen fixiert. Für die STED-Aufnahmen (B) wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei war der sekundäre Antikörper mit einem für das STED-System geeigneten Atto-Fluoreszenzfarbstoff (647N) markiert. Alle Aufnahmen der folgenden

Abbildung wurden in der Abteilung NanoBiophotonik des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie gemacht.

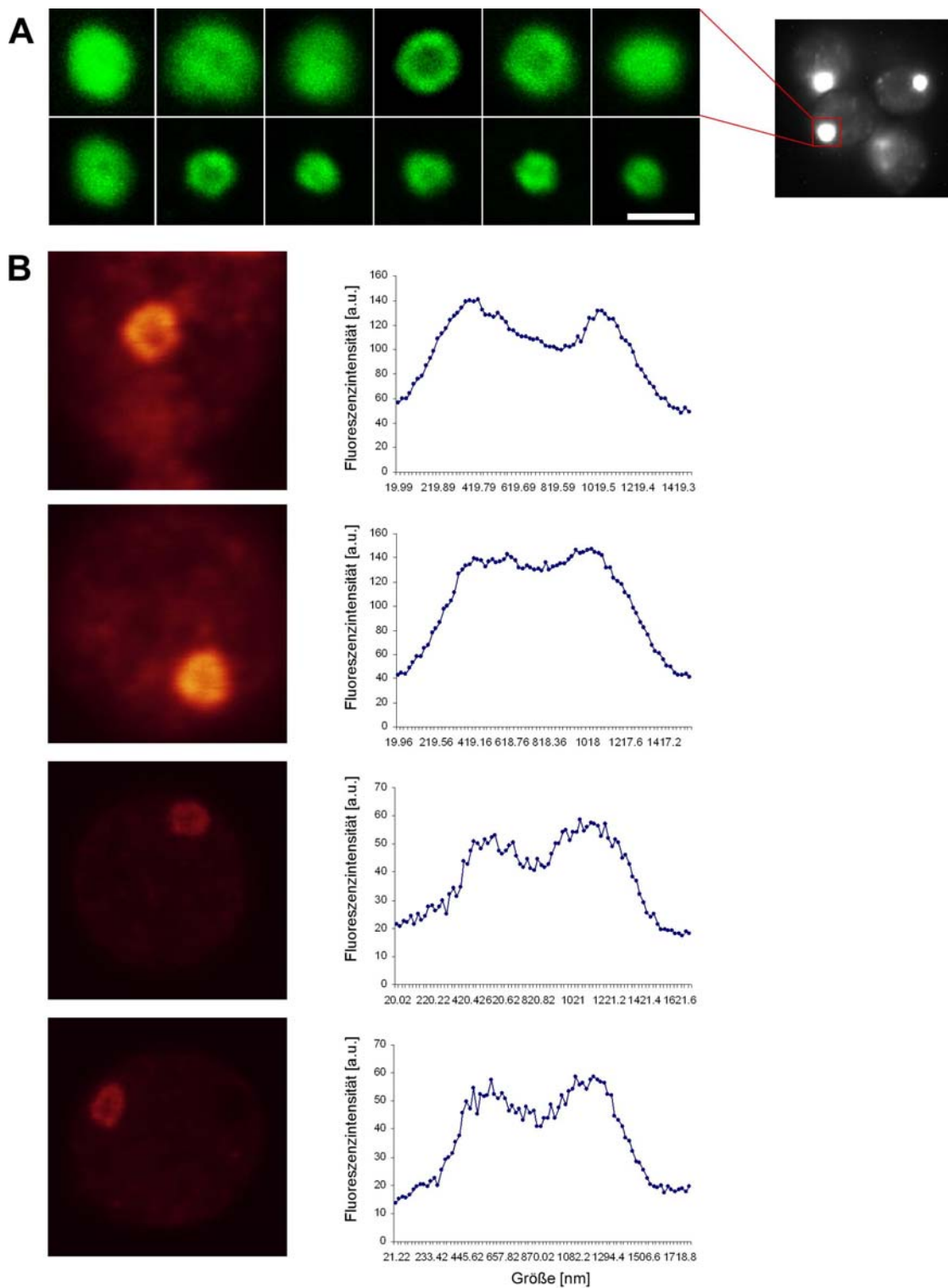


Abb. 25: A) Konfokale Detailaufnahmen der Vesikelcluster von Zellen des in Glukose-Medium angezogenen β^1 -COP^{GFP}/GD1 Stammes. B) Detailaufnahmen mit einem STED-Mikroskop von Zellen desselben Stammes mit dazugehörigen *linescans*. Größe variiert von 0,7 μm - 1 μm . Größenbalken: 1 μm .

In Abb. 25 A sieht man die Detailaufnahmen der Vesikelcluster, die mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops aufgenommen wurden. Die Größe der Aggregationen bewegt sich dabei stets zwischen 0.7 und 1 μm . Außerdem ist zu erkennen, dass diese Cluster keineswegs eine glatte Struktur aufweisen, sondern dass sie meist eine unregelmäßige Ring-Form bilden. Das wird auch durch die STED Aufnahmen sowie durch die dazugehörigen *linescans* in Abb. 25 B bestätigt.

3.14 Die Ausbildung des Phänotyps und der Wachstumsstopp fallen zeitlich eng zusammen

Als nächstes sollte untersucht werden, ab welchem Zeitpunkt nach dem Ausschalten von *DSL1*, dieser Phänotyp auftritt. Dafür wurde wieder der Stamm β' -COP^{GFP}/GD1 über Nacht in Galaktose-Medium angezogen und am Morgen in Glukose-Medium überführt, um *DSL1* auszuschalten. Dann wurden jede Stunde Proben genommen, die Zellen fixiert und zusammen mit DAKO Fluoreszenzmedium auf einen Objektträger mit Deckgläschen überführt. Am nächsten Tag wurden dann von allen Proben jeweils 100 Zellen auf das Vorhandensein des Vesikelcluster hin untersucht und die Ergebnisse in einem Diagramm dargestellt.

Zusätzlich wurden Wachstumskurven folgender Stämme bestimmt: Wildtyp, GD1 und GD1/ β' -COP^{GFP}. Letzterer wurde ausgewählt um einen GFP bedingten Effekt ausschließen zu können. Nach dem Ausschalten von *DSL1* durch Überführung in Glukose-Medium wurden jede Stunde Proben genommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Dabei wurden die Kulturen regelmäßig verdünnt, um einen Wachstumsstopp durch den Eintritt in die stationäre Phase ausschließen zu können.

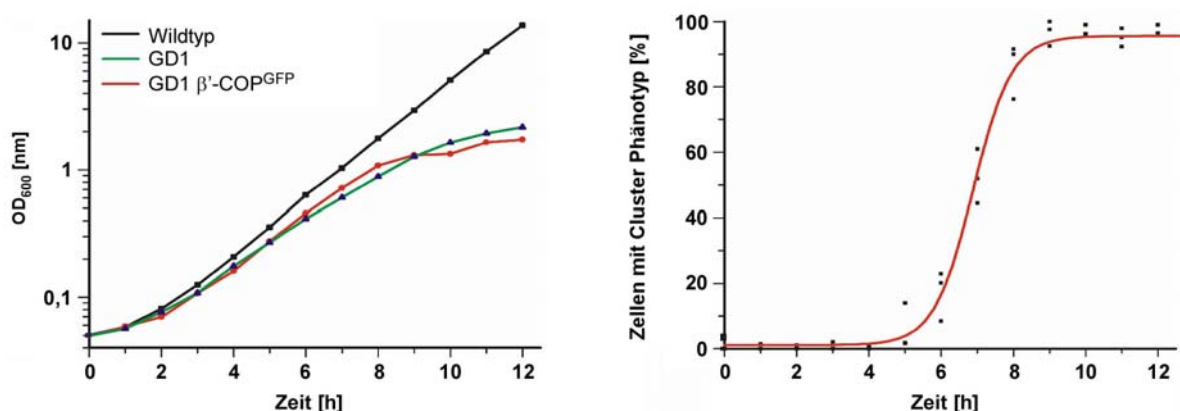


Abb. 26: Links: Diagramm der Wachstumskurven der Stämme Wildtyp, GD1 und GD1/ β' -COP^{GFP}. Es wurde jede Stunde eine Probe genommen und deren optische Dichte bestimmt. Rechts: Diagramm mit Trendlinie der gezählten Zellen mit Cluster-Phänotyp in %. Auch hier wurde jede Stunde eine Probe genommen. Alle hier gezeigten Ergebnisse sind Resultate zweier unabhängiger Versuche.

Der Wildtyp wächst erfahrungsgemäß unendlich weiter solange frisches Medium vorhanden ist. Dagegen führt das Ausschalten des *DSL1*-Gens im Stamm GD1 mit ihne ohne GFPtag zu einer deutlichen Verzögerung des Wachstums nach ca. acht Stunden (Abb. 26 links).

Nach fünf Stunden in Glukose-Medium fangen die ersten Zellen an, einen Vesikelcluster auszubilden und nach sieben Stunden zeigen mehr als die Hälfte der Zellen diesen Phänotyp. Wird *DSL1* länger als acht Stunden ausgeschaltet, ist in so gut wie allen Zellen ein COP-I-Cluster zu finden (Abb. 26 rechts). Anscheinend fallen beide Ereignisse, Wachstumsstop und Akkumulation von COP-I-Vesikeln, zeitlich sehr eng zusammen. Wird *DSL1* nun wieder eingeschaltet (Überführung in Galaktose), kommt es innerhalb von drei Stunden zu einer Auflösung der Cluster in fast allen Zellen und nach weiteren zwei Stunden beginnen die Hefezellen wieder zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Somit konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation durch Zugabe von Dsl1p wieder aufgehoben werden kann und reversibel ist.

3.15 Die Akkumulation der Vesikel ist nicht die Folge einer erhöhten COP-I-Produktion

Sieht man den Vesikelcluster in den Mutantenzellen nur infolge einer erhöhten Produktion/Expression an COP-I-Untereinheiten? Um diese Frage zu klären, wurden zwei Übernachtkulturen mit Wildtyp- und GD1-Zellen aus dem Galaktose-Medium in Glukose-Medium übertragen. Nach 0, 6, 9 und 14 h in Glukose wurden entsprechende Zellextrakte (Kapitel 2.8.5) hergestellt. Diese konnten anschließend per Western-Blot auf das Vorhandensein verschiedener Proteine hin untersucht werden.

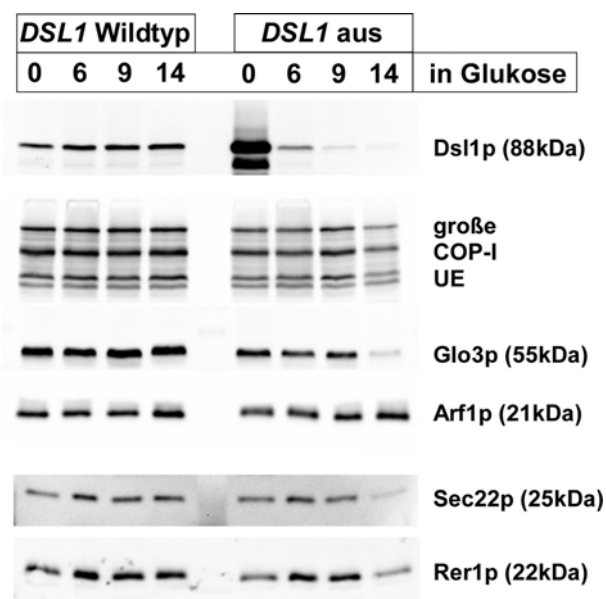


Abb. 27: 8-12 %ige SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analyse der Hefeextrakte aus Zellen die die angegebene Zeit in Glukose inkubiert wurden. Zur Detektion der beschriebenen Proteine wurden entsprechende Antikörper (1:2000) verwendet.

Wie in Abb. 27 zu sehen, ändern sich im Wildtyp zu keinem Zeitpunkt die Mengen der untersuchten Proteine (Spuren 1-4). Der *DSL1*-Ausschaltstamm (Spuren 5-8) zeigt schon nach 6 h deutliche Effekte und nach 14 h ist Dsl1p fast komplett aus dem Zellextrakt verschwunden. Im Gegensatz dazu gibt es keine Änderungen der COP-I-Untereinheiten, da die Mengen (große COP-I UE) über die gesamte Zeit relativ konstant bleiben. Das weist darauf hin, dass die Bildung von Vesikelclustern nach dem Ausschalten von *DSL1* keine Folge einer Überproduktion von COP-I-Untereinheiten ist. Die Mengen an Glo3p, Sec22p und des COP-I Cargo-Moleküls Rer1p sinken nach 14 h ohne Dsl1p, während Arf1p über die Zeit konstant bleibt. Die Abnahme von Sec22p und Rer1p wurde bereits früher beobachtet und beruht auf der Abwanderung der Proteine in die Vakuole bei defekter ER-Retention (Sato et al. 1995, Ballensiefen et al. 1998).

3.16 Die Vesikelcluster sind nicht mobil

Um herauszufinden, ob sich diese Vesikelcluster mobil oder statisch in der Zelle verhalten, wurden Zeitraffer-Aufnahmen des Stammes β' -COP^{GFP}/GD1 durchgeführt.

Die dabei aufgenommenen Filme (siehe CD) zeigen Zellen nach 7, 7,5, 10 und 25 h in Glukose-Medium, während ein in Galaktose gewachsener Stamm als Kontrolle dient. Nach 7 h zeigen sich die ersten kleineren Cluster, welche sich noch relativ schnell in der Zelle bewegen. In den nachfolgenden Proben (7,5; 10 und 25 h) sind diese Cluster jeweils zu einem großen, sehr hellen Fleck herangewachsen, der sich kaum mehr bewegt, sondern sich eher stationär verhält. Der Kontrollstamm dagegen zeigt auch nach etlichen Stunden noch heftige Aktivitäten in der Zelle.

3.17 Andere Mutationen können ebenfalls eine Vesikelakkumulation verursachen

Nach der gründlichen Untersuchung der durch das Ausschalten von *DSL1* verursachten COP-I Vesikelcluster, wurden anschließend auch Stämme mit Mutationen in anderen Untereinheiten des Dsl1p-Komplexes, des COP-I-Komplexes sowie des COP-II-Komplex auf diesen Phänotyp hin analysiert. Die entsprechenden Mutanten (*tip20-8* [Cosson et al. 1997], *dsl3-2* [Kraynack et al. 2005], *dsl1-22* [Andag et al. 2001], *ufe1-1* [Lewis and Pelham 1996], *sec22-3* [Novick et al. 1980], *sec20-1* [Novick et al. 1980], *sec28Δ* [Duden et al. 1998], *sec12-4* [Novick et al. 1980], *GAL-ARF1* [Stearns et al. 1990 und im Labor konstruiert], *dsl1-5xWA* [im Labor konstruiert]) waren durch frühere Versuche bereits im Labor verfügbar und wurden durch Kreuzungen mit GFP-tragenden COP-I-Untereinheiten (β' -COP oder ϵ -COP) kombiniert. Die Dsl/SNARE-Komplex-Mutanten wurden anschließend bei 25° C und 37° C inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 28).

Außer dem Wildtyp und der *dsl1-22*-Mutante zeigen alle Zellen mit Mutationen im Dsl/SNARE-Komplex den Vesikelcluster-Phänotyp. Allerdings tritt er nur in *tip20-8*-, *ufe1-1*- und *sec20-1*-Zellen

so deutlich auf wie im *DSL1*-Ausschaltstamm, teilweise sogar schon bei 25° C. In der *dsl3-2*- und *sec22-3*-Mutante dagegen zeigen sich mehrere Spots pro Zelle, die nicht die Größe der anderen Strukturen erreichen. Das Ergebnis der *dsl1-22*-Mutante bestätigt wieder die Resultate von Andag et al. (2001), dass hier keine Akkumulation von Vesikeln stattfindet (siehe auch Kapitel 3.12).

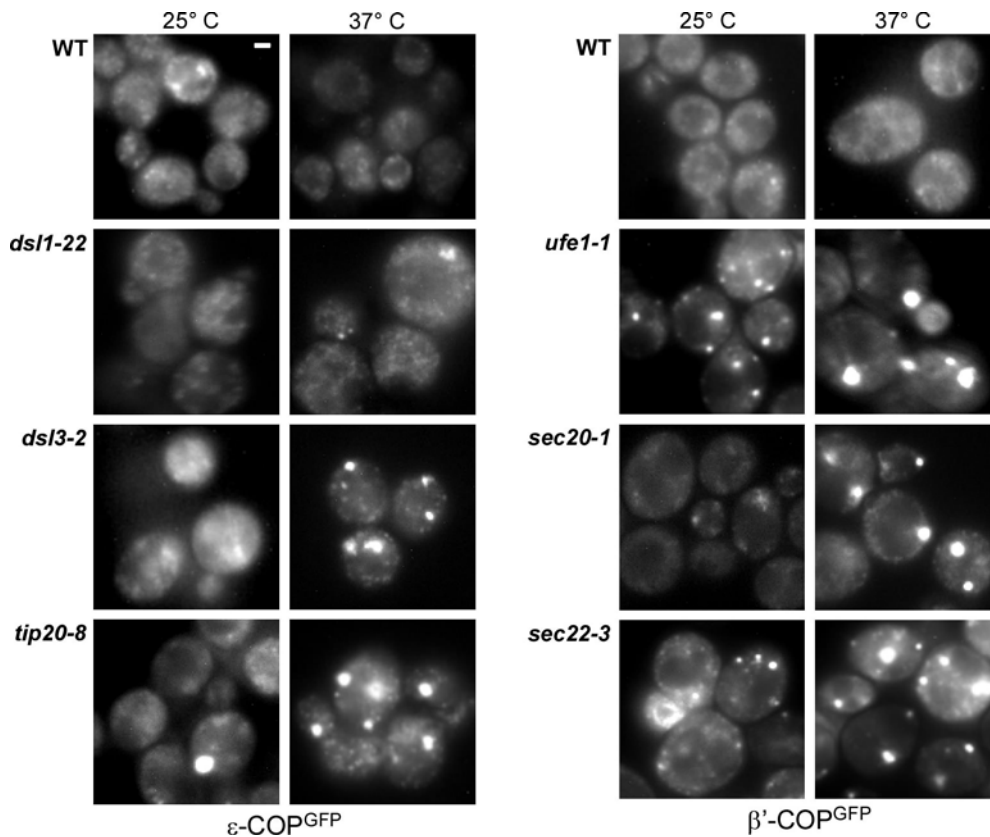


Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der angegebenen Stämme die zuvor 1-2 h bei 25° C oder 37° C inkubiert wurden. Größenbalken: 1 µm.

Die Stämme mit Mutationen im COP-I- oder COP-II-Komplex wurden entweder ebenfalls bei 25° C und 37° C inkubiert (*sec28Δ* und *sec12-4*) oder im Fall von GAL-*ARF1* in Galaktose („*ARF1* an“) oder Glukose („*ARF* aus“) angezogen. Zusätzlich wurde auch ein Stamm mit der zuvor schon untersuchten 5xWA Mutation in *dsl1* untersucht (Abb. 29)

Die Deletion von ε-COP verursacht keine Vesikelakkumulation. Das Ausschalten der COP-I GTPase Arf1p führt zu sehr kleinen punktuellen Strukturen, die aber nicht besonders ausgeprägt sind, so dass dieser Effekt offensichtlich nichts mit der hier untersuchten Anhäufung von COP-I Vesikeln zu tun hat. Die Mutation aller fünf Tryptophane in *DSL1*, die für die Interaktionen mit dem COP-I Komplex gebraucht werden, führt in 12-21 % der Zellen zu einer Vesikelakkumulation. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Resultat des Kapitels 3.7 überein, da auch dort die 5xWA Mutante noch in

der Lage ist, etwas COP-I zu binden (23 % für δ -COP, 6 % für ϵ -COP). Im Gegensatz dazu zeigt die *sec12-4*-Mutante, die ein defektes GEF für die COP-II-spezifische GTPase Sar1p exprimiert, keine Effekte. Diese Kontrolle zeigt, dass es nicht möglich ist durch einen Defekt im Vorwärtstransport eine COP-I-Vesikelakkumulation zu induzieren.

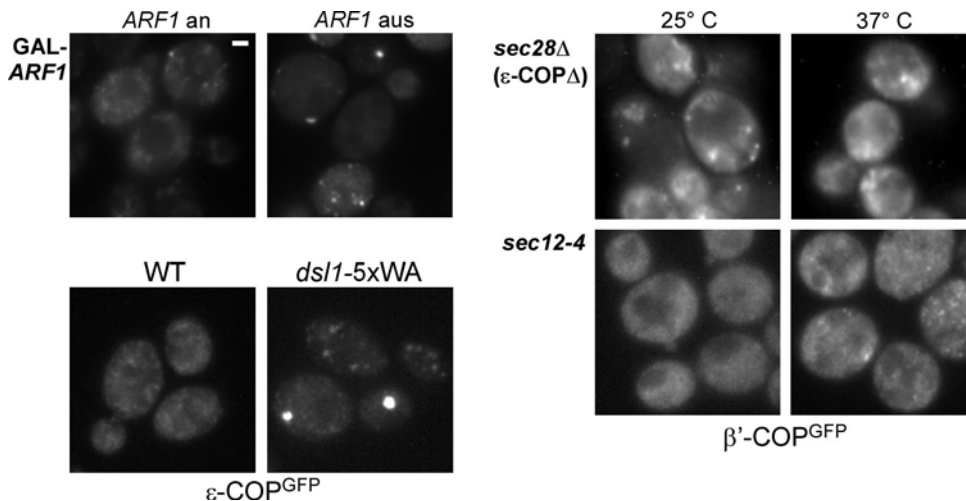


Abb. 29: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der angegebenen Stämme die zuvor 1-2 h bei 25° C und 37° C (rechts) oder nur bei 30° C (WT, *ds1_5xWA*) inkubiert wurden oder in Galaktose und Glukose angezogen wurden (Gal-*ARF1*). Größenbalken: 1 μ m.

3.18 Mutationen in α - und δ -COP können den Phänotyp aufheben

Gibt es eine Möglichkeit die Akkumulation von COP-I-Vesikeln zu verhindern? Um diese Frage zu beantworten, wurden Stämme derart gekreuzt, dass sie neben dem Galaktose-induzierbaren *DSL1* und der GFP-markierten COP-I-Untereinheit zusätzlich eine C-terminale Deletion in *RET1* (α -COP_ Δ 19C), eine Deletion des ϵ -COP-kodierenden *SEC28*-Gens oder eine temperatursensitive Mutation in *RET2* (*ret2-1*; δ -COP) trugen. Die Zellen konnten dann unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (Abb. 30).

Aus diesem Versuch geht hervor, dass sowohl α -COP_ Δ 19C als auch δ -COP^{ts} (*ret2-1*) den Dsl1p-Mangelphänotyp verhindern. Dagegen hat die Deletion von ϵ -COP wiederum keinen Effekt auf die Bildung der Vesikelcluster, wie auch schon im vorangegangenen Experiment beobachtet (Abb. 29). Offensichtlich supprimieren Mutationen in Dsl1p-Interaktionspartnern den Effekt des *DSL1*-Ausschaltens, was nahe legt, dass sie für die Ausbildung des Phänotyps eine Rolle spielen.

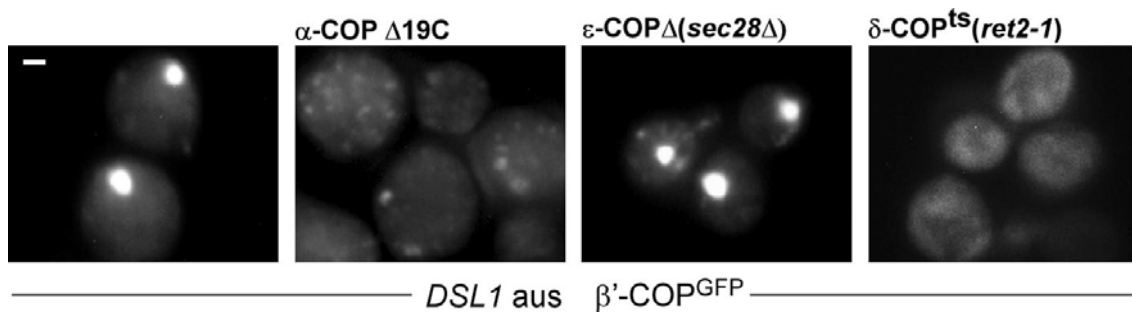


Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der angegebenen Stämme die in Glukose-Medium angezogen wurden. Größenbalken: 1 μm .

3.19 Lokalisation des Vesikelclusters in der Zelle

Für eine genaue Untersuchung zur Lage des Vesikelclusters in der Zelle wurden Doppelmarkierungen durchgeführt. Im Fall von Rer1p, welches als *cis*-Golgi-Marker und Cargomolekül dient, wurde das mit einem Immunfluoreszenz-Versuch mit Rer1p-Antikörpern und sekundären Cy3-Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern durchgeführt (rote Fluoreszenz, Abb. 31 oben). Sec7^{DsRed}, ein oft verwendeter Golgi-Marker, wurde durch Hefekreuzungen in einen ϵ -COP^{GFP}/GD1 Stamm gekreuzt (Abb. 31 Mitte). Der Originalstamm enthielt das Plasmid Ylplac204-T/C-SEC7-DsRed (B. Glick, Universität Chicago). Als PCR-Template für die „Rot-fluoreszierende Protein“-Kassette, die an SEC28 (ϵ -COP) fusioniert wurde, diente das Plasmid pYM38 aus der „PCR-Toolbox“ (Euroscarf, Janke et al. 2004). Um die Fusion der RFP-kodierenden Sequenzen an SEC28 zu erleichtern, wurde ein Stamm mit einer ϵ -COP^{TAP}-Fusion transformiert. Somit wurde TAP::*HIS5* gegen RFP::*KanMX* ausgetauscht, was leicht zu kontrollieren und zudem effizienter war als die Transformation eines Wildtyp-Stammes ist. Dieser Stamm konnte dann wiederum mit einem SEC63^{GFP}/GD1-Stamm gekreuzt werden, damit auch ein ER-Marker zur Verfügung stand (Abb. 31 unten).

Im Fall von Rer1p wurde als Kontrolle ein Wildtyp-Stamm (β '-COP) verwendet, da das Immunfluoreszenz-Protokoll die enzymatische Entfernung der Zellwand beinhaltet, die sich in Zellen aus Galaktose-Medium schwieriger gestaltet als in Glukose-gewachsenen Zellen (dickere Zellwand). Die Sec7^{DsRed}- und Sec63^{GFP}-Stämme dagegen wurden über Nacht in Galaktose („*DSL1* an“) oder Glukose („*DSL1* aus“) angezogen und anschließend fixiert.

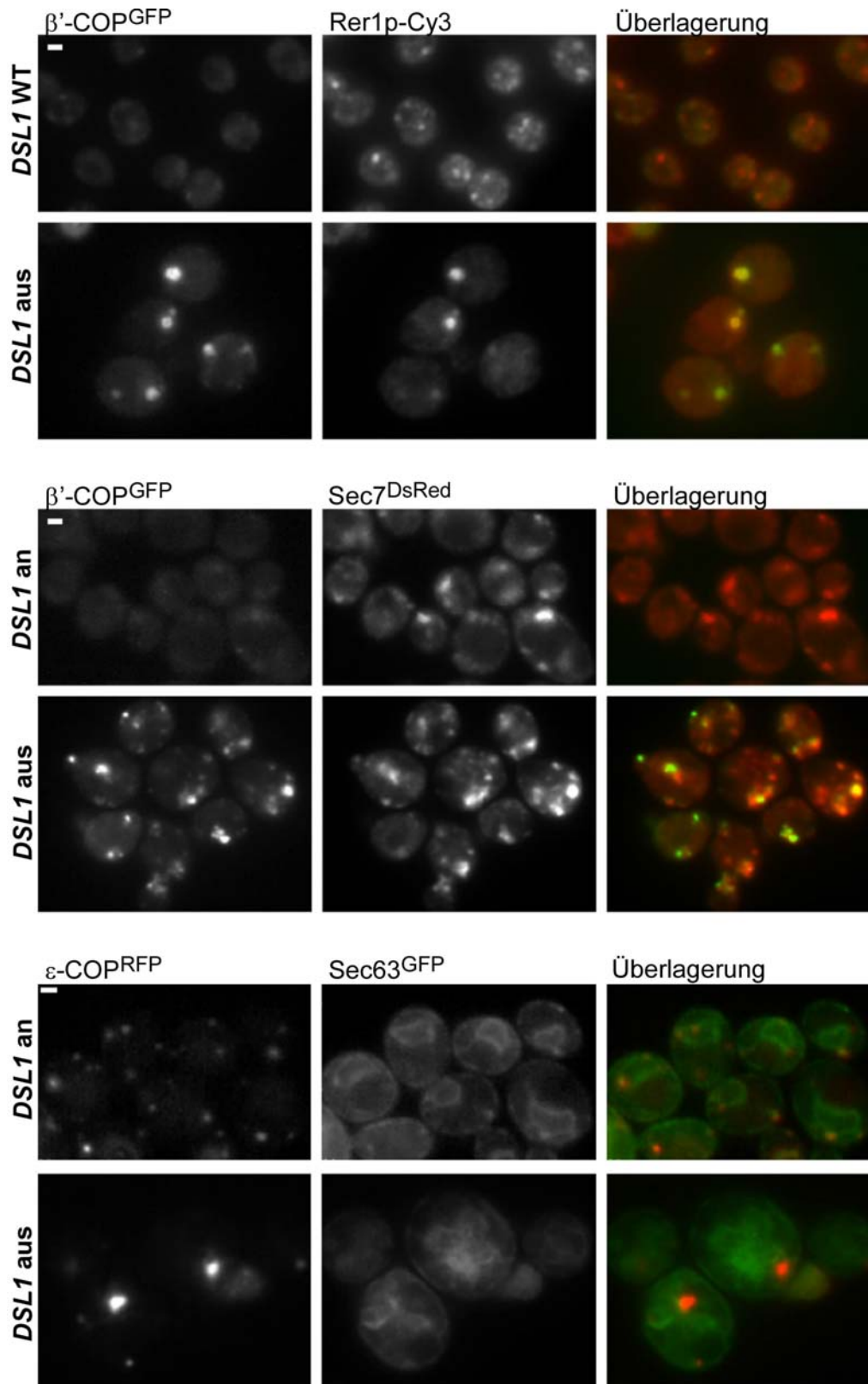


Abb. 31: Fluoreszenzaufnahmen von Stämmen mit *DSL1* WT / *DSL1* an (Glukose/Galaktose) oder ausgeschaltet (Glukose), β' -COP^{GFP}/Rer1p-Cy3 (Immunfluoreszenz) (Oben), ϵ -COP^{GFP}/Sec-DsRed (Mitte) oder ϵ -COP^{RFP}/Sec63^{GFP} (Unten). In der rechten Spalte wurden beide Bilder jeweils mit entsprechender Software (Photoshop, Metamorph) übereinander projiziert. Größenbalken: 1 μ m.

In jeweils der ersten Spalte sind die GFP- oder RFP-markierten COP-I-Untereinheiten zu erkennen. Der Golgi-Apparat wird in Wildtyp-Zellen (*DSL1* WT, *DSL1* an) durch vier bis fünf Punkte innerhalb der Zelle gekennzeichnet, wie auch in den entsprechenden Bildern mit Rer1p-Cy3 und Sec7p^{DsRed} oben sichtbar. Das Cargomolekül Rer1p konzentriert sich in den „*DSL1* aus“-Zellen nur noch auf die Vesikelcluster selbst, was nahe legt, dass diese COP-I Vesikel keine Artefakte darstellen, sondern mit Cargo beladen sind, und dass ansonsten kein Golgi-Apparat mehr vorhanden ist. Die Zellen, in denen der späte Golgi-Marker Sec7p^{DsRed} - ein lösliches Protein im Gegensatz zu Rer1p - zu sehen ist, verdeutlichen ebenso eine Zerstörung dieses Organells in den Mutantenzellen, da hier nur noch sehr zerstreute Markierungen erkennbar sind.

Das endoplasmatische Retikulum, sichtbar durch Sec63p^{GFP}, wird in normalen Zellen in Form der Kernmembran und einem dünnen Netz unterhalb der Zellmembran sichtbar. Wird nun *DSL1* ausgeschaltet, bläht sich das ER auf und bildet verschnörkelte Strukturen, an deren Ausläufern die Vesikelcluster zu finden sind. Anscheinend findet der Transport der COP-I-Vesikel zum ER noch statt, gerät dort aber ins Stocken, wodurch es zur Vesikelakkumulation kommt und indirekt ein Block im Vorwärtstransport verursacht wird. Das Ausschalten von *DSL1* hat also neben der Akkumulation von Vesikeln auch drastische Effekte auf verschiedene Zellorganellen, wie am Beispiel des Golgi-Apparats und des ERs gezeigt werden konnte.

3.20 Auch COP-II-Untereinheiten befinden sich in den Vesikelakkumulationen

Sind neben den COP-I-Untereinheiten auch Proteine des Vorwärtstransports in den Vesikelclustern zu finden? Um das zu testen, wurden COP-II-Untereinheiten mit einer GFP-Markierung zusammen mit ϵ -COP^{RFP} und GD1 in einen Stamm gekreuzt. Die Zellen der über Nacht in Galaktose (*DSL1* an) und Glukose (*DSL1* aus) gewachsenen Kulturen wurden fixiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

In der ersten Spalte der Abb. 32 sieht man jeweils die GFP-markierten COP-II-Untereinheiten, während die zweite Spalte ϵ -COP^{RFP} zeigt. Beide Bilder sind in Spalte 3 übereinander gelegt. Die *Dsl1p*-Mangelzellen bilden wie zuvor Vesikelcluster, während das in den Zellen mit *Dsl1p* nicht der Fall ist. Sowohl Sec13^{GFP} als auch Sec31^{GFP} zeigen eine punktuelle Verteilung in beiden Zelltypen, wobei in *Dsl1p*-Mangelzellen zusätzlich eine Anhäufung des markierten Proteins in einer bestimmten Region zu erkennen ist. Legt man beide Abbildungen übereinander, ist gut zu sehen, dass die markierten Komplex-Untereinheiten colokalisieren. In den Vesikelclustern akkumulieren offensichtlich nicht nur COP-I-Vesikel, es sind auch COP-II-Membranen zu finden. Dieser Effekt ist kein Artefakt, denn eine Kombination aus Sec13p^{mRFP}, welches nicht tetramerisiert, und β' -COP^{GFP} ergab eine noch stärkere Colokalisation. Des Weiteren kann man Sec13p^{mRFP}-Cluster unter *Dsl1p*-Mangel-

bedingungen in Zellen finden, die keine zusätzliche GFP-markierte COP-I-Untereinheit tragen (H.D. Schmitt, Daten nicht gezeigt).

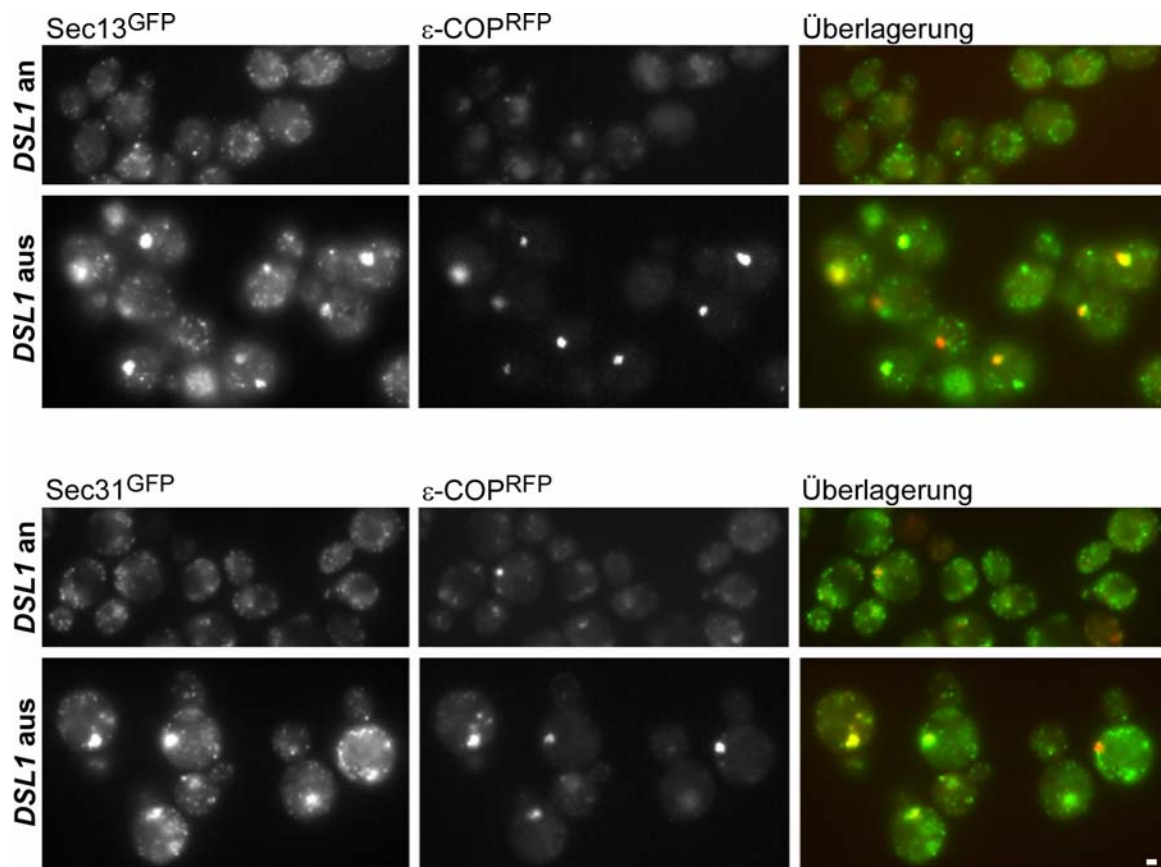


Abb. 32: Fluoreszenzaufnahmen von ϵ -COP^{RFP}/GD1-Stämmen welche zusätzlich Sec13^{GFP} oder Sec31^{GFP} enthalten. In beiden Fällen wurden die Zellen in Galaktose (*DSL1 an*) oder Glukose (*DSL1 aus*) inkubiert und fixiert. Größenbalken: 1 μ m.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden zusätzlich Elektronenmikroskop-Aufnahmen von über Nacht in Glukose gewachsenen Zellen angefertigt, die in einer Immunogold-Antikörperfärbung mit anti-COP-I und anti-Sec23p (COP-II) behandelt wurden. Auch hier ist zu erkennen, dass sowohl COP-I- als auch COP-II-Untereinheiten detektiert werden können (Abb. 33 oben). Um einen besseren Überblick zu erreichen, wurden bei einigen EM-Aufnahmen die Signale der Antikörperfärbung durch rote (Sec23p) bzw. grüne (COP-I) Markierungen ersetzt. So kann man erkennen, dass die mittig liegenden Strukturen meist COP-II-Membranen aufweisen und diese von COP-I-Vesikeln umschlossen werden (Abb. 33 unten). Dieses Bild erklärt möglicherweise auch die unregelmäßige Struktur der Vesikelcluster, wie sie in den konfokalen- und STED-Aufnahmen der Abb. 25 beobachtet werden konnten.

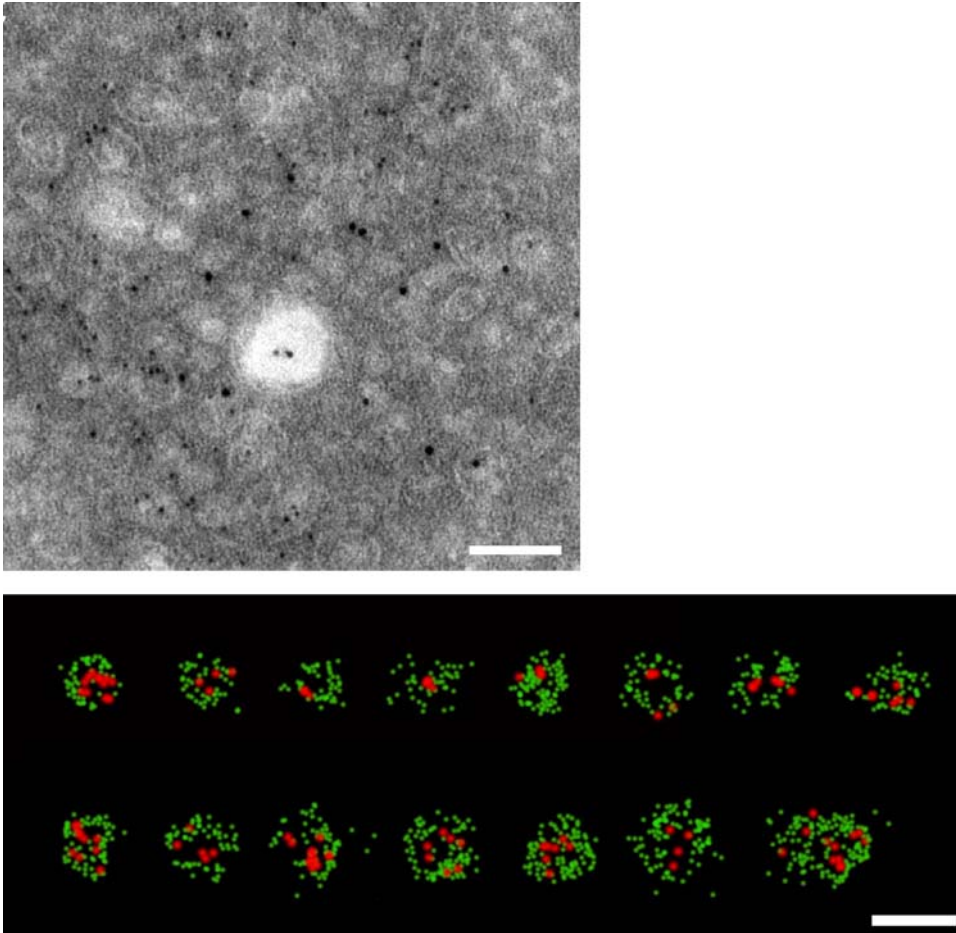


Abb. 33: Oben: EM-Aufnahmen der Immunogold-Antikörpermarkierung (anti-COP-I (5nm Gold), anti-COP-I (10nm Gold)) der Cryoschnitte von Zellen mit über Nacht ausgeschaltetem *DSL1*. Größenbalken: 100 nm. Unten: Falschfarben-Analyse der EM-Bilder. Rot: Sec23p, grün: COP-I. Größenbalken: 1 μ m.

3.21 Aufreinigung von COP-I-Vesikeln

Nachdem die Vesikelcluster mikroskopisch sehr genau untersucht worden waren, sollten nun biochemische Analysen erfolgen. Dafür eignete sich der zuvor verwendete β' -COP^{TAP}/GD1-Stamm sehr gut, da hier die COP-I-Vesikel den TAPtag tragen und somit eine relative einfache Aufreinigung möglich war (siehe Kapitel 2.8.10). Ein wichtiger Punkt bei dieser Methode ist das Vermeiden von Detergenzien während des ganzen Prozesses, weil nur so die Lipiddoppelschicht der intakten Vesikel gewahrt werden kann. Darin unterscheidet sich der Ansatz von früheren Experimenten, die in diesem Labor durchgeführt wurden (Kraynack et al. 2005).

Das Ergebnis einer solchen Aufreinigung ist in Abb. 34 zu sehen. Die an Calmodulin-Sepharose gebundenen Vesikel werden dort in Elektronenmikroskop-Aufnahmen gezeigt. Außerdem ist zu erkennen, dass relativ viele Vesikel gebunden sind, die teilweise an der Calmodulin-Matrix

aggregieren, ein Zustand, wie er in den Zellen *in vivo* bereits vorliegt. Damit sind sie nach der Elution der ideale Ausgangspunkt für weiterführende biochemische Untersuchungen.

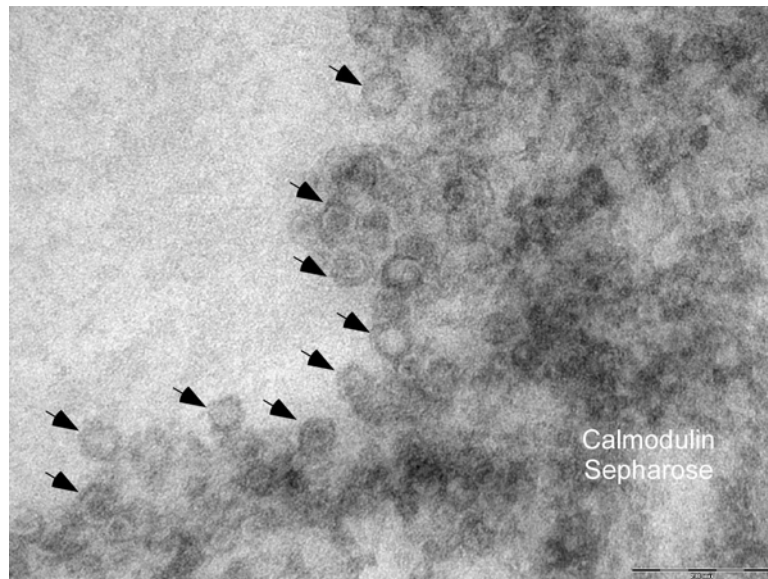


Abb. 34: EM-Aufnahme der an Calmodulin-Sepharose gebundenen Vesikel. Pfeile zeigen beispielhaft auf einige Vesikel. Größenbalken: 200 nm.

3.22 Charakterisierung der gereinigten Vesikel im Western-Blot

Zunächst wurden aus verschiedenen Stämmen, und unter Verwendung von IgG-Sepharose, Vesikel aufgereinigt. Während die Kontrolle kein TAP-Fusionsprotein enthielt (Abb. 35, Spur 4), konnten in den Stämmen WT, GD1, *tip20-8*, *dsl3-2* und *dsl1-22* die Vesikel über β' -COP^{TAP} aufgereinigt werden. Alle Stämme wurden in Glukose angezogen und im Fall von *tip20-8*, *dsl3-2* und *dsl1-22* jeweils 1,5 h bei 37° C inkubiert. Die so gewonnenen Vesikel und löslichen COP-I-Komplexe wurden dann auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western-Blot auf das Vorhandensein unterschiedlicher Proteine hin überprüft. Zum einen wurden COP-I-Untereinheiten (β' -COP^{TAP}, δ -COP) detektiert und zum anderen Cargomoleküle (Emp47p, Rer1p) nachgewiesen, um zu gewährleisten, dass es sich bei den gereinigten Strukturen um intakte Vesikel handelt.

Im Kontrollstamm (Abb. 35, Spur 4) konnte kein TAP-Fusionsprotein und auch keines der anderen untersuchten Proteine detektiert werden. In allen anderen Stämmen dagegen können beide COP-I-Untereinheiten gefunden werden (Spur 5-9). Nur im *Dsl1p*-Mangelstamm, in *tip20-8* und teilweise in *dsl3-2* wurden auch die Cargomoleküle in ca. den gleichen Mengen detektiert. Im Wildtyp sowie in der *dsl1-22* Mutante (Spur 5 und 9) ist kein bzw. kaum Cargo zu finden. Dieses Ergebnis korreliert bemerkenswert gut mit der Fähigkeit Vesikelclustern zu bilden, denn lediglich die Stämme mit

diesem Phänotyp weisen neben den COP-I-Untereinheiten auch die daran gebundenen Cargomoleküle, also intakte Vesikel, auf. Im Gegensatz dazu zeigen der Wildtyp und der *dsl1-22* Stamm weder eine Anhäufung intakter Vesikel noch eine Copräzipitation von Hüllproteinen und Cargo.

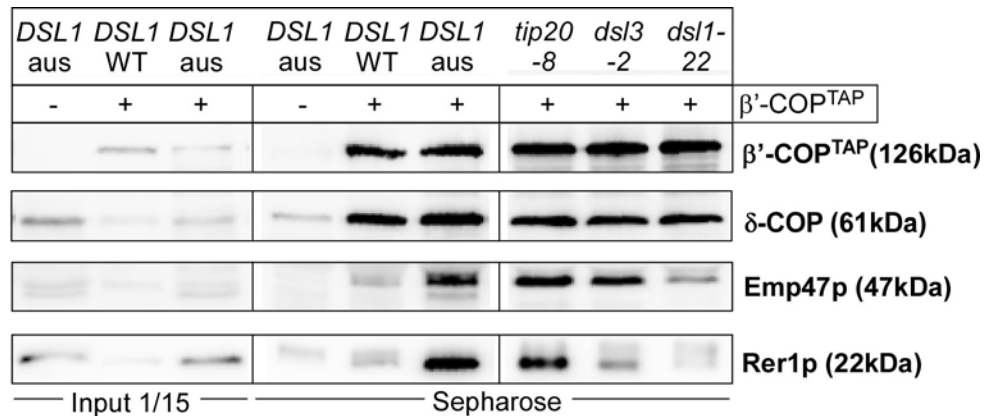


Abb. 35: Charakterisierung gereinigter Vesikel. Proben aus den jeweils angegebenen Stämmen wurden per SDS-PAGE getrennt (Gradientengel) und anschließend ein Western-Blot mit COP-I-, Emp47p- und Rer1p-Antikörpern (alle 1:2000) durchgeführt.

Zusätzlich erfolgte eine Vesikelaufreinigung aus den Stämmen β' -COP^{TAP}/GD1 und \sim /Wildtyp sowie aus Sec31^{TAP}/GD1 und \sim /Wildtyp. Es sollte geklärt werden, ob es Membranen gibt, die sowohl COP-I als auch COP-II enthalten, ob sich die Membranen also gemischt haben. Diese Aufreinigung erfolgte wieder wie oben beschrieben. In Abb. 36 kann man in den vorderen Spuren die über Sec31^{TAP} gereinigten COP-II-Membranen (1+2) bzw. Sec31^{TAP}-Zellextrakte (5+6, Input) erkennen und in den hinteren Spuren die über β' -COP^{TAP} gereinigten COP-I Vesikel bzw. die β' -COP^{TAP}-Zellextrakte (7+8, Input). Die Untereinheiten β , β' , γ , δ und ε -COP werden genau wie das Cargomolekül Rer1p jeweils nur über das COP-I-Fusionsprotein gebunden, nicht jedoch über Sec31^{TAP}. Während die Hüllproteine jedoch im Extrakt (siehe Input) in relativ gleicher Konzentration vorkommen, kann das Rer1p lediglich im Wildtyp detektiert werden und kaum im Dsl1p-Mangelstamm. Die Sepharose-Spuren verdeutlichen jedoch, dass die geringen Mengen an Rer1p, die noch vorhanden sind und somit nicht abgebaut wurden, zu 100 % in den COP-I Vesikeln zu finden sind. Eine entsprechende Quantifizierung ist in der Abb. 37 zu finden.

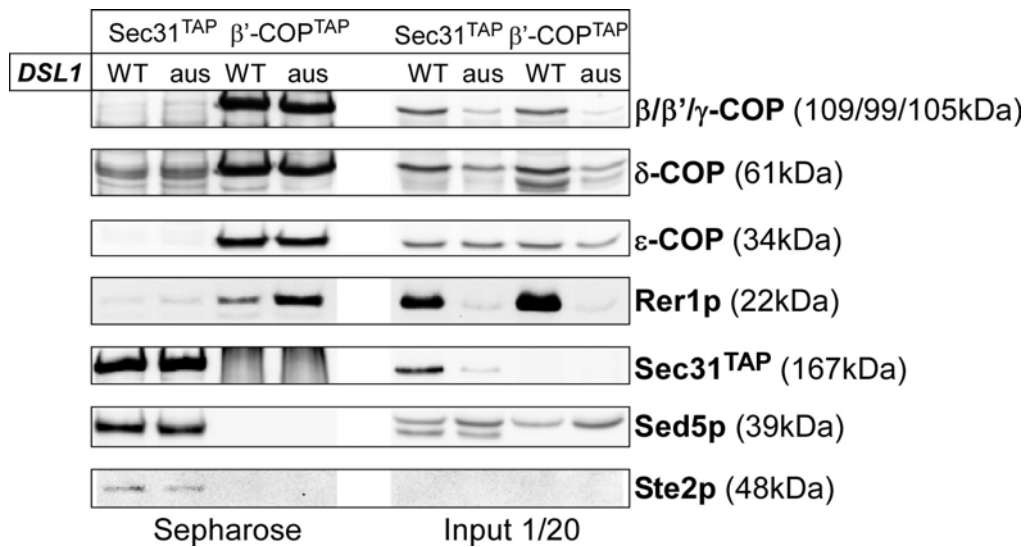


Abb. 36: Charakterisierung partiell gereinigter COP-I/COP-II-Membranen. Proben aus den jeweils angegebenen Stämmen wurden in einer SDS-PAGE (10 % Gel) getrennt und anschließend ein Western-Blot mit COP-I- (1:2000), Rer1p- (1:2000), Sed5p- (1:2000) und Ste2p-Antikörpern (1:500) durchgeführt.

Die COP-II^{TAP}-Fusionsproteine sind nur bei der Sec31^{TAP}-Aufreinigung zu finden, genau wie die spezifischen COP-II-Cargomoleküle Sed5p und Ste2p, die in beiden Stämmen im gleichen Maße detektiert werden konnten (Spur 1+2). Das bedeutet, dass in Dsl1p-Mangelzellen die Verteilung der Cargomoleküle bzw. die Mengen an Protein die an entsprechende Hüllproteine gebunden sind, sich für COP-I-Vesikel dramatisch ändert, während bei COP-II-Vesikeln kaum Veränderungen auftreten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich COP-I- und COP-II-Membranen, auch wenn sie sich sehr nahe kommen, nicht fusionieren.

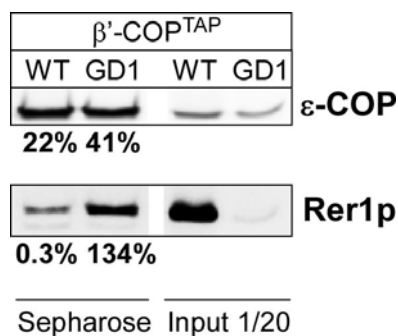


Abb. 37: Ergebnis der Quantifizierung des Western-Blots (Abb. 36). Proteinbanden des Ausgangsmaterials (Input) wurden auf 100 % gesetzt. ε-COP gilt als Vergleichskontrolle. Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der LumiAnalyst Software.

3.23 Weitere Aufreinigung der COP-I-Vesikel durch Trennung im Sucrosegradienten

Für eine weitere Analyse wurden die Calmodulin-gebundenen Komplexe von der Matrix eluiert und einer Zentrifugation durch einen Sucroседichtegradienten (Zonenzentrifugation) unterzogen. Dabei kommt es allgemein zu einer Trennung von Proteinkomplexen, RNA, DNA und Organellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte und ihres unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens. Die Proben wurden auf den 10 - 50 %igen Sucrosegradienten geladen. So konnten ganze Vesikel von anderen, nicht gebundenen Proteinen getrennt werden. Die von oben abgenommenen 100 µl-Fractionen wurden anschließend per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert, die Proteinbanden quantifiziert und in entsprechenden Diagrammen aufgetragen (Abb. 38)

Das erste Diagramm zeigt das Ergebnis der COP-I-Aufreinigung aus Wildtypzellen. Das vordere Maximum (ca. Fraktion 6-13) repräsentiert dabei freies Coatomer, während das zweite Maximum (ca. Fraktion 15-20) Vesikel mit Hülle, die *gecoateten* Vesikel, zeigt. Im Wildtyp sieht man, dass viel freies Coatomer vorhanden ist, während das zweite Maximum hauptsächlich durch Cargomoleküle (Rer1p) vertreten wird. Das spricht für eine Mehrzahl an „nackten“ Membranen, könnte aber auch COP-I umhüllte Reste des cis-Golgi darstellen. Bei der ersten Möglichkeit geschieht die Isolierung dieser Strukturen dabei höchstwahrscheinlich durch einige wenige β' -COP^{TAP}-Moleküle, die noch auf dem Vesikel verblieben sind und somit eine Detektion ermöglichen.

Das Diagramm des GD1 Stammes (Abb. 38 Mitte) dagegen zeigt ein stark ausgeprägtes zweites Maximum, in dem sich sowohl Cargo- (Rer1p) als auch Hüllproteinen (β - und γ -COP) befinden. Dieses Ergebnis bestätigt die vorhergehenden Resultate über die Akkumulation umhüllter Vesikel in Zellen in denen *DSL1* ausgeschaltet wurde. Jedoch sind auch hier freie Hüllproteine zu finden, wie das erste Maximum zeigt.

Der Probe, die im unteren Diagramm dargestellt ist, wurde vor der Dichtegradientenzentrifugation für 10 min mit 1 % Triton X-100 bei 30° C behandelt, einem starken Detergenz, welches die Membranen der Vesikel zerstört. Wenn es sich bei den isolierten Strukturen tatsächlich um intakte Vesikel handelt, muss nach dieser Behandlung das zweite Maximum verschwinden. Wie in Abb. 38 unten zu erkennen, können lediglich in den oberen Fraktionen Hüll- und Cargoproteine detektiert werden, nicht jedoch in den Fraktionen 15-20, in denen unter normalen Umständen intakte Vesikel zu finden sind. Rer1p verbleibt als monomeres Protein ganz oben auf dem Gradienten, während COP-I Komplexe etwas tiefer in den Gradienten hineinlaufen.

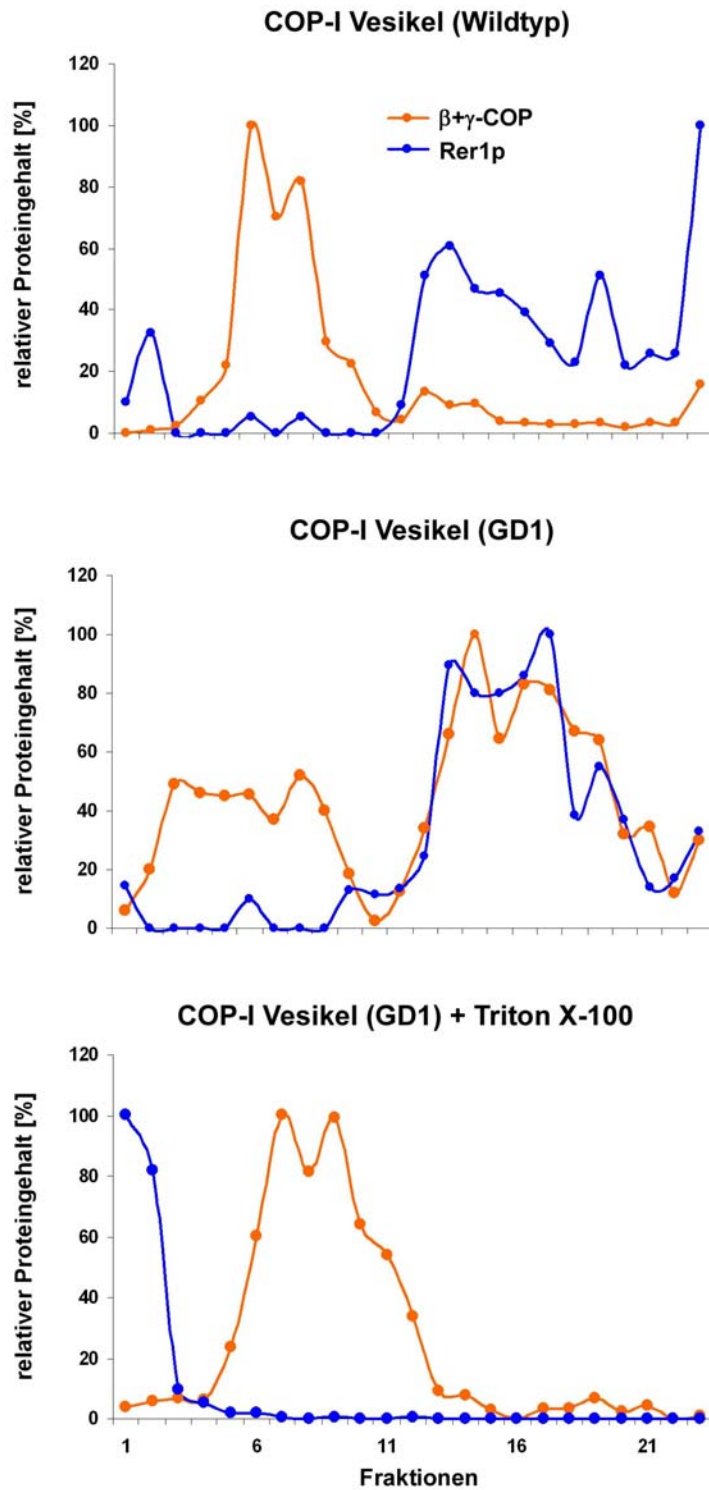


Abb. 38: Quantifizierung von Western-Blots der Fraktionen aus Sucrosegradientenzentrifugations-Experimenten. Nach der SDS-PAGE (10 % Gel) wurden im Western-Blot Hüllproteine (β - und γ -COP) und Cargoproteine (Rer1p) detektiert und mit LumiAnalyst Software ausgewertet. Die Fraktionen gehen von 10 % Sucrose (1) bis 50 % Sucrose (24). Die höchsten Werte wurden jeweils auf 100 % gesetzt.

Das Resultat bestätigt die früheren Ergebnisse über die Akkumulation von COP-I-umhüllten Vesikeln in Dsl1p-Magelzellen. Zudem ermöglicht die Methode zur Isolierung von COP-I-Vesikeln und die gleichzeitige Abtrennung von löslichen Proteinen aber auch die Entwicklung neuer Versuchsanordnungen, beispielsweise eines Assays, welcher den *Uncoating*-Prozess von COP-I-Vesikeln analysiert.

4. Diskussion

Die Interaktionen zwischen *Tethering*- und Hüllproteinkomplexen im vesikelvermittelten Proteintransport waren in den letzten Jahren immer öfter Gegenstand verschiedenster Veröffentlichungen und Dissertationen. Meist sind jedoch Funktionsweise sowie Mechanismus dieser Wechselwirkungen weitestgehend unbekannt und die Bedeutung dieses Prozesses für die Zelle noch recht wenig untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der genauen Analyse der Interaktion zwischen Dsl/SNARE-Komplex und COP-I-Komplex, bzw. zwischen den Untereinheiten Dsl1p und α -COP, welche wichtige Komponenten im retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum darstellen.

4.1 Der Dsl/SNARE-Komplex und seine Untereinheiten

Obwohl die Analyse der Untereinheiten in der Massenspektrometrie keine neuen Ergebnisse ergeben hat, ist es nicht ausgeschlossen, dass der Dsl/SNARE-Komplex noch andere Interaktionen, neben den bisher bekannten, eingeht. Informationen darüber sind für das Verständnis seiner Funktion von großer Bedeutung. Eine Interaktion von Dsl1p mit Zytoskelett-Elementen wäre zum Beispiel auf Grund der Dynactinbindung des Säugerhomologs denkbar. Da viele Wechselbeziehungen, die innerhalb einer Zelle vorkommen, relativ transient sind, können sich dahingehende Untersuchungen aber recht schwierig gestalten. Das hier erzielte Ergebnis bestätigt allerdings, dass die meisten Untereinheiten des Dsl/SNARE-Komplexes in einer 1:1 Stöchiometrie vorliegen.

Die *tandem affinity purification*-(TAP)-Methode ist offensichtlich sehr gut geeignet, um ganze Komplexe aus Hefezellen zu isolieren. Daneben gibt es auch eine Vielzahl an Möglichkeiten, diese Methode zu modifizieren und für andere Zwecke einzusetzen, wie beispielsweise die Aufreinigung von COP-I-Vesikeln oder einstufige Affinitätsreinigungen, in denen der TAPtag benutzt werden kann.

4.2 Mögliche Funktion der α -COP/ α -COP-Interaktion

Der Aufbau des COP-I-Komplexes war bzw. ist schon seit längerer Zeit gut untersucht (Waters et al. 1991, Stenbeck et al. 1992, 1993, Barlowe 2000, Lippincott-Schwartz und Liu 2006,...).

Im Verlauf dieser Arbeit konnten Interaktionen innerhalb des Komplexes beobachtet werden, die durch die α -COP-Untereinheit vermittelt werden. Durch verschiedene Experimente konnte zum einen der Bereich in α -COP, der für die Interaktion mit ϵ -COP und daher auch für die Stabilität und Funktion des COP-I-Komplexes verantwortlich ist, auf die letzten 19 Aminosäuren eingeschränkt

werden. Zum anderen wurde auch die zentrale Domäne (Tryptophan 870) dieser Untereinheit als wichtige Region charakterisiert.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass die zentrale Domäne in α -COP sowie der C-Terminus dazu dienen, eine Bindung von COP-I-Komplexen untereinander zu vermitteln. Die daraus resultierende Vernetzung von COP-I-Komplexen, welche schematisch in der Abb. 39 gezeigt ist, ist sicherlich bedeutend für die Funktionsweise der Hüllproteine.

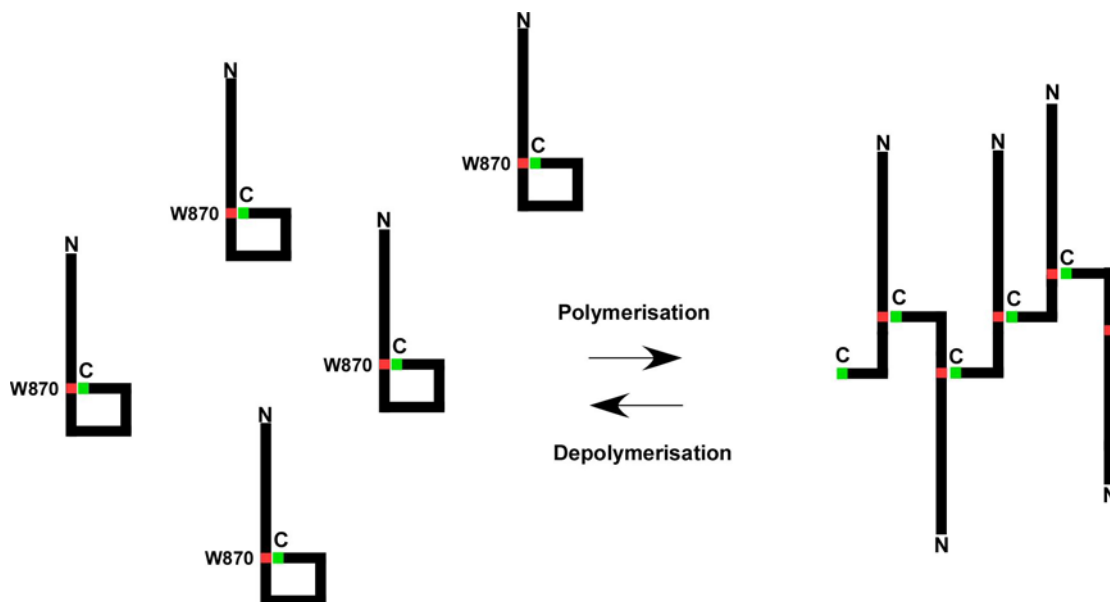


Abb. 39: Schematische Darstellung des Polymerisations/Depolymerisations-Gleichgewichts von α -COP-Molekülen. Domänen: rot: W870, grün: C-Terminus.

4.3 Identifikation der Dsl1p/ α -COP-Interaktionsdomänen

Der zweite wichtige Punkt dieser Arbeit bestand in der Identifikation der Bindedomänen in Dsl1p und α -COP. In der Arbeit von Andag und Schmitt (2003) wurde der für die δ -COP-Interaktion zuständige Bereich in Dsl1p bereits identifiziert und gleichzeitig dort auch die α -COP-Interaktion gefunden.

Die hier gezeigten *in vivo* Studien zeigten, dass tatsächlich die dort ansässigen Tryptophane für die Wechselbeziehung verantwortlich sind. Die Tryptophan zu Alanin Substitution an Position 425, sowie die Substitutionen aller fünf Tryptophane führt zu einem Verlust bzw. zu einer deutlichen Minderung der Interaktion zum COP-I-Komplex. W425 stellt dabei diejenige Position dar, die für die α -COP-Interaktion zuständig ist, im Gegensatz zu W413, W415, W455 und W459, die für die Wechselwirkung mit δ -COP wichtig sind (Andag und Schmitt 2003). Durch Sequenzvergleiche und Bindungsstudien wurde eine bemerkenswerte Ähnlichkeit in Aminosäure-Zusammensetzung und Bindungseigenschaften dieser Region in Dsl1p und der zentralen Domäne in α -COP um das

Tryptophan 870 nachgewiesen. Das zeigt auch die Bindung beider Regionen an den C-Terminus von α -COP an (siehe voriger Abschnitt).

Die Ergebnisse der GST-Bindestudien sowie des Yeast-2-Hybrid-Assays bestätigten ebenfalls eine direkte Bindung von Dsl1p über das Tryptophan 425 mit dem C-Terminus von α -COP und einen stabilisierenden Effekt von ε -COP auf diese Interaktion. Damit besitzt diese α -COP-Domäne eine Dreifachfunktion: die Bindungen innerhalb des COP-I-Komplexes (α - α und α - ε) und die Bindung an Dsl1p, eine Untereinheit des zuständigen *Tethering*-Faktors. Es ist wahrscheinlich, dass die Interaktionen unterschiedlichen Zwecken dienen, also zu verschiedenen Zeitpunkten an verschiedenen Orten des Transportweges stattfinden - erst bei der Bildung von Vesikeln und später bei ihrer Fusion mit dem ER. Die Interaktionen zwischen den COP-I-Komplexen könnten, sobald das Vesikel am ER angekommen ist, durch Wechselwirkungen mit Dsl1p ersetzt werden, was dann zum *Tethering* und zur Fusion führt. Dieses Szenario erfordert allerdings, dass die Hülle nicht, wie früher angenommen, gleich nach der Ablösung des Vesikels von der Golgi-Membran abfällt (siehe Bonifacino und Glick 2004), sondern dass die Hülle komplett oder zumindest teilweise bis zum Eintreffen am ER erhalten bleibt.

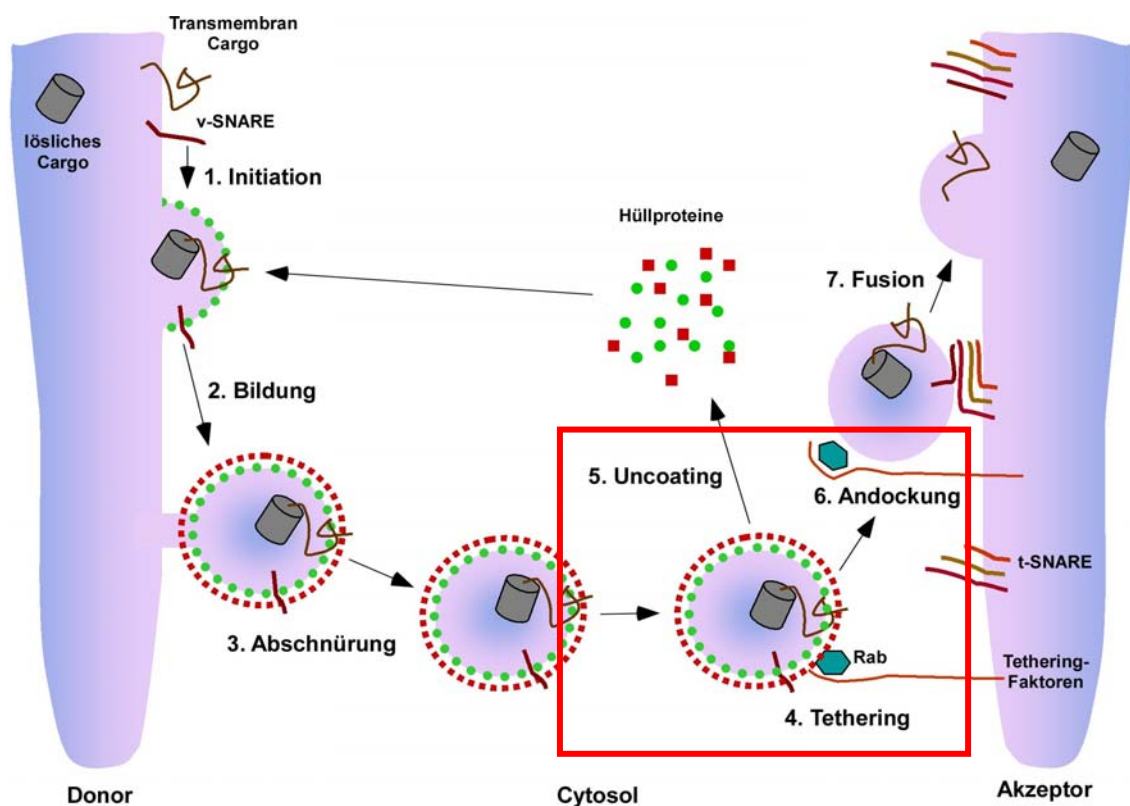


Abb. 40: Schema der einzelnen Schritte im vesikelvermittelten Proteintransport, nach neuen Ergebnissen modifiziert.

Ein dahingehend verändertes Schema der Schritte im Vesikeltransport ist in Abb. 40 zu sehen. Hier erfolgt der *Uncoating*-Prozess nicht unmittelbar nach der Abschnürung sondern erst nach dem Transport zur Akzeptormembran und dem *Tethering*. In diesem Fall sind die *Tethering*-Faktoren in der Lage, mit den Hüllproteinen auf dem Vesikel zu interagieren und so den nachfolgenden Andockungsprozess zu initiieren. Des Weiteren beruht das Modell auf der Annahme, dass der Dsl/SNARE-Komplex immer fest am ER verankert bleibt. Dafür spricht unter anderem die hohe Stabilität der Interaktionen von Dsl1p, Dsl3p und Tip20p mit den SNAREs (Kraynack et al. 2005, Tripathi et al. 2009).

4.4 Akkumulation von COP-I-Vesikeln am ER in Dsl1p-Mangelzellen

Da *dsl1Δ*-Mutationen nicht lebensfähig sind, müssen für die Analyse der Funktion von *DSL1* entweder konditional letale Mutationen oder Fusionen mit regulierbaren Promotern benutzt werden. Letzteres hat den Vorteil, dass nach dem Ausschalten von *DSL1* das ganze Genprodukt fehlt und nicht nur eine Domäne betroffen ist (siehe *dsl1-22*).

Wie die Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen zeigten, verursacht der Verlust von Dsl1p eine massive Akkumulation von *gecoateten* Vesikeln, welche sich am endoplasmatischen Retikulum zu Aggregaten zusammenfinden. Auch in Zellen, in denen der Dsl/SNARE-Komplex durch andere Mutationen in seinem Zusammenhalt negativ beeinflusst wurde, konnte dieser Phänotyp beobachtet werden.

Früherer Arbeiten zeigten bereits, dass Mutanten, die einen Defekt im Dsl/SNARE-Komplex aufweisen, durch ein aufgeblähtes ER und teilweise durch kleinere Ansammlungen von Vesikeln (*SEC20* aus und *TIP20* aus Zellen) charakterisiert werden (Kaiser und Scheckman 1990, Sweet und Pelham 1992, Sweet und Pelham 1993, Kraynack et al. 2005). Die hier erzielten Ergebnisse stimmen in diesen Punkten durchaus überein, identifizierten aber zusätzlich die akkumulierten Strukturen als noch umhüllte COP-I-Vesikel.

Ähnliche Phänotypen wurden auch in Säugerzellen beobachtet. Wird beispielsweise der p115 *Tethering*-Faktor inhibiert, kommt es zu einem deutlichen Anstieg an COP-I-Vesikeln in der Golgi-Region. Diese Vesikel tragen allerdings keine Hüllproteine (Seemann et al 2000).

Zolov und Lupashin (2005) zeigten, dass die Deletion einer COG Untereinheit zur Akkumulation teilweise *gecoateter* Vesikel führt, diese aber nicht aggregieren, wie das in unseren Hefezellen der Fall ist.

Das von uns beobachtete Phänomen der Akkumulation und Aggregation umhüllter COP-I-Vesikel am ER scheint also hier auf Hefezellen und den Dsl/SNARE-Komplex beschränkt zu sein und eröffnet die Möglichkeit die zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu untersuchen.

4.5 Sind die akkumulierten Strukturen funktionelle COP-I-Vesikel?

Mit diesem Phänotyp stellt sich natürlich die Frage, ob diese Cluster bzw. die akkumulierten Vesikel lediglich die Folge extremer Stressbedingungen sind oder ob sie tatsächlich funktionell sind und diese Strukturen durch einen Block im Proteintransport bzw. der Fusion verursacht wird.

Für die letztere Möglichkeit spricht zum einen, (1) dass der Wachstumsstopp nach Ausschalten des Gens und die Bildung der Vesikelcluster zeitlich eng beieinander liegen, so dass die Zellen ohne lange diesen Stressbedingungen ausgesetzt zu sein, diesen Phänotyp aufweisen. (2) Zum anderen lösen sich diese Aggregationen relativ kurze Zeit nach Anschalten des Gens wieder auf und die Zellen beginnen wieder mit dem Wachstum, was zeigt, dass der normale Proteintransport wieder aufgenommen werden kann. (3) Ein anderes Indiz ist die Colokalisation der Vesikelcluster sowohl mit Cargomolekülen, die zwischen ER und Golgi-Apparat recyceln (Emp47p, Rer1p), als auch mit späten Golgi-Marker (Sec7p), da beide Transportschritte (Golgi-ER und intra-Golgi) COP-I-abhängig sind. Die Vesikel scheinen also funktionell zu sein. Die durch GTP- γ S induzierte Akkumulation von COP-I-Vesikeln in Säugerzellen ist dagegen unphysiologisch, da diese Vesikel weitgehend frei von Cargo sind (Nickel et al. 1998).

Andere Colokalisation-Studien zeigten, dass sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante *gecoatete* COP-I-Vesikel in der Nähe oder am endoplasmatischen Retikulum zu finden sind. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für die im vorigen Abschnitt diskutierte Möglichkeit, dass sich COP-I-Vesikel in jedem Fall am ER befinden und durch Dsl1p-Mangel der nächste Schritt im Transportweges verbaut wird und somit die Vesikel an dieser Stelle anstauen.

4.6 Was ist die Ursache für die Anhäufung von COP-II-Membranen im Zentrum von COP-I-Vesikelclustern?

Die überraschende Entdeckung, dass neben COP-I Vesikeln auch COP-II Untereinheiten des anterograden Transports in den Clustern zu finden waren, veranlasste uns zu der Frage, ob es in anderen Zellen ein ähnliches Phänomen gibt, welches jedoch bisher nicht beobachtet werden konnte.

In Säugerzellen findet man ein so genanntes ERGIC, das ER-Golgi intermediate compartment (oder VTC – vesicular tubular cluster), ein komplexes Membransystem zwischen ER und Golgi. Proteine aus dem ER müssen auf ihrem Weg zum Golgi-Apparat dieses ERGIC passieren, wo Modifikationen, Faltungen und Qualitätskontrollen stattfinden. Danach werden sie in einem zweiten vesikelvermittelten Schritt weiter zum Golgi transportiert. Das ERGIC scheint als stationäre und stabile Struktur vorzuliegen und sowohl COP-I- als auch COP-II-abhängige Vesikel könne an diesem intrazellulären „Knotenpunkt“ gefunden werden (Saraste und Svensson 1991, Ben-Tekaya et al.

2005, Appenzeller-Herzog und Hauri 2006). Ein ähnliches Kompartiment wurde auch in *S. cerevisiae*-Zellen beobachtet, allerdings erscheint es hier als sehr kurzlebige Ansammlung von Vesikeln in der Nähe des ERs (Morin-Ganet et al. 2000). Somit wäre es möglich, dass die hier beobachteten COP-I-/COP-II-Cluster ein stark vergrößertes und stabileres ER-Golgi-Intermediat in der Hefezelle darstellt, in der die Vesikel anstauen, weil der weitere Transportweg blockiert ist.

Andererseits könnte es zu der Colokalisation auch durch die direkte Nachbarschaft von *ER exit sites* (Austrittspunkte der COP-II-Vesikel) und bevorzugten Fusionsregionen der COP-I-Vesikel am ER kommen, wie schon in Säugerzellen gezeigt wurde (Stephens et al. 2000, Castillon et al. 2009). Kommt es so zur Anstauung der COP-I-Strukturen an dieser Stelle, könnte man natürlich auch COP-II-Membranen finden.

Ein anderer Faktor, der zur Colokalisation von COP-I- und COP-II-Membranen führen könnte, liegt in der Funktion von COP-I-Vesikeln, Proteine der Transportmaschinerie zu recyceln, also zum ER zurückzubringen. Ist dieser Weg jedoch blockiert, fehlen diese Komponenten nach einer gewissen Zeit und auch der Vorwärtstransport kann nicht mehr funktionieren, so dass es auch zu einer Akkumulation von COP-II-Komponenten am ER kommen könnte.

Die *tip20-8*-Mutante, welche laut unserer Ergebnisse denselben Phänotyp wie ein Dsl1p-Mangelstamm aufweist, wurde in früheren Arbeiten bereits mit COP-II-Vesikeln in Zusammenhang gebracht (Kamena und Spang 2004). Dort konnte gezeigt werden, dass in *tip20*-Mutanten diese Vesikel wieder mit der ER-Membran verschmelzen, was im Wildtyp verhindert wird. Genau wie in unseren Versuchen, zeigte die *dsl1-22*-Mutante diesen Phänotyp nicht. Das Ergebnis passt zu dem hier vorgestellten Befund, dass sich in Mutanten mit defektem Dsl/SNARE-Komplex COP-I- und COP-II-Membranen sehr nahe kommen. Allerdings konnte keine Vermischung der Membranen in Dsl1p-Mangelzellen festgestellt werden (Abb. 36).

4.7 Welche Rolle spielt die Dsl1p/ α -COP-Interaktion im vesikelvermittelten Proteintransport?

Wie bereits erwähnt, gibt die direkte Interaktion von Dsl/SNARE-*Tethering*- und COP-I-Komplex Anlass zu der Vermutung, dass die Hüllproteine länger auf dem Vesikel verbleiben als bisher allgemein angenommen wurde (siehe auch Abb. 40).

Betrachtet man allerdings frühere Arbeiten, gibt es Hinweise, dass direkt nach der Fertigstellung des Vesikels Signale ausgesendet werden, welche die Arf1-GTPasen stimulieren und in Folge dessen die Hüllproteine vom Vesikel abfallen (Antonny et al. 2001, Bigay et al. 2003). Unbekannt ist aber der Zeitrahmen, in der sich dieser Prozess abspielt, wie lange also die Hüllproteine nach der GTP-Hydrolyse noch auf dem Vesikel verbleiben.

Für eine Möglichkeit, bei der die Hülle länger auf dem Vesikel bleibt, sprechen Hinweise auf Interaktionen zwischen Hüllproteinkomplexen und *Tethering*-Faktoren, wie beispielsweise zwischen Sec23p (COP-II) und Bet3p (TRAPP-I) (Cai et al. 2007).

Im Fall des COP-I-Komplexes ist es vorstellbar, dass der C-Terminus von α -COP eine entscheidende Rolle für den Mechanismus spielt. Das heißt, im Wildtyp könnte es während der Entstehung des Vesikels durch die Interaktion zwischen den α -COP-Domänen verschiedener COP-I-Komplexe zur Bildung von α -COP-Dimeren bzw. -Oligomeren kommen. Damit wäre eine Grundlage geschaffen für eine Polymerisation der Hüllkomplexe um das Vesikel. Bei der Ankunft an der ER-Membran könnte dann Dsl1p zum Einsatz kommen, indem es den C-Terminus von α -COP bindet. Wirkt Dsl1p dabei enzymatisch als *Uncoating*-Faktor? Wahrscheinlich nicht, da bisher keinerlei Daten für eine direkte Rolle von Dsl1p in diesem Prozess vorliegen (zum Beispiel in „*Uncoating Assays*“). Darüber hinaus zeigt die erst vor kurzem aufgeklärte Struktur des Dsl/SNARE-Komplexes Charakteristika eines typischen *Tethering*-Komplexes (Tripathi et al. 2009). Vorstellbar dagegen ist, dass Dsl1p die Entfernung der Vesikelhülle erleichtert, indem es eine Repolymerisation zwischen den α -COP-Domänen verhindert. Die Membranbindung und Ablösung von COP-I-Untereinheiten ist ein sehr dynamischer Arf-regulierter-Prozess. Durch die Bindung von Dsl1p an α -COP könnte das Gleichgewicht auf die Seite der Depolymerisation (*Uncoating*) verschoben werden.

Beim Fehlen von Dsl1p kommt es zum Anstau der Vesikel und die α -COP-Domänen der benachbarten Vesikel beginnen zu interagieren, was schlussendlich zu einer massiven Aggregation dieser Strukturen am ER führt. Dieses Szenario erscheint auch insofern plausibel, als dass durch Zerstörung der Dsl1p-Bindedomäne (*DSL1_5XWA*) für α -COP der beschriebene Phänotyp ausgelöst wird und durch Deletion der C-terminalen 19 Aminosäuren in α -COP die Clusterbildung wieder aufgehoben werden kann. Ein Modell dieses möglichen Mechanismus ist in Abb. 41 dargestellt. Dort wird gezeigt wie das *Tethering* zwischen umhüllten COP-I-Vesikeln und dem Dsl/SNARE-Komplex im Wildtyp ablaufen und wie die Clusterbildung in Dsl1p-Mangelzellen entstehen könnte.

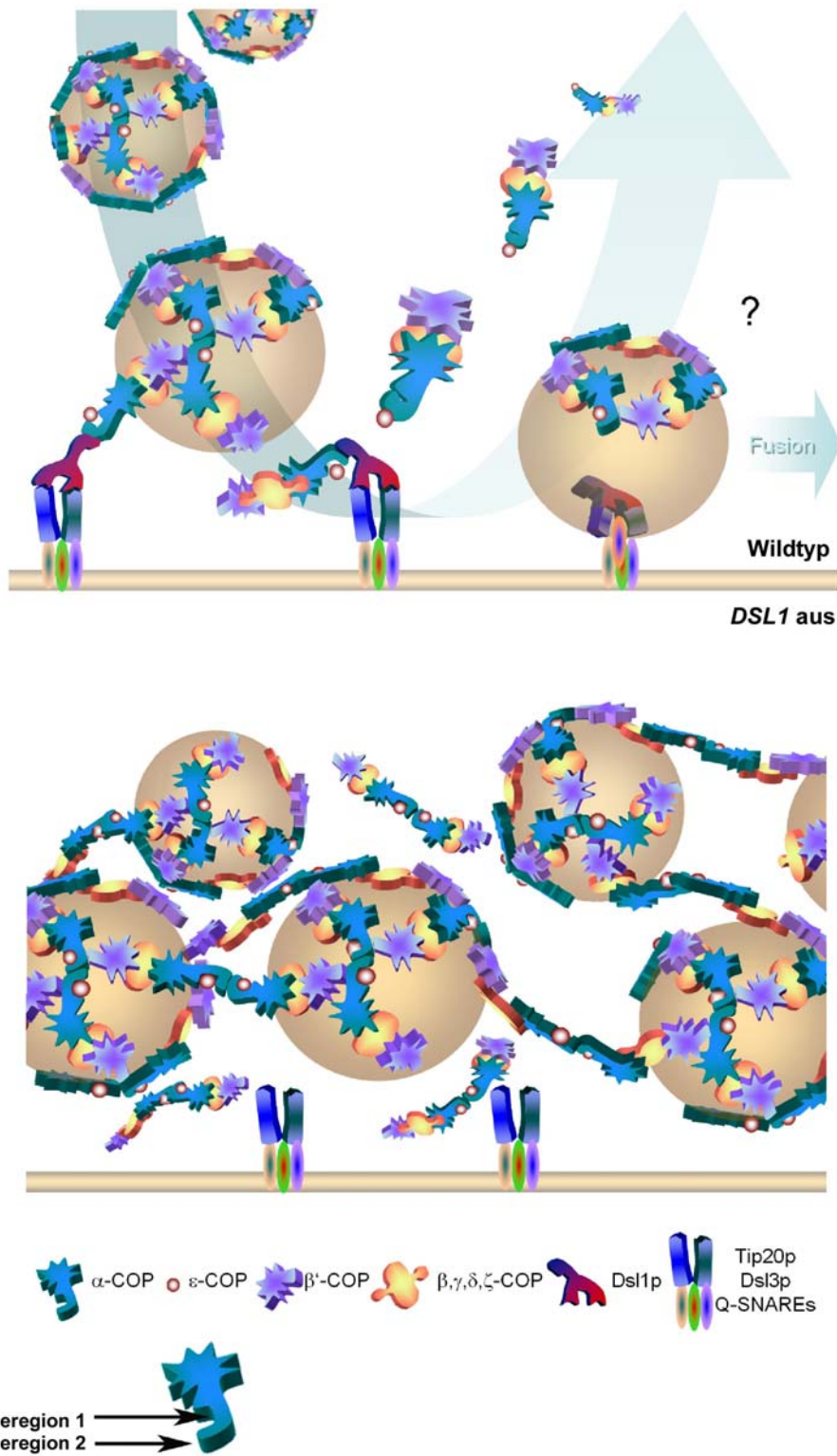


Abb. 41: Modell der Interaktion zwischen COP-I-Vesikel und Dsl/SNARE-Komplex an der ER-Membran in Wildtyp und Dsl1p-Mangelzellen. Zur Verfügung gestellt von H.D. Schmitt (MPI für biophysikalische Chemie, Abteilung Neurobiologie).

4.8 Die Struktur des Dsl/SNARE-Komplexes

Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde die Struktur des Dsl/SNARE-Komplexes vor kurzem von Tripathi und Kollegen (Tripathi et al. 2009) teilweise aufgeklärt. Gleichzeitig wurden paarweise Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes detailliert untersucht. Die dort vorgestellten Ergebnisse passen gut zu den hier erzielten Resultaten.

- (1) Die 1:1 Stöchiometrie des Dsl/SNARE-Komplexes, wie hier zum Beispiel in der TAP-Aufreinigung gesehen, wurde bestätigt.
- (2) Die COP-I-Interaktionsdomäne in Dsl1p um das Tryptophan 425 wird laut den Kristallographie-Daten exponiert, so dass eine Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten erleichtert wird. Dieses Szenario wird auch in der Abb. 40 angedeutet.
- (3) Im dort vorgestellten Modell agiert der Dsl/SNARE-Komplex als Einheit. Die Tatsache, dass Mutationen in *DSL1*, *TIP20* und den SNARE-Proteinen den exakt gleichen Effekt haben, wie von uns beobachtet, ist ein weiteres Indiz für dieses Modell.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertationsschrift sollte die Interaktion zwischen dem ER-lokalisierten Dsl/SNARE-*Tethering*-Komplex und dem COP-I-Hüllkomplex einer genaueren Analyse unterzogen werden. Dabei sollte besonders auf die Rolle von Dsl1p und α -COP im *Tethering*- und Fusionsprozess von COP-I-Vesikeln mit der ER-Membran eingegangen werden.

Zuerst einmal ist es gelungen, den Dsl/SNARE-Komplex über die *tandem affinity purification*-Methode zu isolieren. Wenn auch keine neuen Untereinheiten oder Interaktionspartner identifiziert werden konnten, so bestätigte sich doch die 1:1 Stöchiometrie des Komplexes.

Für die Interaktion mit Dsl1p ist der C-Terminus von α -COP von entscheidender Bedeutung, was durch Wachstumstests, Affinitätsreinigungen, GST-Bindungsstudien und zusätzlich durch einen Yeast-2-Hybrid-Test nachgewiesen wurde. Außerdem waren wir mit dieser Art von Versuchen auch in der Lage, dieser Region weitere Bindungseigenschaften zuzuordnen, da er sowohl an die regulatorische COP-I-Untereinheit ϵ -COP bindet, als auch an die zentrale Domäne um das Tryptophan 870 in α -COP selbst. Die Bindedomäne in Dsl1p konnte dagegen auf den zentralen Bereich des Proteins mit den fünf Tryptophanen (besonders W425) eingegrenzt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Dsl1p in einem Bereich des COP-I-Komplexes bindet, der für die Vernetzung der Komplexe zu Hüllstrukturen eine entscheidende Rolle spielt. Dabei benutzt Dsl1p ein Sequenzmotiv, das in α -COP selbst zu finden ist.

Durch die Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie wurde ein neuer Phänotyp durch das Ausschalten von *DSL1* entdeckt: Die massive Akkumulation gecoateter COP-I-Vesikel und deren Aggregation zu Clustern am endoplasmatischen Retikulum. Dieses Phänomen konnte auch in Zellen mit anderen Defekten des Dsl/SNARE-Komplexes beobachtet werden. Colokalisationsstudien und Affinitätsreinigungen zeigten, dass es sich bei diesen Strukturen um intakte Vesikel handelt, welche am ER anstauen und dass neben COP-I- auch COP-II-Membranen in den Clustern zu finden sind. Die Möglichkeit der einfachen Isolation und Aufreinigung von Vesikeln könnte für spätere Untersuchungen des *Uncoating*-Prozesses von größter Bedeutung sein.

Zusammengenommen liefern uns die Resultate dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Rolle des Dsl/SNARE-Komplexes im vesikelvermittelten Proteintransport als Vermittler des *Tetherings* von COP-I-Vesikeln und als wichtigen Faktor im *Uncoating*-Mechanismus, der vor der Fusion mit der ER-Membran erfolgt.

6. Literaturverzeichnis

Andag, U., Neumann, T., and Schmitt, H.D. (2001). The coatamer-interacting protein Dsl1p is required for Golgi-to-endoplasmic reticulum retrieval in yeast. *J Biol Chem* **276**, 39150-39160.

Andag, U., and Schmitt, H.D. (2003). Dsl1p, an essential component of the Golgi-endoplasmic reticulum retrieval system in yeast, uses the same sequence motif to interact with different subunits of the COPI vesicle coat. *J Biol Chem* **278**, 51722-51734.

Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* **3**, 531-537.

Appenzeller-Herzog, C., and Hauri, H.P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* **119**, 2173-2183.

Arasaki, K., Taniguchi, M., Tani, K., and Tagaya, M. (2006). RINT-1 regulates the localization and entry of ZW10 to the syntaxin 18 complex. *Mol Biol Cell* **17**, 2780-2788.

Ballensiefen, W., Ossipov, D., and Schmitt, H.D. (1998). Recycling of the yeast v-SNARE Sec22p involves COPI-proteins and the ER transmembrane proteins Ufe1p and Sec20p. *J Cell Sci* **111** (Pt 11), 1507-1520.

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

Barlowe, C. (1997). Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *J Cell Biol* **139**, 1097-1108.

Barlowe, C. (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 67-76.

Barlowe, C. (2000). Traffic COPs of the early secretory pathway. *Traffic* **1**, 371-377.

-
- Behnia, R., Barr, F.A., Flanagan, J.J., Barlowe, C., and Munro, S. (2007). The yeast orthologue of GRASP65 forms a complex with a coiled-coil protein that contributes to ER to Golgi traffic. *J Cell Biol* **176**, 255-261.
- Bennett, M.K., and Scheller, R.H. (1993). The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2559-2563.
- Ben-Tekaya, H., Miura, K., Pepperkok, R., and Hauri, H.P. (2005). Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *J Cell Sci* **118**, 357-367.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S., and Antonny, B. (2003). Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**, 563-566.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Boehm, J., Letourneur, F., Ballensiefen, W., Ossipov, D., Demolliere, C., and Schmitt, H.D. (1997). Sec12p requires Rer1p for sorting to coatomer (COPI)-coated vesicles and retrieval to the ER. *J Cell Sci* **110 (Pt 8)**, 991-1003.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-166.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Burnette, W.N. (1981). "Western-Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007a). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* **12**, 671-682.

Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J.C., and Ferro-Novick, S. (2007b). TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature* **445**, 941-944.

Cao, X., Ballew, N., and Barlowe, C. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Usa1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J* **17**, 2156-2165.

Castillon, G.A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T.M., and Riezman, H. (2009). Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* **10**, 186-200.

Cosson, P., Schroder-Kohne, S., Sweet, D.S., Demolliere, C., Hennecke, S., Frigerio, G., and Letourneur, F. (1997). The Sec20/Tip20p complex is involved in ER retrieval of dilysine-tagged proteins. *Eur J Cell Biol* **73**, 93-97.

Dilcher, M., Veith, B., Chidambaram, S., Hartmann, E., Schmitt, H.D., and Fischer von Mollard, G. (2003). Usa1p is a yeast SNARE protein required for retrograde traffic to the ER. *EMBO J* **22**, 3664-3674.

Dogic, D., de Chasse, B., Pick, E., Cassel, D., Lefkir, Y., Hennecke, S., Cosson, P., and Letourneur, F. (1999). The ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Glo3p is involved in ER retrieval. *Eur J Cell Biol* **78**, 305-310.

Duden, R., Kajikawa, L., Wuestehube, L., and Schekman, R. (1998). ϵ -COP is a structural component of coatamer that functions to stabilize α -COP. *EMBO J* **17**, 985-995.

Duden, R. (2003). ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol* **20**, 197-207.

Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., and Duden, R. (2000). COP I domains required for coatamer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J* **19**, 3905-3917.

Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., and Duden, R. (2004). The α - and β' -COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell* **15**, 1011-1023.

- Ferro-Novick, S., and Jahn, R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* **370**, 191-193.
- Giepmans, B.N., Adams, S.R., Ellisman, M.H., and Tsien, R.Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217-224.
- Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., and Heuser, J.E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* **90**, 523-535.
- Hein, B., Willig, K.I., and Hell, S.W. (2008). Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14271-14276.
- Hell, S.W., and Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* **19**, 780-782.
- Hirose, H., Arasaki, K., Dohmae, N., Takio, K., Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Tani, K., Yamamoto, A., Tohyama, M., and Tagaya, M. (2004). Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *EMBO J* **23**, 1267-1278.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-643.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Jamieson, J.D., and Palade, G.E. (1967). Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. *J Cell Biol* **34**, 597-615.

- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., *et al.* (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947-962.
- Kaiser, C.A., and Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* **61**, 723-733.
- Kamena, F., and Spang, A. (2004). Tip20p prohibits back-fusion of COPII vesicles with the endoplasmic reticulum. *Science* **304**, 286-289.
- Kamena, F., Diefenbacher, M., Kilchert, C., Schwarz, H., and Spang, A. (2008). Ypt1p is essential for retrograde Golgi-ER transport and for Golgi maintenance in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* **121**, 1293-1302.
- Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 187-198.
- Klar, T.A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., and Hell, S.W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8206-8210.
- Kops, G.J., Kim, Y., Weaver, B.A., Mao, Y., McLeod, I., Yates, J.R., 3rd, Tagaya, M., and Cleveland, D.W. (2005). ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore. *J Cell Biol* **169**, 49-60.
- Kraynack, B.A., Chan, A., Rosenthal, E., Essid, M., Umansky, B., Waters, M.G., and Schmitt, H.D. (2005). Dsl1p, Tip20p, and the novel Dsl3(Sec39) protein are required for the stability of the Q/t-SNARE complex at the endoplasmic reticulum in yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 3963-3977.
- Kümmel, D., and Heinemann, U. (2008). Diversity in structure and function of tethering complexes: evidence for different mechanisms in vesicular transport regulation. *Curr Protein Pept Sci* **9**, 197-209.
- Lämmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H., and Cosson, P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199-1207.

Lewis, M.J., and Pelham, H.R. (1996). SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* **85**, 205-215.

Lewis, M.J., Rayner, J.C., and Pelham, H.R. (1997). A novel SNARE complex implicated in vesicle fusion with the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **16**, 3017-3024.

Lin, R.C., and Scheller, R.H. (1997). Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* **19**, 1087-1094.

Lippincott-Schwartz, J., and Liu, W. (2006). Insights into COPI coat assembly and function in living cells. *Trends Cell Biol* **16**, e1-4.

Liu, Y., Kahn, R.A., and Prestegard, J.H. (2009). Structure and membrane interaction of myristoylated ARF1. *Structure* **17**, 79-87.

Lowe, M., and Kreis, T.E. (1995). In vitro assembly and disassembly of coatamer. *J Biol Chem* **270**, 31364-31371.

Lowe, M., and Kreis, T.E. (1996). In vivo assembly of coatamer, the COP-I coat precursor. *J Biol Chem* **271**, 30725-30730.

Majoul, I., Straub, M., Hell, S.W., Duden, R., and Söling, H.D. (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell* **1**, 139-153.

Mellman, I., and Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**, 99-112.

Michelsen, K., Schmid, V., Metz, J., Heusser, K., Liebel, U., Schwede, T., Spang, A., and Schwappach, B. (2007). Novel cargo-binding site in the β and δ subunits of coatamer. *J Cell Biol* **179**, 209-217.

Morin-Ganet, M.N., Rambourg, A., Deitz, S.B., Franzusoff, A., and Kepes, F. (2000). Morphogenesis and dynamics of the yeast Golgi apparatus. *Traffic* **1**, 56-68.

Nickel, W., Malsam, J., Gorgas, K., Ravazzola, M., Jenne, N., Helms, J.B., and Wieland, F.T. (1998). Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTP γ S in vitro. *J Cell Sci* **111** (Pt 20), 3081-3090.

Novick, P., Field, C., and Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-215.

Orth, T., Reumann, S., Zhang, X., Fan, J., Wenzel, D., Quan, S., and Hu, J. (2007). The PEROXIN11 protein family controls peroxisome proliferation in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 333-350.

Palade, G. (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* **189**, 867.

Poon, P.P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R.A., and Johnston, G.C. (1999). Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *EMBO J* **18**, 555-564.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229.

Reilly, B.A., Kraynack, B.A., VanRheenen, S.M., and Waters, M.G. (2001). Golgi-to-endoplasmic reticulum (ER) retrograde traffic in yeast requires Dsl1p, a component of the ER target site that interacts with a COPI coat subunit. *Mol Biol Cell* **12**, 3783-3796.

Rein, U., Andag, U., Duden, R., Schmitt, H.D., and Spang, A. (2002). ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat. *J Cell Biol* **157**, 395-404.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-1032.

Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.

Sato, K., Nishikawa, S., and Nakano, A. (1995). Membrane protein retrieval from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum (ER): characterization of the RER1 gene product as a component involved in ER localization of Sec12p. *Mol Biol Cell* **6**, 1459-1477.

Schröder, S., Schimmöller, F., Singer-Kruger, B., and Riezman, H. (1995). The Golgi-localization of yeast Emp47p depends on its di-lysine motif but is not affected by the ret1-1 mutation in alpha-COP. *J Cell Biol* **131**, 895-912.

Seemann, J., Jokitalo, E.J., and Warren, G. (2000). The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo. *Mol Biol Cell* **11**, 635-645.

Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**, 3-41.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). „Molecular cloning“ Cold Spring Harbor New York, CSH Lab Press.

Saraste, J., and Svensson, K. (1991). Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J Cell Sci* **100 (Pt 3)**, 415-430.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.

Smith, D.B., and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.

Spang, A., and Schekman, R. (1998). Reconstitution of retrograde transport from the Golgi to the ER in vitro. *J Cell Biol* **143**, 589-599.

Spang, A., Herrmann, J.M., Hamamoto, S., and Schekman, R. (2001). The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **12**, 1035-1045.

Stearns, T., Kahn, R.A., Botstein, D., and Hoyt, M.A. (1990). ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. *Mol Cell Biol* **10**, 6690-6699.

Stenbeck, G., Schreiner, R., Herrmann, D., Auerbach, S., Lottspeich, F., Rothman, J.E., and Wieland, F.T. (1992). γ -COP, a coat subunit of non-clathrin-coated vesicles with homology to Sec21p. *FEBS Lett* **314**, 195-198.

Stenbeck, G., Harter, C., Brecht, A., Herrmann, D., Lottspeich, F., Orci, L., and Wieland, F.T. (1993). β' -COP, a novel subunit of coatamer. *EMBO J* **12**, 2841-2845.

Stephens, D.J., Lin-Marq, N., Pagano, A., Pepperkok, R., and Paccaud, J.P. (2000). COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites. *J Cell Sci* **113 (Pt 12)**, 2177-2185.

Sweet, D.J., and Pelham, H.R. (1992). The *Saccharomyces cerevisiae* *SEC20* gene encodes a membrane glycoprotein which is sorted by the HDEL retrieval system. *EMBO J* **11**, 423-432.

Sweet, D.J., and Pelham, H.R. (1993). The *TIP1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an 80 kDa cytoplasmic protein that interacts with the cytoplasmic domain of Sec20p. *EMBO J* **12**, 2831-2840.

Sztul, E., and Lupashin, V. (2006). Role of tethering factors in secretory membrane traffic. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C11-26.

Tripathi, A., Ren, Y., Jeffrey, P.D., and Hughson, F.M. (2009). Structural characterization of Tip20p and Dsl1p, subunits of the Dsl1p vesicle tethering complex. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 114-123.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-544.

Vanrheenen, S.M., Reilly, B.A., Chamberlain, S.J., and Waters, M.G. (2001). Dsl1p, an essential protein required for membrane traffic at the endoplasmic reticulum/Golgi interface in yeast. *Traffic* 2, 212-231.

Varma, D., Dujardin, D.L., Stehman, S.A., and Vallee, R.B. (2006). Role of the kinetochore/cell cycle checkpoint protein ZW10 in interphase cytoplasmic dynein function. *J Cell Biol* 172, 655-662.

Waters, M.G., Serafini, T., and Rothman, J.E. (1991). 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 349, 248-251.

Whyte, J.R., and Munro, S. (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci* 115, 2627-2637.

Zolov, S.N., and Lupashin, V.V. (2005). Cog3p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells. *J Cell Biol* 168, 747-759.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Bez.	Bezeichnung
Bsp.	Beispiel
C	Cytein
COP	Coatprotein/-e, Hüllprotein/-e
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
E	Glutaminsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER Golgi intermediate compartment
F	Phenylalanin
G	Glycin
GAP	Guaninnukleotid-Aktivierungsprotein (guanine nucleotid activation protein)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotid exchange factor)
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
h	Stunde
I	Isoleucin
K	Lysin
kDa	kilo Dalton
L	Leucin
M	Methionin
min	Minuten
N	Asparagin
OD	optische Dichte
P	Prolin

Q	Glutamin
R	Arginin
RS	Restriktionsschnittstelle
S	Serin
SDS	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunden
SNARE	soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
T	Threonin
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
Tab.	Tabelle
UE	Untereinheiten
V	Valin
(v/v)	Volumverhältnis (volume/volume)
W	Tryptophan
(w/v)	Masse/Volumenverhältnis (weight/volume)
Y	Tyrosin

7.2 Ergebnisse der Massenspektrometrie-Analyse des Dsl/SNARE-Komplexes

Tab. 14: Gesamtübersicht über die Ergebnisse der MS-Analyse des Dsl/SNARE-Komplexes. Orange: Proteine des Dsl/SNARE Komplexes und Abbaubanden (graue Schrift). Blau: Überreste TAP-Aufreinigung. Weiß: Kontaminationen (*S. cerevisiae*). Gelb: Kontaminationen (andere Organismen)

Bande	Mascot	Größe (Dalton)	Score	Beschreibung
1	gi 6324071	88 016	1898	Dsl1p
	gi 54306503	20 092	213	Cloning vector pMK33-NTAP
	gi 54020050	85 014	41	hypothetical protein mhp132 [<i>Mycoplasma hypopneumoniae</i> 232]
	gi 75910335	96 831	40	TPR repeat-containing protein [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]
2	gi 6323473	82 344	677	Dsl3p
	gi 6324071	88 016	383	Dsl1p
3 + 4	gi 14318435	81 116	1216	Tip20p
	gi 6324071	88 016	311	Dsl1p
5	gi 58250	5741	35	keptide unit, Factor X unit, calmodulin bindung unit
	gi 6324071	88 016	833	Dsl1p
	gi 225632	24 420	91	casein alphaS1
	gi 54306503	20 092	81	Cloning vector pMK33-NTAP
	gi 2983632	8980	36	ferredoxin [<i>Aquifex aeolicus</i> VF5]
6	gi 17512136	60 064	355	IGHG1 protein [<i>Homo sapiens</i>]
	gi 121043	35 862	253	Ig gamma-2 chain C region
	gi 6320706	43 855	146	Sec20p
	gi 6324071	88 016	108	Dsl1p
	gi 58250	5741	57	keptide unit, Factor X unit, calmodulin bindung unit
	gi 10173136	30 834	32	positive regulator of sigma-B activity [<i>Bacillus halodurans</i> C-125]
7	gi 6324071	88 016	645	Dsl1p
	gi 54306503	20 092	88	Cloning vector pMK33-NTAP
	gi 6320706	43 855	81	Sec20p
	gi 11466617	20 911	46	hypothetical protein [<i>Porphyrta pulchra</i>]
8	gi 6324071	88 016	614	Dsl1p
	gi 54306503	20 092	101	Cloning vector pMK33-NTAP
	gi 6320706	43 855	52	Sec20p
	gi 9665101		34	Hypothetical protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
9	gi 6324071	88 016	508	Dsl1p
	gi 6324649	40 513	71	Ufe1p
	gi 58250	5741	46	keptide unit, Factor X unit, calmodulin bindung unit
	gi 26452122	62 628	44	unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
10	gi 4698	38 957	35	beta-isopropylmalate dehydrogenase [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]
	gi 6321340	28 089	599	Use1p
	gi 6324071	88 016	29	Dsl1p
11	gi 6324649	40 513	35	Ufe1p
	gi 21669345	28 576	479	immunoglobulin kappa light chain VLJ region [<i>Homo sapiens</i>]
	gi 6321653	28 007	141	Rps0ap [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>], small (40S) ribosomal subunit
12	gi 6322583	25 023	106	Rps5p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>], small (40S) ribosomal subunit
	gi 11275302	23 502	322	anti TNF-alpha antibody light-chain Fab fragment [<i>Homo sapiens</i>]
13	gi 106586	23 037	97	Ig kappa chain V-III (KAU cold agglutinin) - human
	gi 223872	16 696	81	calmodulin

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Göttingen, April 2009

Danksagung

Bei Herrn Dr. habil. Schmitt möchte ich mich ganz herzlich für das interessante Thema, seine hilfsbereite Betreuung und die vielen bereichernden Ideen und Diskussionen danken. Ich habe in der Zeit viel Neues gelernt - nicht nur über Hefen.

Herrn Prof. Jahn danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie für viele lehrreiche Kommentare und Anregungen.

Für die freundliche Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg / Institut für Biologie danke ich Herrn Prof. Klösgen.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen KollegInnen der Abteilung Neurobiologie für die angenehmen Jahre, die Hilfsbereitschaft und viele nette Nachmittage und Abende in geselliger Runde.

Für die Hilfe bei meinen ersten Schritten am Mikroskop möchte ich Christian Wurm (konfokal), Arne Schreiber (STED) und Ulf Geumann danken. Dirk Wenzel hat uns mit seinen Elektronenmikroskop-Aufnahmen auf den richtigen Weg gebracht. Danke dafür. Contanze Riel danke ich für Ihre hilfreichen Vorschläge und Anregungen und Janina Boyken für die Einführung in die Sucrosegredientenzentrifugation.

Bei Peter Mienkus möchte ich mich für all die Dinge bedanken, die mir meinen Laboralltag sehr viel leichter und angenehmer gemacht haben und natürlich für die nette Nachbarschaft im Labor.

Besonders erwähnen möchte ich noch einmal meine Laborkollegen Dieter, Peter und Janina - es war immer ein Vergnügen ins Labor zu kommen. Nicht zuletzt wegen einiger „Daniel Düsentrieb“-hafter Anwendungen, dem berühmten frischen Wind und dem konstanten Nachschub an Keksen.

Zum Schluss möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken: meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und natürlich Mirko - ohne ihn wäre ich nicht so weit gekommen. Danke für alles!

Publikationsliste

Zink, S., Mehlgarten, C., Kitamoto H.K., Nagase, J., Jablonowski, D., Dickson, R.C., Stark, M.J., Schaffrath, R. 2005. Mannosyl-diinositolphospho-ceramide, the major yeast plasma membrane sphingolipid, governs toxicity of *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Eukaryot Cell*. 4: 879-89

Jablonowski, D., Zink, S., Mehlgarten, C., Daum, G., Schaffrath, R. 2006. tRNAGlu wobble uridine methylation by Trm9 identifies Elongator's key role for zymocin-induced cell death in yeast. *Mol Microbiol*. 59: 677-88

Mehlgarten, C., Zink, S., Rutter, J., Schaffrath, R. 2007. Dosage suppression of the *Kluyveromyces lactis* zymocin by *Saccharomyces cerevisiae* ISR1 and UGP1. *FEMS Yeast Res*. 7: 722-30

Studte, P., Zink, S., Jablonowski, D., Bär, C., von der Haar, T., Tuite, M.F., Schaffrath, R. 2008. tRNA and protein methylase complexes mediate zymocin toxicity in yeast. *Mol Microbiol*. 69: 1266-77

Zink, S., Wenzel, D., Wurm, C., Schmitt, H.D. A link between vesicle recognition and tethering. (eingereicht)

Lebenslauf

Name: Sabrina Zink
 Geburtsdatum: 02.04.1980
 Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1986 – 1991 Heinrich-Heine-Oberschule (Grundschule) in Wittenberg OT Dobien
 1991 – 1998 Lucas-Cranach-Gymnasium Wittenberg/Piesteritz, Abitur

Studium:

10/99 – 03/04 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 04/04 – 03/05 Diplomarbeit in der Abteilung Molekulargenetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Dr. habil. Schaffrath,
 Thema: „Analyse von *Saccharomyces cerevisiae* Sphingolipidmutanten auf die Wirkung des *Kluyveromyces lactis* Zymocins“
 Abschluss als Diplom-Biologe
 seit 03/06 Promotionsarbeit in der Abteilung Neurobiologie des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie, Göttingen unter Leitung von Dr. habil. Schmitt,
 Thema: „Untersuchungen zur Interaktion von COP-I Vesikeln mit dem Dsl/SNARE Komplex“

sonstige Tätigkeiten:

08/98 – 07/99 Kassiererin in einem Baumarkt, Wittenberg
 04/05 – 07/05 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Molekulargenetik der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
 08/05 – 10/05 Forschungsaufenthalt an der KU Leuven (Belgien) im Center of Microbial and Plant Genetics (Prof. B. Cammue) im Rahmen eines FEBS Summer Fellowships
 11/05 – 02/05 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Molekulargenetik der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg