Rekonstitution des membranvermittelten Proteintransportes vom Golgi-Komplex zum Endoplasmatischen Retikulum *in vitro*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Bernd Sander aus Düsseldorf

> > Göttingen 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Priv. Doz. Dr. R. Kölling-Paternoga Koreferent: Prof. Dr. J. F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2004

1.	Einleitung	1 - 23
1.1	Der Membrantransport in der eukaryontischen Zelle	1 - 3
1.2	Die Vesikelbildung	3 - 5
1.3	Clathrin	6 - 7
1.4	Die "Nicht Clathrin"-Hüllen COPI und COPII	7 - 14
	1.4.1 COPII	8 - 10
	1.4.2 COPI	11 - 14
1.5	Die BAP31-Homologen Yet1n und Yet2n	14 – 16
1.6	Emp47n ein Hefehomolog von ERGIC-53	16 - 17
1.0	Die Vesikelfusion	18 - 20
1.7	Konzention der Arbeit	20 - 23
1.0		~0 ~0
9	Matarial	24 - 36
~. 91	Hater lat	24 - JU 91 97
2.1	9.1.1 Saccharomycos caravisiaa	24 - 27 91 97
	2.1.1 Sattilai olliytes televisiae	24 - 21 07
0.0	Z.1.2 ESCHEFICHIA COII	21
۵.۵ ۵.۵		28 - 29
2.3		30 - 32
2.4	Enzyme und Kits	32 - 33
2.5	Antikorper	33
2.6	Chemikalien	33 - 34
2.7	Medienzusätze	34
2.8		35
2.9	Geräte	35 - 36
_		
3.	Methoden	37 - 64
3.1	Mikrobiologische Methoden	37 - 41
	3.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten	37
	3.1.2 Wachstumskontrolle	37
	3.1.3 Kulturen des Bakteriums <i>Escherichia coli</i>	37
	3.1.4 Herstellung von transformationskompetenten <i>Escherichia</i>	
	<i>coli</i> -Zellen	37
	3.1.5 Transformation von <i>Escherichia coli</i> -Zellen	38
	3.1.6 Kulturen der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38 - 39
	3.1.7 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	39 - 40
	3.1.8 Kreuzung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	40
	3.1.9 Sporulation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	40
	3.1.10 Analyse von Hefetetraden	41
3.2	Molekularbiologische Methoden	41 - 49
	3.2.1 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration einer Lösung	
	mittels Absorptionsspektroskopie	41 - 42
	3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	42
	3.2.3 Päparation chromosomaler DNA aus Saccharomyces	
	cerevisiae	43
	3.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA	44 - 45
	3.2.4.1 Fragmentierung von DNA mit Restriktions-	
	endonukleasen	44
	3.2.4.2 Dephosphorylierung linearisierter DNA	44
	3.2.4.3 Glättung von 3´-überhängenden DNA-Enden	
	dunch die TA DNA Delemenness	4.4
		44

		3.2.4.4 Auffüllen von 5´-überhängenden DNA-Enden	
		durch das Klenow-Fragment	44 - 45
		3.2.4.5 Ligation von DNA	45
	3.2.5	Die Polymerase-Kettenreaktion	45 - 46
	3.2.6	Gerichtete DNA-Mutagenese	47
	3.2.7	Gelektrophoretische Auftrennung von DNA	47 - 48
	3.2.8	Aufreinigung von DNA aus präparativen Agarosegelen	49
	3.2.9	DNA-Sequenzierung	49
3.3	Proteint	piochemie	49 - 62
	3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung	49
	3.3.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinextrakten	49 - 50
	3.3.3	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie brilliant blue	51
	3.3.4	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf	
		Nitrozellulose-Filtern ("Blotten")	51
	3.3.5	Ponceau S-Färbung von Nitrozellulose-Filtern	51 - 52
	3.3.6	Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine auf	
		Nitrozellulose-Filtern	52
	3.3.7	Herstellung eines Proteinextraktes aus <i>Escherichia coli</i> -	
		Zellen	53
	3.3.8	Denaturierende Protein-Extraktion aus <i>Saccharomyces</i>	
		<i>cerevisiae</i> -Zellen	53
		3.3.8.1 Zellaufschluß durch Aufkochen mit SDS-	
		Probenputter	53
		3.3.8.2 Zellautschluß durch alkalische Lyse	53
	3.3.9	Nativer Zellaufschluß mit flüssigem N_2 im Mörser	54
	3.3.10	Expression and Aufreinigung des Proteins β -1,3-Glycanase .	54 - 55
	3.3.11		55 - 58
		3.3.11.1 Praparation von Zytosol aus Saccharomyces	
			55
		3.3.11.2 Praparation von Membranen des ER aus	FF FA
		Saccharomyces cerevisiae	33 - 37
		3.3.11.3 Praparation von Golgi-Membranen aus	E 71
		Saccharomyces cerevisiae	5/ 50
	0 0 1 0	3.3.11.4 Sukrosegradienten	38 59 69
	3.3.12	2.2.19.1 Versuch a run Dildung and CODI Verilala	J9 - 0%
		3.3.12.1 Versuche zur Bildung von COPI-vesikein	50 50
		("vesicie buduling assay)	39 - 3 8
		5.5.12.2 Nachweis des Vesikenhansportes mittels	50 GO
		2 2 12 2 Sodimontationsonalyza	39 - 00 GN
	2 2 1 2	"Dulce Chese" Experimente	UU 60 69
34	J.J.IJ Mikrock		69 GA
J.4	2 / 1	Immunfloureszenz	62 - 64
	3.4.1	СЕР	64 64
	3.4.2	Flektronenmikroskonie	64
	0.4.0		UT

4.	Ergebnis	sse		65 - 105
4.1	Rekonstit	ution des	membranvermittelten Proteintransportes vom	
	Golgi-Kon	nplex zun	n Endoplasmatischen Retikulum <i>in vitro</i>	65 - 93
	4.1.1	Transport	nachweis durch Sedimentationsanalyse	65 - 67
	4.1.2	Transport	nachweis durch Glukosidase 1- Aktivität	67 - 71
	4.1.3 l	Proteolyti	scher Nachweis des retrograden Vesikel-	
	t	transporte	es	72 - 93
		4.1.3.1	Das Fusionsprotein α -Faktor-Emp47p	74 - 77
		4.1.3.2	Nachweis von α -Emp47p in COPI-Vesikeln	78 – 79
		4.1.3.3	Fusion der Protease Bar1p mit den Typ 1 –	
			Membranproteinen Cnelp, Cuelp, Sec66p sowie	00 01
		4194		80 - 81
		4.1.3.4	Enzymatische Aktivität der Proteaserusionen In	01 09
		1125	VIVU Intrazelluläre Lekalisatien von Chel Barln	01 - 03 84 - 85
		4.1.3.3	Untersuchungen zur Zeitebhängigkeit der <i>in</i>	04 - 0J
		4.1.5.0	vive-Aktivität von Cnel-Barln	85 - 87
		4137	<i>In vitro</i> -System für den retrograden Vesikel-	00 07
		1.1.0.7	transport vom Golgi-Komplex zum FR	87 - 88
		4.1.3.8	Kopplung der Sedimentationsanalyse mit dem	0, 00
		1111010	proteolytischen Testsystem	88 - 89
		4.1.3.9	Zeit- und Temperaturoptimierung des In vitro-	
			Assays.	89 - 91
		4.1.3.10	Verwendung zytosolischer Fraktionen aus	
			<i>sec18</i> -, <i>sec23</i> - bzw. <i>sec27</i> -Deletionsmutanten im	
			Transportsystem	92 - 93
4.2	Untersucl	hungen zu	ır Funktion der BAP31-Homologen Yet1p und	
	Yet2p			94 - 105
	4.2.1	Erzeugung	g einer <i>yet1- yet2</i> -Doppelmutante	95 - 96
	4.2.2	Das Wach	stumsverhalten der Insertionsmutanten unter	
	400 1	verschiede	enen Umweltbedingungen	96 - 98
	4.2.3	Intrazellu	lare Lokalisation der Fusionsproteine GFP-Yet1p	00 100
	1 1 1 1 1	und GFP-	YetZp	98 - 100
	4.2.4	Intrazellu	are Lokalisation von Proteinen des anterograden	
	1	uzw. retro mutanton	graden vesikentransportes in den insertions-	100 - 104
	125	Fyprossio	n der Fusionsgene CEP-VET1 und CEP-VET2 in	100 - 104
	T.2.0 1	den Mutai	nten RV4741 $vet1$ hzw RV4742 $vet2$	104 - 105
	,		men D14741 yett bzw. D14742 yetz	104 - 105
5.	Diskussi	on		106 - 124
5.1	Entwickl	ing eines	<i>In vitro</i> -Transport-Assays für den retrograden	100 101
	Vesikeltra	ansport		106 - 121
	5.1.1	Durch Sec	limentationsanalyse kann <i>in vitro</i> eine mittlere	_
	1	Umverteil	ung von 20% beobachtet werden	106 - 107
	5.1.2	Transport	nachweis durch Glukosidase1-Aktivität –	
]	Fusionspr	oteine von Emp47p mit N-glykosylierten	
]	Proteinen	werden hyperglykosyliert	107 - 109
	5.1.3 I	Nachweis	des retrograden Vesikeltransportes über	
]	Proteolyse	<u>.</u>	109 - 121
		5.1.3.1	Das α -Faktor-Emp47p-Reporterkonstrukt	109 - 111

	5.1.3.2	Die Bar1p-Fusion	111 - 113
	5.1.3.3	Das <i>In vitro</i> - Transportsystem mit Hilfe des proteolytischen Nachweisverfahrens	113 - 116
	5.1.3.4	Das <i>In vitro</i> -Transportsystem im Vergleich –	
		Möglichkeiten und Ausblick	116 - 121
5.2	Yet1p und Yet2p .		121 - 124
5.	Zusammenfassur	ıg	125 - 126
6.	Literaturverzeic	hnis	127 - 137
7.	Anhang		138 - 141

1. Einleitung

1.1 Membrantransport in der eukaryontischen Zelle

Lebende Organismen können in die drei Domänen der Archaea, der Bacteria sowie der Eucarya unterteilt werden, wobei die Archaeen und die Eubakterien aufgrund ihres ähnlichen Zellaufbaus traditionell als Prokaryonten zusammengefaßt werden. Die sogenannte Protocyte der Prokaryonten weist entweder keine Untergliederung, oder nur eine rudimentäre Kompartimentierung auf. Alle notwendigen Membranfunktionen werden von der Plasmamembran erfüllt, die spezialisierte Bereiche mit Einstülpungen und sogar Abschnürungen aufweisen kann. Die Eucyte, die in Folge ihrer Größe ein deutlich geringeres Verhältnis zwischen Zelloberfläche und Zellvolumen als die Protocyte besitzt, ist dagegen in zahlreiche, durch interne Membranen umhüllte Organellen unterteilt. Das Innere dieser intrazellulären Kompartimente entspricht dabei (mit Ausnahme des Zellkerns) topologisch dem extrazellulären Raum. Die Organellen sind sowohl funktionell, als auch strukturell spezialisiert und weisen eine jeweils für sie charakteristische Ausstattung von Proteinen und anderen Makromolekülen auf. Die wichtigsten Organellen der Eucyte sind der Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, die Mitochondrien und Chloroplasten (Letztere nur bei Pflanzen), die Lysosomen (bzw. die Vakuole bei Pflanzen und Pilzen), die Endosomen sowie die Peroxisomen.

Eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle, von einatomigen Ionen bis zu komplexen Proteinen, wird von der eukaryontischen Zelle zu jeder Zeit selektiv über ihre Oberfläche aufgenommen, intrazellulär zwischen den Organellen transportiert oder ins extrazelluläre Medium abgegeben. Der Transport von Lipiden und Proteinen wird dabei hauptsächlich von kleinen Membranbläschen (Ø 50 - 100 nm), den sogenannten Vesikeln, vermittelt, welche sich von einem Organell ablösen und mit einem anderen verschmelzen (Palade, 1975). Die zu transportierenden Frachtmoleküle werden hierfür entweder in die Lipiddoppelschicht des Vesikels integriert, oder befinden sich löslich im Inneren. Zwischen der Abkopplung eines Vesikels von der Donormembran und seiner Fusion mit der Akzeptormembran vergehen oft nur wenige Sekunden. Ein Fibroblast im Ruhestadium ist unter optimalen Nährstoffbedingungen in der Lage, innerhalb einer Stunde eine Membranfläche in der Größenordnung seiner eigenen Zelloberfläche zu internalisieren (Kirchhausen, 2000). Der Vesikeltransport innerhalb einer eukaryontischen Zelle ist jedoch nicht nur rasch und umfangreich, sondern insbesondere selektiv. Trotz der beständigen Transportvorgänge bleibt die spezifische Struktur und Funktion der einzelnen Zellkompartimente innerhalb der Interphase jederzeit erhalten. Eine Homogenisierung der Membrankomponenten wird durch eine selektive Inkorporation der Frachtmoleküle sowie durch eine zielgerichtete Fusion des Vesikels mit der Akzeptormembran vermieden. Letztere ist abhängig von spezifischen Sortierungssignalen innerhalb der Frachtproteine. Nahezu sämtliche Faktoren, welche für die Direktionalität des vesikulären Transportes verantwortlich sind, sind evolutionär hoch konserviert (Bennet und Scheller, 1993; Ferro-Novick und Jahn; 1994).

Alle Organellen des biosynthetischen und endozytotischen Weges stehen direkt oder indirekt miteinander in Verbindung. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der bekannten intrazellulären Transportprozesse in der Eucyte.



Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung des intrazellulären Vesikeltransportes innerhalb der eukaryontischen Zelle (aus dem Lehrbuch "Genes V" von B. Lewin; Oxford University Press).

Bei der Endocytose werden die Proteine zunächst über die Plasmamembran aus dem extrazellulären Medium aufgenommen und den frühen Endosomen zugeführt. Von

diesen Zellkörpern aus erfolgt dann entweder ein Transport über die späten Endosomen zu den Lysosomen (bzw. zur Vakuole), oder eine Rückführung der Frachtmoleküle zur Plasmamembran. Der sekretorische oder anterograde (= vorwärtsgerichtete) Transportweg verläuft dagegen vom ER über den Golgi-Komplex (inklusive Trans-Golgi-Netzwerk) bis zur Plasmamembran bzw. alternativ bis zum Lysosom. Der entgegengesetzte Weg vom Golgi zurück zum ER wird als retrograder (= rückwärtsgerichteter) Transport bezeichnet. Alle Prozesse innerhalb einer eukaryontischen Zelle stehen in einem dynamischen Gleichgewicht miteinander, so daß es durch den Membrantransport nicht zwingend zu einer Nettozunahme bzw. -abnahme der Zelloberfläche kommen muß. Nach heutigen Erkenntnissen existieren jedoch auch Ausnahmen zum klassischen Modell des vesikulären Transportes. Für den Intra-Golgi-Transport wurde ein sogenanntes Reifungsmodell postuliert, welches in seinem Resultat einem vesikulären Transportvorgang ähnelt, aber die Beteiligung von Vesikeln nur indirekt erfordert (Pelham, 1998). Nach dieser Theorie stellen die einzelnen Golgi-Zisternen keine statischen Organelle dar, sondern sind durch die sukzessive Rückführung der spezifischen Komponenten des jeweils vorhergehenden Golgi-Kompartimentes einer beständigen Modifikation und Reifung von cis nach trans unterworfen. Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) geht auf diese Weise kontinuierlich aus dem cis-Golgi-Kompartiment hervor, welches selbst wiederum durch die Fusion von Vesikeln entsteht, die vom ER abstammen. Transportvesikel sind demnach ausschließlich zur Rückführung von Golgi-Enzymen, nicht aber für den anterograden Transport innerhalb der Zisternen erforderlich. Das Reifungsmodell wird durch die Beobachtung gestützt, daß auch Proteinaggregate, welche für eine Inkorporation in Vesikel zu groß sind, den Golgi zu durchwandern vermögen (Becker und Melkonian, 1996; Bonfanti, 1998). Es kann jedoch nicht hinreichend erklären, weshalb verschiedene Proteine den Golgi-Komplex unterschiedlich schnell passieren (Bonfanti et al., 1999). Ein Modell von Pelham & Rothman (2000) vertritt die Ansicht, daß der interne Golgi-Transport nebem einem Reifungsprozeß auch einen Vesikeltransport beinhaltet, welcher zugleich in anterograder und retrograder Richtung verläuft.

1.2 Die Vesikelbildung

Die Abschnürung eines Transportvesikels von seiner Donormembran ist eine energetisch ungünstige Reaktion, die nicht spontan abläuft. Sie wird erst durch die Anlagerung eines heterooligomeren Komplexes von Hüllproteinen (englisch: "coat proteins") ermöglicht, welche eine Krümmung der Membran und somit eine Senkung der zu überwindenden Energiebarriere bewirkt. Die Aggregation der Hüllproteine wird dabei durch eine kleine, membrangebundene GTPase in ihrer GTP-gebundenen Form initialisiert. Drei Hauptklassen von Hüllproteinkomplexen, auf die in den Abschnitten 1.3 bis 1.5 näher eingegangen wird, sind bisher bekannt: Clathrin, COPII und COPI (Cosson und Letourneur, 1997; Pishvaee und Payne, 1998; Schmid, 1997). Welcher Hüllkomplex bei einer bestimmten Vesikelbildung Verwendung findet, ist dabei vom jeweiligen intrazellulären Transportprozeß abhängig.

Für die Ausbildung eines funktionellen Vesikels ist aber nicht nur die Rekrutierung der richtigen Proteinhülle von Bedeutung: Die jeweiligen Frachtproteine müssen ebenso erkannt und innerhalb der knospenden Membranregion angereichert werden, wie spezifische SNARE-Proteine, welche eine Selektivität bei der späteren Vesikelfusion mit der Akzeptormembran erlauben (siehe hierzu auch Abschnitt 1.7). Aktuellen Modellen zufolge wird dies durch eine Kopplung der Frachtanreicherung mit dem Aufbau der Proteinhülle ermöglicht. Exemplarisch ist das Schema eines solchen Modells (Springer et al., 1999) in Abbildung 1.2 dargestellt. Der erste Schritt der Vesikelbildung besteht diesem Modell zufolge in der Anlagerung einer GTPase an die Donormembran, wobei die GTPase vom GDP-gebundenen in den GTP-gebundenen Zustand übergeht. Diese Reaktion wird von einem GEF-Protein ("Guanin nucleotide exchange factor") katalysiert, welches für die jeweils beteiligte GTPase spezifisch ist (Abbildung 1.2.A). Lösliche Hüllproteine erkennen zugleich die membrangebundene GTPase sowie ein spezielles Membranprotein (z.B. ein v-SNARE), daß als Nukleationspunkt ("Primer") zu fungieren vermag. Daraufhin kommt es zur Ausbildung eines sogenannten Primerkomplexes (Abbildung 1.2.B). Im weiteren Verlauf der Vesikelbildung aggregieren mehrere dieser Komplexe, so daß sich eine Proteinhülle zu formen und die Donormembram infolge dessen zu krümmen beginnt. Frachtmoleküle werden dabei durch eine direkte Bindung an die gebundenen Hüllproteine innerhalb der knospenden Membranregion angereichert (Abbildung 1.2.C). Die Hydrolyse des GTP-Moleküles der zum Primerkomplex gehörenden GTPase induziert schließlich die Ablösung der Proteinhülle. Letztere ist unbedingte Voraussetzung für die Vesikelfusion und kann zumindest partiell bereits während der Bildung des Vesikels erfolgen. Die Katalyse der GTP-Spaltung erfolgt hierbei entweder durch ein lösliches GAP ("GTPase aktivierendes Protein") oder durch eine intrinsische GAP-Aktivität der Vesikelhülle, wie in Abbildung 1.2 gezeigt. Der exakte Mechanismus der Vesikelbildung ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt. So wird zum Beispiel die Möglichkeit diskutiert, daß die am Prozeß beteiligte GTPase im Verlaufe der Vesikelformierung mehrere Zyklen von GDP-Phosphorylierung und GTP-Hydrolyse durchläuft. Auf diese Weise wäre ein einziges GTPase-Molekül in der Lage, zahlreiche Frachtproteine an den Hüllkomplex zu binden (Barlowe, 2000).



Abbildung 1.2: Modell für den Mechanismus der Vesikelbildung nach Springer et al. (1999). Eine Erläuterung der Abbildung findet sich im Text. \mathbf{P} = Primer, \mathbf{F} = Frachtprotein, \mathbf{GAP} = GTPase-aktivierendes Protein, \mathbf{GEF} = Guanin-Austauschfaktor.

1.3 Clathrin

Von den drei bekannten Hauptklassen der Vesikelproteinhüllen ist die Clathrin-Hülle am besten untersucht. Von Clathrin umgebende Vesikel vermitteln einen Großteil der Endocytose, für welche allerdings auch alternative Mechanismen existieren (Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001), sowie in höheren Eukaryonten den Transport zwischen dem TGN und den Endosomen (Anderson et al., 1977; Robinson, 1987). Im Jahre 1964 durch elektronenmikroskopische Aufnahmen erstmals entdeckt, wurde Clathrin 1975 durch B. Pears als Bestandteil der Ummantelung von sogenannten "Stachelsaum"-Vesikeln (englisch: "Coated vesicles") isoliert (B. Pears 1975, 1976). Die circa 20 nm durchmessende Clathrinhülle ist in eine äußere und eine innere Hülle unterteilt (Vigers et al., 1986) und besteht von innen nach außen aus einer GTPase (ARF1 bei Säugern, Arf1/2p bei der Bäckerhefe), einem heterotetrameren Adaptorkomplex sowie den namensgebenden Clathrin-Polypeptiden. Zusätzlich sind über fünfundzwanzig assoziierte Proteine unterschiedlicher Funktion bekannt (Kirchhausen, 2000). Beispiele hierfür sind AP180 (Regulation der Größe neuronaler Vesikel), Synaptotagmin (Ca2+-Sensor) oder Dynamin (Abtrennung des Vesikels von der Donormembran). Tabelle 1.1 faßt die strukturgebenden Komponenten der Clathrin-Vesikelhülle zusammen.

Das stark konservierte Clathrinprotein setzt sich aus einer schweren und einer regulatorisch wirkenden leichten Kette zusammen. Jeweils drei dieser Clathrinmoleküle formieren sich dabei zu einer dreiarmigen Triskelion-Struktur, welche ihrerseits auf der Vesikeloberfläche zu einem wabenartiges Korbgeflecht mit Fünf- oder Sechsecken polymerisiert (Ungewickell und Branton, 1981). Die Adaptorkomplexe, von denen bei höheren Eukaryonten vier Arten existieren (AP-1 bis AP-4), bilden unterhalb des Clathrinkorbes (bzw. unterhalb eines Clathrin-analogen Proteinkomplexes) die innere Proteinhülle aus (Hirst und Robinson, 1998; Rehling et al., 1999). Ihre Funktion besteht einerseits in einer Verbindung der Clathrinmoleküle zur Lipidmembran, sowie andererseits in der rezeptorabhängigen Rekrutierung von Frachtproteinen (Robinson, 2001). Alle vier Adaptorkomplexe bestehen jeweils aus zwei großen (γ und β 1 bei AP-1; α und β 2 bei AP-2), einer mittleren (μ 1 bei AP-1; μ 2 bei AP-2) sowie einer kleinen Untereinheit (σ1 bei AP-1 bzw. σ2 bei AP-2). Während AP-1 bei "Coated Pits" auftritt, die sich vom TGN abschnüren, liegt AP-2 in Vesikeln vor, welche von der Plasmamembran abstammen (Clathrin-vermittelte Endocytose). AP-3 ist vermutlich in den Transport bestimmter Proteine Richtung Lysosom involviert (Cowles et al., 1997), wohingegen die Funktion von AP-4 zur Zeit noch unbekannt ist (Robinson, 2001).

	Mammalia:	Saccharomyces cerevisiae:
Äußere	Hüllproteine:	
Clathrin (schwere Kette)	HC (192)	Chc1p (187)
Clathrin (leichte Kette)	LCa (23)	Clc1p (26)
	LCb (27)	-
Innere	Hüllproteine:	
AP-1	γ(91)	Apl4p (115)
	β1 (105)	Apl2p (93)
	μ1 (47)	Apm1p (53)
	σ1 (19)	Aps1p (18)
AP-2	α a/c (108/104)	Apl4p (115)
	β2 (106)	Apl1p (80)
	μ2 (50)	Apm4p (55)
	σ2 (17)	Aps2p (17)
AP-3	δ (160)	-
	β3 (120)	-
	μ3 (47)	-
	σ3 (25)	-
AP-4	ε (140)	-
	β4 (83)	-
	μ4 (50)	-
	σ4 (17)	-
C C	TPase	
	ARF1 (21)	Arf1/2 (21)

Tabelle 1.1: Übersicht über die Proteinkomponenten der Clathrin-Vesikelhülle nach Kirchhausen (2000) sowie nach Robinson & Bonifacino (2001). Die Zahlen in Klammern geben die jeweiligen Molekulargewichte der Proteine in kDa an.

1.4 Die "Nicht-Clathrin"-Hüllen COPI und COPII

Vom COPI-Komplex, welcher auch als "Coatomer" bezeichnet wird, umhüllte Vesikel vermitteln den Transport vom Golgi-Apparat zum ER sowie den Intra-Golgi-Transport. COPII-Vesikel sind dagegen für den anterograden Transport (ER \rightarrow Golgi) verantwortlich und knospen ausschließlich von spezialisierten Bereichen des rauhen ER, den sogenannten "Privileged sites" oder "Transitional elements", ab (Hobman et al., 1998; Klumperman, 2000). Im Gegensatz zur Clathrinhülle liegt bei den COPI- bzw. COPII-Hüllkomplexen vermutlich keine Unterteilung in eine äußere und eine innere Hülle vor. Ihre Dicke liegt bei circa 10 nm, was ungefähr der Hälfte des gemessenen Durchmessers der Clathrin-Hülle entspricht, und ihr struktureller Aufbau erscheint unter dem Elektronenmikroskop weniger regelmäßig (Orci et al., 1986; Barlowe et al., 1994). Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die Proteinkomponenten von COPI und COPII, deren nähere Beschreibung den Abschnitten 1.4.1 bzw. 1.4.3 entnommen werden

kann. Bestimmte Proteinbestandteile der beiden Vesikelhüllen (β -, γ -, δ - und ζ -COP bei COPI, Sec24p und Sec23p bei COPII) weisen eine signifikante Homologie zu Untereinheiten der Adaptorkomplexe auf, was auf eine ähnliche Funktion hindeutet (Duden et al., 1991; Cosson et al., 1996).

	Saccharomyces cerevisiae:	Mammalia:	Größe in kDa:	Homologie zum AP1- bzw. AP2- Komplex:
		СОРИ		поприса.
Sec13-Komplex	Sec13p	HSec13p	34	
•	Sec31p	HSec31p	150	
Sec23-Komplex	Sec23p	HSec23p	85	AP47/AP19 (AP1)
	Sec24p	HSec24p	105	β'-, γ-Adaptin (AP1) β-, α-Adaptin (AP2)
GTPase:	Sar1p	Sar1	21	
		СОРІ		
Coatomer:	Ret1p	α-COP	140	
	Sec26p	β-COP	107	β´-Adaptin (AP1) β-Adaptin (AP2)
	Sec27p	β΄-COP	102	
	Sec21p	ү-СОР	97	γ -Adaptin (AP1) α -Adaptin (AP2)
	Ret2p	δ-COP	57	AP47 (AP1) AP50 (AP2)
	Sec28p	ε-COP	35	
	Ret3p	ζ-COP	20	AP19(AP1) AP17(AP2)
GTPase:	Arf1p/Arf2p	ARF	20	

Tabelle 1.2: Zusammenfassung der Proteinkomponenten der Vesikelhüllkomplexe COPI und COPII.

1.4.1 COPII

Die temperatursensitiven *sec*-Mutanten der Bäckerhefe ("sec" für "secretion") weisen Defekte in verschiedenen Schritten des intrazellulären Vesikeltransportes auf, in deren Folge es bei restriktiver Temperatur zu einem Block der Proteinsekretion kommt. Die Charakterisierung dieser *sec*-Mutanten (Novick et al., 1980; Kaiser & Schekman, 1990) sowie die Durchführung zellfreier Rekonstitutionsexperimente zur Quantifizierung des Proteintransportes zwischen ER und Golgi (Baker et al., 1988) führte zur Identifikation der löslichen COPII-Komponenten Sar1p, Sec13p, Sec23p, Sec24p sowie Sec31p. Zusammen mit aufgereinigten ER-Membranen reichen diese fünf Proteine aus, um funktionelle COPII-Vesikel *in vitro* zu erzeugen (Salama et al, 1993). Während Sec23p und Sec24p einen Heterodimer ausbilden, formen Sec13p und Sec31p, die beide WD40Sequenzmotive zur Protein-Protein-Interaktion aufweisen (Neer et al., 1994), einen Heterotetramer. Die Sec24/23-Dimere und die Sec31/13-Tetramere lagern sich zur eigentlichen COPII-Vesikelhülle zusammen (Pryer et al., 1993; Salama et al., 1993; Salama et al., 1997). Sar1p schließlich ist eine kleine GTPase mit Sequenzhomologie zur Familie der Ras-GTPasen bei Säugern (Barlowe et al., 1993).

Die Generierung eines COPII-umhüllten Vesikels folgt dem in Abschnitt 1.2 beschriebenen Grundprinzip und beginnt mit der Bindung von Sar1p-GTP an die ER-Membran. Dieser Anlagerungprozeß wird durch das integrale Membranprotein Sec12p katalysiert, welches als GEF von Sar1p fungiert und die kleine GTPase von ihrer zytosolischen, GDP-gebundenen Form in die membrangebundene GTP-Form überführt. Der nächste Schritt der Vesikelbildung besteht in der Rekrutierung des Sec23/24p-Heterodimers durch Sar1p-GTP sowie in einer damit verbundenen Anreicherung von Frachtproteinen in die Membranregion des entstehenden Vesikels (Kuehn et al., 1998; Springer & Schekman, 1998). Die Beobachtung, daß sowohl Sar1p, als auch Sec23/24p für ihre Bindung an das ER eine jeweils spezifische Lipidzusammensetzung benötigen (neutrale Phospholipide für Sar1p, saure Phospholipide für Sec23/24p), impliziert eine mögliche Erklärung für die Existenz der "Transitional elements" (Gorelick & Shugrue, 1999; Matsuoka et al., 1998). Ist die Sec23/24p-Rekrutierung erst einmal erfolgt, lagert sich anschließend der Sec31/13p-Tetramer an, was eine Krümmung der ER-Membran bedingt und letztendlich in einer bisher nicht verstandenen Weise zur Abschnürung des Vesikels führt. Das Protein Sec16p, welches sowohl mit Lipiden, als auch mit allen löslichen COPII-Komponenten interagiert, stabilisiert vermutlich als eine Art Stützwerk (englisch: "Scaffold") den COPII-Hüllaufbau (Shaywitz et al., 1997; Lederkremer et al., 2001). Nach dem Abschnüren des Vesikels wird der Hüllkomplex durch die Spaltung des an Sar1p gebundenen GTP-Moleküls wieder abgelöst. Die Hydrolyse wird dabei durch das Sec23-Protein, selbst Komponente der COPII-Hülle, stimuliert. Um eine vorzeitige Ablösung des Hüllkomplexes zu verhindern, dient vermutlich das Sec12p-homologe Protein Sed4p während der Vesikelbildung als Inhibitor der GAP-Aktivität von Sec23p (Nakano & Nakano, 2000).

Das sogenannte "Bulk flow"-Modell (Pfeffer & Rothman, 1987), demzufolge Proteine ausschließlich nach dem Zufallsprinzip in Vesikel inkorporiert werden, gilt wahrscheinlich nur für wenige, in großen Mengen sezernierte Proteine (Warren & Mellman, 1999). Die Inkorporation der meisten Frachtmoleküle wird dagegen durch einen aktiven Sortierungsprozeß reguliert, in dessen Folge Proteine im Bereich des entstehenden Vesikels eine bis zu zehnfach erhöhte Konzentration aufweisen können (Balch et al., 1994). Umgekehrt werden stabil im ER lokalisierte Proteine (wie z.B. das Chaperone BiP) offenbar gezielt aus diesen Membranregionen ausgeschlossen (Aridor et al., 2001). Der Prozeß der Konzentrierung und Sortierung wird vermutlich hauptsächlich durch Wechselwirkungen mit Frachtrezeptoren bzw. mit der COPII-Hülle selbst vermittelt, wohingegen molekulare Siebe wie Shr3p (Kuehn et al., 1996) nur eine untergeordnete Rolle spielen. Für lösliche Frachtmoleküle konnte die Existenz spezifischer Rezeptoren wie Erv29p (Belden & Barlowe, 2001) oder auch ERGIC-53 (Kappeler et al., 1997) gezeigt werden, während die Anreicherung integraler Membran-proteine über eine direkte Interaktion mit dem Sec23/24p-Dimer erfolgt (Mossessova et al., 2003; Miller et al., 2003).

Drei unterschiedliche Sequenzmotive innerhalb des Carboxyterminus von integralen Frachtproteinen sind in Säugerzellen als Sortierungssignale für den anterograden Vesikeltransport bekannt: D/EXD/E (mit X als beliebige Aminosäure), FF sowie LV. Das D/EXD/E-Motiv wurde ursprünglich im viralen VSV-G-Protein identifiziert (Nishimura et al., 1997) und konnte später in zahlreichen Säugerproteinen wie z.B. PRA1 (Abdul-Ghani et al., 2001) sowie in Proteinen der Hefe *S. cerevisiae* (Votsmeier & Gallwitz, 2001) nachgewiesen werden. Nach Nishimura et al. (1999) spielt dieses Signalmotiv eine größere Rolle bei der Proteinkonzentrierung, als bei der eigentlichen Sortierung. Das di-Phenylalanin-Motiv (FF) ist für den Golgi-Transport des Lektins und Frachtprotein-Rezeptors ERGIC-53 essentiell, aber nicht ausreichend (Fiedler et al., 1994; Kappeler et al., 1997; Dominguez et al., 1998). Möglichweise bindet dieses Motiv an den Sec13/Sec31p-Heterotetramer und nicht an den Sec23/24p-Dimer (Belden & Barlowe, 2001). Die LV-Sequenz wurde schließlich im Hefeprotein Emp24p identifiziert (Nakamura et al, 1998).

Die Beobachtung, daß in *S. cerevisiae* Isoformen von Sec24p (Sfb2p und Sfb3p) existieren, deutet auf die Existenz von Subpopulationen von COPII-Vesikeln hin, welche wahrscheinlich unterschiedliche Frachtmoleküle transportieren (Robert et al., 1999; Peng et al., 2000; Higasho et al., 2000; Kurihara et al.; 2000). So führt z.B. eine Deletion des *SFB3*-Gens zu einer Fehllokalisation der Plasmamembran-ATPase Pma1p, während andere Proteine der Plasmamembran ihren Bestimmungsort ungehindert erreichen (Robert et al., 1999).

1.4.2 COPI

Im Gegensatz zu den COPII-Vesikeln, welche ausschließlich auf den anterograden Transport zwischen ER und Golgi-Apparat spezialisiert sind, vermitteln COPI-umhüllte Vesikel anscheinend gleich mehrere intrazelluläre Transportschritte. Neben ihrer Beteiligung am retrograden Golgi-ER-Transport, wird für die COPI-Vesikel eine Funktion beim Intra-Golgi-Transport (sowohl in anterograder, als auch retrograder Richtung), beim anterograden ER-Golgi-Transport sowie bei der strukturellen Aufrechterhaltung von Golgi und Endosomen postuliert (Whitney et al., 1995; Cosson & Letourneur, 1997). Eine biochemische Charakterisierung der COPI-Hülle (Ostermann et al., 1993; Serafini et al., 1991) machte deutlich, daß sich die Vielfältigkeit der Aufgabenbereiche in einer im Vergleich zu COPII höheren Komplexität wiederspiegelt. Neben einer zytosolischen GTPase (ARF1) besteht die COPI-Hülle aus einem heteroheptameren Proteinkomplex namens "Coatomer" mit sieben Untereinheiten im stöchiometrischen Verhältnis (α -, β -, β '-, γ -, δ -, ε - und ζ -COP in Säugerzellen). Dabei weisen die α - und die β '-Untereinheiten des Coatomer-Komplexes ebenso wie die COPII-Komponenten Sec13p und Sec31p eine WD40-Domäne auf (Letourneur et al., 1994).

Der prinzipielle Mechanismus des COPI-Hüllaufbaus wurde durch die schrittweise in vitro-Generierung von COPI-Vesikeln mit gewaschenen Golgi-Membranen und aufgereinigten Proteinkomponenten aufgeklärt (Ostermann et al., 1993), lediglich die genau Funktion der einzelnen Coatomer-Untereinheiten innerhalb des Aufbauprozesses ist noch nicht bekannt. Die COPI-Vesikelbildung verläuft in ihren Grundzügen analog zur COPII-Bildung (siehe hierzu die Abschnitte 1.2 sowie 1.4.1) und ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt. Die am Aufbauprozeß beteiligte GTPase ARF1 liegt in ihrem GDP-gebundenen Zustand löslich im Zytosol vor, der myristoylierte N-Terminus des Proteins wird innerhalb einer hydrophoben Tasche vom umgebenden Medium abgeschirmt. Eine Überführung der GTPase in ihre aktive, GTP-gebundene Form bedingt eine Konformationsänderung von ARF1, wodurch der N-Terminus an die Proteinoberfläche gelangt und sich über seinen Myristinsäure-Anhang in die Donormembran zu inserieren vermag (Abbildung 1.3.A). Im Gegensatz zu Sec12p handelt es sich bei den bekannten Nukleotid-Austauschfaktoren von ARF1 (ARF-GEFs) wie z.B. ARNO3 bei Säugern bzw. Gea1/2p in der Hefe S.cerevisiae um zytosolische Proteine (Chardin & McCormick, 1999).



Abbildung 1.3: Schema der Bildung von COPI-umhüllten Vesikeln nach Kirchhausen (2000). Die Erläuterung zu den Abbildungen A bis D findet sich im Text. **F** = Frachtprotein. α , β , β ', γ , δ , ε , ζ : Coatomer-Untereinheiten. **ARF-GEF** = Nukleotid-Austauschfaktor für ARF1. **ARF-GAP**= GTPase-aktivierendes Protein für ARF1. **P**_i = Orthophosphat.

Die ARF1-GTP-Verankerung an die Membran erlaubt die Rekrutierung von Frachtmolekülen sowie die Anlagerung des Coatomer-Komplexes (Abbildung 1.3.B). Letztere geschieht schrittweise, indem zwei bereits vorab formierte Subkomplexe (aus den Untereinheiten β , γ , δ , ζ bzw. α , β , ϵ) sukzessive gebunden werden (Orci et al., 1993; Faulstich et al., 1996). Dabei bindet ARF1-GTP direkt an β -COP und γ -COP (Zhao et al., 1997; Zhao et al., 1999). Zu den Frachtmolekülen gehören auch Proteine der p24-Familie, welche mit der γ-COP-Untereinheit interagieren und vermutlich so die Coatomer-Anlagerung begünstigen (Harter et al., 1996). Die Spaltung des GTP-Moleküls von ARF1-GTP beginnt bereits während des COPI-Hüllaufbaus und wird sowohl durch die Anwesenheit der Coatomer-Untereinheiten (Goldberg, 1999), als auch durch ein lösliches GTPase-aktivierendes Protein (Glo3p bzw. Gcs1p; Poon et al., 1999) stimuliert (Abbildung 1.3.C). Die wiederholte GTP-Hydrolyse von ARF1-GTP ist für die Frachtansammlung unbedingt notwendig (Lanoix et al., 1999) und ihre Geschwindigkeit hängt von der Art des gebundenen Frachtmoleküls ab, was für eine kinetische Kontrolle des Akkumulationsprozesses spricht (Goldberg, 2000). Erst nach erfolgter Abspaltung des COPI-Vesikels wird schließlich der Coatomer-Komplex abgeworfen (Abbildung 1.3.D).

Für den retrograden, COPI-abhängigen Vesikeltransport zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER sind insgesamt vier verschiedene Transportsignale nachgewiesen worden. Das di-Lysin- bzw. K(X)KXX-Signal besteht aus zwei Lysinen an den Positionen -5/-3 oder -4/-3 (gerechnet vom C-Terminus) und vermittelt die Rückführung von ER-Membranproteinen des Typs I (Jackson et al., 1990). Das KDEL-Motiv (bzw. HDEL-Motiv in der Hefe S.cerevisiae) wurde dagegen hauptsächlich bei löslichen luminalen Proteinen gefunden, eine Ausnahme bilden lediglich die Hefeproteine Sed4p und Sec20p. Für den Rer1p-abhängigen Transport des Nukleotid-Austauschfaktors Sec12p (Sar1p-GEF) konnte die Existenz eines Signals innerhalb der Transmembrandomäne gezeigt werden (Boehm et al., 1994; Sato et al., 1996). Ein aminoterminales di-Arginin-Motiv kommt schließlich bei TypII-Membranproteinen wie zum Beispiel dem humanen CD74-Protein vor (Teasdale & Jackson, 1996). Die Mechanismen des signalvermittelten Rücktransportes zum ER sind im Falle des Sec12p- sowie des di-Arginin-Motivs zur Zeit noch nicht näher bekannt. Der retrograde Vesikeltransport von di-Lysin-tragenden Proteinen verläuft über eine direkte Interaktion der K(X)KXX-Sequenz mit COPI (Cosson & Letourneur, 1994). Dementsprechend zeigen bestimmte COPI-Mutanten von S.cerevisiae Defekte in der ER-Retention von di-Lysin-Proteinen (Letourneur et al., 1994; Schröder et al., 1995; Lewis & Pelham, 1996). Im Gegensatz zu den di-LysinProteinen werden die löslichen H/KDEL-markierte Proteine durch einen spezifischen Transmembran-Rezeptor gebunden (Pelham, 1990). Erd2p, der HDEL-Rezeptor der Hefe, zykliert zwischen Golgi und ER, liegt im Fließgleichgewicht aber überwiegend im Golgi-Komplex vor (Lewis & Pelham, 1990). Mit steigendem Expressionsniveau HDELmarkierter Proteine verschiebt sich die Erd2p-Lokalisation jedoch in Richtung ER (Lewis & Pelham, 1992), was für die Überlegung spricht, daß erst die Bindung eines HDEL-Proteins Erd2p die Inkorporation in COPI-Vesikel ermöglicht. Gemäß aktueller Modelle (Lewis & Pelham, 1996) verläuft der retrograde Transport HDEL-markierter Proteine in vier Schritten ab: 1. Bindung der HDEL-Proteine durch Erd2p im Golgi-Apparat. 2. Inkorporation des Ligand-Rezeptor-Komplexes in COPI-Vesikel und Transport zum ER. 3. Auflösung der Bindung zwischen Erd2p und dem HDEL-Protein unter den physiologischen Bedingungen des ER. 4. Anterograder Transport des Erd2-Proteins zum Golgi, wo der Rezeptor schließlich erneut aktiv werden kann. Vermutlich spielt in dem Transportprozeß zudem eine Oligomerisierung des Erd2p-Rezeptors eine Rolle (Majoul et al., 2001).

1.5 Die BAP31-Homologen Yet1p und Yet2p

Das integrale ER-Membranprotein BAP31 sowie das zu 47% identische BAP29 gehören einer hochkonservierten Proteinfamilie in Säugern an, für die eine Sortierungsfunktion innerhalb des anterograden Vesikeltransportes vermutet wird. Die BAP-Proteinfamilie wurde ursprünglich als Bindungspartner bestimmter Antigenrezeptoren (mIgD im Falle von BAP31/29) in murinen B-Lymphozyten identifiziert (Kim et al., 1994). Die Bezeichnung der Proteine als BAPs (BCR-associated proteins) rührt von dieser Wechselwirkung mit Antigenrezeptoren (B-cell antigen receptor = BCR) her. Zusammen mit BAP29 bildet BAP31 einen Heterodimer aus, wobei die Protein-Protein-Interaktion vermutlich über eine Leucin-Zipper-ähnliche Sequenz sowie über C-terminale "Coiled Coil"-Strukturen verläuft (Adachi et al., 1996). Sowohl BAP31, als auch BAP29 weisen einen hydrophoben N-Terminus, drei putative Transmembrandomänen und einen α helikalen C-Terminus mit einem di-Lysin-Signal auf. Der Carboxyterminus der Proteine ist dem Zytosol zugewandt, während sich der Aminoterminus im Lumen des ER befindet (Li et al., 1995). Neben der Bindung an den mIgD-Antigenrezeptor in B-Lymphozyten konnte eine Interaktion des BAP31/29-Heterodimers mit dem MHC KlasseI-Protein (Spiliotis et al, 2000) sowie mit dem neuronalen v-SNARE Cellubrevin gezeigt werden (Annaert et al., 1997). Für die korrekte intrazelluläre Lokalisation aller drei Proteine erwies sich das BAP31/29-Dimer als notwendig. Zudem konnte BAP31 zu einem geringen Prozentsatz auch im *cis*-Golgi- bzw. im intermediären Kompartiment nachgewiesen werden (Annaert et al., 1997). Die Art der mit BAP31-assoziierten Proteine führte Manley und Lennon (2001) zu der Annahme, daß der BAP31/29-Heterodimer hauptsächlich in Lymphozyten, Neuronen und endokrinen Zellen fungiert, obwohl die *m*RNA des *BAP31*-Gens bisher in allen getesteten Gewebetypen nach-gewiesen werden konnte (Mosser et al., 1994).



Abbildung 1.7: Orientierung von BAP31 in der ER-Membran nach Manley und Lennon (2001). BAP31 weist drei putative Transmembrandomänen, eine α -helikale "Coiled coil"-Domäne (177-233) sowie ein terminales Di-Lysin-Signal auf. N = Aminoterminus, **KKEE** = Di-Lysin-Signal am Carboxyterminus, **1** bis **246**: Aminosäureposition.

In der Bäckerhefe existieren zwei Homologe von BAP31: Yet1p sowie Yet2p (gleich YMR040W). Beide Proteine sind integrale TypIII-Membranproteine mit jeweils drei putativen Transmembrandomänen, wobei Yet1p mit circa 25 kd (206 Aminosäuren) ein etwas größeres Molekulargewicht als Yet2p (19 kd; 160 Aminosäuren) aufweist. Um die Frage zu klären, ob Yet1p und Yet2p analog zum BAP31/29-Dimer eine Sortierungsfunktion im sekretorischen Vesikeltransport ausüben, bestand ein Nebenprojekt meiner Arbeit in einer Charakterisierung dieser beiden Proteine. Zu Beginn der Untersuchungen war lediglich die Primärstruktur von Yet1p und Yet2p bekannt. Im Anschluß an die Herstellung einer yet1 yet2-Doppelmutante sollte deshalb zunächst das Wachstumsverhalten der mutanten Stämme unter verschiedenen Umweltbedingungen beobachtet werden. Weiterhin beinhaltete die geplante Charakterisierung von Yet1p und Yet2p eine Fusion der beiden Proteine mit GFP, um mittels Lebendfärbung deren Vergleich intrazelluläre Lokalisation zu bestimmen. Ein der intrazellulären Lokalisierung von bereits bekannten Faktoren des ER-Golgi- bzw. Golgi-ER-Vesikeltransportes in Wildtyp-Hefe und in den *yet*-Mutanten sollte schließlich einen Einblick in die Funktion von Yet1p und Yet2p geben.

1.6 Emp47p, ein COPI-abhängig transportiertes Hefehomolog von ERGIC-53

ERGIC-53 wurde in Säugerzellen ursprünglich als Markerprotein für das sogenannte ERGIC-Kompartiment ("<u>ER-G</u>olgi intermediate <u>compartment</u>") identifiziert (Schweizer et al., 1990; Fiedler & Simons, 1995). Das TypI-Transmembranprotein weist ähnlich wie das Lektin VIP36 (Fullekrug et al., 1999) eine Sequenzhomologie zu leguminosen Lektinen aus Pflanzen auf (Fiedler & Simons, 1995). In Folge eines di-Phenylalaninsowie eines di-Lysin-Signalmotivs am C-Terminus (Schindler et al., 1999) zirkuliert ERGIC-53 zwischen dem ER und dem *cis*-Golgi (Schweizer et al., 1988, 1990; Schindler et al., 1993; Kappeler et al., 1997). Die genaue Funktion von ERGIC-53 ist bisher noch unbekannt, jedoch wird aufgrund der Bindungen des Proteins zu Mannose (Itin et al., 1996) sowie zu bestimmten Glykoproteinen (Santamaria et al., 1998; Appenzeller et al, 1999) eine mögliche Funktion als Glykoprotein-Rezeptor im ER-Golgi-Transport postuliert (Hauri et al., 2000). In der Hefe *S.cerevisiae* weisen Emp47p sowie das zu 45% identische Emp46p eine Homologie zu ERGIC-53 auf. Aufgrund seiner besonderen intrazellulären Transporteigenschaften spielt Emp47p eine zentrale Rolle in dieser Arbeit und soll deshalb näher betrachtet werden.

Emp47p ist ein nichtessentielles TypI-Membranprotein von 417 Aminosäuren Länge (bzw. 445 vor Abspaltung des Signalpeptides) mit einem di-Lysin-Signal am Carboxyterminus. Abbildung 1.4 zeigt ein Schema der Primärstruktur sowie der Membrantopologie des Proteins. Emp47p zirkuliert zwischen ER und dem Golgi, liegt im Gegensatz zur überwiegenden Mehrzahl di-Lysin-markierter Proteine im Fließgleichgewicht aber nahezu ausschließlich innerhalb des Golgi-Apparates vor (Schröder et al., 1995). Diese beiden Eigenschaften, Lokalisation am Startpunkt des retrograden Vesikeltransportes sowie Zirkulation zwischen ER und Golgi, machen das Emp47-Protein zu einem idealen Marker für den retrograden Vesikeltransport.



Abbildung 1.4: Primärstruktur und Membrantopologie von Emp47p. **N** = Aminoterminus, **C** = Carboxyterminus, **SP** = Signalpeptid, **CC** = Potentielle "Coiled coil"-Domäne, **CRD** = Lektinähnliche Domäne, potentielle CRD ("<u>C</u>arbohydrate <u>r</u>ecognition <u>d</u>omain"), **TM** = Transmembrandomäne, **KTKLL** = di-Lysin-Signal, **1** bzw. **417**: Aminosäurenposition im reifen Protein.

Für die korrekte Golgi-Lokalisation von Emp47p erwies sich der Sec20p/Tip20p-Komplex (Cosson et al., 1997) sowie das *t*-SNARE Ufe1p (Lewis & Pelham, 1996) als notwendig. Die Zirkulierung des Proteins zwischen Golgi-Komplex und ER konnte über eine Blockierung des anterograden Vesikeltransportes nachgewiesen werden, welcher eine quantitative Umlagerung der Emp47p-Population in das ER zur Folge hatte (Schröder et al., 1995). Mutationen, welche die Struktur bzw. die Position des di-Lysin-Motivs innerhalb von Emp47p verändern, bewirken eine Fehllokalisation des Proteins zur Vakuole, wo eine rasche Degradation erfolgt. Entsprechend liegt die Halbwertszeit des Wildtyp-Emp47-Proteins (t½ = 5 h bei 30 °C) rund sechsmal höher als im Falle einer verkürzten Mutante ohne di-Lysin-Signal (t½ = 0,8 h bei 30 °C) (Schröder-Köhne et al., 1998). Das gleiche Phänomen kann in fast allen COPI-Mutanten beobachtet werden, eine Ausnahme bilden dabei lediglich Mutanten von α-COP wie z.B. *ret1-1* (Schröder et al., 1995; Schröder-Köhne et al., 1998).

Neben dem di-Lysin-Motiv weist Emp47p möglicherweise noch weitere Sortierungssignale auf, da eine Chimäre aus dem α -Pheromon-Rezeptor Ste2p und dem di-Lysinmarkierten C-Terminus von Emp47p im ER lokalisiert ist. Die Existenz einer Lektinähnlichen Domäne mit einer potentiellen CRD (<u>Carbohydrate receptor domain</u>) in Emp47p läßt wie bei ERGIC-53 die Vermutung auf eine Funktion bei der Konzentrierung und Sortierung von Glykoproteinen zu. Bisher konnte jedoch weder eine Zuckerbindung, noch eine Sortierung von Glykoproteinen nachgewiesen werden.

1.7 Vesikelfusion

Die Verschmelzung eines Vesikel mit der Akzeptormembran wird durch spezielle integrale Rezeptorproteine, SNAREs ("SNAP-receptor") genannt (Söllner et al., 1993), vermittelt. Diese Rezeptoren kommen sowohl innerhalb der Vesikelmembran, als auch innerhalb der jeweiligen Zielmembran vor. Nach Auflösung der Vesikelhülle interagieren die vesikulären SNARE-Proteine (v-SNAREs) dabei mit ihrem jeweiligen Bindungspartner auf der Zielmembran (t-SNAREs), wobei sie zusammen mit SNAP-Proteinen ("Soluble NSF attachment protein") und temporär auch NSF ("NEM-sensitive factor") einen Komplex ausbilden. Der gebildete Komplex wird als SNARE-Komplex bezeichnet und die bei seiner Formierung freiwerdende Energie ist vermutlich die treibende Kraft bei der Vesikelfusion. Die Orientierung der Proteine im SNARE-Komplex (Hanson et al., 1997) ist mittlerweile ebenso bekannt wie dessen Kristallstruktur in Neuronen (Sutton et al., 1998). SNARE-Proteine können in die drei Proteinfamilien der Synaptobrevine (auch VAMP genannt), der Syntaxine (ebenso wie die Synaptobrevine TypII-Membranproteine) sowie der SNAP-25-Homologen, welche über einen Acylrest an die Membran verankert sind (Weimbs et al., 1998), unterteilt werden. Charakteristisches Merkmal aller im Komplex befindlichen SNARE-Proteine sind "Coiled Coil"-Domänen aus zusammengelagerten α -helikalen Sekundärstrukturen, die stabile Protein-Protein-Interaktion eingehen. Am Beispiel der Exocytose in der Hefe stellt Abbildung 1.5 den Mechanismus der Vesikelfusion (Hanson et al., 1997; Otto et al., 1997; Fiebiget et al., 1999) schematisch dar. Neben einem Syntaxin (Sso1/2p) und einem SNAP-25-Homolog (Sec9p) innerhalb der Zielmembran ist in der Hefe ein vesikuläres Synaptobrevin (Snc1/2p) am Prozeß der exocytotischen Vesikelfusion beteiligt. Zu Beginn sind alle SNARE-Proteine noch ungebunden. Das Syntaxin liegt in seiner "geschlossenen Form" vor, d.h. sein aus drei α -Helices bestehender N-Terminus bindet an die eigene C-terminale Helix (Abbildung 1.5.A). Im ersten Schritt der Vesikelfusion lösen sich zunächst die internen Wechselwirkungen im Syntaxin und das Protein geht einen binären Komplex mit dem SNAP-25-Homolog ein. An diesen binären Komplex lagert sich dann das vesikuläre Synaptobrevin an, wobei es eine α-helikale Struktur annimmt (Abbildung 1.5.B). Der zentrale Bereich des nun ternären Komplexes besteht aus vier Helices, wobei zwei vom SNAP-25-Protein beigesteuert werden. Abhängig von der jeweiligen Aminosäure, welche sich strukturell in die Mitte des 4-Helix-Bereichs ausrichtet, werden SNARE-Proteine auch in Q- und R-SNAREs unterteilt (Fasshauer et al., 1998).



Abbildung 1.5: Modell für die SNARE-vermittelte Vesikelfusion mit der Akzeptormembran. Als Beispiel ist der SNARE-Komplex dargestellt, welcher sich bei der Exocytose an der Plasmamembran ausbildet. Eine Erläuterung zu den Schemata A, B und C findet sich im Text. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr H. D. Schmitt.)

= SNAP-25-Homolog = Synaptobrevin = Syntaxin

Die Ausbildung des ternären Komplexes erzeugt nach dem Modell die notwendige Energie, um eine Verschmelzung der räumlich sehr nahen Membranen zu initiieren (Abbildung 1.3.C). Im letzten Schritt der Fusion binden schließlich SNAP (Sec17p) und die ATPase NSF (Sec18p) an den ternären Komplex, was zu dessen ATP-abhängigen Auflösung führt (Clary et al., 1990; Wilson et al., 1992).

Wie zu Beginn der Einleitung bereits erwähnt, ist die Spezifität der Vesikelfusion essentiell zur Aufrechterhaltung der Integrität der Zellorganellen. Gemäß der sogenannten SNARE-Hypothese (Söllner et al., 1993; Søgaard et al., 1994) ist jeweils eine bestimmte t-SNARE/v-SNARE-Kombination spezifisch für einen bestimmten Transportschritt. Tatsächlich sind jedoch SNARE-Proteine bekannt, welche an gleich mehreren Fusionsprozessen beteiligt sind. Nach heutigen Erkenntnissen vermitteln nicht nur SNARE-Proteine, sondern auch eine Reihe weiterer Faktoren die Direktionalität der Vesikelfusion, darunter Proteine der Sec1-Familie, Ypt/Rab-GTPasen und die sogenannten "Tethering"-Faktoren. Sec1-Proteine binden an Syntaxine und halten diesen vermutlich in ihrer geschlossenen Konformation (Lupashin & Waters, 1997; Yang et al., 2000), d.h. sie wirken inhibitorisch auf die Vesikelfusion. Vertreter der Ypt/Rab-Proteinfamilie sind spezifisch für einen bestimmten Transportschritt und wechseln zwischen einer inaktiven, zytosolischen GDP-Form und einer aktiven, membrangebundenen GTP-Form (Lazar et al., 1997) ab. Ihre Funktion liegt wahrscheinlich innerhalb des "Docking"-Prozesses des Vesikels (Mayer & Wickner, 1997) bzw. in der Ablösung der Sec1-Proteine vom Syntaxin (Lian et al., 1994; Lupashin & Waters, 1997). Die sogenannten "Tethering-Faktoren" initialisieren schließlich die Ankopplung des Vesikels an die Zielmembran, so daß die an der eigentlichen Fusion beteiligten SNARE-Proteine in ausreichender Nähe zueinander gelangen können (Pfeffer, 1999). So fungieren z.B. das homodimere Uso1p (Cao et al., 1998), der Sec34/35p-Komplex (VanRheenen et al., 1998 & 1999) sowie der multimere, über 800 kDa große Proteinkomplex TRAPP ("Transport protein particle"; Sacher et al., 1998) im ER-Golgi-Transport.

1.8 Konzeption der Arbeit

Die grundlegende Zielsetzung unserer Arbeitsgruppe bestand in der Untersuchung des membranvermittelten Proteintransportes zwischen dem Golgi-Komplex und dem ER in der Hefe *S.cerevisiae*. Hierdurch sollte insbesondere ein Einblick in die molekularen Mechanismen der COPI-Direktionalität, der Inkorporation von di-Lysin-Proteinen in COPI-umhüllte Vesikel sowie der Wechselwirkungen von Coatomer-Untereinheiten untereinander gewonnen werden. Ein weiterer Schwerpunkt unserer Zielsetzung lag zudem in der Identifizierung neuer Proteinfaktoren des COPI-abhängigen Vesikeltransportes und in deren funktionalen Analyse. Die deutliche numerische Diskrepanz zwischen den zu Beginn dieser Arbeit bekannten Proteinfaktoren des anterograden und des retrograden Transportes ließ die Vermutung zu, daß noch weitere, bisher unbekannte Proteine mit einer Funktion im retrograden Vesikeltransport existieren. Einen Überblick über den derzeitigen Forschungsstand gibt die Tabelle 1.3.

Proteinfak Vesikelti	toren im anterograden ransport ER → Golgi	Proteinfaktoren im retrograden Vesikeltransport Golgi \rightarrow ER		
Bezeichnung:	Funktion:	Bezeichnung:	Funktion:	
Emp24p	Frachtprotein-Rezeptor			
Sar1p	GTPase	Arf1p	GTPase	
Sec12p	GEF von Sar1p	Gea1p, Gea2p, Sec7p, Syt1p	GEF von Arf1p	
Sec23/Sec24p	COPII-Hülle, GAP von Sar1p	Coatomer	COPI-Hülle	
Sec13/31p	COPII-Hülle	Glo3p, Gcs1p	GAP von Arf1p	
Sec16p	COPII-Hüllaufbau			
Sed4p	COPII-Hüllaufbau			
Sec18p (NSF)	ATPase, Vesikelfusion			
LMA1-Komplex	Vesikelfusion			
Bet1p	<i>v</i> -SNARE			
Bos1p	<i>v</i> -SNARE			
Sec22p	<i>v</i> -SNARE	Sec22p	<i>v</i> -SNARE	
Ykt6p	<i>v</i> -SNARE			
Sed5p	t-SNARE	Ufe1p	t-SNARE	
Uso1p	"Tethering"-Faktor	Tip20p	"Tethering"-Faktor	
TRAPP-Komplex	"Tethering"-Faktor	Sec20p	"Tethering"-Faktor	
Sec34/35p	"Tethering"-Faktor			
Sly1p	Sec1p-Protein			
Ypt1p	GTPase			
Sec19p	GDI			

Tabelle 1.3: Bekannte Faktoren des anterograden und des retrograden Vesikeltransportes zwischen dem ER und dem Golgi-Komplex in der Hefe *S.cerevisiae*.

Um eine Identifikation sowie eine Funktionsanalyse neuer Proteinfaktoren des Golgi-ER-Vesikeltransportes zu ermöglichen, bestand das Thema meiner Arbeit in der Entwicklung eines System zur *In vitro*-Rekonstitution dieses speziellen intrazellulären Transportschrittes. Als methodische Basis dienten dabei bereits existente *In vitro*-Systeme für den sekretorischen ER-Golgi-Transport. Insbesondere der sogenannte "Enriched ER assay" nach Baker et al. (1988), dessen Aufbau und Funktionsprinzip in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt ist, war hierbei von Bedeutung.



Abbildung 1.6: Funktionsprinzip des *In vitro*-Transportsystems "Enriched ER assay" (Baker et al.,1988) nach Wuestehube und Schekman (1992). Eine Inkubation von [³⁵S]-markiertem α -Faktor-Vorläufer mit aufgereinigten ER-Membranen sowie mit einem ATP-Regenerationssystem führt zu einer posttranslationalen Translokation der Proteinmoleküle ins ER. Im ER-Organell werden Man₉GlcNAc₂-Oligosaccharide an spezifische Aspartat-Reste der α -Faktor-Vorläufer-proteine angefügt (ER- bzw. "Core"-Glykosylierung). Der zweite Schritt des Assays beinhaltet eine Inkubation der ER-Membranen, welche nun die "Core"-glykosyliertem Reportermoleküle enthalten, mit aufgereinigten Golgi-Membranen, Zytosol und einem ATP-Regenerationssystem bei 20 °C bis 30 °C. Erreicht der S³⁵-markierte α -Faktor-Vorläufer im Verlaufe dieser zweiten Inkubation mittels COPII-Vesikeltransport den Golgi-Komplex, erfolgt dort eine weitere Reifung der Kohlenhydratketten durch Golgi-spezifische Enzyme. Als Resultat ergibt sich die Transport-effizienz des "Enriched ER assay" direkt aus dem Mengenverhältnis zwischen der ER- und der Golgi-glykosylierten Form des S³⁵- α -Faktor-Vorläufers.

∇ ∇ = Golgi-Glykosylierung, ∇ = ER-Glykosylierung, $\mathcal{N}\mathcal{N}\mathcal{N}$ = [S³⁵]-markierter α -Faktor-Vorläufer

Das geplante *In vitro*-System für den retrograden Vesikeltransport sah in Analogie zum "Enriched ER assay" eine Inkubation aufgereinigter ER- und Golgi-Membranen zusammen mit Zytosol sowie mit einem ATP-Regenerationssystem vor. Infolge der Notwendigkeit eines retrograd transportierten Substrates konnte das von Baker et al. benutzte α -Faktor-Vorläufermolekül hierbei jedoch nicht als molekularer Reporter Verwendung finden. Stattdessen sollte eine subzelluläre Umverteilung (GolgiLokalisation \rightarrow ER-Lokalisation) des Emp47-Proteins als Indikator für erfolgten Vesikeltransport dienen. Um diese Umverteilung auch ohne radioaktive Markierung sichtbar machen zu können, bestand die Absicht, die für den Assay benötigten ER-Membranen aus einem Emp47p-defizienten Hefestamm zu isolieren. Als Folge der Verwendung solcher *emp47* Δ -ER-Membranen würde nach Ablauf der Inkubationszeit eine vorhandene ER-Lokalisation des Emp47p-Reporters retrograden Vesikeltransport direkt belegen.

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Emp47p sollten ursprünglich zwei unterschiedliche Strategien zur Anwendung kommen. Das einfachste Verfahren, welches die prinzipielle Durchführbarkeit des geplanten *In vitro*-Assays demonstrieren sollte, beinhaltete eine differentielle Zentrifugation zur Trennung der ER- und Golgi-Membranen (Gaynor et al., 1994; Schröder et al., 1995). Die zweite Strategie sah eine Fusion des Emp47p-Reportermoleküls mit einem N-glykosylierten Protein vor, wobei der Glykosylierungsstatus der resultierenden Chimäre (entweder "Core"- oder Golgi-Glykosylierung) als Indikator für deren intrazelluläre Lokalisation dienen sollte. In einem später konzipierten dritten Verfahren wurde schließlich eine ER-spezifische Proteolyse des Reportermoleküls zum Nachweis ausgenutzt.

2. Material

2.1 Hefen- und Bakterienstämme

2.1.1 Saccharomyces cerevisiae

Stamm:	Merkmal:	Quelle:
BY4741	MATa, his $3\Delta 1$, leu $2\Delta 0$, met $15\Delta 0$, ura $3\Delta 0$	Euroscarf, Frankfurt am
		Main
BY4742	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0	Euroscarf, Frankfurt am
		Main
BY4741 yet1	MATa, his $3\Delta 1$, leu $2\Delta 0$, met $15\Delta 0$, ura $3\Delta 0$,	Euroscarf, Frankfurt am
	<i>yet1</i> ::kanMX4	Main
BY4742 yet2	MAT α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0,	Euroscarf, Frankfurt am
	<i>yet2</i> ::kan MX4	Main
BY4741 yet1	MAT a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0,	diese Arbeit
yet2	met15∆0, <i>yet1</i> ::kanMX4, <i>yet2</i> ::kan MX4	
RH448	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, his4, bar1</i>	H. Riezman, Basel,
		Schweiz
RH732	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, his4, bar1</i> ,	H. Riezman, Basel,
	pep4::URA3	Schweiz
RH912	MATa, his4, ura3, leu2, trp1, lys2, BAR1	H. Riezman, Basel,
		Schweiz
RH2825	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, his4, bar1</i> ,	S. Schröder-Köhne
	pep4::URA3, emp47::LYS2	
RH3045	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, his4, bar1</i> ,	S. Schröder-Köhne
	emp47::LYS2	
S27P4-9C	MATα sec27-1 leu2 ura3 lys2 His+	H. D. Schmitt
	pep4::HIS3 Trp⁺	
SC23-3A	MATα sec23 leu2 ura3 his3 trp1 lys2 ade2	H. D. Schmitt
	<i>suc2-</i> Δ9	
SEL18-10C	MATα sec18 leu2	H. D. Schmitt
SEY6210	MATα, <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>lys2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>suc2</i> ,	S. Emr, San Diego, USA
	kex2::TRP1	

Stamm:	Merkmal:	Quelle:
SSY10071	leu2, ura3, trp1, his1, his3, och1::LEU2,	S. Schröder-Köhne
	gls1-1	
SSY10137	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	S. Schröder-Köhne
	kex2::TRP1, emp47::LYS2	
SSY10143	MATα, <i>mfα::AD2</i> , <i>mfα2::TRP1</i> , <i>ura3</i> ,	S. Schröder-Köhne
	lys2, ade2, trp1, leu2, bar1::lys2::SEC22-	
	c-myc-α-KanMX4, emp47::LYS2	
SSY10144	MATa, his4, ura3, leu2, trp1, lys2, BAR1,	S. Schröder-Köhne
	emp47::LYS2	
SSY10150	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, his4, bar1</i> ,	S. Schröder-Köhne, diese
	pep4::URA3, emp47::LYS2, α-	Arbeit
	EMP47::LEU2	
SSY10151	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, his4, bar1</i> ,	S. Schröder-Köhne, diese
	pep4::URA3, emp47::LYS2, α-LINK-	Arbeit
	EMP47::LEU2	
SSY10152	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	S. Schröder-Köhne, diese
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, α-LINK-	Arbeit
	EMP47::LEU2	
SSY10153	MATα, <i>mfα::AD2</i> , <i>mfα2::TRP1</i> , <i>ura3</i> ,	S. Schröder-Köhne, diese
	lys2, ade2, trp1, leu2, bar1::lys2::SEC22-	Arbeit
	c-myc-α-KanMX4, emp47::LYS2, c-myc-α-	
	EMP47::LEU2	
SSY10154	MATa, his4, ura3, leu2, trp1, lys2, BAR1,	S. Schröder-Köhne, diese
	emp47::LYS2, α-LINK-EMP47::LEU2	Arbeit
SSY10155	MATa, his4, ura3, leu2, trp1, lys2, BAR1,	S. Schröder-Köhne, diese
	emp47::LYS2, α-EMP47::LEU2	Arbeit
SSY10156	MATa, his4, ura3, leu2, trp1, lys2, BAR1,	S. Schröder-Köhne, diese
	emp47::LYS2, c-myc-α-EMP47::LEU2	Arbeit
SSY10157	MATα, <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>lys2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>suc2</i> ,	S. Schröder-Köhne, diese
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, α-	Arbeit
	EMP47::LEU2	

Stamm:	Merkmal:	Quelle:
SSY10224	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	S. Schröder-Köhne, diese
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, α-c-myc-	Arbeit
	EMP47::LEU2	
SSY 10225	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, BAR1-CNE1	
SSY10226	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, BAR1-CUE1	
SSY10227	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, BAR1-SEC66	
SSY10228	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, BAR1-WBP1	
SSY 10229	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, c-myc-α-	
	EMP47::LEU2, BAR1-CNE1	
SSY 10230	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2</i> ,	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, c-myc-α-	
	EMP47::LEU2, BAR1-CUE1	
SSY 10231	MATα, <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>lys2</i> , <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>suc2</i> ,	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, c-myc-α-	
	EMP47::LEU2, BAR1-SEC66	
SSY 10232	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2,</i>	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, c-myc-α-	
	EMP47::LEU2, BAR1-WBP1	
SSY10233	MATα, leu2, ura3, lys2, his4, bar1, SPC3-	diese Arbeit
	EMP47	
SSY10234	MATα, leu2, ura3, lys2, his4, bar1, pCPY-	diese Arbeit
	EMP47	
SSY10235	MATα, <i>leu2, ura3, lys2, his4, bar1,</i>	diese Arbeit
	CNE1-EMP47	
SSY10236	leu2, ura3, trp1, his1, his3, och1::LEU2,	diese Arbeit
	gls1-1, SPC3-EMP47	

Stamm:	Merkmal:	Quelle:
SSY10237	leu2, ura3, trp1, his1, his3, och1::LEU2,	diese Arbeit
	gls1-1, pCPY-EMP47	
SSY10238	leu2, ura3, trp1, his1, his3, och1::LEU2,	diese Arbeit
	gls1-1, CNE1-EMP47	
SSY10239	MATα, leu2, ura3, lys2, trp1, his3, suc2,	diese Arbeit
	kex2::TRP1, emp47::LYS2, BAR1-CNE1-	
	МҮС	
SSY10240	MAT a, his $3\Delta 1$, leu $2\Delta 0$, lys $2\Delta 0$, ura $3\Delta 0$,	diese Arbeit
	met15 $\Delta 0$, <i>YET1-GFP</i>	
SSY10241	MAT a, his $3\Delta 1$, leu $2\Delta 0$, lys $2\Delta 0$, ura $3\Delta 0$,	diese Arbeit
	met15 Δ 0, YET2-GFP	
SSY10242	MAT a, his $3\Delta 1$, leu $2\Delta 0$, lys $2\Delta 0$, ura $3\Delta 0$,	diese Arbeit
	met15∆0, <i>yet1</i> ::kanMX4, <i>yet2</i> ::kan MX4,	
	YET1-GFP	
SSY10243	MAT a, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0,	diese Arbeit
	met15∆0, <i>yet1</i> ::kanMX4, <i>yet2</i> ::kan MX4,	
	YET2-GFP	
TNY26	MATα, <i>mfα::AD2</i> , <i>mfα2::TRP1</i> , <i>ura3</i> ,	T. Neumann, H. D.
	lys2, ade2, trp1, leu2, bar1::lys2::SEC22-	Schmitt
	c-myc-α-KanMX4	
1		

2.1.2 Escherichia coli

Stamm:	Merkmal:	Quelle:
DH5a	F ⁻ /endA, hsdR17(rk ⁻ m ⁺), supE44, thi-1,	Gibco BRL, Eggenstein
	recA1, gyrA1(Naŀ), relA1∆(lacZYA-argF),	
	U169(m80lacZΔM15)	

2.2 Plasmide

Plasmid:	Beschreibung:	Quelle:
pBSAG1	pBSKS(+)-EMP47	diese Arbeit
pBSAG2	pBSKS(+)-EMP47/CNE1	diese Arbeit
pBSAG3	pYIplac128- <i>EMP47/CNE1, LEU2</i>	diese Arbeit
pBSAG4	pBSKS(+)-EMP47/PRC1	diese Arbeit
pBSAG5	pYIplac128- <i>EMP47/PRC1, LEU2</i>	diese Arbeit
pBSAG6	pBSKS(+)-EMP47/SPC3	diese Arbeit
pBSAG7	pYIplac128- <i>EMP47/SPC3, LEU2</i>	diese Arbeit
pBSAP1	pRS316-WBP1, URA3	diese Arbeit
pBSAP2	pRS316-WBP1-BAR1, URA3	diese Arbeit
pBSAP6	pRS306-WBP1-BAR1, URA3	diese Arbeit
pBSAP10	pRS316-SEC66, URA3	diese Arbeit
pBSAP11	pRS316-SEC66-BAR1, URA3	diese Arbeit
pBSAP15	pRS306-SEC66-BAR1, URA3	diese Arbeit
pBSAP19	pRS316-CNE1, URA3	diese Arbeit
pBSAP20	pRS316-CNE1-BAR1, URA3	diese Arbeit
pBSAP24	pRS306-CNE1-BAR1, URA3	diese Arbeit
pBSAP28	pRS316-CUE1, URA3	diese Arbeit
pBSAP29	pRS316-CUE1-BAR1, URA3	diese Arbeit
pBSAP33	pRS306-CUE1-BAR1, URA3	diese Arbeit
pBSAP39	pRS306-CNE1-BAR1-c-myc, URA3	diese Arbeit
pBSKS(+)	Klonierungsvektor	Stratagene, San Diego,
		USA
pRS306	Hefevektor zur Integration ins	Sikorski & Hieter, 1989
	Genom. amp ^r (E.coli), URA3 (Hefe)	
pRS313	CEN-Hefevektor, amp ^r (E.coli),	Sikrorski & Hieter, 1989
	<i>HIS3</i> (Hefe)	
pRS313-Snc2- <i>myc</i>	CEN-Hefevektor, amp ^r (E.coli),	Ossig et al., 2000
	HIS3, SNC2-MYC	

Plasmid:	Beschreibung:	Quelle:
pRS313-Sso2-myc	CEN-Hefevektor, amp ^r (E.coli),	Ossig et al., 2000
	HIS3 (Hefe), SSO2-MYC	
pRS316	CEN-Hefevektor, amp ^r (E.coli),	Sikorski & Hieter, 1989
	URA3 (Hefe)	
pRS326	2µ-Hefevektor, <i>amp</i> ^r (E.coli), URA3	Sikorski & Hieter, 1989
	(Hefe)	
pRS426-Sec66	2µ-Hefevektor, <i>amp</i> ^r (E.coli), URA3	Marinus Pilon, 1997
	(Hefe), <i>SEC66</i>	
pUG36	amp ^r (E.coli), URA3, CEN6/ARS4,	Niedenthal et al., 1996
	yEGFP3	
pUG36-Yet1	amp ^r (E.coli), URA3, CEN6/ARS4,	diese Arbeit
	yEGFP3-YET1	
pUG36-Yet2	amp ^r (E.coli), URA3, CEN6/ARS4,	diese Arbeit
	yEGFP3-YET2	
pUV5-G1S	amp ^r (E.coli), BGL2	Shen et al., 1991
pWO24	YEp13-PRC1	S. Schröder-Köhne
pYIplac128	Yeast Integrating plasmid. amp ^r	Gietz und Sugino, 1988
	(E.coli), <i>LEU2</i> (Hefe)	
pYIplac128-	amp ^r (E.coli), LEU2 (Hefe),	S. Schröder-Köhne, diese
α-Emp47	α -EMP47	Arbeit
pYIplac128-	amp ^r (E.coli), LEU2 (Hefe),	S. Schröder-Köhne, diese
<i>c-myc</i> -α-Emp47	α -c-myc-EMP47	Arbeit
pYIplac128-	amp ^r (E.coli), LEU2 (Hefe),	S. Schröder-Köhne, diese
α -link-Emp47	α -LINK-EMP47	Arbeit
YEp13-Prc1	2 μ-Hefevektor, <i>URA3</i>	Hill et al., 1986
YEp352	2 μ-Hefevektor, <i>URA3</i>	Hill et al., 1986
YEp352-Wbp1	2 μ-Hefevektor, URA3, WBP1	te Heesen, 1992

2.3 Oligonukleotide

Bezeichnung:	Sequenz (5 \rightarrow 3'):	Verwendungszweck:
BSBAR1-1	GCGATTATTAACACCATTGGATCCT	Klonierung des BAR1-Gens
	TAACAAACGATGGCACTGGTCACTT	für die CNE1-BAR1-Fusion,
	AGAATTCC	5´-Ende
BSBAR1-2	GCTATAAAGAAATTGTACTCCAGAT	Klonierung des BAR1-Gens
	GGATCCATATGTTGGTTTACAGACA	für die CNE1-BAR1-Fusion,
	TTTATTAAGAC	3´-Ende
BSBAR1-3	GCTTTAACAAACGATGCCATGGGTC	Klonierung des BAR1-Gens
	ACTTAGAATTCC	für die CUE1-BAR1-Fusion,
		5´-Ende
BSBAR1-4	GTACTCCAGATTTCTTAATCCATGG	Klonierung des BAR1-Gens
	GTTTACAGACATTTATTAAGAC	für die CUE1-BAR1-Fusion,
		3´-Ende
BSBAR1-5	CCATTACTGCTTTGACGTCCGATGG	Klonierung des BAR1-Gens
	CACTGGTCAC	für die SEC66-BAR1-
		Fusion, 5´-Ende
BSBAR1-6	GGTTTCTGCAATAAGCGAAGAGGA	Klonierung des BAR1-Gens
	CGTCGATGATTGAAGAAAAGGCC	für die SEC66-BAR1-
		Fusion, 3´-Ende
BSBAR1-7	GGTCACTTAGAATTCCTTCTAGAAC	Klonierung des BAR1-Gens
	ACGAAGAGGAGATG	für die WBP1-BAR1-Fusion,
		5´-Ende
BSBAR1-8	GGCTGTCGATGATTCTAGAAAAGG	Klonierung des BAR1-Gens
	CCTACTCTTGCAGCC	für die WBP1-BAR1-Fusion,
		3´-Ende
BSCNE1M-1	GATCCGAGCAGAAATTGATCAGCG	Insertion eines <i>Myc</i> -Epitops
	AGGAAGACTTGGCATGCGCATGCA	in das <i>CNE1</i> -Gen, 5´-Ende
BSCNE1M-2	GATCTGCATGCGCATGCCAAGTCTT	Insertion eines <i>Myc</i> -Epitops
	CCTCGGTCATCAATTTCTGCTCG	in das <i>CNE1</i> -Gen, 3´-Ende
BSCPY1	GGTCAAGAATGATGCATTTGAAAAAC	Klonierung von PRC1,
	TATCAGC	5´-Ende
Bezeichnung:	Sequenz (5´ \rightarrow 3´):	Verwendungszweck:
--------------	--------------------------------	------------------------------
BSCPY2	GAGTCTTCCATAGCAGAGCATGCAT	Klonierung von PRC1,
	CCGAGGGC	5´-Ende
BSCPY3	AGGATTTGAATGCATCAGCGACCTC	Sequenzierung des PRC1-
	GTCGG	Gens, 5´-Ende
BSCPY4	AACCATCTGTTTTGCCC	Sequenzierung des PRC1-
		Gens, 3´-Ende
BSCNE1-1	CGTTGGTGAATGCATCTTCATTGCT	Klonierung des EMP47-
	ATCCAACG	CNE1-Fusionsgens, 5´-Ende
BSCNE1-2	CGCAGCAAGCACAAATGCATGAGG	Klonierung des EMP47-
	TTGCTCTAA	CNE1-Fusionsgens, 3´-Ende
BSE1	GTTTTTACCGTCTTAGCG	Sequenzierung der EMP47-
		Fusionsgene, 5´-Ende
BSE2	TAGACTAGCTTGTTCTCC	Sequenzierung der EMP47-
		Fusionsgene, 3´-Ende
BSPCNE1-1	CTGTGCAGGCAAAAAGTGCTCGAG	Klonierung von <i>CNE1</i> ,
	AAGGTAATGCTGAAAAGG	5´-Ende
BSPCNE1-2	GTATTTTTTTAGCAAATATTCATTTC	Klonierung von CNE1,
	TAGAGCTCACATTTCCCTTGTCACC	3´-Ende
BSPCUE1-1	CAGCAATAACAGCAATAACAATACC	Klonierung von CUE1,
	GGATCCACCTCCAGCGGGAGAACC	5´-Ende
	AATGGGAAG	
BSPCUE1-2	CCTTGTATATACCGTGCGCAGGATC	Klonierung von <i>CUE1</i> ,
	CGGTAAAGATATCCCTGCACTTG	3´-Ende
BSSEC66-1	CTCCAACAACGGGACGTCTTTTGAA	Einführung einer AatII-
	ACGGAAGAGCC	Schnittstelle in SEC66
BSSEC66-2	GGCTCTTCCGTTTCAAAAGACGTCC	Einführung einer AatII-
	CGTTGTTGGAG	Schnittstelle in SEC66
BSSEC66-3	GTAGTGAGCAAGAAGAAGGG	Einführung einer AatII-
		Schnittstelle in SEC66
BSSEC66-4	CCTGTCGGGTTTCGCCACC	Einführung einer AatII-
		Schnittstelle in SEC66

Bezeichnung :	Sequenz (5 \rightarrow 3'):	Verwendungszweck:
BSSPC3-1	CAATTAATCAATGCATACGCGTTCT	Klonierung von SPC3,
	CAGTACC	5´-Ende
BSSPC3-2	AGCAAAGACTAGTCTATGCATTGTT	Klonierung von <i>SPC3</i> ,
	TTTATTTTCCAC	3´-Ende
BSY1-1	CCGAGAAGAATAAATAATTCTAGAA	Klonierung von GFP-YET1,
	TGAGTTTATACTTTAGCACA	5´- Ende
BSY1-2	ACATTTATACATAAATATATCTCTA	Klonierung von GFP-YET1,
	GAGTTTCCTTTCTTGGAAGC	3´- Ende
BSY1-3	GGTCGACGGTATCGATAAGC	Sequenzierung des YET1-
		Gens, 5´-Ende
BSY1-4	CCACCGCGGTGGCGGCTC	Sequenzierung des YET1-
		Gens, 3´-Ende
BSY2-1	CAAAATTTCAAAGTCGAGTCTAGAA	Klonierung von <i>GFP-YET2</i> ,
	TGGGTGTTTATTTGGCAGTACTC	5´-Ende
BSY2-2	CTTTTCTTCTTTTTTAGTTTTTTCTC	Klonierung von <i>GFP-YET2</i> ,
	TAGAAAATTTCTTCTTCTGCAATTC	3´- Ende
BSY2-3	GGGCTTATCTAGATTGTACTATCTA	Sequenzierung des YET2-
	CC	Gens, 5´-Ende
BSY2-4	AGGGTTTTCAGATCTAACACAGAAT	Sequenzierung des YET2-
	GG	Gens, 3´-Ende

2.4 Enzyme und Kits

Bezeichnung:	Lieferant:
β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus <i>Helix pomatia</i>	Boehringer, Mannheim
Deep Vent-DNA-Polymerase aus Thermococcus	New England Biolabs
litoralis	
DNA-modifizierende Enzyme	New England Biolabs, Boehringer
	Mannheim
ECL-Western blotting detection reagents	NEN Life Science Products, Belgien
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Düsseldorf

Bezeichnung:	Lieferant:
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Boehringer
	Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Perkin Elmer
Zymolyase 6000 aus Athrobacter luteus	Sigma, Deisenhofen

2.5 Antikörper

Bezeichnung:	Quelle:
Monoklonaler Anti-c-myc-Antikörper aus der	Cambridge Research Biochemicals
Maus (9E10)	Ltd., Cheshire, GB
Polyklonaler Anti-Bet1p-Antikörper	H. D. Schmitt
Polyklonaler Anti-Bos1p-Antikörper	H. D. Schmitt
Polyklonaler Anti-c-myc-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, USA
Polyklonaler Anti-CPY-Antikörper	H. D. Schmitt
Polyklonaler Anti-δ-COP-Antikörper	S. Schröder-Köhne
Polyklonaler Anti-Emp47p-Antikörper	S. Schröder-Köhne
Polyklonaler Anti-Hexokinase-Antikörper	S. Schröder-Köhne
Polyklonaler Anti-Kar2p-Antikörper	H. D. Schmitt
Polyklonaler Anti-Kex2p-Antikörper	H. D. Schmitt
Polyklonaler Anti-Pep12p-Antikörper	H. D. Schmitt
Polyklonaler Anti-Rer1p-Antikörper	H. D. Schmitt
Polyklonaler Anti-Sec22p-Antikörper	R. Ossig & R. Grabowski
Polyklonaler Anti-Sed5p-Antikörper	H. D. Schmitt
Polyklonaler Anti-Ufe1p-Antikörper	M. Lewis, London
Peroxidase-konjugierter Anti-Kaninchen IgG	Amersham Buchler, Braunschweig
(sekundärer Antikörper vom Esel)	
Peroxidase-konjugierter Anti-Maus IgG	Amersham Buchler, Braunschweig
(sekundärer Antikörper vom Schaf)	

2.6 Chemikalien

Für die Arbeit fanden handelsübliche Chemikalien der Qualitätsstufe p.A. der Firmen J. T. Baker (Deventer, Niederlande), Serva (Heidelberg), Merk AG (Darmstadt) sowie Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) Verwendung. Chemikalien anderer Hersteller sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt:

Chemikalen:	Lieferant:
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-galactopyranosid	Boehringer Mannheim
(X-Gal)	
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Eurogentec, Belgien
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia Biotech
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Biomol, Ilvesheim
Proteingrößenstandard für Acrylamidgele	GibcoBRL
14 mCi/ml Trans ³⁵ S-labeling Mix	ICN

2.7 Medienzusätze

Medienzusatz:	Lieferant:
Adeninsulfat und Uracil	Merk AG (Darmstadt)
Aminosäuren	Serva, Heidelberg
Ampicillin Natriumsalz	Appli Chem, Biolith Diagnostica,
	Göttingen
Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Bacto-	Difco, Detroit, MI, USA
Yeast-Extract, Bacto-Yeast Nitrogen Base w/o	
Amino Acids	
Geneticin	GibcoBRL Life Technologies
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Oxoid-Agar, Bacteriological Agar No. 1	Oxoid Basingstoke, UK

2.8 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien:	Lieferant:
Nitrozellulose-Membranfilter BA 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Qiagen Säulen	Qiagen, Düsseldorf
Kulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Polypropylenröhrchen (30 und 15 ml Falcon)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Whatman 541 Filter	Whatman, Maidstone, England

2.9 Geräte

Gerät:	Lieferant:
Autoklav "SANOclav"	Wolf, Geislingen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Elektroporationsgerät "Gene Pulser™"	BioRad, Richmond, USA
Röntgenfilm-Entwicklermaschine "Gevamatik 60"	AGFA Gevaert, Hannover
"Elektrophoresis Power supply" Stromquelle	Renner GmbH, Dannstadt
Eppendorf-Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C	Rettberg, Göttingen
Glaswaren	Schütt, Göttingen
Inkubationsschüttler "GYROTORY Shaker"	New Brunswick, Edison, USA
Inkubationsschüttler "Multitron"	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
"Lumi-Imager [™] "	Boehringer, Mannheim
Magnetrührer "Ikamag Reo"	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Mikromanipulator	Singer Instruments, Watchet,
	England
Mikroskop "Laborlux D"	Leitz, Wetzlar
Mikroskop "Axiophot"	Zeiss, Oberkochen
PCR-Gerät "PTC-100 TM "	MJ Research, Watertown, USA
PCR-Gerät "RoboCycler 40 Gradient"	Stratagene
PhosphorImager [™]	Molecular dynamics, USA

Gerät:	Lieferant:
Photometer "Uvikon 860"	Kontron Instruments, Eching
Szintillationszähler "Tri-Carb"	Packard, Frankfurt
Transilluminatoren (302 nm bzw. 366 nm)	Bachofer, Reutlingen
Ultrazentrifugen "L7-55" und "L8-70M" sowie	Beckman Instruments, Palo Alto,
dazugehörende Rotoren	USA
"Vortex Genie 2 TM "	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad-Schüttelmaschine "Aquatron"	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Wasserbad-Schüttelmaschine "GFL 1086"	GFL, Burgwedel
Zentrifugen Sorvall "RC-5B", "RC-3B" sowie	DuPont Instruments, Bad Homburg
dazugehörende Rotoren	

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Alle hitzestabilen Medien und Lösungen wurden bei 120 °C und 1 bis 3 bar Überdruck für mindestens 30 Minuten autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm Membran, FB 030/3, Schleicher & Schüll).

3.1.2 Wachstumskontrolle

Das Wachstum der Bakterien- bzw. Hefekulturen wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt, wobei die hauptsächlich durch Streuung verursachte Abnahme der Lichtintensität gemessen wurde.

3.1.3 Kulturen des Bakteriums Escherichia coli

Als Kulturmedium diente eine Luria-Bertani-Nährlösung (LB-Medium): 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, 5 ml 1M NaOH (+ 20 g Agar für Agarplatten) auf 1 l dH₂O. Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (Ampicillin-Endkonzentration: 50 mg / l). Die Anzucht erfolgte bei 37 °C, Flüssigkulturen wurden bei circa 210 rpm geschüttelt. Um eine Dauerkultur anzulegen, wurden 500 μ l einer logarithmisch wachsenden *E.coli*-Kultur (OD₆₀₀ = 0,5) mit einem Volumen Glycerin versetzt und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei -80 °C.

3.1.4 Herstellung von transformationskompetenten Escherichia coli-Zellen

Um kompetente *E.coli*-Zellen für die DNA-Transformation mittels Elektroporation (siehe Abschnitt 3.1.5) zu erhalten, wurde ein Liter einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur ($OD_{600} = 0,5$ bis 1) zunächst 30 Minuten auf Eis abgekühlt und dann zentrifugiert (4000 *g*, 4 °C, 15 Minuten). Das Zellpellet wurde anschließend mindestens dreimal mit ddH₂O sowie einmal mit 10% Glycerin gewaschen, um sämtliche Ionen aus dem Medium zu entfernen. Das Bakterienpellet wurde schließlich in 10% Glycerin aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C für maximal drei Monate.

3.1.5 Transformation von Escherichia coli-Zellen

Die Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung des BioRad "GenePulser". 50 µl einer Suspension kompetenter *Escherichia coli*-Zellen (siehe Abschnitt 3.1.4) wurde auf 0 °C erwärmt, mit 10 µl DNA-Lösung (1 bis 2 ng Plasmid-DNA / µl) vermischt und in eine "GenePulser"-Küvette überführt. Die Elektroporation wurde bei C = 25 µF, U = 2,5 kV, R = 200 Ω sowie t = 4,3 s durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterienzellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen, 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln (210 rpm) inkubiert und schließlich auf eine Agarplatte mit Selektionsmedium ausplattiert.

3.1.6 Kulturen der Hefe Saccharomyces cerevisiae

Für die Anzucht von Hefekulturen fanden die Medien YPEG bzw. YPEGal (Vollmedien) sowie SD (Synthetisches Dextrose-Minimalmedium) Verwendung. Wenn im Text nicht anders vermerkt, erfolgte die Inkubation bei 30 °C.

YPEG/YPEGal:		SD:	
Hefeextrakt	10 g / l	Yeast Nitrogen Base	1,7 g / l
Pepton Nr.140	20 g / l	Ammoniumsulfat	5 g / l
Glukose/Galaktose	20 g / l	Glukose	20 g / l
Adeninsulfat (1 g / l)	5 ml / l	"Dropout powder"	1,3 g / l
Uracil (1 g / l)	5 ml / l	1 M NaOH	5 ml / l
Agar (für Platten)	20 g / l	Agar (für Platten)	20 g / l

Beim "Dropout powder" handelt es sich um eine Mischung spezifischer Aminosäuren und Nukleotide nach Sherman et al. (1979). Je nach Bedarf wurden eine oder mehrere Komponenten dieser Mischung weggelassen, um entsprechend prototrophe Hefestämme zu selektieren.

Nährstoffe im "Dropout powder"	Konzentration des Nährstoffes im Medium (µg / ml):
Adenin	40
L-Arginin	20
L-Asparaginsäure	100
L-Glutaminsäure L-Histidin	100 100 20
L-Leucin	60
L-Lysin	30
L-Methionin	20
L-Phenylalanin	50
L-Sorin	375
L-Strin L-Threonin L-Tryptophan	200 40
L-Tyrosin	30
L-Valin	150
Uracil	20

Um eine Dauerkultur anzulegen, wurden 500 μ l einer logarithmisch wachsenden Hefekultur (OD₆₀₀ = 1) in einem sterilen Plastikgefäß mit einem Volumen sterilen Glycerin versetzt und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei -80 °C.

3.1.7 Transformation von Saccharomyces cerevisiae-Zellen

Die Hefetransformation wurde nach der Methode von Ito et al (1983) durchgeführt. Eine logarithmisch wachsende Hefekultur ($OD_{600} = 1$) wurde abzentrifugiert und das Zellpellet mit TE-Puffer sowie mit LiOAc-Puffer gewaschen. Danach wurden die Hefezellen in 1 ml LiOAc-Puffer resuspendiert und für eine Stunde bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die zu transformierende DNA zugegeben (5 bis 10 mg DNA auf 100 µl Zellsuspension), 30 Minuten bei 30 °C inkubiert, PEG-Lösung (1 ml auf 100 µl Zellsuspension) zugefügt und für weitere 30 Minuten bei

30 °C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen einem Hitzeschock (10 Minuten Inkubation bei 42 °C) ausgesetzt, zweimal mit TE-Puffer gewaschen, in 100 μ l YPEG-Medium aufgenommen und auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert.

TE-Puffer:	10 mM TrisHCl pH 8,0
	1 mM EDTA
LiOAc-Puffer:	100 mM LiOAc
	1 x TE
PEG-Lösung:	40% (w/v) PEG 6000
	100 mM LiOAc
	1 x TE

3.1.8 Kreuzung von Saccharomyces cerevisiae-Zellen

Flüssigkulturen eines MAT**a** und eines MATα-Stammes wurden mit Hilfe einer Impföse auf einer YPEG-Platte ausgestrichen und vermischt. Nach einem Tag Inkubation bei 30 °C bzw. 25 °C wurden die gewachsenen Hefen zur Isolation der diploiden Zellen auf eine Agarplatte mit Selektionsmedium überstempelt. Die diploiden Zellen, welche die gewünschten Marker beider Parentalstämme enthielten, konnten nach einem weiteren Tag Inkubation als Kolonien identifiziert werden.

3.1.9 Sporulation von Saccharomyces cerevisiae-Zellen

Zur Sporulation von diploiden Hefezellen wurden 5 ml einer Übernacht-Kultur abzentrifugiert (2000 rpm, 25 °C, 5 Minuten), das Zellpellet in 5 ml YPEGal-Medium aufgenommen und die Flüssigkultur für 3 Stunden bei 30 °C bzw. 25 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die pelletierten Zellen im restlichen Medium resuspendiert. Die so erhaltene konzentrierte Zellsuspension wurde auf eine KOAc-Agarplatte (= SD-Agarplatte mit 10 g/l KOAc) getropft. Nach Inkubation für 3 bis 5 Tage bei 30 °C bzw. 25 °C konnte die Ausbildung der Asci mit Hilfe eines Lichtmikroskopes kontrolliert werden.

3.1.10 Analyse von Hefetetraden

Sporulierte Zellen (siehe Abschnitt 3.1.9) wurden mit Hilfe einer Impföse von einer KOAc-Platte in eine β -Glucuronidase/Arylsulfatase-Lösung (0,1 U/ml in ddH₂O) gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, was einen partiellen Abbau der Asciwände bewirkte. Nach dieser Behandlung wurde die Zellsuspension auf den Rand einer YEPG-Agarplatte aufgebracht und die Sporen einer Tetrade mit Hilfe der Glasspitze eines Mikromanipulators separiert. Zum Auskeimen der isolierten Sporen wurden die YPEG-Agarplatten für 2 bis 4 Tage bei 30 °C bzw. 25 °C inkubiert. Die daraus resultierenden Kolonien wurden anschließend auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausgestrichen, um die Segregation der jeweiligen Marker bei der meiotischen Teilung zu kontrollieren.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration mittels

Absorptionsspektroskopie

Um die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung zu bestimmen, wurde deren Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) im Photometer gemessen. Dabei gilt folgende Beziehung:

c [
$$\mu$$
g / ml] = A₂₆₀ x V x k
c [μ mol / ml] = $\frac{A_{260} x V x k}{M_w x L}$

	dsDNA	ssDNA	Oligonukleotide:
c [µmol / ml]	A ₂₆₀ xV / 13,2	A ₂₆₀ xV / 10 x L	A260 xV /
	x L		(15xA + 7,1xC + 12xG +8,4xT)

dsDNA = doppelsträngige DNA, ssDNA = einzelsträngige DNA, c = Konzentration der Nukleinsäure-Lösung, V = Verdünnungsfaktor, k = Konstante (50 für dsDNA, 40 für RNA, 37 für ssDNA, 20 für einzelsträngige Oligonukleotide), L = Länge der Nukleinsäure in kb, M_W = Molekulargewicht je Base (330 g / mol) bzw. pro Basenpaar (660 g / mol). Aromatische Aminosäuren absorbieren stark im Bereich von 280 nm. Aus dem Verhältnis A_{260nm} / A_{280nm} kann deshalb eine Aussage über die Proteinkontamination einer DNA-Lösung getroffen werden. Nach Sambrook et al. (1989) weisen proteinfreie Lösungen einen Quotienten von 1,8 bis 2 auf. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden sämtliche Messungen in Anwesenheit von 1 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 8,5) durchgeführt.

3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Echerichia coli

Zur Isolierung analytischer Mengen bakterieller Plasmid-DNA diente die Methode der "Alkalischen Lyse" nach Birnboim und Doly (1979). Das Pellet von 2 ml Bakterienkultur wurde in 250 μ l Lösung 1 resuspendiert, mit 250 μ l Lösung 2 vermischt und für 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 250 μ l Lösung 3 zugegeben, der gesamte Ansatz gemischt und dann zentrifugiert (10000 *g*, 4 °C, 10 Minuten). Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 1ml Isoproponal vermischt und die DNA sofort danach durch Zentrifugation (10000 *g*, 4 °C, 20 Minuten) gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet, in 50 bis 100 μ l ddH₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Zur Aufreinigung größerer Mengen bakterieller Plasmid-DNA wurden Anionenaustauschersäulen sowie Lösungen der Firma Genomed (JETSTAR) verwendet. Die Isolierung wurde gemäß dem beigefügten Protokoll durchgeführt, die Ausbeute lag zwischen 50 und 500 μ g DNA pro 100 ml Bakterienkultur.

Lösung 1:	50 mM Glukose
	25 mM TrisHCl
	10 mM EDTA
	600 µg / ml RNAse
Lösung 2:	200 mM NaOH
	1% (w/v) SDS
Lösung 3:	3 M KOAc (pH 5,2)

3.2.3 Präparation chromosomaler DNA aus Saccharomyces cerevisiae

Zur Gewinnung chromosomaler DNA aus Hefe wurden 50 ml einer gesättigten (OD₆₀₀ 10) Flüssigkultur zentrifugiert (4000 g, 25 °C, 5 Minuten), das resultierende Zellpellet zweimal mit 1 M Sorbitol gewaschen und in 14 ml Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Zymolyase-haltiger Lösung 2 erfolgte eine eine Stunde Inkubation bei 37 °C, wobei die Spheroplastierung (Abrundung der Zellen) mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert wurde. Anschließend wurden die Spheroplasten pelletiert (5000 g, 25 °C, 10 Minuten), in 5 ml Puffer 3 resuspendiert und zum Zellaufschluss für 30 Minuten auf 65 °C erhitzt. Die Fällung der Proteine als unlöslicher Kalium-SDS-Komplex erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml 5 M KOAc und eine Stunde Inkubation auf Eis. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10000 g, 15 Minuten, 4 °C) sedimentiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltene DNA durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation (10000 g, 4 °C, 30 Minuten) wurde die DNA in 3 ml TE-Puffer aufgenommen, durch Zugabe von 150 µl RNAse-Lösung (1 mg/ml) sowie 30 Minuten Inkubation bei 37 °C von RNA-Kontamination befreit, erneut gefällt (1 Volumen Isopropanol + 30 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 10000 g) und schließlich in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung der so gewonnenen DNA erfolgte bei -20 °C.

Lösung 1:	12,5 ml 1 M Sorbitol
	+ 1,5 ml 500 mM EDTA (pH 8)
Lösung 2:	15 mg/ml Zymolyase
	10 mM TrisHCl (pH 8,0)
	1 mM EDTA
Lösung 3:	50 mM Tris/HCl
	20 mM EDTA (pH 8)
	1% SDS
TE-Puffer:	10 mM TrisHCl (pH 8,0)
	1 mM EDTA

3.2.4 Enzymatische Modifikation von DNA

3.2.4.1 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet, um DNA-Fragmente für Klonierungsansätze herzustellen oder plasmidäre DNA anhand ihres Musters spezifischer Abbauprodukte zu analysieren. Die Endonukleasen wurden nach den jeweiligen Angaben des Herstellers in den entsprechenden Pufferlösungen bei der optimalen Temperatur eingesetzt. Die Zahl der verwendeten Enzymunits pro µg DNA richtete sich dabei nach der Anzahl vorhandener Restriktionsschnittstellen, die Glycerin-Konzentration im Ansatz lag aber stets unterhalb 5%.

3.2.4.2 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Für die Dephosphorylierung der endständigen 5'-Phosphatgruppe wurden 5 μ g linearisierte DNA mit einer Unit Alkalische Phosphatase (Boehringer Mannheim) im firmeneigenen Puffersystem 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend über eine präparative Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.7) aufgereinigt.

3.2.4.3 Glättung von 3´-überhängenden DNA-Enden durch die T4-DNA-Polymerase

Die T4-DNA-Polymerase weist neben ihrer 5´ \rightarrow 3´-Polymerase-Aktivität auch eine 3´ \rightarrow 5´-Exonuklease-Aktivität auf. Zur Entfernung von 3´-überhängenden DNA-Enden wurde 1 µg DNA mit 0,05 Units T4-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) im firmeneigenen Puffersystem inklusive 250 µM dNTPs (Endkonzentration) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Am Ende jeder T4-DNA-Polymerase-Behandlung wurde das Enzym durch 10 Minuten Inkubation bei 75 °C inaktiviert und die behandelte DNA über ein präparatives Agarosegel (siehe Abschnitt 3.2.7) aufgereinigt.

3.2.4.4 Auffüllen von 5´-überhängenden DNA-Enden durch das Klenow-Fragment

1 bis 5 µg linearisierte DNA wurde in 40 µl ddH₂O, 5 µl 10 x Klenow-Puffer sowie 5 µl 10 x NTP-Lösung aufgenommen, mit 5 Units Klenow-Enzym (Boehringer Mannheim) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch 10 Minuten Inkubation bei 75 °C inaktiviert.

```
10 x Klenow-Puffer: 0,5 M TrisHCl (pH 7,2)
0,1 M MgCl<sub>2</sub>
1 mM DTT
10 x dNTP-Lösung: 2,5 mM dATP
2,5 mM dCTP
2,5 mM dGTP
2,5 mM dTTP
```

3.2.4.5 Ligation von DNA

Der Ligationsansatz enthielt bei einem Gesamtvolumen von 20 μ l 50 bis 100 ng linearisiserte Vektor-DNA, einen 5 bis 10-fachen molaren Überschuß des zu integrierenden DNA-Fragmentes, 2 μ l des vom Hersteller mitgelieferten 10 x Ligase-Puffers sowie eine Unit T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim). Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 25 °C (Ligation von DNA-Strängen mit komplementären überhängenden Enden) bzw. für 20 Stunden bei 15 °C (Ligation glatter DNA-Enden). 1 bis 2 μ l des Ansatzes konnten anschließend direkt zur Transformation von kompetenten *E.coli*-Kulturen (siehe dazu Abschnitt 3.14 und 3.1.5) verwendet werden.

3.2.5 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in dieser Arbeit zur Amplifikation bestimmter Gene aus chromosomaler Hefe-DNA, zur Durchführung gerichteter Mutagenesen (Eliminierung oder Einführung spezifischer Restriktions-schnittstellen) sowie zur Verifizierung ortsgerichteter Integrationen ins Hefe-Genom verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgten nach den Versuchsprotokollen im Buch "PCR" von Gassen, Sachse & Schulte (Gustav Fischer Verlag 1994) bzw. nach dem Protokoll von Saiki et al (1988), wobei einzelne oder mehrere Reaktionsbedingungen jedoch den spezifischen Anforderungen der individuellen Amplifikation angepaßt wurden. Als DNA-Matrize diente entweder Plasmid-DNA (20 bis 100 ng pro Reaktionssansatz) oder chromosomale Hefe-DNA (1 bis 5 µg). Wenn im Text nicht anders vermerkt, fand eine Mixtur aus fünf Teilen Perkin-Elmer *Taq*-Polymerase (Enzym mit hoher Prozessivität) und einem Teil Deep-Vent-DNA-Polymerase (mit Proofreading-Funktion; New England Biolabs) Verwendung. Als 10 x Puffer diente 100 mM TrisHCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂. Die Annealingtemperatur (46 – 54 °C) richtete sich nach Art der verwendeten Oligonukleotide, während die Zeitdauer der Elongationsreaktion (zumeist 1 – 2 Minuten) von der Länge des gewünschten PCR-Produktes abhing. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte schließlich über Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.7).

Reaktionsansatz einer Standard-PCR:

- 1 mg genomische DNA oder 100 ng Plasmid-DNA (DNA-Matrize)
- 100 pmol Oligonukleotid 1
- 100 pmol Oligonukleotid 2
- 10 ml 10 x PCR-Puffer
- 10 ml dNTP-Mixtur (jeweils 2,5 mM)
- 0,8 Units Perkin-Elmer Taq-Polymerase
- 0,2 Units Deep-Vent-Polymerase

Programm einer Standard-PCR:

- 1. 1 Zyklus: 3 Minuten 94 °C, 30 Sekunden 46 54 °C, 1 2 Minuten 72 °C
- 2. 30 Zyklen: 1 Minute 94 °C, 30 Sekunden 46 54 °C, 1 2 Minuten 72 °C
- 3. 1 Zyklus: 1 Minute 94 °C, 30 Sekunden 46 54 °C, 10 Minuten 72 °C
- 4. 1 Zyklus: ∞ 4 °C

3.2.6 Gerichtete DNA-Mutagenese

Zur gezielten Einführung von Punktmutationen diente das Verfahren der sogenannten "SOE"-PCR ("Splicing by overlap extension") nach Ho et al. (1989).



Diese Methode (siehe dazu Abbildung 3.1) basiert auf zwei getrennt durchgeführten PCR-Reaktionen mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren (I und II bzw. III und IV), welche aufgrund ihrer Bindung an diesselbe Matrize zwei Fragmente mit überlappenden, die Mutation tragende Enden liefern. Nach einer Aufreinigung über präparative Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.7 sowie 3.2.8) werden die primären PCR-Fragmente denaturiert und durch Hybridisierung rekombiniert, so daß u.a. ein produktiver Doppelstrang entsteht, welcher als Matrize in einer zweiten PCR-Reaktion aufgefüllt und amplifiziert werden kann. Der nichtproduktive Doppelstrang kann dagegen nicht als Matrize dienen und erfährt daher auch keine Vermehrung.

3.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zum Gießen von Agarose-Flachbettgelen (108 x 142 mm) wurde 0,5% bis 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (Tris-Actetat-EDTA-Puffer) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, auf circa 50 °C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (0,1 μ g / ml Endkonzentration) versetzt und schließlich in eine vorbereitete Gelkammer inklusive Probenkamm gegossen. Die jeweils verwendete Agarosekonzentration richtete sich dabei nach der Länge der aufzutrennenden DNA. Für präparative Zwecke wurde zudem "Low Melting Point"-Agarose benutzt, welche im Gegensatz zur normalen Agarose bereits bei <50 °C schmilzt.

Fragmentlänge:	Agarosekonzentration	Bromphenol	Xylencyanol
	(w/v):	komigriert mit:	komigriert mit:
1 bis 30 kb	0,5%	1000 bp	10 kb
0,8 bis 12 kb	0,7%	700 bp	6 kb
0,5 bis 7 kb	1,0%	300 bp	3 kb
0,4 bis 6 kb	1,2%	200 bp	1,5 kb
0,2 bis 3 kb	1,5%	120 bp	1 kb
0,1 bis 2 kb	2%	< 100 bp	0,8 kb

TAE-Puffer:	40 mM TrisHCl (pH 7,2)
	20 mM NaOAc
	1 mM EDTA (pH 8)
Probenpuffer:	30% Glycerin
	50 mM EDTA (pH 8)
	0,25% (w/v) Bromphenolblau
	0,25% (w/v) Xylencyanol

Das erstarrte Gel wurde in einer Elektrophoresenkammer mit TAE-Puffer überschichtet, die DNA-Proben mit 1/5-Volumen Probenpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Als Größenmarker diente 1 μ g *BstEII*-geschnittene λ -Phagen-DNA. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 5 bis 10 V/cm durchgeführt. Die anschließende Analyse des DNA-Bandenmusters erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators bei 302 nm (analytisch) bzw. 366 nm (präparativ).

3.2.8 Aufreinigung von DNA aus präparativen Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen ("Low Melting Point"-Agarose) fand das "QIAquick"-System der Firma Qiagen Verwendung. Dieses System nutzt kleine zentrifugierbare Säulen mit DNA-bindendem Silica-Material, wobei das Gel zunächst bei 50 °C unter Verwendung stark chaotroper Salze verflüssigt und die resultierende Lösung dann auf eine Silica-Säule gegeben wird. Alle Präparationen wurden gemäß des beigefügten Protokolls mit den firmeneigenen Puffern durchgeführt.

3.2.9 DNA-Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von Herrn Hans-Peter Geithe mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers der Firma Stretch in der Abteilung für Molekulare Genetik durchgeführt.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung

Zur Messung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde der Test nach Bradford (1976) verwendet, welcher auf den Absorptionseigenschaften des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 basiert. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes verschiebt sich durch die Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist daher ein Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung. Sämtliche Messungen wurden mit einer Farblösung der Firme BioRad (Richmond, USA) gemäß der beigefügten Anleitung durchgeführt. Zur Aufnahme einer Eichkurve wurden definierte Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt und parallel zu den eigentlichen Probenlösungen gemessen.

3.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinextrakten

Um Proteinextrakte aufzutrennen, wurden diskontinuierliche SDS-Gelelektrophoresesysteme nach Lämmli (1970) verwendet. Ein Sammelgel (5% Acrylamid) überschichtet dabei ein Trenngel (8 bis maximal 15% Acrylamid). Die benutzte Acrylamidkonzentration des Trenngels richtete sich dabei nach der Größe der jeweils zu trennenden Proteine (10 bis 60 kDa: 15%, 30 bis 120 kDa: 10%, 50 bis 200 kDa: 8%). Das SDS-Gel wurde zwischen vertikalen Glasplatten (8 x 10 cm) zunächst mit dem Trenngel und anschließend mit dem Sammelgel gegossen. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Probenkamm entfernt und die Platten mit dem Gel in einer Elektrophorese-Kammer fixiert. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit einem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese selbst erfolgte im Elektrophorese-Puffer bei konstanter Stromstärke von 20 oder 30 mA. Als Größenstandard diente der "Benchmark Prestained Protein Ladder" der Firma Gibco BRL.

Elektrophorese-Puffer	0,19 M Glycin
	25 mM TrisHCl
	0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer:	100 mM TrisHCl (pH 8)
	2% (w/v) β -Mercaptoethanol
	20% (w/v) Glycerin
	0,002% (w/v) Bromphenolblau
Acrylamid-Stammlösung:	29,2% Acrylamid
	0,8% Bisacrylamid
5% Sammelgel (je 10 ml):	1,7 ml Acrylamid-Stammlösung
	2,5 ml 500 mM TrisHCl (pH 6,8)
	100 μl 10% SDS-Lösung
	100 μl 10% APS-Lösung
	10 μl TEMED
	ad 10 ml mit dH2O
8 – 15% Trenngel	
(je 10 ml):	2,7 bis 5 ml Acrylamid-Stammlösung
	2,5 ml 1,5 M TrisHCl (pH 8,8)
	100 μl 10% SDS-Lösung
	100 μl 10% APS-Lösung
	10 μl TEMED
	ad 10 ml mit dH2O

3.3.3 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie brilliant blue

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese (siehe Abschnitt 3.3.2) von den Glasplatten abgelöst, 30 Minuten bei 37 °C in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und dann für 2 bis 3 Stunden in 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend konnte es unter Vakuum bei 60 °C getrocknet werden. Die vom jeweiligen Protein abhängige Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung lag bei circa 400 ng pro Bande.

Coomassie-Färbelösung:	0,1% (w/v) Serva Blau R250
	50% Methanol
	10% (w/v) Essigsäure

3.3.4 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Filtern (Blotten)

Der Blott-Prozeß diente dazu, die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran zu übertragen und ist bei Towbin (1979) beschrieben. Auf ein in Transfer-Puffer getränktes Filterpapier (Whatman) wurde zunächst die mit Transfer-Puffer angefeuchtete Nitrozellulose-Membran ("Protran^R" BA 85; Schleicher & Schüll) gelegt. Auf die Membran folgte dann luftblasenfrei das Gel und schließlich noch eine weitere Lage Filterpapier. Die ganze Anordnung wurde in eine Blotkammer (Naßzelle mit Platin/Edelstahl-Elektroden) von BioRad transferiert und die Elektrophorese bei konstanter Spannung (50 V) für 2 Stunden durchgeführt.

Transfer-Puffer:

20 mM TrisHCl (pH 8,3) 150 mM Glycin 20% Methanol

3.3.5 Ponceau S-Färbung von Nitrozellulose-Filtern

Die Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Blot-Prozeß (siehe Abschnitt 3.3.4) einmal mit dH_2O gewaschen, 30 Sekunden in Ponceau S-Lösung (20 mM Ponceau S, 15% (w/v) Essigsäure, 40% Methanol) geschwenkt und schließlich solange mit dH_2O wieder

entfärbt, bis die Proteinbanden klar sichtbar wurden. Von der gefärbten Membran wurde zur Dokumentation und Quantifizierung eine Auflichtaufnahme am Lumi-Imager™ (Boehringer Mannheim) gemacht.

3.3.6 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine auf Nitrozellulose-Filtern

Um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Blot-Prozeß (siehe Abschnitt 3.3.4) zunächst für 15 Minuten in PBSM-Puffer geschwenkt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung je nach Antiserum) erfolgte für eine Stunde in PBSM-Puffer, anschließend wurde die Membran dreimal in PBS-Puffer für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper dauerte 30 Minuten, danach folgten sieben Waschschritte mit PBS-Puffer für jeweils 5 Minuten. Schließlich wurde die Membran kurz mit dH₂O gewaschen und mit frischer ELC-Lösung ("<u>E</u>nhanced <u>L</u>uminol <u>C</u>hemiluminescence Substrate"; NEN Life Science Products; Belgien) benetzt.

PBS-Puffer:	137 mM NaCl
	3 mM KCl
	6 mM Na ₂ HPO ₄
	1 mM NaH ₂ PO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBSM-Puffer:	137 mM NaCl
	3 mM KCl
	6 mM Na ₂ HPO ₄
	1 mM NaH ₂ PO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	3% (w/v) Magermilchpulver

Alle oben beschriebenen Inkubationen und Waschschritte fanden bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln statt. Die Auswertung der Chemoluminiszenz erfolgte am Lumi-Imager™ der Firma Boehringer Mannheim.

3.3.7 Herstellung eines Proteinextraktes aus Escherichia coli-Zellen

2 ml einer *E.coli*-Flüssigkultur wurden durch 2 Minuten Zentrifugation (14000 rpm) bei Raumtemperatur geerntet und in 100 μ l Puffer (50 mM Na₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8) aufgenommen. Der Aufschluß der Bakterienzellen erfolgte durch Ultraschall ("Branson Sonifier^R B15": 3 x 15 Sekunden Puls auf Stufe 5). Die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 2 Minuten), der Überstand mit einem Volumen SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 3.3.2) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert.

3.3.8 Denaturierende Protein-Extraktion aus Saccharomyces cerevisiae-Zellen

3.3.8.1 Zellaufschluß durch Aufkochen mit SDS-Probenpuffer

Diese Methode (Horvath und Riezman, 1994) diente dazu, Proteinextrakte aus in Vollmedium gewachsenen Hefen für die SDS-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.3.2) zeitsparend herzustellen. 2 ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden abzentrifugiert (8000 rpm, 1 Minute, 25 °C), mit dH₂O gewaschen und dann in 100 μ l SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 3.3.2) aufgenommen. Nach 10 Minuten Inkubation bei 95 °C folgten 3 Minuten auf Eis. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 10 Minuten) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

3.3.8.2 Zellaufschluß durch alkalische Lyse

Die Alkalische Lyse stellte eine Alternative zum Aufkochen mit SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 3.3.8.1) dar und fand bei Minimalmedium-Kulturen bzw. bei Hefen in der stationären Phase Verwendung, deren Aufschluß mit SDS-Probenpuffer unbefriedigend ist. 2 ml einer Hefekultur wurden abzentrifugiert (8000 rpm, 1 Minute, 25 °C), einmal mit TE-Puffer gewaschen, in 600 μ l Lysepuffer (2 M NaOH, 5% β -Mercaptoethanol) aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 70 μ l Trichloressigsäure (Endkonzentration circa 10%) zugegeben, die Proben erneut 10 Minuten auf Eis gestellt und zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 10 Minuten). Das resultierende Proteinpellet wurde einmal mit 1M TrisHCl (pH 8) gewaschen und dann in 100 μ l SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 3.3.2) gelöst.

3.3.9 Nativer Zellaufschluß mit flüssigem N2 im Mörser

Um Hefezellen aus mehreren Litern Kulturmedien unter nicht denaturierenden Bedingungen aufzuschließen, wurden diese zunächst abzentrifugiert (5500 rpm, 25 °C, 10 Minuten) und dann zweimal mit dH₂O sowie einmal mit B88-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Hefen in B88-Puffer aufgenommen und in einen Mörser mit flüssigen Stickstoff getropft. Die Zellen wurden dann im Mörser unter ständigem Zufuhr von flüssigem Stickstoff sorgfältig zermahlen. Das Lysat wurde anschließend in einem Eisbad auf 0 °C erwärmt und dann durch Zentrifugation (2000 rpm und 4 °C für 5 Minuten) von Zelltrümmern sowie noch intakten Hefezellen befreit.

> B88-Puffer: 20 mM HEPES (pH 6,8) 250 mM Sorbitol 150 mM KOAc 5 mM Mg(OAc)₂ 1 mM DTT

3.3.10 Expression und Aufreinigung des Proteins β -1,3-Glucanase

Die Induktion von pUV5-G1S-rekombinanten DH5 α -Stämmen zur Expression der plasmidkodierten β -1-3-Glycanase wurde durch Zugabe von 1 ml 1 M IPTG (1 mM Endkonzentration) zu einem Liter einer logarithmisch wachsenden Kultur (OD₆₀₀ = 0,7) erreicht. Die Induktion wurde für 3 bis 4 Stunden bei 37 °C durchgeführt und die Zellen danach pelletiert (5500 rpm, 25 °C, 20 Minuten).

Die Aufreinigung der β -1,3-Glycanase orientierte sich nach der Vorschrift von Slilaty (1991) und beinhaltete eine Osmolyse. Das Bakterienpellet wurde dafür zunächst in 27,5 ml Puffer A aufgenommen, zentrifugiert (8000 rpm, 4 °C, 10 Minuten) und dann in 27,5 ml eiskaltem Puffer B resuspendiert. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 0 °C unter leichtem Rühren wurden die Zellen erneut zentrifugiert (8000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) und dann in 40 ml Puffer C aufgenommen. Es folgten 30 Minuten Osmolyse bei 0 °C unter leichtem Rühren sowie eine weitere Zentrifugation (12000 rpm, 4 °C, 20 Minuten). Das Lysat wurde für 20 Stunden bei 4 °C in Puffer D dialysiert (Dialyseschläuche der Firma Medicell; London) und anschließend zentrifugiert (10000 *g*, 10 Minuten, 4 °C). Die

β-1,3-Glycanase wurde dann über einen Kationenaustauscher-Filter der Firma Sartorius ("Sartobind™ Membrane Absorber" S100) aufkonzentriert.

Puffer A:	10 mM TrisHCl (pH 7)
	30 mM NaCl
Puffer B:	10 mM TrisHCl (pH 7)
	20% Sukrose
	0,1 mM EDTA
Puffer C:	0,1 mM MgCl2 in ddH2O
Puffer D:	10 mM NaOAc (pH 5)

Ein μ l einer β -1,3-Glycanase-Stocklösung (in 25% Glycerin; Lagerung bei -20 °C) enthielt schließlich genügend Enzymaktivität, um 5 x 10⁷ Hefezellen zu spheroplastieren.

3.3.11 Zellfraktionierungen

3.3.11.1 Präparation von Zytosol aus Saccharomyces cerevisiae-Zellen

Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll von Spang und Schekman (1998). Zwei Liter einer Hefekultur wurden in YPEG-Medium bei 30 °C bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 2 angezüchtet und dann geerntet (5000 rpm, 25 °C, 10 Minuten). Der Zellaufschluß erfolgte mittels flüssigem Stickstoff im Mörser, wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben. Nach der Entfernung sämtlicher Zelltrümmer wurde das Hefelysat zunächst bei 2 x 10⁴ g (15 Minuten, 4 °C) und der resultierende Überstand dann bei 10⁵ g (1 Stunde, 4 °C) zentrifugiert, um ER- sowie Golgi-Membranen vom Zytosol abzutrennen. Bei der Überführung des 10⁵ g – Überstandes (des Zytosols) wurde das Pellet sowie die obere Lipidschicht sorgfältig vermieden. Die Lagerung des mit flüssigem N₂ schockgefrorenen Zytosols erfolgte bei -80 °C.

3.3.11.2 Präparation von Membranen des ER aus Saccharomyces cerevisiae

Die Methode der Präparation von ER-haltigen Membranen basierte auf der Vorschrift von Wuestehube und Schekman (1992). Hierfür wurden vier Liter einer Hefekultur (YPEG-Medium) bei 30 °C bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 2 angezüchtet und dann mittels Zentrifugation geerntet (5500 rpm, 25 °C, 10 Minuten). Das resultierende Pellet wurde in 100 ml Puffer 1 resuspendiert und für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in 100 ml Zymolyase-haltigen Puffer 2 aufgenommen und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, die Bildung von Spheroblasten konnte dabei mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert werden. Anschließend wurden die Hefen abzentrifugiert (3500 rpm, 25 °C, 10 Minuten), zweimal mit Puffer 3 gewaschen und schließlich in 5 ml Puffer 3 aufgenommen. Die Lyse der Hefezellen erfolgte durch Zugabe von 100 ml eiskaltem Puffer 4, sorgfältige Homogenisierung sowie 10 Minuten Inkubation bei 0 °C. Eine Zentrifugation (2000 rpm, 4 °C, 5 Minuten) trennte schließlich Zelltrümmer sowie noch intakte Zellen vom Lysat ab. Zur weiteren Aufreinigung wurde das Hefelysat zunächst 10 Minuten bei 4 °C und 27000 g zentrifugiert und das resultierende Pellet in 2 ml Puffer 4 resuspendiert. Jeweils 0,5 ml dieser Suspension wurden dann vorsichtig auf ein Sukrosekissen (1 ml 1,5 M Sukrose + 1 ml 1,2 M Sukrose in Puffer 4) gegeben und erneut zentrifugiert (10⁵ g, 4 °C, 1 Stunde), wobei sich die ER-Membranen in der Interphase anlagerten. Die isolierten Membranen wurden zweimal mit B88-Puffer gewaschen und dann in B88-Puffer (1 ml B88-Puffer pro 5 mg Gesamtprotein) aufgenommen. Die Lagerung der mit flüssigem N2 schockgefrorenen ER-Membranen erfolgte bei -80 °C.

Puffer 1:	100 mM TrisHCl (pH 9,4) 10 mM DTT
Puffer 2:	10 mM TrisHCl (pH 7,4) 700 mM Sorbitol 1,5% (w/v) Pepton 140 0,75% Hefeextrakt 0,5% Glukose 3,2 ml β-1,3-Glycanase-Stocklösung (siehe Abschnitt 3.3.9) oder 400 μl Zymolyase-Lösung (20 mg / ml) pro 100 ml Puffer

Puffer 3:	20 mM HEPES (pH 7,4)
	700 mM Sorbitol
	50 mM KOAc
Puffer 4:	100 mM Sorbitol
	20 mM HEPES (pH 7,4)
	50 mM KOAc

3.3.11.3 Präparation von Golgi-Membranen aus Saccharomyces cerevisiae

Vier Liter einer Hefekultur in YPEG-Medium wurden bei 30 °C bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 2 angezüchtet und dann mittels Zentrifugation geerntet (5500 rpm, 25 °C, 10 Minuten). Aus den pelletierten Zellen erfolgte dann wie in Abschnitt 3.3.10.2 beschrieben die Herstellung eines Lysates. Die bei der Golgi-Präparation zur Osmolyse verwendete Pufferlösung (Puffer 5) enthielt jedoch im Gegensatz zu Puffer 4 von Abschnitt 3.3.10.2 zusätzlich 1 mg/l RNAse.

Puffer 5:	100 mM Sorbitol
	20 mM HEPES (pH 7,4)
	50 mM KOAc
	10 mg RNAse / 100 ml Puffer

Zur weiteren Aufreinigung wurde das Hefelysat zunächst 10 Minuten bei 4 °C und 10000 *g* zentrifugiert (Abtrennung der ER-Membranen) und der resultierende Überstand einer weiteren Ultrazentrifugation unterzogen (10^5 g, 70 Minuten, 4 °C). Das Pellet mit den Golgi-haltigen Membranen wurden zweimal mit B88-Puffer gewaschen und schließlich in B88-Puffer (1 ml B88-Puffer pro 5 mg Gesamtprotein) aufgenommen. Die Lagerung der mit flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Golgi-Membranen erfolgte bei -80 °C.

3.3.11.4 Sukrosegradienten

Eine Hefekultur wurde bei 30 °C bzw. 25 °C in YPEG-Medium bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 1 angezüchtet und dann geerntet (5500 rpm, 25 °C, 10 Minuten). Der Zellaufschluß erfolgte wie in Abschnitt 3.3.8.3 beschrieben mit Hilfe eines Mörsers unter flüssigem Stickstoff, wobei jedoch der B88 – Puffer zusätzlich Proteaseinhibitoren der Firma Boehringer ("CompleteTM Mini, EDTA-free"; 1 Tablette pro 10 ml Puffer) enthielt. Jeweils 1,5 ml Hefelysat wurde auf einen vorbereiteten 11-stufigen Sukrosegradienten (60% bis 18% Sukrose in 500 mM HEPES (pH 7), 100 mM MgCl₂) aufgetragen, welcher 2,5 Stunden bei 10⁵ g und 4 °C zentrifugiert wurde (Schröder et al., 1995). Nach der Zentrifugation wurden 1 ml-Fraktionen abgenommen, mit einem Volumen Harnstoff-Probenpuffer vermengt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert.

Harnstoff-Probenpuffer:	7 M Harnstoff
	1% (w/v) SDS
	100 mM TrisHCl (pH 8)
	2% (w/v) β-Mercaptoethanol
	20% (w/v) Glycerin
	0,002% (w/v) Bromphenolblau

3.3.12 In vitro Vesikeltransport-Experimente

3.3.12.1 Versuche zur Bildung von COPI-Vesikeln ("Vesicle budding assay")

Die Versuche erfolgten gemäß der Vorschrift von Spang und Schekman (1998). Ein Standard-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

- 20 μl aufgereinigte Golgi-Membranen aus Hefestamm RH448 (5 μg Gesamtprotein / $\mu l)$
- 25 μ l Zytosol aus Hefestamm RH2825 (10 μ g Gesamtprotein / μ l)
- 25 μ l eines 10 x ATP-Regenerationssystems (nach Wuestehube und Schekmann, 1992): 10 mM ATP, 5 mM GTP, 50 mM Kreatinphosphat, 100 U / ml Kreatinphosphat-Kinase
- 25 μl 10 mM GTPγS
- ad 250 µl mit B88 Puffer

Alle Komponenten wurden bei 0 °C zusammenpipettiert, wobei die Golgi-Membranen (siehe Abschnitt 3.3.10.3) und das Zytosol (siehe Abschnitt 3.3.10.1) zuvor auf diese Temperatur erwärmt wurden. Der gesamte Ansatz wurde dann für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert, um die Bildung von COPI-Vesikeln zu ermöglichen. Parallel durchgeführte Kontrollversuche fehlte entweder eine Komponente, oder ihre Inkubation erfolgte bei 0 °C. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden 50 μ l 3 M KCl zugegeben und die Versuchsansätze auf einen Ficoll-Sukrosegradienten aufgetragen. Dieser bestand aus 0,32 ml 60% Sukrose (in 20 mM HEPES (pH 6,8), 5 mM Mg(OAc)₂), 0,64 ml 7,5% Ficoll, 0,8 ml 5% Ficoll, 0,8 ml 4% Ficoll, 0,8 ml 3% Ficoll und 0,64 ml 2% Ficoll (alle in 15% Sukrose, 20 mM HEPES (pH 6,8), 5 mM Mg(OAc)₂). Nach der Zentrifugation des Gradienten (2 Stunden bei 37000 rpm und 4 °C) wurden 0,4 ml Fraktionen abgenommen, diese mit einem Volumen Harnstoff-Probenpuffer vermischt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert.

3.3.12.2 Nachweis des Vesikeltransportes mittels Protease-Aktivität

Die Versuche orientieren sich am Protokoll von Wuestehube und Schekmann (1992) für die *in vitro* Rekonstitution des anterograden Vesikeltransportes vom ER zum Golgi-Apparat. Ein Standard-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

- 20 μl aufgereinigte Golgi-Membranen aus Hefestamm SSY10225 (5 μg Gesamtprotein / $\mu l)$
- + 20 μl aufgereinigte ER-Membranen aus Hefestamm SSY10224 (5 μg Gesamtprotein / $\mu l)$
- 25 µl Zytosol aus Stamm SSY10137 (10 µg Gesamtprotein / µl)
- 25 μ l eines 10 x ATP-Regenerationssystems (nach Wuestehube und Schekmann, 1992): 10 mM ATP, 5 mM GTP, 50 mM Kreatinphosphat, 100 U / ml Kreatinphosphat-Kinase
- ad 250 µl mit B88-Puffer

Alle Komponenten wurden bei 0 °C zusammenpipettiert, wobei die Membranen (siehe Abschnitt 3.3.11.2 sowie 3.3.11.3) und das Zytosol (siehe Abschnitt 3.3.11.1) zuvor auf diese Temperatur erwärmt wurden. Der gesamte Ansatz wurde dann für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert, um den Vesikeltransport zu ermöglichen. Parallel durchgeführte Kontrollversuche fehlte entweder eine Komponente, wurde 1 mM GTP γ S (End-konzentration) zugegeben oder wurden bei 0 °C inkubiert. Nach Ablauf der 30 Minuten

wurde die Reaktion durch Zugabe von einem Volumen SDS-Probenpuffer sowie 5 Minuten Inkubation bei 95 °C gestoppt.

3.3.12.3 Sedimentationsanalyse

Auch diese Versuche orientieren sich am Protokoll von Wuestehube und Schekmann (1992). Ihr Ablauf ist mit den *In vitro*-Experimenten von Abschnitt 3.3.12.2 bis zum Ende der Inkubation bei 30 °C identisch, allerdings fanden hierbei auch ER- und Golgi-Membranen aus Wildtyp-Hefezellen (Stamm RH448) Verwendung. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Ansätze zentrifugiert (5000 *g*, 4 °C, 4 Minuten), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und das resultierende Pellet in 250 μ l B88-Puffer (0 °C) aufgenommen. Beide Fraktionen wurden anschließend mit einem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert.

3.3.13 "Pulse Chase" Experimente

Um die zeitabhängige spezifische Prozessierung des Markerproteins αEmp47p innerhalb einer Hefezelle des Stammes SSY10226 (produziert sowohl das CNE1-BAR1-Fusionsprotein, als auch das α-Faktor-Emp47p-Reportermolekül) zu verfolgen, wurden sogenannte "Pulse Chase" Experimente durchgeführt. Eine 50 ml Hefekultur wurde hierfür zunächst in Vollmedium (YPEG) bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezüchtet und dann geerntet. Die Zellen wurden zweifach mit SDE-Medium (Minimalmedium, welches nur die essentiellen Aminosäuren enthält) gewaschen, in 50 ml SDE-Medium aufgenommen und dann für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Hefen abzentrifugiert, in 600 µl des radioaktiven "Label-Mix" (570 µl SDE-Medium, 30 µl Trans³⁵S-Label) resuspendiert und für 2 Minuten bei 30 °C unter Schütteln inkubiert ("Pulse"). Nach Abschluß der zweiminütigen Inkubation wurde ein 100 µl-Aliqout aus dem "Pulse"-Ansatz entnommen, die Zellen kurz abzentrifugiert (10 Sekunden, 14000 rpm, 25 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren ("Null-Probe"). Zum restlichen "Pulse"-Ansatz (500 µl) wurde anschließend 3 ml "Chase-Mix" gegeben (30 µg / ml Methionen, 30 µg / ml Cystein, 3 mM (NH₄)SO₄ in YPEG-Medium) und die Hefen bei 30 °C unter Schütteln inkubiert ("Chase"). Zu jedem gewünschten Zeitpunkt wurden dann 700 µl entnommen, abzentrifugiert (10 Sekunden, 14000 rpm, 25 °C), das Zellpellet vom Überstand befreit und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Waren alle Proben gesammelt, wurden die Pellets in jeweils 200 µl Lysis-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen wurden die Hefen durch Scherkräfte (3 Minuten Verwendung des VortexTM-Gerätes bei 0 °C) aufgeschlossen, das entstandene Lysat für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und mit 1ml TNET-Lösung vermischt. Anschließend wurden die Glasperlen sedimentiert und das Lysat zur Entfernung von Zelltrümmern erneut zentrifugiert (10 Minuten, 14000 rpm, 25 °C). Der neue Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, mit polyklonalem Emp47p-Antikörper versetzt und für zwei Stunde bei Raumtemperatur (25 °C) auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde 50 µl 30% Protein A-Sepharose (Sigma) zugegeben und für weitere zwei Stunden unter identischen Bedingungen inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Sepharose-Perlen fünfmal mit 1 ml TNET sowie zweimal mit 1 ml 20 mM TrisHCl (pH 8,0) gewaschen und schließlich in SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 3.3.2) 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Die Auswertung der "Pulse Chase"-Experimente erfolgte mittels SDS-PAGE. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Überprüfung der Immunpräzipitation (Detektion der schweren IgG-Ketten) für 15 Minuten in Coomassie-Färbelösung (siehe Abschnitt 3.3.3) geschwenkt und für weitere 45 Minuten in 10% Essigsäure wieder entfärbt. Anschließend wurde das Gel unter Vakuum getrocknet und für 2 bis 5 Tage in einer PhosphoImager™-Kasette (Molecular Dynamics) gelagert. Die Auswertung erfolgte am PhosphoImagerTM.

SDE-Medium:	1,7 g / l Yeast Nitrogen Base
	5 g / l Ammoniumsulfat
	20 g / l Glukose
	5 ml / l 1 M NaOH
	20 mg / l Adeninsulfat
	20 mg / l Uracil
	20 mg / l L-Histidin-HCL
	30 mg / l L-Leucin
	20 mg / l Lysin-HCl
	20 mg / l L-Tryptophan

Trans ³⁵ S-Label:	Gemisch aus 35 S-Cystein und 35 S-
	Methionin, 3,7 x 10 ⁸ Bq/ml
Lysis-Puffer:	50 mM TrisHCl (pH 8,0)
	10 mM β-Mercaptoethanol
	150 mM NaCl
	10 mM NaF
	10 mM NaN ₃
	Proteaseinhibtoren ("Complete™
	Mini, EDTA-free"; Boehringer)
	1% Triton X-100
TNET-Puffer:	150 mM NaCl
	5 mM EDTA (pH 8,0)
	50 mM TrisHCL (pH 8,0)

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Immunfloureszenz

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen in Hefezellen fand indirekte Immunfloureszenz-Mikroskopie Verwendung. Hierfür wurden 10 ml einer logarithmisch wachsenden Hefeflüssigkultur (OD₆₀₀ = 1) geerntet (1000 *g*, 5 Minuten, 25 °C) und in 300 μ l Fixierlösung resuspendiert. Nach 3 Stunden Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen zunächst mit PBSS-Puffer gewaschen und dann in 1 ml PBSS resuspendiert. Um einen partiellen Abbau der Hefezellwand zu erreichen, wurde β -Mercaptoethanol (1,4 μ l pro ml Zellsuspension) sowie Zymolyase-Lösung (60 U pro ml Zellsuspension) zugegeben und für 1 Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Hefen abzentrifugiert (2000 rpm, 2 Minuten, 25 °C), zweifach mit PBSS-Puffer gewaschen und in 100 μ l PBSS aufgenommen.

PBS-Puffer:	137 mM NaCl
	3 mM KCl
	6 mM Na ₂ HPO ₄
	1 mM NaH ₂ PO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBSS-Puffer:	10% (w/v) Sorbitol in PBS
Fixierlösung:	3,5% Formaldehyd in PBSS
Blockierlösung:	1% Triton X-100
	1% BSA
	in PBSS-Puffer

Auf zuvor mit 0,1% Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma) beschichtete 10-Loch-Objektträger (ICN-Biochemicals) wurde nun 15 μ l der Hefesuspension vorsichtig aufgetragen. Der Überstand wurde 10 Minuten später vom Objektträger wieder entfernt und die mittlerweile sedimentierten und adhärierenden Hefen für weitere 10 Minuten mit 15 μ l Blockierlösung inkubiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C mit Antikörper-Lösung 1. Die Hefezellen auf dem Objektträger wurden anschließend fünfmal mit PBSS-Puffer gewaschen, für zwei Stunden mit Antikörper-Lösung 2 bei 30 °C inkubiert und dann siebenmal für jeweils 3 Minuten mit PBSS-Puffer gewaschen. Zur Färbung der zellulären DNA wurde 15 μ l DAPI-Lösung für 5 Minuten auf jedes Objektträgerloch gegeben. Nach einmaligen Waschen mit PBSS-Puffer wurde anschließend 2 μ l Einbettungsmedium auf die Zellen getropft und der Objektträger unter Vermeidung von Luftblasen mit einem Deckgläschen versiegelt. Die fertigen Präparate wurden mit Hilfe eines Zeiss Axiophot-Mikroskops betrachtet.

Antikörper-Lösung 1:	Primärer Antikörper in
	Blockierlösung
Antikörper-Lösung 2:	FITC-konjugiertes Anti-
	Kaninchen IgG in 10%
	Blockierlösung
DAPI-Lösung:	1 μg/ml 4,6-Diamino-2-
	Phenolindol (DAPI) in PBSS-
	Puffer
Einbettungsmedium:	10% p-Phenyldiamin
	in PBS-Puffer (pH 8,5 – 9)

3.4.2 GFP

Die Beobachtung der Lebendfärbung mit GFP-Fusionsproteinen erfolgte an einem Zeiss Axiophot-Mikroskop nach Chalfie et al. (1994). Die entsprechenden Hefestämme wurden dafür zunächst in SD-Medium ohne Methionin über Nacht bei 30 °C angezüchtet, durch Zentrifugation (1000g, 5 Minuten, 30 °C) geerntet, einmal mit ddH₂O gewaschen und schließlich auf ein 10-Loch-Objektträger (ICN-Biochemicals) aufgebracht.

3.4.3 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen inklusive Präparation der Hefezellen (u.a. Fixierung Kontrastierung) wurden von Dr. H. H. Trepte durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Rekonstitution des membranvermittelten Proteintransportes vom Golgi-Komplex zum Endoplasmatischen Retikulum *in vitro*

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines *In vitro* - Systems für den COPIabhängigen Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zum ER, auch als retrograder Vesikeltransport bezeichnet. Entweder modifiziert, oder in seiner Wildtypform diente das Hefeprotein Emp47p hierbei als molekularer Reporter. Wie in Abschnitt 5 der Einleitung bereits beschrieben, zirkuliert Emp47p in Folge eines C-terminalen di-Lysin-Signals (KTKLL) zwischen Golgi und ER, liegt im Fließgleichgewicht aber mehrheitlich im Golgi-Komplex, dem Startpunkt des retrograden Vesikeltransportes, vor (Schröder et al.,1995; 1998). Zu Beginn der Arbeit war Emp47p das einzig bekannte di-Lysin-Protein mit diesen speziellen intrazellulären Transporteigenschaften. Für das zu entwickelnde *In vitro*-System wurden zunächst zwei Nachweisstrategien verfolgt, welche Unterschiede in den Sedimentationseigenschaften von Zellorganellen (Abschnitt 4.1.1) bzw. im Glykosylierungsniveau von Oligosaccharid-Seitenketten (Abschnitt 4.1.2) als Mittel zur intrazellulären Lokalisation des Reporterproteins ausnutzten. In einer später konzipierten dritten Strategie diente schließlich eine ER-spezifische Proteolyse des Reporters zum Nachweis der Fusion von COPI-Vesikeln (Abschnitt 4.1.3).

4.1.1 Transportnachweis durch Sedimentationsanalyse

Membranen des Golgi-Komplexes bzw. des Endoplasmatischen Retikulums aus homogenisierten Hefezellen können mittels differentieller Zentrifugation separiert werden. Während ER-Fragmente bereits bei einer Zentrifugalbeschleunigung von weniger als $10^4 g$ innerhalb weniger Minuten sedimentieren, pelletieren Golgi-Membranen erst nach circa einer Stunde Zentrifugation bei $10^5 g$ quantitativ (Gaynor et al., 1994). Diese unterschiedlichen Eigenschaften der Zellorganellen ermöglichen einen indirekten Nachweis des retrograden Vesikeltransportes über eine einfache Sedimentationsanalyse. Die grundlegende Funktionsweise des Systems, welches die prinzipielle Durchführbarkeit eines *In vitro*-Assays für den retrograden Vesikeltransport belegen sollte, ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Der Versuchsansatz enthielt unter Standardbedingungen Golgi-Fragmente aus einem Wildtyp-Hefestamm (RH448), ER-Membranen und Zytosol aus einer isogenen Emp47p-Nullmutante (Stamm RH2825) sowie ein ATP-Regenerationssystem (nach Wuestehube und Schekman, 1992). Als Folge hiervon befanden sich zum Startzeitpunkt des *In vitro*-Experimentes alle Emp47p-Moleküle im Golgi-Komplex. Nach 45 Minuten Inkubation des Ansatzes bei 30 °C wurden Golgi und ER mittels differentieller Zentrifugation bei 5000 g (10 Minuten, 4 °C) wieder voneinander getrennt und die resultierenden Fraktionen mittels Immunoblot-Analyse mit spezifischem Emp47p-Antikörper ausgewertet. Ein Vergleich des relativen Mengenanteils der Emp47-Reportermoleküle in der ER-haltigen Pelletfraktion bzw. in der Überstandfraktion (mit dem Golgi-Komplex) diente dabei als Indikator für den während der Inkubationszeit erfolgten retrograden Vesikeltransport. Ein detailliertes Versuchsprotokoll des *In vitro*-Assays findet sich im Abschnitt 3.3.12.3, die Präparation des Zytosols sowie der Membranen wird dagegen in den Abschnitten 3.3.11.1, 3.3.11.2 und 3.3.11.3 beschrieben.



Abbildung 4.1: Grundprinzip des *In vitro*-Transportsystems mittels Sedimentationsanalyse. Zum Startzeitpunkt des *In vitro*-Experimentes liegt Emp47p (\bullet) ausschließlich im Golgi-Apparat vor (t = 0 Minuten). Nach 45 Minuten Inkubation bei 30 °C werden ER und Golgi-Komplex durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennt. Hat während der Inkubationszeit ein retrograder Vesikeltransport stattgefunden, kann Emp47p nun auch im ER-haltigen Pellet nachgewiesen werden.

Abbildung 4.2 zeigt das Ergebnis eines typischen Sedimentations-Assays inklusive begleitender Kontrollexperimente. Unter den oben beschriebenen Standardbedingungen konnte nach Beendigung der Zentrifugation durchschnittlich rund 40% der Emp47p-Moleküle im Pellet, also in der Fraktion mit den ER-Membranen, nachgewiesen werden. Das System reagierte in den Kontrollen temperaturabhängig (Inkubation bei 0 °C), energieabhängig (Inkubation ohne ATP-Regenerationssytem mit 10 U/ml Apyrase) sowie empfindlich auf das Fehlen von Zytosol. In allen drei Fällen lag die gemessene
Umverteilung des Emp47-Proteins von langsam in schnell sedimentierende Membranen bei lediglich 15% bis 20% der gesamten Reportermenge. Die tatsächliche mittlere Netto-Umverteilung, hier definiert als Differenz zwischen der durchschnittlichen Emp47p-Umverteilung unter Standardbedingungen und der mittleren Umverteilung in den Kontrollexperimenten, betrug demnach circa 20%.



Abbildung 4.2: Beispiel eines *In vitro*-Assays über Sedimentationsanalyse. Ü = Emp47p im Überstand (Golgi-Fraktion). **P** = Emp47p im Pellet (ER-Fraktion). **1** = Standardbedingungen (siehe Beschreibung im Text). **2** = Inkubation bei 0 °C. **3** = Ansatz ohne ATP-Regenerations-system mit 10 U/ml Apyrase. **4** = Ansatz ohne Zytosol-Fraktion. Die Prozentangaben beziehen sich auf die relative Menge von Emp47p in der Pelletfraktion in Bezug zur gesamten Proteinmenge des Reportermoleküls.

Aufgrund des indirekten Nachweisprinzips der Sedimentationsanalyse konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die im *In vitro*-Experiment innerhalb der Pelletfraktion beobachteten Emp47-Proteine (siehe Abbildung 4.2) nicht Folge vesikulären Transportes sind, sondern ihre Ursache lediglich in einer Adhäsion/Aggregation von COPI-Vesikeln (bzw. ganzer Golgi-Membranen) untereinander oder mit der Zielmembran haben. Daher war die Entwicklung eines komplexeren Nachweisverfahrens notwendig, welches eine eindeutige Zuordnung des Emp47p-Reportermoleküls zu bestimmten Membranen bei der Auswertung erlaubte. Die folgenden Abschnitte 4.1.2 und 4.1.3 beschreiben die zwei unterschiedlichen Ansätze, welche zur Entwicklung eines solchen Nachweisverfahrens verfolgt wurden.

4.1.2 Transportnachweis durch Glukosidase1- Aktivität

Viele Proteine sind für ihre intrazelluläre Zielsteuerung auf eine posttranslationale Glykosylierung angewiesen und tragen daher eine oder mehrere Kohlenhydratketten (Herscovics und Orlean, 1993). Bei Proteinen mit N-Glykanen wird zunächst ein Oligosaccharid (Glc₃Man₉GlcNAc₂) von einem Dolicholcarrier auf einen spezifischen Aspartat-Rest übertragen. Der nächste Schritt besteht dann in einer Abspaltung der drei Glukosereste durch die Enzyme Glukosidase1 (erster Glukoserest) sowie Glukosidase2 (zweiter und dritter Rest). Bei Hefen ohne Glukosidase1-Aktivität (*gls1-1*) verbleiben die drei Glukosemoleküle an der Oligosaccharid-Kette, was jedoch keinen meßbaren Einfluß auf die intrazellulären Transporteigenschaften oder die späteren Golgi-spezifischen Modifikationen der Glykane ausübt (Esmon et al., 1984; Latterich und Schekman, 1994). Fusionieren aus *gls1-1*-Mutanten isolierte ER-Membranen mit Wildtyp-ER, werden die Glukosereste korrekt abgespalten (Latterich und Schekman, 1994). Die Golgi-Modifikationen der Kohlenhydratketten können in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* auf nur wenige Mannosereste beschränkt sein (diskrete Glykosylierung) oder variabel bis zu über 200 Mannose-Moleküle betragen, wie es z.B. beim Sekretprotein Invertase (Grossmann und Zimmermann, 1979) der Fall ist.

Kernstück der zweiten Nachweisstrategie für den retrograden Vesikeltransport (siehe Abbildung 4.3) war die Herstellung eines Hybrides aus dem Reporter Emp47p, welcher in seiner Wildtypform nicht glykosyliert vorliegt, und einem Protein, das bei relativ geringem Molekulargewicht möglichst viele N-Glykane mit diskreter Golgi-Modifizierung aufweist. Auf diese Weise sollte das resultierende Konstrukt sowohl über die Transporteigenschaften von Emp47p (siehe Abschnitt 1.6) verfügen, als auch als Substrat der Glykosylierung dienen. Die Überlegung bestand darin, daß sich unter Verwendung von Golgi-Membranen aus einem gls1-1-Hefestamm und von Wildtyp-ER (GLS1) die Lokalisation des Fusionsproteins im In vitro-Experiment direkt aus der Anzahl vorhandener Glukosereste (Golgi-Membran: 3 pro N-Glykan, ER: 0) ergeben würde. Der rechnerisch zu erwartende Größenunterschied zwischen der glukosylierten und der deglukosylierten Form der Proteinchimäre betrug dabei circa 0,6 kDa pro N-Glykan. Das geplante In vitro-Transportsystem (siehe Abbildung 4.3) sah eine Isolation von Golgi-Membranen aus einem gls1-1-Hefestamm (SSY10071) vor, welcher anstelle des endogenen Emp47-Proteins das glykosylierte Hybrid (mit den oben beschriebenen drei Glukoseresten pro Oligosaccharid-Seitenkette) produzierte. Zytosol sowie ER sollten dagegen aus einer GLS1-expremierenden Emp47p-Nullmutante (RH2825) stammen. Erfolgt im In vitro-Experiment nun ein retrograder Vesikeltransport, würde das Emp47p-Konstrukt via COPI-Vesikel das ER erreichen und von der dort vorhandenen Glukosidase1 deglukosyliert werden.



Abbildung 4.3: Prinzip des *In vitro*-Transportsystems durch Glukosidase1-Aktivität. (\bigcirc) = Golgi-Modifikationen; (\bigcirc) = α -1,3-Glukose; (\bigcirc) = ER-Glykosylierung (Man₈GlcNAc₂). Die Golgi-Membranen mit dem Emp47p-Fusionsprotein (Anzahl der N-Glykane hier willkürlich gewählt) stammen aus einer *gls1-1*-Mutante (SSY10071). Nach erfolgtem Vesikeltransport des Fusionsproteins zum ER, welches Glukosidase1 enthält, kommt es zur Deglukosylierung. Der Größenunterschied zwischen der glukosylierten und der deglukosylierten Form des Fusionsproteins (0,6 kDa pro N-Glykan) kann über SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Zur Fusion mit Emp47p wurden die Proteine pCPY (Pro-Carboxypeptidase Y), Spc3p sowie Cne1p ausgewählt, da diese Proteine eine im Vergleich zum Molekulargewicht hohe Anzahl von Glykosylierungsstellen aufweisen. pCPY (59,8 kDa) weist vier solcher Glykosylierungsstellen auf, wobei nur drei der vier N-Glykane über Golgi-Modifikationen verfügen (Klionsky et al, 1990). Cne1p, ein Protein mit Homologie zu Calnexin, besitzt fünf mögliche Glykosylierungsstellen. Da das apparente Molekular-gewicht von Cne1p (76 kDa) nach Behandlung mit dem Enzym EndoH auf 60 kDa sinkt, kann davon ausgegangen werden, daß *in vivo* nur vier dieser Stellen tatsächlich auch glykosyliert vorliegen (Parlati et al., 1995). Spc3p (21,3 kDa) schließlich, eine Untereinheit des Signalpeptidase-Komplexes, trägt zwei potentielle Glykosylierungsstellen (Meyer und Hartmann, 1997). Für die Klonierung der Emp47p-Fusionsproteine wurde zunächst mittels der PCR-Methode ein Fragment mit dem *PRC1-, CNE1-* und

dem *SPC3*-Gen hergestellt, wobei entweder genomische Hefe-DNA (*CNE1, SPC3*) oder das Plasmid PWO24 (YEp13-*PRC1*) als Template diente. Die Fragmente wurden dann über eine *Nsi*I-Schnittstelle, welche innerhalb des *EMP47*-Gens liegt (111 Nukleotide vom Startkodon entfernt, was Aminosäureposition 9 im reifen Emp47-Protein entspricht), in den Vektor pBSK+-*EMP47* eingefügt. An dieser *Nsi*I-Schnittstelle wurde bereits zuvor Insertionen des *Myc*-Epitops und einer singulären N-Glykosylierungsstelle durchgeführt, ohne dabei die Lokalisations- bzw. Transporteigenschaften von Emp47p zu ändern (Schröder et al., 1995). Schließlich erfolgte eine Transformation der Plasmide mit den Fusionsgenen (pBSAG2, pBSAG4, pBSAG6) in den Stamm RH2825 (*emp47*\Delta).

Zur Bestimmung des Glykosylierungsgrades der exprimierten Fusionsproteine wurde Totallysat aus den resultierenden Hefekolonien entweder unbehandelt oder nach Inkubation mit dem Enzym EndoH einer Immunoblot-Analyse mit spezifischem Emp47p-Antikörper unterzogen. Wie aus der Abbildung 4.4 ersichtlich ist, lagen in den unbehandelten Zellextrakten alle drei unterschiedlichen Chimären unerwartet hyperglykosyliert vor (sichtbar am "Schmier" auf dem SDS-PAGE), obwohl die glykosylierten Fusionsanteile als eigenständige Proteine lediglich diskrete Golgi-Modifikationen aufweisen. Zudem befand sich der relative Größenunterschied zwischen der "Core"glykosylierten Proteinform und der nach EndoH-Inkubation gänzlich deglykosylierten Form unterhalb des theoretisch zu erwartenden Wertes, welcher bei 16 kd (Cne1p), 12 kd (pCPY) bzw. 8 kd (Spc3p) lag. Ein analoges Bild zeigte sich bei Expression der Chimärengene in der gls1-1-Mutante SSY10071 (Abbildung 4.5). Die hierbei beobachtete Größendifferenz zwischen den unterschiedlich glukosylierten Formen der Fusionsproteine lag am Rande der experimentellen Nachweisgrenze für das geplante In vitro-System, welches die Trennung dieser beiden Formen innerhalb eines Versuchsansatzes erfordete, erschien dieser relativ geringe Unterschied als unzureichend. Die Mehrzahl der Hybridproteine lag zudem nicht diskret glykosyliert, sondern erneut hyperglykosyliert vor. Die diskret glykosylierte Variante stellte jedoch die einzige Proteinform dar, bei der die An- bzw. Abwesenheit einer Glukosidase1-Aktivität erkennbar gewesen wäre. Aufgrund der Summe dieser Problematiken wurde das Nachweisverfahren über Glukosidase1-Aktivität nicht weiterentwickelt, sondern eine neue Strategie verfolgt, welche eine proteolytische Spaltung des Reportermoleküls am Zielorganell beinhaltet (Abschnitt 4.1.3).

	pCPY- Emp47p		Cne1- Emp47p		Spc3- Emp47p	
EndoH	-	+	-	+	-	+
MW (10 ³) 220 160 120 100 90 80 70 60 50 40		-				-

Abbildung 4.4: Immunoblot-Analyse (Emp47p-Antikörper) der Totallysate aus Transformanden des Hefestammes RH2825, welche die Emp47p-Fusionsproteine mit pCPY, Cne1p oder Spc3p enthielten. Vor der SDS-Gelelektrophorese (7% Trenngel) wurde jeweils ein Aliqout der Lysate mit dem Enzym EndoH behandelt.



4.1.3 Proteolytischer Nachweis des retrograden Vesikeltransportes

Haploide S.cerevisiae-Zellen des Paarungstyps MATa bzw. MATa sekretieren ein Peptidpheromon namens a-Faktor bzw. α -Faktor. Die Bindung des Pheromons an seinen spezifischen Rezeptor beim jeweils anderen Paarungstyp führt zu einer Arretierung der Zelle in der G1-Phase. Kommt es nicht zu einer anschließenden Zellfusion, wird von MATa-Zellen der α-Faktor durch die Aktivität der periplasmatischen Bar1p-Protease gespalten und die G1-Arretierung dadurch wieder aufgehoben (Hicks und Hersowitz, 1981). Ballensiefen und Schmitt (1997) fusionierten Sec22p bzw. Sec12p mit dem α -Faktor-Pheromon und konnten zeigen, daß Bar1p in der Lage ist, das resultierende Konstrukt ebenfalls zu prozessieren. Zudem erwies sich, daß die Protease bereits im ER enzymatisch aktiv ist. Die oben genannten Erkenntnisse wurden zur Grundlage der dritten Nachweisstrategie zur In vitro-Rekonstitution des retrograden Vesikeltransportes. Diese Strategie, im weiteren Verlauf des Textes als "Proteolytisches Nachweissystem" bezeichnet, basiert auf zwei verschiedenen Proteinhybriden. Eine Chimäre aus Emp47p und dem α -Faktor-Pheromon (α -Emp47p), welche gleich dem endogenen Emp47p zwischen Golgi-Komplex und dem ER zirkuliert, dient im System als intrazellulärer Reporter. Die Funktion einer Fusion der Bar1p-Protease mit einem stabil im ER-lokalisierten integralen Membranprotein besteht dagegen in der Fixierung der proteolytischen Aktivität des Enzyms an das ER, was eine experimentell nachweisbare Spaltung von α-Emp47p am Zielorganell des retrograden Vesikeltransportes ermöglichen soll.

Die Versuchsansätze dieses *In vitro*-Transportsystems enthielten unter Standardbedingungen Golgi-Membranen aus einem MAT α -Hefestamm (d.h. ohne endogene BAR1-Protease), welcher das α -Emp47p-Konstrukt, aber kein endogenes Emp47p produzierte. Die ER-Membranen für den Versuchsansatz wurden dagegen aus einem $\Delta emp47$ -Stamm (MAT α) präpariert, während das Zytosol schließlich aus einer einfachen Emp47p-Nullmutante (ebenfalls MAT α) stammte. Gelangte nun α -Emp47p im *in vitro*-Experiment via retrograden Vesikeltransport in die ER-Fraktion, wurde das Reporterprotein durch die hier verankerte Bar1p-Fusion proteolytisch gespalten, woraus eine molekulare Größenabnahme von circa 1,7 kDa (entsprechend 15 Aminosäuren) resultierte. Abbildung 4.6 stellt ein Schema des Nachweissystems dar. A



Abbildung 4.6: Prinzip des proteolytischen Nachweissystems. Der Versuchsansatz enthält Golgi-Membranen aus einem $\Delta emp47$ -Hefestamm (MATα), der das α-Emp47p-Konstrukt produziert. Das ER wird aus einem $\Delta emp47$ -Stamm (MATa) präpariert, welcher die Chimäre der Bar1p-Protease mit einem integralen ER-Membranprotein enthält. Das Zytosol stammt schließlich aus einer einfachen Emp47p-Nullmutante (MAT α) (A). 45 Minuten Inkubation des Versuchsansatzes bei 30 °C ermöglicht retrograden Transport über COPI-Vesikel. Das α-Emp47p-Fusionsprotein gelangt hierdurch in das ER (B). α-Faktor-Emp47p wird im ER-Lumen von der Bar1p-Fusion als Substrat erkannt und proteolytisch gespalten (C). Der Größenunterschied zwischen α -Emp47p und seiner prozessierten Form (circa 2 kDa) kann über SDS-Geleleketrophorese sichtbar gemacht werden.

Um den geschilderten Proteolyse-Assay etablieren zu können, mußten zunächst folgende essentiellen Punkte sichergestellt werden: Das Substrat a-Emp47p mußte in vivo schneidbar sein (1), die korrekte intrazelluläre Lokalisation aufweisen (2) und einem COPI-abhängigen retrograden Vesikeltransport unterliegen (3). Zudem mußte das Proteasekonstrukt eine In vivo-Aktivität mit richtiger Kinetik (Geschwindigkeit der

Spaltung \geq Geschwindigkeit des Vesikeltransportes) aufweisen (4) und dabei fest im ER verankert sein (5). Diese fünf Voraussetzungen für den Transport-Assay werden in den Abschnitten 4.1.3.1 bis 4.1.3.2 (Punkte 1, 2 und 3) sowie 4.1.3.4 bis 4.1.3.6 (Punkte 4 und 5) behandelt.

4.1.3.1 Das Fusionsprotein α-Faktor-Emp47p

Die Klonierung von α -Faktor-Emp47p sowie seiner alternativen Formen mit *Myc*-Epitop (*Myc*- α -Emp47p) bzw. zusätzlicher Kex2p-Schnittstelle (α -KS-Emp47p) wurde von Stephan Schröder-Köhne durchgeführt (siehe dazu Abbildung 4.7). Eine Prozessierung der Fusionsproteine durch die Bar1p- bzw. Kex2p-Protease sollte zu einer Abspaltung von 15 (α -Emp47p), 23 (*Myc*- α -Emp47p) bzw. 27 Aminosäuren (α -KS-Emp47p) führen, was einem Molekulargewicht von circa 1,7 kDa, 2,6 kDa bzw. 3 kDa entspricht.



Abbildung 4.7: Emp47p-Fusionen mit dem α -Faktor-Pheromon. Die Konstrukte enthielten alternativ neben dem α -Faktor zusätzlich das *Myc*-Epitop **(Myc)** bzw. eine Kex2p-Schnittstelle **(KS)**. N = Aminoterminus, C = Carboxyterminus.

Um ihre Funktion im geplanten Assay erfüllen zu können, mußten die α-Emp47p-Fusionsproteine eine Reihe spezifischer Anforderungen erfüllen. Hierbei war insbesondere die Beibehaltung der Lokalisationseigenschaften von Emp47p (Überwiegende Golgi-Verteilung im Fließgleichgewicht; COPI-abhängige Rezyklierung) sowie die Spaltbarkeit durch entsprechende Proteasen von Bedeutung. Um die letzte Fragestellung zu klären, wurden die α -Emp47p-Hybride zunächst darauf getestet, ob die endogenen Proteasen Bar1p bzw. Kex2p in der Lage sind, sie in vivo selektiv als zu erkennen. Dazu wurden die Plasmide mit dem Fusionsgenen in die Substrat Hefestämme RH2825 $(\Delta emp47),$ RH912 $(\Delta emp47,$ BAR1), SSY10143 sowie

SEY6210 ($\Delta emp47$, $\Delta kex2$) transformiert, was zu einer stabilen Integration des α -*EMP47*-Gens (bzw. des *Myc*- α -*EMP47*- oder KS- α -*EMP47*-Gens) in das Genom führte. Abbildung 4.8 zeigt das Ergebnis einer Immunoblot-Analyse von Totallysaten entsprechender Stämme mit Hilfe spezifischer Emp47p-Antikörper.

α		ι	Μус - α		α - KS		
BAR1	-	+	-	+	-	-	
KEX2	+	+	+	-	-	+	
EMP47	-	-	-	-	-	-	
			-	dil water		•	
		Sec. 1	-	-			-
	1	9	9	1999 C.	E	C	

Abbildung 4.8: Die α -Emp47p-Konstrukte werden durch die endogenen Proteasen Bar1p bzw. Kex2p prozessiert. $\alpha = \alpha$ -Faktor-Emp47p. *Myc*- $\alpha = Myc$ - α -Faktor-Emp47p. α -**KS** = α -Faktor-Emp47p mit Kex2p-Schnittstelle. **1** = SSY10150 (RH2825 Δ *emp47*, α -*EMP47*), **2** = SSY10155 (RH912 Δ *emp47*, *BAR1*, α -*EMP47*), **3** = SSY10153 (E3 Δ *emp47*, *MYC*- α -*EMP47*), **4** = SSY10156 (RH912 Δ *emp47*, *MYC*- α -*EMP47*, *BAR1*), **5** = SSY10152 (Δ *emp47*, Δ *kex2*, α -*KS*-*EMP47*), **6** = SSY10151 (RH2825 Δ *emp47*, α -*KS*-*EMP47*), **7** = RH448 (Wildytp). Das Totallysat der Hefestämme wurde über ein 10%-SDS-Gel aufgetrennt, die anschließende Immunoblot-Analyse erfolgte mit spezifischem Emp47p-Antikörper.

Aus Abbildung 4.8 ergibt sich, daß die Emp47p-Fusionsproteine von den endogenen Proteasen Bar1p (α -Emp47p, *Myc*- α -Emp47p) bzw. Kex2p (α -KS-Emp47p) *in vivo* als Substrat erkannt und gespalten werden. Zudem zeigte sich, daß die gespaltene und die unprozessierte Form des Myc- α -Konstruktes für praktische Zwecke ausreichend weit voneinander getrennt laufen. Das Experiment vermag jedoch keine Aussage darüber zu treffen, an welchem Ort innerhalb der Zelle die Prozessierung erfolgt. Für die Funktion des proteolytischen Nachweisystems ist die korrekte intrazelluläre Lokalisierung der *Myc*- α -Emp47p-Konstrukte, welche der Lokalisation des endogenen Emp47p entsprechen muß, aber von entscheidender Bedeutung. Um als molekularer Reporter im System fungieren zu können, war insofern ein mehrheitliches Vorkommen des

Fusionsproteins im Golgi-Komplex, dem Startpunkt des retrograden Vesikeltransportes, Voraussetzung. Zur Identifikation der Lokalisation wurde zunächst die Methode der Immunfloureszenz unter Verwendung des Emp47p- bzw. des *Myc*-Antikörpers angewandt. Die Ergebnisse dieser Analyse finden sich in Abbildung 4.9.



A





С



Abbildung 4.9: Immunfloureszenz-Analyse der intrazellulären Lokalisation von α -Emp47p (**A**), *Myc*- α -Emp47p (**B**) sowie α -Faktor-KS-Emp47p (**C**). Die Analyse wurden entweder mit Emp47p-Antikörper (**A**) und (**C**), oder mit *Myc*-Antikörper (**B**) durchgeführt. Die Lage der Zellkerne wurde mittels DAPI-Färbung der Kern-DNA überprüft (hier nicht gezeigt). Das punktförmige Muster, welches sich in allen drei Fällen mehrheitlich ergab, ist typisch für den dispersen Golgi-Komplex der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Bei allen drei Konstrukten (α -Emp47p, *Myc*- α -Emp47p bzw. α -KS-Emp47p) ergab sich bei der Untersuchung mehrheitlich ein punktförmiges Muster. Derartige disperse Strukturen sind typisch für den Golgi-Komplex der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welcher im Gegensatz zum gestapelten Golgi-Apparat von *Pichia pastoris* als einzelne Zisternen über die gesamte Zelle gleichmäßig verteilt vorliegt (Rossanese et al., 1999; Glick und Malhotra, 1998). Die ringförmigen Strukturen, welche bei der Immunfloureszenz z.T. ebenfalls zu erkennen sind, kennzeichnen dagegen das perinukläre ER und deuten darauf hin, daß α -Faktor-Emp47p genau wie das endogene Emp47-Protein im Fließgleichgewicht zu einem Teil auch im ER lokalisiert. ZellfraktionierungsExperimente dienten als zusätzliche Kontrolle der Immunfloureszenz-Untersuchungen. Hefezellen aus den Stämmen RH448 (Wildtyp) sowie SSY10153 ($\Delta emp47$, *MYC*- α -*EMP47*) wurden hierfür bei 30 °C angezüchtet, abzentrifugiert und unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Das Totallysat wurde anschließend auf einen Sukrosegradienten gegeben und für 2,5 Stunden bei 10⁵ g zentrifugiert (Dichtegradientenzentrifugation). Das detaillierte Protokoll der Zellfraktionierungs-Experimente findet sich im Abschnitt 3.3.11.4. Die Auswertung der resultierenden Fraktionen erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (10%-Trenngel) und anschließender Immunoblot-Analyse unter Verwendung eines spezifischen Emp47p-Antikörpers (Abbildung 4.10). In den Experimenten zeigte sich, daß Emp47p und *Myc*- α -Emp47p nahezu vollständig cofraktionieren.



Abbildung 4.10: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von *Myc-* α -Emp47p mittels Zellfraktionierung im Sukrosegradienten. RH448 ist ein Wildytypstamm (*EMP47*), während SSY10153 ($\Delta emp47$) das *MYC-* α -*EMP47*-Fusionsgen enthielt. Die Fraktionen des Sukrosegradienten wurden über ein 10%-SDS-Gel aufgetrennt und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse auf ihren Emp47p-Gehalt geprüft.

4.1.3.2 Nachweis von α-Emp47p in COPI-Vesikeln

Spang und Schekman (1998) entwickelten ein In vitro-System zur Generierung von COPI-umhüllten Vesikeln. In meiner Arbeit diente dieses System zur Klärung der Frage, ob das $Myc-\alpha$ -Emp47p-Konstrukt ebenso wie das endogene Emp47p als Frachtmolekül in COPI-Vesikeln inkorporiert wird. Der Versuchsansatz enthielt unter Standardbedingungen Golgi-Membranen aus Hefestamm SSY10153 (Δemp47, MYC-α-*EMP47*), Zytosol aus dem isogenen Stamm SSY10137 (Δ*emp47*), 10 mM GTPγS sowie ein ATP-Regenerationssystem (nach Wuestehube und Schekmann, 1992) und wurde für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Begleitenden Kontrollansätzen fehlte entweder eine notwendige Versuchskomponente (Zytosol bzw. ATP-Regenerationssystem) oder sie wurden bei 0 °C inkubiert. Nach Beendingung der halbstündigen Inkubation erfolgte zur Separation der relativ langsam sedimentierenden Vesikel von den schweren Golgi-Membranen eine Dichtegradientenzentrifugation im Ficoll/Sukrose-Gradienten für zwei Stunden bei 10⁵ g. Die resultierenden Fraktionen wurden einer SDS-Gelelelektrophorese (10%-Trenngel) unterzogen und ihr jeweiliger *Myc*-α-Emp47p-Gehalt mittels Immunoblot-Analyse mit spezifischem Emp47p-Antikörper bestimmt (Abbildung 4.11, siehe nächste Seite). Abschnitt 3.3.12.1 beschreibt das gesamte Protokoll der Experimente im Detail. Wies der Versuchsansatz sämtliche Komponenten auf (Standardbedingungen), konnte nach der Zentrifugation *Myc*-α-Emp47p mehrheitlich in den Fraktionen 2 bis 5, wo aufgrund der Experimente von Spang und Schekman (1998) die COPI-Vesikel erwartet wurden, beobachtet werden. Lediglich 20 bis 25% der gesamten Proteinmenge verblieben in diesem Falle in den letzten beiden Fraktionen, welche die sedimentierten Golgi-Membranen enthielten. Erfolgte die Inkubation des Assays dagegen bei 0 °C oder fehlte Zytosol bzw. das ATP-Regenerationssystem im Versuchsansatz, kam es zu keinem signifikanten Signal in den Fraktionen 2 bis 5 (< 5% der gesamten Emp47p-Menge pro Fraktion). Das nicht hydrolysierbare GTP-Analog GTP_γS, welches den COPI-Hüllkomplex auf den Vesikeln stabilisiert (Lanoix et al., 1999; Pepperkok et al., 1998), erwies sich in den Versuchen für die Myc-α-Emp47p-Lokalisation in den Fraktionen 2 bis 5 als unbedingt notwendig (Daten der Negativkontrolle hier nicht gezeigt). Zusammengefaßt deuten die Ergebnisse darauf hin, daß *Myc*-α-Emp47p genau wie das endogene Emp47p als Frachtmolekül in COPI-Vesikel integriert wird und somit diese Anforderungen an ein funktionelles Reporterkonstrukt (siehe Abschnitt 4.1.3.1) erfüllt.



B - Standardbedingungen 90 -85 -80 ---- 0 °C %: ---▲--- Ohne ATP-Regenerationssystem 75 ····▼···· Ohne Zytosol 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 20 -5 -20 -20 -5 10 5 0 2 4 6 8 10 Fraktion:

Abbildung 4.11: Beispiel eines **COPI-Vesikel-Assay nach Spang** und Schekman. Abgebildet ist die Immunoblot-Analyse mit spezifischem Emp47-Antikörper (A) sowie dessen graphische Darstellung (B). Der Pfeil gibt die Orientierung (Sedimentationsrichtung) des Ficoll/Sukrose-Gradienten an, von oben (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 10). Nur im Experiment unter Standardbedingungen konnte *Myc*-α-Emp47p in signifikanter Menge (> 5% des Gesamtsignals) in den Fraktionen 2 bis 5 beobachtet werden.

ST = Versuch unter Standardbedingungen;

0 °**C** = Inkubation des Ansatzes bei 0 °**C**;

-ATP = Ansatz ohne ATP-Regenerationssystem plus 10 U/ml Apyrase, -ZYT = Versuchsansatz ohne

Zytosol-Fraktion.

% = Prozent des Gesamtsignals

4.1.3.3 Fusion der Protease Bar1p mit den TypI – Membranproteinen Cne1p, Cue1p, Sec66p sowie Wbp1p

Der zweite zentrale Punkt des proteolytischen Nachweissystems (siehe Abbildung 4.6) bestand in der Verankerung der periplasmatischen Protease Bar1p im ER. Dieses Ziel sollte über eine Fusion von Bar1p mit einem nichtzyklierenden ER-Membranprotein erreicht werden. Als Fusionspartner wurden die TypI-integralen Membranproteine (N-Terminus im ER-Lumen) Cne1p, Cue1p, Sec66p sowie Wbp1p ausgewählt, für deren beständige ER-Lokalisation zu Beginn dieser Arbeit bereits entsprechende Daten vorlagen. Die Verwendung von gleich vier ER-Proteinen sollte dabei sicherstellen, daß zumindest eines der resultierenden Bar1p-Konstrukte (siehe dazu Abbildung 4.12) die notwendigen drei Kriterien aufwies: 1. Ausreichende Expression des entsprechenden Fusionsgens und hohe Proteinstabilität, 2. Hohe proteolytische Aktivität, 3. Ausschließliche Lokalisation im ER.

Das Calnexin-homologe Protein Cne1p (502 Aminosäuren; 57 kDa) spielt bei der Qualitätskontrolle von Sekretproteinen eine Rolle (Parlati et al., 1995). Zur Klonierung von BAR1-CNE1 (1089 Kodons) wurde ein PCR-Fragment mit dem kompletten CNE1-Gen hergestellt und dieses in das CEN-Plasmid pRS416\[]BamHI eingefügt. Ein BAR1-PCR-Fragment wurde anschließend über eine BamHI-Schnittstelle hinter dem 78.Kodon des CNE1-Gens einkloniert. Cue1p (203 Aminosäuren; 22,8 kDa) ist für die Kopplung der Ubiquitinierung an die ER-Proteindegradation verantwortlich, indem es Ubc7p an die ER-Membran bindet (Biederer et al., 1997). Die Herstellung von Bar1-Cue1p (790 Aminosäuren) erfolgte analog zur Herstellung von Bar1-Cne1p. Ein PCR-Fragment mit dem vollständigen CUE1-Gen wurde in den Vektor pRS416ANcoI einkloniert und anschließend ein BAR1-PCR-Fragment über eine NcoI-Schnittstelle direkt vor dem Startkodon des CUE1-Gens eingefügt. Sec66p (206 Aminosäuren; 24,2 kDa) ist Bestandteil des ER-Translokationskomplexes (Lyman und Schekman, 1997; Young et al., 2001). Das SEC66-Gen wurde mittels PCR hergestellt und über EcoRI und HindIII in den 2µ-Vektor pRS426 einkloniert. An Nukleotidposition 44 wurde mittels In vitro-Mutagenese (T \rightarrow C - Punktmutation) eine *Aat*II-Schnittstelle in das *SEC66*-Gen eingeführt, was im Bar1-Sec66p Fusionsprotein später einen F₁₅→S-Austausch zur Folge hatte. Über die neu entstandene AatII-Schnittstelle wurde anschließend ein BAR1-PCR-Fragment einkloniert. Wbp1p (430 Aminosäuren; 49,4 kDa) schließlich ist die β-Untereinheit der Oligosaccharyl-Transferase (Kelleher und Gilmore, 1994). Um das Fusionsprotein Bar1-Wbp1p (1017 Aminosäuren) zu erhalten, wurde die BAR1-Sequenz (587 Kodons) an Position 49 von *WBP1* eingefügt. Über die Restriktionsenzyme *Sac*I sowie *Hind*III wurde das *WBP1*-Gen dafür zunächst aus dem 2µ-Plasmid YEp352 ausgeschnitten und in den Vektor pRS416 Δ XbaI umkloniert. In den resultierenden Vektor pRS416 Δ XbaI-*WBP1* wurde dann ein *BAR1*-PCR-Fragment über eine XbaI-Schnittselle eingefügt.



Abbildung 4.12: Schema der Bar1p-Fusionsproteine sowie ihrer Lokalisation innerhalb der ER-Membran. Die dunklen vertikalen Balken symbolisieren die Protease Bar1p, während die helleren Balken das jeweilige ER-Membranprotein darstellen. Die Zahlen bezeichnen die jeweilige Aminosäureposition.

4.1.3.4 Enzymatische Aktivität der Proteasefusionen in vivo

Der erste Test der Bar1p-Konstrukte (siehe Abschnitt 4.1.3.4) bestand in einer Messung ihrer proteolytischen Aktivität *in vivo*, was durch eine Expression der *BAR1*-Fusionsgene in einem *Myc*- α -Emp47p-produzierenden Hefestamm (SSY10153) ermöglicht wurde. Hierfür erfolgte zunächst eine Umklonierung der entsprechenden Fusionsgene in den Integrationsvektor pRS306 inklusive einer anschließenden Transformation der resultierenden Plasmide in den Hefestamm SSY10153 ($\Delta emp47$, *MYC*- α -EMP47). Die daraus entstandenen Transformanden sowie der Kontrollstamm SSY10156 ($\Delta emp47$, *MYC*- α -EMP47, *BAR1*) wurden anschließend über Nacht bei 30 °C in Vollmedium (YPEG) angezüchtet, abzentrifugiert und das Zellpellet in SDS-Probenpuffer aufgekocht (siehe dazu Abschnitt 3.3.8.1). Pro Fusionskonstrukt wurden mindestens vierzig Transformanden getestet. Das exemplarische Ergebnis einer Immunoblot-Analyse dieser Proben mit spezifischem Emp47p-Antikörper zeigt Abbildung 4.13. Um ein Maß für die In vivo-Aktivität der Proteasefusionen zu erhalten, wurde jeweils das relative Mengenverhältnis zwischen dem Reporter Myc-α-Emp47p und seiner prozessierten Form, hier als Emp47p* gekennzeichnet, bestimmt. Eine auch in Wildtyp-Stämmen auftretende Degradations-Bande von *Myc*-α-Emp47p, welche im Immunoblot ungefähr die gleiche Größe wie das prozessierte Emp47p* hat, lag bei durchschnittlich fünf Prozent der gesamten Emp47p-Menge. Wie einkalkuliert, wiesen die vier verschiedenen Bar1p-Konstrukte eine stark unterschiedliche Proteaseaktivität auf. Es wurde nicht weiter untersucht, ob dies an mangelnder Expression, geringer Stabilität, falscher Orientierung innerhalb der Membran oder anderen Gründen lag. Das Bar1-Wbp1p-Fusionsgen erzeugte in keinem der In vivo-Experimente eine nachweisbare proteolytische Aktivität (Abbildung 4.13.A). Bar1-Sec66p spaltete dagegen im Durchschnitt der getesteten Transformanden rund 50% der vorhandenen Reportermoleküle (4.13.B). Die Konstrukte Bar1-Cne1p sowie Cue1-Bar1p schließlich prozessierten in allen Transformanden die vorhandenen Myc-a-Emp47p-Moleküle nahezu vollständig (4.13.C). Da das Expressionsniveau einzelner Transformanden erfahrungsgemäß sehr unterschiedlich ist (vermutlich durch eine verschiedene Kopienzahl des integrierten Gens verursacht), spricht dieses Ergebnis dafür, daß die proteolytische Aktivität nicht limitierend ist. Für alle weiteren Versuche fand lediglich Bar1-Cne1p, welche sich im späteren Verlauf der Arbeit in vitro als aktivste Protease erwies, Verwendung. Auf die Konstruktion von Kex2p-Proteasefusionen wurde nach Etablierung eines funktionalen Substrat-Protease-Systems ebenfalls verzichtet.



Abbildung 4.13: Proteolytische Aktivität der Bar1p-Fusionsproteine *in vivo*. Das Totallysat aus Hefestämmen, welche sowohl *Myc*- α -Emp47p, als auch jeweils ein Bar1p-Konstrukt enthielten, wurde gelelektrophoretisch (10% Trenngel) aufgetrennt und einer Immunoblot-Analyse mit Emp47p-Antikörper unterzogen. Als Maßstab für die Aktivität der Proteasen diente dabei das relative Verhältnis zwischen *Myc*- α -Emp47p und der prozessierten Form Emp47p*. (Wie im Text vermerkt, wird die Emp47p*-Bande zu einem geringen Teil auch durch eine Degradation von *Myc*- α -Emp47p verursacht, welche sich gelelektrophoretisch nicht immer von dem tatsächlich Prozessionsprodukt Emp47p* trennen ließ.) Bar1-Wbp1p erwies sich als gänzlich inaktiv **(A)**, Bar1-Sec66p-Transformanden prozessierten durchschnittlich circa 50% der Reportermoleküle **(B)**, in den Stämmen mit Bar1-Cne1p und Bar1-Cue1p konnte praktisch kein *Myc*- α -Emp47p mehr nachgewiesen werden **(C)**.

4.1.3.5 Zelluläre Lokalisation von Bar1-Cne1p

Das Prinzip des proteolytischen Nachweissystems erfordert, daß die Bar1p-Proteasefusion stabil im ER verankert ist, da sonst eine Spaltung des Reporters α-Emp47p innerhalb des Golgi-Komplexes nicht ausgeschlossen werden kann. Um eine immunologische Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des Bar1-Cne1p-Konstruktes zu ermöglichen, wurde mit Hilfe eines entsprechend konstruierten Oligonukleotid-Paares (BSCNE1M-1/BSCNE1M-2) zwischen Aminosäure 78 und 79 ein einfaches Myc-Epitop in das Fusionsprotein inseriert. Hefezellen des Stammes SSY10239, welche Myc-Bar1-Cne1p exprimierten, wurden zunächst über Nacht in Vollmedium (YPEG) angezüchtet, abzentrifugiert und unter flüssigem Stickstoff im Mörser aufgeschlossen (siehe Abschnitt 3.3.11.1). Das von Zelltrümmern und nichtlysierten Hefen befreite Totallysat wurde anschließend einer subzellulären Fraktionierung unterworfen. Hierzu erfolgte eine Zentrifugation des Lysates für jeweils 10 Minuten bei 4000 g bzw. bei 27000 g. Ein Aliqout des 4000 g-Überstandes wurde zudem einer weiteren Zentrifugation für 10 Minuten bei 27000 g unterzogen, um innerhalb dieser Fraktion Golgi- von Zytosolproteinen unterscheiden zu können (Abbildung 4.14). Als Markerproteine dienten bei der Auswertung der Fraktionierung Kar2p (ER-Lumen) sowie Emp47p (Golgi-Komplex).

	4 P	4 Ü	27 P	27 Ü	4+27 P	4+27 Ü
Kar2p	-		-	20 4 T		
<i>Myc</i> -Bar1-Cne1p			harris			
Emp47p		-	-		-	•

Abbildung 4.14: *Myc*-Bar1-Cne1p co-lokalisiert mit dem ER-Markerprotein Kar2p, nicht aber mit dem Golgi-Protein Emp47p. Totallysat aus dem Hefestamm SSY10239 (Δ emp47, *MYC-BAR1-CNE1*) wurde bei 4000 g (**4**) oder bei 27000 g (**27**) zentrifugiert. Ein Aliqout des Überstandes der 4000 g – Zentrifugation (**4Ü**) wurde zudem zusätzlich bei 27000 g zentrifugiert (**4** + **27**). **Ü** = Überstand, **P** = Pellet. Die Proben der Fraktionierung wurden gelelektrophoretischen aufgetrennt (10% Trenngel) und einer Immunoblot-Analyse mit spezifischem Kar2p-, *Myc*- oder Emp47p-Antikörper unterzogen.

Obwohl die beobachtete Signalstärke im Falle des Proteasekonstruktes nur sehr gering war, wird aus Abbildung 4.14 deutlich, daß *Myc*-Bar1-Cne1p bereits bei 4000 *g* pelletiert. Das Fusionsprotein co-lokalisiert somit mit dem ER-Protein Kar2p, nicht aber mit Emp47p. Kontrollversuche zur Zeitabhängigkeit der *in vivo*-Proteaseaktivität (4.1.3.6) bzw. *In vitro*-Transportexperimente (4.1.3.8) ergaben im späteren Verlauf dieser Arbeit weitere Belege für die stabile ER-Lokalisation des Proteasekonstruktes.

4.1.3.6 Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der *in vivo*-Aktivität von Bar1-Cne1p

In vivo (Abschnitt 4.1.3.4) vermochte das Bar1-Cne1p-Konstrukt die vorhandenen *Myc*- α -Emp47-Moleküle nahezu vollständig zu prozessieren. Mit Hilfe des einfachen Versuchprinzips der Co-Expression beider Fusionproteine, welches zur Bestimmung der Proteaseaktivität dabei Verwendung fand, war jedoch keine Unterscheidung zwischen co-translationaler Proteolyse und einer Prozessierung nach erfolgtem retrograden Vesikeltransport des Reporters möglich. Um einen Hinweis darauf zu liefern, daß eine Spaltung des *Myc*- α -Emp47p-Substrates nach erfolgtem retrograden Transport zumindest *in vivo* überhaupt möglich ist, wurde ein sogenanntes "Pulse-Chase"-Experiment durchgeführt. Das "Pulse Chase"-Verfahren erlaubt eine zeitabhängige Messung der *In vivo*-Prozessierung von *Myc*- α -Emp47p, wobei für die Spaltung nach erfolgtem retrogradem Transport eine signifikant langsamere Reaktionskinetik als für den co-translationalen Abbau erwartet wurde.

Für das Experiment wurden zunächst Hefen des Stammes SSY10229 (Δ*emp47*, *MYC*-α-*EMP47*, *BAR1-CNE1*) für zwei Minuten in Minimalmedium mit ³⁵S-Cystein sowie ³⁵S-Methionin inkubiert, was zu einem Einbau der radioaktiven Aminosäuren in die Zellproteine führte ("Pulse"). Anschließend wurde ein Überschuß nichtradioaktiver Aminosäuren zum Ansatz gegeben und auf diese Weise die Markierungsreaktion beendet. Zu bestimmten Zeitpunkten (5, 10, 20, 40 sowie 70 Minuten) wurden dann Aliqouts entnommen ("Chase"), die Proteaseaktivität darin sofort gestoppt und die im Aliqout enthaltenen Reportermoleküle (*Myc*-α-Emp47p sowie die geschnittene Form Emp47p*) mittels Immunpräzipitation isoliert. Die Auswertung des "Pulse Chase"-Experimentes (Abbildung 4.15) erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese (10%-Trenngel) und Autoradiographie. Das detaillierte Versuchsprotokoll ist im Abschnitt 3.3.13 beschrieben.



Abbildung 4.15: Zeitabhängige Prozessierung des Reportermoleküls *Myc*- α -Emp47p *in vivo*. Hefezellen des Stammes SSY10229 ($\Delta emp47$, *MYC*- α -*EMP47*, *BAR1*-*CNE1*) wurden einem "Pulse Chase"-Experiment unterzogen, wobei Proben 5, 10, 20, 40 bzw. 70 Minuten nach Zugabe der "Chase"-Lösung entnommen wurden. Die Auswertung erfolgte mittels quantitativer Audioradiographie am PhosphorImagerTM (A). *Myc*- α -**Emp47p**: Reportermolekül, **Emp47p***: Prozessierter Reporter. Abbildung (B) zeigt die graphische Darstellung des Ergebnisses, wobei der Meßwert für t = 0 Minuten (mit einem Kreis gekennzeichnet) extrapoliert wurde.

Zum "Chase"-Zeitpunkt 0 lagen bereits rund 40% der gesamten Reportermoleküle in der geschnittenen Form vor (Wert mit Hilfe des Programmes "Origin41" extrapoliert), siebzig Minuten später waren weitere 38% von *Myc*-α-Emp47p prozessiert. Der graphisch dargestellte Zeitverlauf der Proteaseaktivität (Abbildung 4.15.B) impliziert die Existenz von gleich zwei Spaltungsprozessen unterschiedlicher Geschwindigkeit. Der schnelle, im Experiment zeitlich nicht aufgelöste Prozeß läuft vermutlich co-translational ab, zumal offenbar bereits während der "Pulse"-Phase (2 min) ein großer Teil der Reportermoleküle geschnitten wurde. Der langsamer verlaufenden Abbau von

Myc-α-Emp47p kann unter der Bedingung, daß die Bar1-Cne1-Protease stabil im ER verankert ist, als eine Folge der Prozessierung von Reportermolekülen angesehen werden, die zunächst via anterograden Transport den Golgi-Apparat erreichten und dann über COPI-Vesikel zum ER zurücktransportiert wurden (siehe Diskussion). Für das geplante proteolytische Nachweissystem ist der im "Pulse Chase"-Experiment beobachtete Anteil co-translationaler Prozessierung ohne Bedeutung, da die Translation des *Myc*-α-Emp47p-Reportermoleküls in Hefestämmen stattfindet, welche kein Bar1p-Konstrukt enthalten. Vielmehr liefert die Existenz der co-translationale Aktivität von Bar1-Cne1p einen weiteren Hinweis auf die ER-Lokalisation der Proteasefusion.

4.1.3.7 *In vitro*-System für den retrograden Vesikeltransport vom Golgi-Komplex zum ER

Nach Beendigung der notwendigen Kontrolluntersuchungen zum Emp47p- (Abschnitte 4.1.3.1 und 4.1.3.2) bzw. Bar1p-Fusionsprotein (Abschnitte 4.1.3.4 bis 4.1.3.6) konnte mit der Durchführung des eigentlichen In vitro-Assay, dessen theoretisches Prinzip in Abbildung 4.6 skizziert wurde, begonnen werden. Ein detailliertes Protokoll der Experimente findet sich bei Abschnitt 3.3.12.2. Der Versuchsansatz enthielt unter Standardbedingungen Golgi-Membranen aus dem Hefestamm SSY10153 (*\(\Delta emp47, \) MYC-\alpha-EMP47*), ER-Membranen aus SSY10225 (Δ *emp47*, *BAR1-CNE1*), Zytosol aus SSY10137 (\(\triangle en ATP-Regenerationssystem (nach Wuestehube und Schekman, 1992). Einem Teil der Kontrollansätze fehlte entweder ER, Zytosol oder das ATP-Regenerationssystem. Andere Kontrollen wurden bei 0 °C inkubiert oder enthielten GTP_γS, welches den COPI-Hüllkomplex stabilisiert und somit die Vesikelfusion inhibiert. Alle Komponenten wurden stets bei 0 °C zusammengegeben und die kompletten Versuchsansätze dann für 45 Minuten bei der jeweils gewünschten Temperatur (Standardbedingungen: 30 °C) inkubiert. Eine Zugabe von SDS-Probenpuffer inklusive 5 Minuten Denaturierung bei 95 °C stoppte schließend die Reaktion. Die Auswertung der Experimente erfolgte analog zur Sedimentationsanalyse (Abschnitt 4.1.2) über SDS-Gelelektrophorese (10%-Trenngel) und Immunoblot-Analyse mit spezifischem Emp47p-Antikörper. Abbildung 4.16 zeigt das exemplarische Ergebnis eines In vitro-Assays.



Abbildung 4.16: Beispiel eines *In vitro*-Assays mit Transportnachweis über Proteolyse. **ST** = Standardbedingungen, **0** °**C** = Inkubation des Versuchsansatzes bei 0 °C, -**ATP** = Versuchsansatz ohne ATP-Regenerationssystem mit 10 U/ml Apyrase, -**Zyt.** = Versuchsansatz ohne Zytosol, **GTP** γ **S** = Versuchsansatz mit 100 μ M GTP γ S. Nur unter Standardbedingungen (**ST**) liegt ein signifikanter Anteil (>5%) der gesamten Reportermoleküle in der prozessierten Form (Emp47p*) vor.

Als Maßstab für den erfolgten Vesikeltransport wurde der prozentuale Anteil der unteren Bande an der gesamten Signalstärke (Summe aus oberer und unterer Bande) bestimmt. In den Kontrollversuchen lag dieser Anteil über 0% (durchschnittlich circa 5%), da sich ein Degradationsprodukt des Myc- α -Emp47p-Reporters gelelektrophoretisch meist nur unzureichend von Emp47p* (spezifisches Spaltprodukt der Bar1-Cne1p-Aktivität) trennen ließ. Unter Standardbedingungen konnte dagegen eine Transporteffizienz von 10% bis maximal 25% beobachtet werden. Die Bar1-Cne1p-Proteasefusion ist also auch *in vitro* in der Lage, daß Myc- α -Emp47p-Molekül als Substrat zu erkennen und zu prozessieren.

4.1.3.8 Kopplung der Sedimentationsanalyse mit dem proteolytischen Nachweissystem

Der Versuchsansatz des *In vitro*-Assays von Abschnitt 4.1.3.7 läßt die theoretische Möglichkeit offen, daß kein retrograder Transport des Reporters stattfindet, sondern daß umgekehrt die Proteasefusion in anterograder Richtung zum Golgi-Komplex transportiert wird und hier die Myc- α -Emp47p-Moleküle schneidet. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der ursprüngliche Assay mit einer anschließenden differentiellen Zentrifugation, d.h mit einer Sedimentationsanalyse (siehe hierzu auch Abschnitt 4.1.1), gekoppelt. Das Protokoll für diese Versuchsansätze blieb im Vergleich zum Standard-Assay des proteolytischen Nachweissystems (siehe hierzu die Abschnitte 4.1.3.7 und 3.3.12.2) bis zum Ende der 30 °C-Inkubation unverändert. Danach erfolgte jedoch keine sofortige Zugabe von SDS-Probenpuffer, sondern zunächst eine Zentrifugation (4 Minuten bei 5000 g und 4 °C) zur Separation von ER- (Pelletfraktion) und Golgi-Membranen (Überstandfraktion). Die *In vitro*-Experimente wurde anschließend über

SDS-Gelelektrophorese (10%-Trenngel) sowie Immunoblot-Analyse mit Emp47p-Antikörper ausgewertet (Abbildung 4.17).



Abbildung 4.17: Kopplung des *In vitro*-Transportsystems über Proteolyse mit einer differentiellen Zentrifugation. **ST** = Standardbedingungen (siehe Abschnitt 4.1.4.7). **0** °**C** = Kontrollversuch bei 0 °C. -**ATP** = Kontrollversuch mit 10 U/ml Apyrase anstelle des ATP-Regenerationssytems. -**ER** = Kontrollversuch ohne ER-Membranen im Ansatz. **GTP** γ **S** = Kontrollversuch mit 10 mM GTP γ S. **Ü** = Überstand, **P** = Pellet, **1** = *Myc*- α -Emp47p, **2** = degradierte Form von *Myc*- α -Emp47p, **3** = Emp47p* (spezifisch prozessierter Reporter). Die spezifisch geschnittene Reporterform Emp47p* (**3**) zeigte sich nur in der Pelletfraktion der Standard-Assays (**ST**).

Wie auch im Versuch ohne zusätzliche differentielle Zentrifugation (siehe Abbildung 4.16) ist die prozessierte Reporterform Emp47p* lediglich unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 4.1.3.7) zu beobachten. Zudem konnte Emp47p* ausschließlich innerhalb der Pelletfraktion (P) nachgewiesen werden. Die Bar1-Cne1p-Protease schneidet das Reportermolekül demnach also eindeutig innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums, da zumindest ein Teil von Emp47p* ansonsten auch im Überstand (Golgi-Fraktion) hätte vorkommen müssen. Die Beobachtung, daß Emp47p* lediglich in der Pelletfraktion nachgewiesen werden kann, ist zudem ein Hinweis darauf, daß einmal ins ER transportiertes Emp47p *in vitro* nicht wieder anterograd re-exportiert wird.

4.1.3.9 Zeit- und Temperaturoptimierung des In vitro-Assays

Um die Temperaturabhängigkeit des Proteolyse-Assays zu bestimmen, wurde die Inkubationstemperatur der Versuchsansätze variiert. Während das restliche Protokoll des Assays nicht verändert wurde (siehe Abschnitt 4.1.3.7 sowie 3.3.12.2), erfolgte die Inkubation nun bei Temperaturen zwischen 0 °C und 50 °C. Abbildung 4.18.A zeigt das beispielhafte Ergebnis (Immunoblot-Analyse mit spezifischem Emp47p-Antikörper) eines solchen *In vitro*-Assay, während 4.1.8.B die graphische Auswertung sämtlicher drei *In vitro*-Assay mit variabler Inkubationstemperatur darstellt. Die optimale Temperatur liegt demnach bei circa 30 °C, während bei 37 °C noch rund 85% des Höchstwertes beobachtet werden kann. Bei 25 °C erreicht die Transporteffizienz dagegen nur noch bei circa 52% des Maximalwertes.



Abbildung 4.18: Abhängigkeit des *In vitro*-Transportsystems mittels Proteolyse von der Inkubationstemperatur. **(A):** Beispiel eines *In vitro*-Assays mit variabler Inkubationstemperatur. Die Auswertung erfolgte über SDS-Gelelektrophorese (10%-Trenngel) sowie einer anschließenden Immunoblot-Analyse mit Emp47p-Antikörper. **(B):** Statistische Auswertung aller *In vitro*-Assay mit variabler Inkubationstemperatur. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der drei Messungen inklusive Standardabweichung. Die optimale transportabhängige Prozessierung wird bei circa 30 °C erreicht.

Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit des Systems wurde die Inkubation bei 30 °C nun zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 Minuten bis maximal 60 Minuten) durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer sowie einer Denaturierung bei 95 °C gestoppt. Das restliche Versuchsprotokoll (wie in den Abschnitten 4.1.3.7 und 3.3.12.2 beschrieben) blieb dabei identisch. In Abbildung 4.19.A sowie Abbildung 4.19.B wird das Resultat der *In vitro*-Experimente mit variabler Inkubationszeit dargestellt. Der Anstieg der

Transporteffizienz mit der Zeit ergibt eine Sättigungskurve, welche bereits bei 30 Minuten nahezu ihren Maximalwert erreicht.



A





Abbildung 4.19: Zeitabhängigkeit des *In vitro*-Transportsystems über Proteolyse. **(A):** *In vitro*-Assay mit variabler Inkubationszeit (in Minuten) bei 30 °C. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (10%-Trenngel) sowie Immunoblot-Analyse mit Emp47p-Antikörper. **(B):** Graphische Darstellung der Kinetik des Transportsystems.

4.1.3.10 Verwendung zytosolischer Fraktionen aus *sec18*-, *sec23*- bzw. *sec27*-Hefemutanten im Transportsystem

Wenn das In vitro-System den retrograden Vesikeltransport tatsächlich richtig abbildet, ist zu erwarten, daß bereits bekannte Faktoren des retrograden Vesikeltransportes den Prozeß beeinflussen. Eine Möglichkeit, diese These zu prüfen, bestand in der Verwendung von Zytosol aus Hefestämmen, bei denen ein Defekt in einem essentiellen Proteinfaktor des retrograden bzw. des anterograden Vesikeltransportes vorlag. Zu diesem Zweck wurden die temperatursensitiven Mutanten sec18-1, sec23-1 sowie sec27-1 ausgewählt. Sec18 (NSF) bewirkt eine ATP-abhängige Auflösung stabiler SNARE-Komplexe, was diesem Protein eine entscheidende Rolle bei der Vesikelfusion (Ungermann et al., 1998) und somit für den gesamten Sekretionswegs zukommen läßt. Sec23p bildet zusammen mit Sec24p einen 400 kDa großen Proteinkomplex, welcher Bestandteil der COPII-Hülle ist. Sec23p fungiert dabei als Katalysator für die GTP-Hydrolyse von Sar1p (Barlowe, 1997; Veldhuisen et al., 1997). Bei Sec27p handelt es sich um die β '-Untereinheit des COPI-Hüllkomplexes (Duden et al., 1998). Die Mutanten zeigen bei restriktiver Temperatur (37 °C) einen kompletten Block im anterograden (sec23-1) oder retrograden Vesikeltransport (sec27-1) bzw. im Falle von sec18-1 in beiden Richtungen. Für die geplanten in vitro-Experimente wurden Kulturen der Hefemutanten SEL18-10C (sec18-1), SC23-3A (sec23-1), sowie S27P4-9C (sec27-1) zunächst über Nacht bei 25 °C angezüchtet und dann in zwei Aliqouts gleichen Volumens aufgeteilt. Jeweils eines dieser Aliqouts wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, während das zweite Aliqout eine gleichlange Inkubation bei 25 °C erfuhr. Anschließend wurde das Zytosol aus sämtlichen Kulturen isoliert und in den in vitro-Assay je nach vorheriger Inkubationstemperatur entweder bei 25 °C, oder bei 37 °C eingesetzt. Das übrige Versuchsprotokoll der Transport-Assays blieb dabei unverändert. Das Ergebnis der in vitro-Experimente ist in der Abbildungen 4.20 dargestellt. Die beobachtete Transporteffizienz (TE) wurde durch die Verwendung von Zytosol aus der sec23-1-Mutante weder bei 25 °C, noch bei 37 °C signifikant verändert. Zudem konnte analog zur Wildtyp-Kontrolle eine Zunahme der Effizienz bei 37 °C beobachtet werden, was der gemessen Temperaturkurve (siehe Abbildung 4.19) entspricht. Dagegen reduzierte sich die Transporteffizienz in den anderen beiden Mutanten bereits bei 25 °C signifikant. Bei restriktiver Temperatur konnte in diesen Fällen sogar nur circa 20% des Ausgangswertes (gleich Transporteffizienz mit Wildtyp-Zytosol) gemessen werden.

B





Abbildung 4.20: Einfluß der Verwendung von Zytosol aus *sec18-1-, sec23-1-* bzw. *sec27-1-*Hefestämmen auf die Transporteffizienz **(A)** sowie dessen graphische Darstellung im

Balkendiagramm (B). (TE): Transporteffizienz. (Emp47p*): Spezifisch prozessierte Form von *Myc*-α-Emp47p. (-ATP): Ansatz ohne ATP-Regenerationssystem. (WT 25°C): Inkubation mit Wildtyp-Zytosol bei permessiver Temperatur (25 °C). (WT 37°C): Inkubation mit Wildtyp-Zytosol bei restriktiver Temperatur (37 °C). (*sec18* 25°C): Inkubation mit Zytosol aus der *sec18-1*-Mutante bei 25 °C. (*sec18* 37°C): Inkubation mit Zytosol aus der *sec18-1*-Mutante bei 25 °C. (*sec23* 25°C): Inkubation mit Zytosol aus der *sec23-1*-Mutante bei 37 °C. (*sec23* 37°C): Inkubation mit Zytosol aus der *sec23-1*-Mutante bei 37 °C. (*sec27* 37°C): Inkubation mit Zytosol aus der *sec27-1*-Mutante bei 37 °C. (*sec27 1* 37°C): Inkubation mit Zytosol aus der *sec27-1*-Mutante bei 37 °C. Die Auswertung des *In vitro*-Assays erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (10%-Trenngel) sowie Immunoblot-Analyse mit Emp47p-Antikörper.

4.2 Untersuchungen zur Funktion der BAP31- bzw. BAP29-Homologen Yet1p und Yet2p

Ein Teilaspekt dieser Dissertation bestand aus einer Charakterisierung der beiden Hefeproteine Yet1p und Yet2p (=YMR040p). Aufgrund ihrer Homologie zu den Säugerproteinen BAP31 bzw. BAP29, für die u.a. eine Funktion beim Export des *v*-SNAREs Cellubrevin (Annaert et al., 1997) sowie von Untereinheiten eines IgD-Antigenrezeptors (Adachi et al., 1996) aus dem ER postuliert wurde, konnte eine Rolle von Yet1p/Yet2p beim anterograden Vesikeltransport zwischen ER und dem Golgi-Komplex vermutet werden (siehe Einleitung). Zu Beginn der Arbeit lagen nur wenig Daten über Yet1p oder Yet2p vor. Die Gene sind nicht essentiell und beide Nullmutanten lebensfähig. Die Aminosäurensequenzen der beiden Proteine (Abbildung 4.21) weisen 48% Identität auf. Yet1p besitzt bei insgesamt 206 Aminosäuren ein putatives Molekulargewicht von 25 kDa, während Yet2p mit nur 160 Aminosäuren (19kDa) deutlich kleiner ist.



Abbildung 4.21: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Yet1p und Yet2p, welche zu 48% Identität aufweisen. Konservierte Aminosäuren sind in der Abbildung schwarz unterlegt, Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften grau. Die Klammern markieren die postulierten Transmembranregionen. Am C-Terminus der Proteine findet sich an den Positionen 203/204 (*YET1*) bzw. 158/159 (*YET2*) ein di-Lysin-Signal (KKXX). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm "Clustal V" (Higgins et al., 1991) durchgeführt.

Genau wie für die Homologen BAP31 und BAP29 werden auch für Yet1p und Yet2p jeweils drei Transmembrandomänen am N-Terminus postuliert. Drei bzw. vier Aminosäuren vom jeweiligen C-Terminus entfernt ist zudem ein mögliches di-LysinSignal zu erkennen, was zu einer ER-Lokalisation von Yet1p/Yet2p kompatibel wäre. Über die Topologie der beiden Proteine (z.B. ob sich der C-Terminus zum Zytosol ausgerichtet ist) konnte lediglich aufgrund der Homologie zu BAP31/29 Vermutungen angestellt werden.

4.2.1 Erzeugung einer yet1 yet2-Doppelmutante

Eine Erklärung für die Lebensfähigkeit der yet1- bzw. yet2-Deletionsmutante bestand in der Möglichkeit, daß beide Genprodukte das Fehlen des jeweils anderen Proteins auszugleichen vermögen. Um diese Überlegung zu überprüfen, sollte eine yet1 yet2-Doppelmutante konstruiert werden. Hefestämme, welche eine DNA-Kasette mit dem Kanamycin-Resistenzgen KanMX4 im YET1- (BY4741 yet1) bzw. YET2-Gen (BY4742 yet2) enthielten, sowie der isogene Wildtypstamm BY4741 wurden von der Firma EUROSCARF (Frankfurt am Main) erworben. Um eine yet1 yet2-Doppelmutante zu erhalten, wurden die beiden Einzelmutanten miteinander gekreuzt und die aus der Sporulation resultierenden Tetraden mit parentalem Dityp bezüglich G418-Resistenz selektiert. Das Protokoll des gesamten Verfahrens ist in den Abschnitten 3.1.8, 3.1.9 sowie 3.1.10 im Detail beschrieben. Die yet1 yet2-Doppelmutante erwies sich als lebensfähig und zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp. Eine PCR-Analyse (Abbildung 4.22) diente zur Kontrolle der mutierten Hefestämme. Die dabei verwendeten Oligonukleotide (BSY1-3/BSYET1-4 bzw. BSY2-3/BSYET2-4) waren komplementär zu flankierenden Nukleotidsequenzen an den Rändern des YET1- bzw. YET2-Gens. Je nachdem, ob eine Insertion der KanMX4-Kasette vorlag, ergab sich dadurch bei der PCR ein DNA-Fragment von circa 620/480 kb (YET1/YET2) bzw. 2170/2030 kb (yet1::KAN/yet2::KAN) Länge. In der genomischen DNA eines der selektierten Hefestämme konnte die KanMX4-Kasette tatsächlich in beiden Genen nachgewiesen werden.



Abbildung 4.22: PCR-Analyse genomischer DNA aus den Hefestämmen BY4741 (Wildtyp), BY4741 ye*t1*, BY4742 *yet2* sowie BY4741 *yet1 yet2*. **1** + **6**: *Bst*EII-geschnitten λ -Phagen-DNA als molekularer Größengewichtsstandard. **2** + **7**: Genomische DNA aus BY4741. **3** + **8**: Genomische DNA aus BY4741 *yet1*. **4** + **9**: Genomische DNA aus BY4742 *yet2*. **5** + **10**: Genomische DNA aus BY4741 *yet1 yet2*. **2 bis 5**: PCR mit den Oligonukleotiden BSYET1-3/1-4, welche komplementär zu flankierenden Sequenzen des *YET1*-Gens sind. **7 bis 10**: PCR mit den Oligonukleotiden BSYET2-3/2-4, welche komplementär zu flankierenden Sequenzen des *YET2*-Gens sind.

4.2.2 Das Wachstumsverhalten der Insertionsmutanten unter verschiedenen Umweltbedingungen

Unter dem Lichtmikrosokop sind Hefezellen der *yet1 yet2*-Doppelmutante sowie der Einzelmutanten nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen, angefertigt von Dr. H. H. Trepte, zeigten keinerlei morphologische Auffälligkeiten (hier nicht gezeigt). Das Wachstumsverhalten der mutierten Stämme weicht sowohl unter optimalen Bedingungen, als auch unter Streßbedingungen nicht vom Verhalten des isogenen Wildtyps ab. Temperaturunterschiede zwischen 15 °C und 37 °C (siehe Abbildung 4.23) haben ebensowenig einen Einfluß, wie ein Wechsel des Kulturmediums von YPEG (Vollmedium) auf SD (Minimalmedium) (Daten hier nicht gezeigt). Auch die Zugabe von DTT (1 bis 10 mM Endkonzentration) bzw. von Orthovanadat (Na₃VO₄; 1 bis 10 mM Endkonzentration), welche einen Hinweis auf eine mögliche Funktion der Yet-Proteine im Redoxhaushalt (DTT) bzw. bei der Proteinglykosylierung (Na₃VO₄; siehe hierzu Ballou et al., 1991) geben sollte, ergab keinen messbaren Wachstumsunterschied (Daten hier nicht gezeigt). Obwohl eine Senkung des pH-Wertes des Kulturmediums auf 4 nach Causton et al. (2001) zu einer erhöhten *YET2*-

Expression führt, war auch unter diesen Bedingungen keine Abweichung im Phänotyp zwischen den beobachteten Hefestämmen erkennbar (Abbildung 4.24).



Abbildung 4.23: Einfluß der Temperatur auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Hefestämme BY4741 (Wildtyp), BY4741 *yet1*, BY4742 *yet2* und BY4741 *yet1 yet2*. Für jeden Stamm wurden 4 μ l einer Vorkultur in unterschiedlicher Verdünnung (OD₆₀₀ = 10⁻³ bis maximal OD₆₀₀ = 0,5) auf eine YPEG-Agarplatte getropft. Anschließend wurden die Platten für 48 Stunden (**25 °C**, **30 °C**, **37 °C**) bzw. 120 Stunden (**15 °C**) bei der jeweils gewünschten Temperatur inkubiert. **1** = BY4741 (Wildtyp). **2** = BY4741 *yet1*. **3** = BY4742 *yet2*. **4** = BY4741 *yet1 yet2*. Der Pfeil markiert die ansteigende Konzentration der jeweils aufgetragenen Vorkultur. Unter keinen Bedingungen konnte ein abweichendes Wachstumsverhalten beobachtet werden.



Abbildung 4.24: Wachstumskurve der Hefestämme BY4741 (Wildtyp), BY4741 *yet1*, BY4741 *yet2* und BY4741 *yet1* yet2 in SD-Kulturmedium bei pH4. Die Meßreihe wurde in jeweils drei Ansätzen durchgeführt, dargestellt ist der Mittelwert. Die von Causton et al. (2001) gezeigte erhöhte Expression des *YET2*-Gens bei pH4 wirkt sich nicht auf das Wachstumsverhalten der Hefestämme aus.

4.2.3 Intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine GFP-Yet1p und GFP-Yet2p

Wegen ihrer Homologie zu den Säugerproteinen BAP31 und BAP29 sowie aufgrund ihrer Aminosäuresequenz (mögliches di-Lysin-Signal am C-Terminus) konnte für Yet1p und Yet2p eine ER-Lokalisation postuliert werden. Um diese These zu überprüfen, wurden sowohl YET1, als auch YET2 mit dem Gen des grünfloureszierenden Proteins GFP (27 kDa) aus der Qualle Aequrea victoria fusioniert, um auf diese Weise eine Lebendfärbung der Hefezelle zu ermöglichen (siehe bezüglich des Versuchsprotokolls Abschnitt 3.4.2). Über eine PCR-Reaktion (Oligonukletide BSY1-1/BSY1-2 sowie BSY2-1/BSY2-2; genomische DNA als Matrize) gewonnene DNA-Fragmente mit dem YET1bzw. YET2-Gen wurden hierfür in den Vektor pUG36 einkloniert, welcher das GFP-Gen unter der Kontrolle eines MET25-Promotors enthält. Anschließend erfolgte eine Transformation der so klonierten Plasmide pUG36-YET1 bzw. pUG36-YET2 in die Hefstämme BY4741 (Wildtyp), BY4741 yet1, BY4742 yet2 sowie BY4741 yet1 yet2. Floureszenzaufnahmen mit Abbildung 4.26 zeigt die den resultierenden Transformanden. Für beide GFP-Fusionsproteine ergab sich dabei in allen vier Stämmen eine ringförmige Struktur, welche in der Hefe Saccharomyces cerevisiae kennzeichnend für das perinukläre ER ist (siehe dazu auch die Abschnitte 3.4.2 und 4.1.4.1). GFP-Yet1p und GFP-Yet2p lokalisieren demnach sowohl im Wildtyp, als auch in den mutierten Hefestämmen in diesem Zellorganell.

Um das Ergebnis der Lebendfärbung zu bestätigen, wurden zusätzliche Zellfraktionierungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.10). Hierfür wurden Hefezellen der Stämme SSY10240 (BY4741, *GFP-YET1*), SSY10241 (BY4741, *GFP-YET2*), SSY10242 (*yet1 yet2*, *GFP-YET1*) sowie SSY10243 (*yet1 yet2*, *GFP-YET2*) zunächst bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 1,5 angezüchtet, mittels Zentrifugation geerntet und unter flüssigem Stickstoff im Mörser aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde dann vorsichtig auf einen Sukrosegradienten gegeben und für 2,5 Stunden bei 10⁵ g (4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten in dreizehn Fraktionen aufgeteilt und jeweils ein Aliqout dieser Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese (10%-Trenngel) sowie Immunoblot-Analyse mit einem spezifischem Antikörper (GFP-, Kar2p- sowie Emp47p-Antikörper) untersucht. Das Ergebnis der Fraktionierungen ist in Abbildung 4.27 graphisch dargestellt.



Abbildung 4.26: Floureszenzmikroskopie von Hefezellen der Stämme BY4741 (Wildtyp), BY4741 *yet1*, BY4742 *yet2* und BY4741 *yet1 yet2*, welche entweder *YET1-GFP* oder *YET2-GFP* expremierten. Die Lage des Zellkerns wurde jeweils durch DAPI-Anfärbung der DNA überprüft (hier nicht gezeigt). In allen acht Fällen konnte die GFP-Chimäre im ER nachgewiesen werden.

99



Abbildung 4.27: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der Fusionsproteine Yet1-GFP sowie Yet2-GFP mittels Zellfraktionierung im Sukrosegradienten. BY4741 ist der isogene Wildtypstamm der *yet1 yet2*-Doppelmutante. Aliqouts der Fraktionen des Sukrosegradienten wurden über ein 10%-SDS-Gel aufgetrennt und mit Hilfe einer Immunoblot-Analye untersucht. Yet1-GFP und Yet2-GFP co-lokalisieren mit dem ER-Marker Kar2p, nicht aber mit Emp47p.

Während Emp47p die bekannte Verteilung im Golgi (Mitte des Gradienten) und partiell auch im ER (Boden des Gradienten) aufwies, fanden sich Kar2p, Yet1p-GFP und Yet2p-GFP ausschließlich am Boden des Gradienten. Auffällig ist jedoch, daß die Lokalisation des ER-Proteins Kar2p in der letzten Fraktion ihr Maximum erreicht, während Yet1p-GFP und Yet2p-GFP in den zuvorgehenden Fraktionen besonders stark vertreten sind.

4.2.4 Intrazelluläre Lokalisation von Proteinfaktoren des anterograden bzw. retrograden Vesikeltransportes in den *yet1/2*-Deletionsmutanten

Wie in Abschnitt 4.2 bereits erwähnt, wurde für die Hefeproteine Yet1p und Yet2p aufgrund ihrer Homologie zu den Säugerproteinen BAP31 bzw. BAP29 eine Funktion im anterograden Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Komplex vermutet. Unter Berücksichtigung dieser Annahme war in Hefestämmen mit einem Defekt im *YET1*-bzw. im *YET2*-Gen eine veränderte intrazelluläre Lokalisation von Komponenten (oder Frachtmolekülen) des Vesikeltransportsystems ein möglicher Phänotyp.

Zur Bestimmung derartiger subzellulärer Umschichtungsprozesse in den *yet*-Mutanten fanden Zellfraktionierungs-Experimente Verwendung. Hefezellen der Stämme BY4741 (Wildtyp) und BY4741 *yet1 yet2* wurden hierfür zunächst bei 30 °C bis zu einer optischen Dichte (600 nm) von 1,5 angezüchtet, abzentrifugiert und unter flüssigem Stickstoff im Mörser aufgeschlossen. Das durch Zentrifugation von großen Zelltrümmern sowie

intakten Hefezellen gereinigte Lysat wurde dann auf einen Sukrosegradienten gegeben und der Gradient für 2,5 Stunden bei 10^5 g zentrifugiert. Schließlich erfolgte eine Analyse der Fraktionen des Sukrosegradienten mittels SDS-Gelelektrophorese (7%- bis maximal 12%-Trenngele) und dem Immunoblot-Verfahren. (Das detaillierte Protokol zu den Zellfraktionierungen ist in Abschnitt 3.3.10.4 beschrieben). Im Verlaufe der Untersuchungen wurde die intrazelluläre Lokalisation folgender Proteine in An- bzw. Abwesenheit von Yet1p/Yet2p betrachtet: Bet1p, Bos1p, Emp47p, Kar2p, Pep12p, Rer1p, Sec22p, Sed5p, Snc2p, Sso2p sowie Ufe1p. Die Wahl fiel auf diese Proteine, weil sie entweder eine Funktion im anterograden bzw. retrograden Vesikeltransport besitzen (siehe Tabelle 4.2), oder als molekularer Marker für ein bestimmtes Zellorganell dienen konnten (Kar2p für das ER sowie Emp47p für den Golgi-Komplex). Das besondere Augenmerk bei den Proteinfaktoren des Vesikeltransportes lag dabei auf den SNARE-Proteinen, da in einer BAP-Mutante das v-SNARE Cellubrevin fehllokalisiert wird (Annaert et al., 1997). Zudem spielte bei der Auswahl die Verfügbarkeit eines entsprechenden Antikörpers ausreichender Spezifität eine Rolle. Alle Fraktionierungen wurden insgesamt dreimal durchgeführt und für die graphisch dargestellte Auswertung jeweils der Mittelwert (inklusive Standardabweichung) gebildet.

	1	2	3
Protein:	Molekulargewicht	Transportschritt:	Proteinfamilie:
	(M _w):		
Bet1p	15,7 kDa	$\mathrm{ER} ightarrow \mathrm{Golgi}$	<i>v</i> -SNARE
Bos1p	27,5 kDa	$\mathrm{ER} ightarrow \mathrm{Golgi}$	<i>v</i> -SNARE
Pep12p	33,0 kDa	$Golgi \rightarrow Vakuole$	t-SNARE
Rer1p	22,3 kDa	$Golgi \rightarrow ER$	-
Sec22p	25,1 kDa	$\mathrm{ER} ightarrow \mathrm{Golgi}$	<i>v</i> -SNARE
		$\mathbf{Golgi} ightarrow \mathbf{ER}$	
Sed5p	38,8 kDa	$\mathrm{ER} ightarrow \mathrm{Golgi}$	t-SNARE
Snc2p	13,0 kDa	$\operatorname{Golgi} \rightarrow$	<i>v</i> -SNARE
		Plasmamembran	
Sso2p	33,7 kDa	$\operatorname{Golgi} \rightarrow$	t-SNARE
		Plasmamembran	
Ufe1p	40,5 kDa	$Golgi \rightarrow ER$	t-SNARE

Tabelle 4.2: Auflistung der Proteine des Vesikeltransportes, deren intrazelluläre Lokalisation in Abhängigkeit von der *YET1*- bzw. *YET2*-Expression mittels Zellfraktionierungs-Experimente untersucht wurde. Angegeben ist das Molekulargewicht der Hefeproteine (Spalte 1) sowie der Transportschritt, in dem sie ihre jeweilige Funktion ausüben (Spalte 2). Ob die Proteine zur Familie der Syntaxin-Homologen (*t*-SNAREs) oder zur Familie der Synaptobrevin-Homologen (*v*-SNAREs) gehören, ist der dritten Tabellenspalte zu entnehmen.

Die Proteine Bet1p, Bos1p, Rer1p und Ufe1p lokalisieren nach Fraktionierung der Gradienten im Wildtyp-Hefestamm BY4741 und in der *yet1 yet2*-Doppelmutante identisch, während im Falle von Sec22p, Pep12p, Snc2p-*myc* sowie Sso2p-*myc* geringe Unterschiede in Größenordnung der Standardabweichung festgestellt werden konnten (Daten hier nicht gezeigt). Lediglich beim Sed5-Protein, welches als *t*-SNARE für den anterograden Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Apparat fungiert (Parlati et al., 2000), zeigte sich eine signifikante Abweichung (Abbildung 4.28): Die ER-haltigen Fraktionen der *yet1 yet2*-Doppelmutante (Fraktionen 12 und 13) enthielten über 100% mehr Sed5p als die entsprechenden Fraktionen beim isogenen Wildtyp. Dieser Effekt konnte in abgeschwächter Form in beiden Einzelmutanten (BY4741 *yet1* und BY4742 *yet2*) ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 4.28.C. und 4.28.D).






Abbildung 4.29: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Sed5p in Abhängigkeit der Expression von *YET1* sowie *YET2*. Lysat aus den Hefestämmen BY4741 (WT), BY4741 *yet1*, BY4742 *yet2* sowie BY4741 *yet1 yet2* wurde über einen Sukrosegradienten (2,5 Stunden Zentrifugation bei 10⁶ g) aufgetrennt. Aliqouts der resultierenden Fraktionen wurden anschließend einer SDS-Gelelektrophorese (11% Trenngel) unterzogen und mittels Immunoblot-Analyse auf ihren Sed5p-Gehalt überprüft **(A)**. **(B):** Graphische Darstellung der Immunoblot-Analyse in den Stämmen BY4741 (WT) und BY4741 *yet1 yet2*. Der prozentuale Anteil der Sed5p-Moleküle im ER (Fraktionen 12 + 13) ist in der *yet1 yet2*-Doppelmutante um über 100% erhöht. **(C):** Graphische Darstellung der Immunoblot-Analyse in den Stämmen BY4741 *yet1* und BY4742

yet2. (**D**): Graphische Darstellung aller vier Stämme, eine Fusion der Abbildungen (**B**) und (**C**). In den Einzelmutanten ist die Menge der Sed5p-Moleküle in den ER-Fraktionen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht. Die Erhöhung ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der Doppelmutante.

4.2.5 Expression der Fusionsgene GFP-YET1 und GFP-YET2 in den Mutanten BY4741 yet1 bzw. BY4742 yet2

Die GFP-Fusionen von Yet1p und Yet2p lokalisieren im ER-Kompartiment, dem wahrscheinlichen Wirkungsbereich der endogenen Proteine (siehe Abschnitt 4.2.2). Zur Klärung der Frage, ob die GFP-Chimären Yet1p bzw. Yet2p funktionell ersetzen können, wurden Plasmide mit den entsprechenden Fusionsgenen (pUG36-*YET1* bzw. pUG36-*YET2*) in die *yet*-Einzelmutanten transformiert. In Zellfraktionierungs-Experimenten (siehe Abschnitt 3.3.10.4 bezüglich des Versuchsprotokolls) mit den resultierenden Hefestämmen BY4741 *yet1 GFP-YET1* sowie BY4742 *yet2 GFP-YET2* zeigte sich, daß die Wildtyp-Verteilung des anterograden *t*-SNAREs Sed5p wiederhergestellt wurde (Abbildung 4.30). Ein vermehrtes Auftreten von Sed5p im ER, welches in den *yet*-Einzelmutanten ohne GFP-Fusionsproteine nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.29.A und 4.29.C), wurde nicht mehr beobachtet. GFP-Yet1p und GFP-Yet2p können daher zumindest bezüglich der intrazellulären Sed5p-Verteilung als funktionell betrachtet werden.





Abbildung 4.30: Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Sed5p in den Hefestämmen BY4741 (WT), BY4741 *yet1*, BY4741 *yet1 GFP-YET1*, BY4742 *yet2* sowie BY4742 *yet2 GFP-YET2*. Lysat aus den Hefen wurde zunächst über einen Sukrose-gradienten (2,5 Stunden Zentrifugation bei 10⁶ g) aufgetrennt. Aliqouts der daraus resultierenden Fraktionen wurden anschließend einer SDS-Gelelektrophorese (11% Trenngel) unterzogen und mittels Immunoblot-Analyse auf ihren Sed5p-Gehalt getestet **(A)**. **(B):** Graphische Darstellung der Analyse in den Stämmen BY4741 (WT), BY4741 *yet1* sowie BY4741 *yet1 GFP-YET1*. **(C):** Graphische Darstellung der Analyse in den Stämmen BY4741 (WT), BY4742 *yet2* sowie BY4741 *yet2 GFP-YET2*.

5. Diskussion

5.1 Entwicklung eines *In vitro*-Transport-Assays für den retrograden Vesikeltransport

Die In vitro-Rekonstitution des membranvermittelten Proteintransportes zwischen dem Golgi-Komplex und dem ER sollte einen Einblick in die molekularen Mechanismen dieses speziellen intrazellulären Transportschrittes ermöglichen. Das Ziel dieser Arbeit bestand insbesondere darin, mit dem In vitro-System eine Methode zu entwickeln, genetisch identifizierte Faktoren hinsichtlich einer möglichen Funktion innerhalb des retrograden Vesikeltransportes zu analysieren (siehe hierzu auch Abschnitt 1.6). Für die geplante In vitro-Rekonstitution wurde das lektinähnliche di-Lysin-Protein Emp47p (siehe Abschnitt 4.1.1) bzw. spezifische Proteinfusionen von Emp47p (Abschnitte 4.1.2 sowie 4.1.3) als molekulare Reporter ausgewählt. Wie bereits geschildert, zirkuliert Emp47p infolge seines C-terminalen di-Lysin-Transportsignals zwischen ER und Golgi, liegt aber im Gegensatz zur Mehrzahl bekannter di-Lysin-Proteine überwiegend im Golgi-Apparat vor (Schröder et al., 1995). Emp47p lokalisiert somit am Ausgangspunkt des retrograden Vesikeltransportes, was die Beobachtung einer Umverteilung von Emp47p bzw. von Emp47p-basierten Reporterproteinen in das Zielkompartiment ER erleichtert. Im Verlaufe dieser Arbeit fanden insgesamt drei unterschiedlich konzipierte Verfahren zum Nachweis einer solchen Umverteilung Anwendung.

5.1.1 Durch Sedimentationsanalyse kann *in vitro* eine mittlere Umverteilung von 20% beobachtet werden

ER- und Golgi-Membranen können aufgrund ihrer unterschiedlichen spezifischen Dichte durch eine differentielle Zentrifugation voneinander getrennt werden (Gaynor et al., 1994; Schröder et al., 1995). Ein erster Versuchsansatz für den geplanten *In vitro*-Assay des retrograden Golgi-ER-Vesikeltransportes basierte daher auf einer einfachen Sedimentationsanalyse, um die intrazelluläre Lokalisation des Emp47-Reporterproteins im Experiment verfolgen zu können. Als Result ergab sich unter Standardbedingungen eine durchschnittliche Golgi-ER-Umverteilung von Emp47p in Höhe von circa 40% in Bezug auf die insgesamt vorhandene Reportermenge. Dagegen konnte in den begleitenden Kontrollen nur 15% bis 20% der Emp47p-Moleküle in der ER-haltigen Pelletfraktion beobachtet werden. Der Grund, weshalb in keinem der Kontrollexperimente ein Wert von 0% erreicht wurde, ist vermutlich in einer partiellen CoPelletierung von Golgi-Membranen selbst bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von lediglich 5000 *g* zu suchen. Hierfür spricht die Beobachtung, daß eine solche Co-Pelletierung auch dann beobachtet werden konnte, wenn ER-Membranen im Versuchsansatz fehlten (Daten nicht gezeigt). Unter Berücksichtigung der Kontrollansätze ergab sich für die mittlere Umverteilung der durchgeführten *In vitro*-Assays ein Nettowert von circa 20%, was ungefähr der maximalen Effizienz des "Enriched ER assay" (22,5%) entspricht (Baker et al., 1988; Wuestehube & Schekman, 1992). Dieses Ergebnis kann als ein erster wichtiger Hinweis darauf gewertet werden, daß retrograder Vesikeltransport *in vitro* prinzipiell darstellbar ist. Einen echten Beweis für einen erfolgten Golgi-ER-Vesikeltransport stellen die Beobachtungen jedoch nicht dar, da aufgrund des Versuchsprinzips nicht die Möglichkeit besteht, zwischen echten Fusionsereignissen und einer Adhäsion von COPI-Vesikeln bzw. einer Adhäsion ganzer Golgi-Membranen an die ER-Membran zu unterscheiden.

5.1.2 Transportnachweis durch Glukosidase1-Aktivität – Fusionsproteine von Emp47p mit N-glykosylierten Proteinen werden hyperglykosyliert

Die Synthese der Kohlenhydratketten von N-Glykanen beginnt im ER-Organell mit der co-translationalen Übertragung eines in allen Eukaryonten identischen Oligosaccharid-Grundgerüstes (Glc₃Man₉GlcNAc₂) auf einen spezifischen Aspartat-Rest des wachsenden Polypeptides. Noch im ER katalysiert das Glukosidase1-Enzym die Abspaltung des ersten Glukoserestes von diesem Grundgerüst, worauf Glukosidase2 die restlichen zwei Glukosereste ebenfalls entfernt (Helenius & Aebi, 2001). In gls1-Hefestämmen, denen die Glukosidase1-Aktivität fehlt, verbleiben alle drei Glukosereste weiterhin an der Kohlenhydratkette (Esmon et al., 1984; Latterich und Schekman, 1994). Die drei Glukosereste werden dagegen korrekt abgespalten, wenn ER aus einer gls1-Mutante mit Wildtyp-ER fusioniert (Esmon et al., 1984). Als Konsequenz dieser Beobachtungen sollte sich in einem In vitro-System mit gls1-Golgi und Wildtyp-ER die Lokalisation eines Glykoproteins direkt aus seinem Glukosylierungsniveau bestimmen lassen. Basierend auf dieser Überlegung, beinhaltete das zweite Konzept für einen In vitro-Assay des retrograden Vesikeltransportes (siehe Abschnitt 4.1.2) die Verwendung eines Hybrides aus einem N-glykosylierten Protein mit dem Emp47-Protein, welches selbst keiner Glykosylierung unterliegt, als molekularen Reporter. Das Ziel der Fusionierung bestand darin, einem Glykoprotein die intrazellulären Transporteigenschaften des Emp47-Proteins zu verleihen und es so ebenfalls zwischen Golgi- und ER-Kompartiment zirkulieren zu lassen. Für die geplante Fusion fiel die Wahl auf die Glykoproteine Cne1p, pCPY (Pro-Carboxypeptidase Y) und Spc3p, da diese Proteine in Relation zu ihrem Molekulargewicht vergleichsweise viele Glykosylierungsstellen aufweisen (Klionsky et al., 1990; Parlati et al., 1995; Meyer & Hartmann, 1997). Letztere Eigenschaft war von besonderer Bedeutung für die im späteren Verlauf des Assays notwendige gelelektrophoretische Auftrennung der glukosylierten (3 Glukosereste pro Oligosaccharid-Kette) und deglukosylierten Form (keine Glukosereste) der resultierenden Chimäre.

Wie sich in Kontrollexperimenten (siehe Abbildung 4.4) zeigte, erfuhr der überwiegende Anteil aller drei Fusionskonstrukte jedoch keine diskrete Glykosylierung (wie im Falle der Ausgangsproteine), sondern eine deutliche Hyperglykosylierung. Letztere ist in der Bäckerhefe von bestimmten Plasmamembran-, Zellwand- oder Sekretproteinen bekannt (Munro,2001) und machte eine Differenzierung zwischen den unterschiedlich stark glukosylierten Proteinformen unmöglich, da lediglich im Falle der diskreten Glykosylierung der relative Größenunterschied hierfür ausreichend ist. Die genauen Mechanismen der Glykosylierungs-Termination in der Hefe sind noch unbekannt, wahrscheinlich spielen jedoch mehrere Faktoren wie z.B. spezifische Zuckerreste am Ende der Oligosaccharid-Kette (α-1,2-*linked* Mannose), die sterische Zugangsmöglichkeit spezifischer Glykosyltransferasen oder auch die Wanderungsgeschwindigkeit des Glykoproteins durch ER und Golgi-Komplex eine Rolle (Dean, 1999). Möglicherweise bedingte die Fusion der N-Glykane mit Emp47p eine Änderung in der Tertiärstruktur der Glykoproteine, welche umfangreich genug war, um zu einer Nichterkennung der vorhandenen Terminationssignale zu führen. Die von Muniz et al. (2001) beschriebene Inkorporation von Frachtproteinen des anterograden Transportweges in unterschiedliche Vesikelpopulationen bietet den Ansatz für eine weitere Erklärungsmöglichkeit: Die Hybridproteine könnten möglicherweise in andere Vesikel als die Ausgangsproteine sortiert und infolgedessen andere Golgi-Abschnitte (mit anderen Glykosyltransferasen) erreicht haben. Interessanterweise zeigt auch eine Emp47p-Mutante, welche nur eine einzige Stelle für N-Glykosylierung aufweist, Hyperglykosylierung (Schröder et al., 1995). Zusammen sind diese Beobachtungen in Einklang mit der Vorstellung, daß es unterschiedliche Golgi-Zisternen gibt, zu denen ein selektiver Zugang besteht. Eine Überführung der Hyperglykosylierung in eine diskrete Glykosylierung kam aufgrund praktischer Überlegungen nicht in Betracht, da hierzu eine nicht verfügbare Endo-Mannanase notwendig gewesen wäre. Neben der Hyperglykosylierung trat zudem das Problem auf, daß der tatsächlich beobachtbare Größenunterschied zwischen der glykosylierten Form der Fusionsproteine und der durch EndoH-Behandlung gänzlich deglykosylierten Variante deutlich kleiner war, als erwartet (Abbildungen 4.4). Im Falle der lediglich unterschiedlich glukosylierten Proteinformen befand sich der Größenunterschied damit am Rande der experimentellen Nachweisbarkeit (Abbildung 4.5). Die geringe Differenz im Molekulargewicht ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in den Chimären nicht diesselbe Anzahl potentieller N-Glykosylierungsstellen genutzt wird, wie in den Ausgangsproteinen. Aufgrund der geschilderten Problematiken wurde das Transportsystem über Glukosidase1-Aktivität schließlich zugunsten eines proteolytischen Nachweisverfahrens (Abschnitt 4.1.3) aufgegeben.

5.1.3 Nachweis des retrograden Vesikeltransportes über Proteolyse

Der dritte Ansatz für ein zellfreies *In vitro*-Transportsystem sah zum eindeutigen Beleg des retrograden Vesikeltransportes eine ER-spezifische Proteolyse des Reportermoleküls vor. Um diese Zielstellung zu erreichen, sollte einerseits ein Reporterkonstrukt aus dem Hefepheromon α -Faktor und Emp47p hergestellt (siehe Abbildung 4.7) werden, wobei die intrazellulären Transporteigenschaften von Emp47p erhalten bleiben mußten. Zudem sollte die α -Faktor-prozessierende, periplasmatische Bar1p-Protease durch Fusion mit einem integralen, nicht zyklierenden ER-Membranprotein an das ER fixiert werden (siehe Abbildung 4.12). Theoretische Grundlage des geplanten *In vitro*-Assays waren Arbeiten von Ballensiefen und Schmitt (1997), welche belegten, daß die Bar1p-Protease α -Faktor-Konstrukte mit Sec12p und Sec22p zu spalten vermag und zudem bereits innerhalb des ER enzymatisch aktiv ist. Aus der geplanten ER-spezifischen Prozessierung von α -Faktor-Emp47p sollte eine experimentell nachweisbare Molekulargewichtsabnahme des Reporters von rund 1,7 kDa (15 Aminosäuren) resultieren. Das Funktionsprinzip des proteolytischen Nachweissystems ist in Abbildung 4.6 schematisch dargestellt.

5.1.3.1 Das α -Faktor-Emp47p-Reporterkonstrukt

Vor ihrer Verwendung im eigentlichen *In vitro*-Assay wurden die Reporterkonstrukte zunächst in Kontrollexperimenten daraufhin überprüft, ob sie als Substrat der endogenen Bar1p- (α-Emp47p, *Myc*-α-Emp47p) bzw. der Kex2p-Protease (α-KS-Emp47p) dienen konnten und ob sie über die gleichen intrazellulären Transporteigenschaften wie Emp47p verfügten (siehe hierzu auch Abschnitt 4.1.3.1).

Um die erste Fragestellung zu klären, wurden die Gene der drei unterschiedlichen Reporterkonstrukte in Hefestämmen expremiert, welche die endogenen Proteasen Bar1p und Kex2p einzeln bzw. gemeinsam enthielten. Eine Immunoblot-Analyse des Totallysates aus diesen Hefezellen mit spezifischem Emp47p-Antikörper zeigte, daß die Konstrukte von den Proteasen *in vivo* tatsächlich spezifisch erkannt und vollständig prozessiert wurden (Abbildung 4.8). Die im Blot beobachtbaren Größenunterschiede zwischen den geschnittenen und ungeschnittenen Formen der Reporterfusionen entsprachen dabei den theoretisch berechneten Erwartungswerten. Die *In vivo*-Prozessierung der Emp47p-Reporterkonstrukte durch die endogenen Proteasen gab daher einen wichtigen ersten Hinweis darauf, daß eine *In vitro*-Spaltung durch die geplanten Proteasehybride überhaupt möglich war.

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Myc-a-Emp47p fanden die Methoden der Immunfloureszenz-Analyse (mit Myc- bzw. spezifischem Emp47p-Antikörper; Abbildung 4.9) sowie der subzellulären Zellfraktionierung im Dichtegradienten (Abbildung 4.10) Anwendung. In beiden Fällen konnte das Reporterkonstrukt hauptsächlich im Golgi-Kompartiment sowie in einem deutlich geringem Maße auch im ER nachgewiesen werden. Dieses Verteilungsschema ist in Übereinstimmung mit der Lokalisation des endogenen Emp47-Proteins, welches im Fließgleichgewicht mehrheitlich im Golgi vorliegt. Aufbauend auf diesem Ergebnis, diente der sogenannte "Vesicle budding assay" (Spang & Schekman, 1988) dazu, die Integration von *Myc*-α-Emp47p in COPI-Vesikeln zu zeigen. Wie sich in den *In vitro*-Experimenten zeigte, konnte das Reporterkonstrukt Myc-α-Emp47p nur dann in den Vesikel-haltigen Fraktionen nachgewiesen werden, wenn der Assay bei optimaler Inkubationstemperatur unter Verwendung sämtlicher Versuchskomponenten durchgeführt wurde (Abbildung 4.11.A und 4.11.B), was für eine spezifische Inkorporation des Fusionsproteins in COPI-Vesikel spricht. Wie in Abschnitt 4.1.3.2 bereits erwähnt, konnte in Abwesenheit von GTPγS keine Myc-α-Emp47p-haltigen Vesikel beobachtet werden, obwohl die Chemikalie keinen Einfluß auf die Vesikelabknopsung ausübt. Das nicht hydrolysierbare GTP-Analog GTP₇S arretiert ARF1 in die GTP-gebundenen Form, was zu einer erhöhten Lebensdauer des assemblierten Hüllkomplexes und somit auch des Vesikels selbst führt, welches nicht mehr mit zu fusionieren vermag (Pepperkok et al., 1988; Lanoix et al., 1999). Die aus der GTP_yS-Verwendung resultierende fehlende Fusionskompetenz ist auch der Grund, weshalb eine Weiterverwendung der isolierten COPI-Vesikel zum Zweck einer Verschmelzung mit ER-Membranen nicht in Betracht kam. Möglicherweise sind hüllenlose COPI-Vesikel unter den gewählten *In vitro*-Bedingungen zu kurzlebig, um im Immunoblot des Assays ein sichtbares Signal zu erzeugen. Unabhängig davon deutet die Anwesenheit von *Myc*- α -Emp47p in den COPI-Vesikel darauf hin, daß das Hybridprotein einer COPI-abhängigen Rezyklierung unterliegt, demnach also die gleichen dynamischen Transporteigenschaften wie das endogene Emp47p aufweist.

5.1.3.2 Die Bar1p-Fusion

Die Aufgabenstellung bei der Konzipierung des sogenannten Proteasekonstruktes bestand darin, die α-Faktor-prozessierende periplasmatische Bar1p-Protease an das ER-Kompartiment zu binden. Bar1p sollte durch die Verbindung mit einem beständig im ER-lokalisierten, integralen Membranprotein an das ER fixiert werden, ohne dabei ihre spezifische Enzymaktivität zu verlieren. Um eine ausreichend hohe zelluläre Konzentration des Fusionsproteins zu erreichen, war es zudem wichtig, daß die resultierende Bar1p-Chimäre keiner raschen Degradation unterlag und die Expression ihres Gens im erforderlichen Maße erfolgte. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, daß die Bar1p-Fusion tatsächlich alle notwendigen Kriterien erfüllen konnte, sollten Varianten mit verschiedenen ER-Proteinen hergestellt werden. Für die Fusion mit Bar1p wurden schließlich die TypI-integralen Membranproteine Cne1p, Cue1p, Sec66p und Wbp1p ausgewählt, da für deren stabile ER-Lokalisation zu Beginn der Arbeiten bereits verlässliche Daten vorlagen. Die Klonierung der Chimären wurde dabei so durchgeführt, daß die Bar1p-Protease sich am N-Terminus der Proteinfusion und somit innerhalb des ER-Lumens befand. Grund hierfür war die Orientierung des Emp47p-Reporterkonstruktes innerhalb der ER-Membran, dessen α -Faktor-haltiger N-Terminus ebenfalls in das Lumen weist (siehe Abbildungen 4.6 und 4.12).

Die *In vivo*-Aktivität der Bar1p-Konstrukte konnte durch Expression der jeweiligen Fusionsgene in einem *Myc*-α-Emp47p-produzierenden Hefestamm kontrolliert werden. Während das *BAR1-WBP1*-Gen keinerlei enzymatische Aktivität erzeugte (Abbildung 4.13.A), prozessierten Bar1-Cne1p und Bar1-Cue1p die vorhandenen *Myc*-α-Emp47p-Moleküle nahezu vollständig (Abbildung 4.13.C). In den Bar1-Sec66-Hefestämmen lagen schließlich rund 50% der Reporterkonstrukte in ihrer geschnittenen Form vor (Abbildung 4.13.B). Die Gründe für die signifikanten Unterschiede in der Proteaseaktivität der unterschiedlichen Bar1p-Fusionen sind unbekannt und können z.B. in der Proteinfaltung sowie in der damit zusammenhängenden Proteinstabilität liegen. Weitere mögliche Erklärungen sind abweichende Expressionsniveaus der Gene oder auch eine Fehllokalisation der Proteasekonstrukte. Insbesondere im Falle der Bar1-Sec66pproduzierenden Hefestämme konnten jedoch zum Teil auch deutlich abweichende Prozessierungsraten in Hefekulturen festgestellt werden, welche dieselbe Bar1p-Fusion enthielten. Letztere Beobachtung ist vermutlich Folge der Verwendung eines Integrationsvektors zur Einschleusung der *BAR1*-Fusionsgene. Hierdurch können eine erhöhte Kopienzahl durch gleich mehrfache Integration des Fusionsgens in das Hefegenom bzw. eine Integrationen an verschiedenen Stellen des Genoms (was den Einfluß unterschiedlicher *cis*-Elemente auf die Genexpression bedingt) nicht ausgeschlossen werden und sind insofern mögliche Erklärungen für differierende Expressionsniveaus.

Wie erwähnt, war neben der Proteaseaktivität auch die intrazelluläre Lokalisation der Bar1p-Chimäre für die Funktion des geplanten In vitro-Assays von entscheidender Bedeutung. Der vorgesehene Nachweis des retrograden Vesikeltransportes basierte auf einer ausschließlich im ER ablaufenden Prozessierung des Reporterkonstruktes - die Bar1p-Fusion durfte also nicht das ER-Organell verlassen und den Golgi-Komplex erreichen. Eine einfache subzelluläre Fraktionierung lieferte den ersten Hinweis auf die korrekte intrazelluläre Fraktionierung des Bar1p-Konstruktes. Hierbei co-fraktionierte die Bar1-Cne1p-Fusion, welche zum immunologischen Nachweis ein zusätzliches Myc-Epitop enthielt, zusammen mit dem ER-Markerprotein Kar2p, nicht aber mit Emp47p (Abbildung 4.14). Die ER-Lokalisation des Proteasehybrides wurde im späteren Verlauf der Arbeit mehrfach bestätigt, so u.a. in einem sogenannten "Pulse Chase"-Experiment. Letzteres diente dazu, die Zeitabhängigkeit der beobachteten In vivo-Proteaseaktivität der Bar1-Cne1p-Fusion zu untersuchen. Mit Hilfe dieses Experimentes sollten Hinweise dafür gefunden werden, ob eine Prozessierung des Myc-α-Emp47p-Konstruktes nach Ablauf retrograden Transportes (und damit die Durchführbarkeit des geplanten In vitro-Assays) überhaupt möglich ist, oder ob die Spaltung des α-Faktors ausschließlich cotranslational erfolgen kann. Hierfür wurde über einen Zeitraum von insgesamt siebzig Minuten der relative Anteil der geschnittenen Form von *Myc*-α-Emp47p in einem Hefestamm verfolgt, welcher sowohl das Reporter-, als auch das Proteasekonstrukt enthielt. Wie sich zeigte, lagen bereits fünf Minuten nach Beginn der "Chase"-Reaktion fünfzig Prozent der Reportermoleküle prozessiert vor, während es nach siebzig Minuten rund 78% waren (Abbildung 4.15.A). Aus der graphischen Darstellung des "Pulse chase"-

Experimentes (Abbildung 4.15.B) ergibt sich ein Kurvenverlauf, welcher die Beteiligung von gleich zwei Komponenten unterschiedlicher Kinetik an der Prozessierung nahelegt. Die Tatsache, daß der anhand des Kurvenverlaufes extrapolierte Wert nach der "Pulse"-Phase von zwei Minuten 40% Prozessierung ergab, deutet auf co-translationale Spaltung hin. Schröder et al (1995) haben gezeigt, daß Emp47p den Golgi-Apparat innerhalb von fünf Minuten nach Synthese erreicht. Die nach fünf Minuten ablaufende, relativ langsame Spaltung beruht daher auf einer post-translationalen Prozessierung von Reportermolekülen. Damit wurden zweierlei Erkenntnisse gewonnen: 1. Die Existenz einer co-translationalen Spaltung belegt eine (zumindest partielle) ER-Lokalisation der Bar1p-Fusion. 2. Die Möglichkeit einer post-translationalen Prozessierung, welche eine entscheidende Voraussetzung für den geplanten Assay darstellt, ist gegeben. Im Kontext der Transporteigenschaften von Emp47p deutet die Spaltungskinetik zudem daraufhin, daß diese post-translationale Prozessierung an Substratmolekülen erfolgen kann, die einen kompletten Transportzyklus (ER \rightarrow Golgi \rightarrow ER) durchlaufen haben. Diese Interpretation wurde später durch direkte *In vitro*-Experimente bestätigt. Um dies auch in vivo zu zeigen, könnte man eine Variation des "Pulse Chase"-Experimentes durchführen, bei der man einen Myc-α-Emp47p/Cne1/Bar1p-produzierenden Hefestammes mit einer zusätzlichen temperatur-sensitiven sec27-Mutation einsetzt. In einer solchen Kontrolle sollte der sec27-bedingte Block im Golgi-ER-Transport den langsamer ablaufenden Spaltungsprozeß komplett inhibieren.

5.1.3.3 Das *In vitro*-Transportsystem mit Hilfe des proteolytischen Nachweisverfahrens

Der *In vitro*-Assay mittels Proteolyse enthielt unter Standardbedingungen Golgi-Membranen, ER-Membranen, Zytosol sowie ein ATP-Regenerationssystem, wobei die Golgi-Fraktion das *Myc*-α-Emp47-Konstrukt und das ER die Bar1p-Proteasefusion aufwiesen. Keines der aufgereinigten subzellulären Kompartimente beinhaltete dagegen das endogene Emp47p, welches sich gelektrophoretisch nicht von der geschnittenen Form des Reporterkonstruktes unterscheiden ließ. Ein funktioneller *In vitro*-Assay für den retrograden Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Komplex mußte folgende Anforderungen erfüllen: Abhängigkeit von Temperatur, Zeit, Zytosol, ER- bzw. Golgi-Membranen und COPI sowie Unabhängigkeit von COPII. Daher wurde parallel zu den eigentlichen *In vitro*-Assays Kontrollexperimente durchgeführt, denen eine essentielle Versuchskomponente im Ansatz fehlte (Zytosol, ER oder das ATP-Regenerationssystem), 10 mM GTP γ S (Endkonzentration) zugeführt wurde oder deren Inkubationstemperatur lediglich 0 °C betrug. Unter Standardbedingungen ergab sich in den *In vitro*-Assays ein relatives Mengenverhältnis der geschnittenen Form von *Myc*- α -Emp47p von 15% bis maximal 35% in Bezug auf die Gesamtmenge der vorhandenen Reportermoleküle. Verursacht durch Degradationsprodukte von *Myc*- α -Emp47p, welche sich infolge der notwendigen Präparationsmethode ohne Proteaseinhibitoren nicht gänzlich vermeiden ließen, wurde in den Kontrollen ein Wert von circa 5% bestimmt. Die resultierende Netto-Transporteffizienz von 10% bis 30% befand sich demnach in der ungefähren Größenordnung der beim "Enriched ER assay" (Baker et al., 1988) und beim Transportsystem mittels Sedimentationsanalyse (siehe 5.1.1) gemessenen Effizienzgrade. Die Gründe für die signifikanten Schwankungen bei der beobachteten Transporteffizienz des Assays sind vermutlich in der Präparation zu suchen, deren jeweilige Ausführung sich entscheidend auf die Aktivität der aufgereinigten Membranen auswirkte.

Um die theoretische Möglichkeit zu widerlegen, daß in den *In vitro*-Assays anstelle eines retrograden Transportes des Reporterkonstruktes ein anterograder Transport der Bar1p-Fusion stattfand, wurde das proteolytische Nachweissystem mit der Methode der Sedimentationsanalyse gekoppelt. Hierfür wurden die jeweiligen Versuchsansätze des *In vitro*-Assays nach Beendigung der Inkubation zentrifugiert, um so ER- (Pelletfraktion) und Golgi-Membranen (Überstand) voneinander zu trennen. Während die Degradationsprodukte von Myc- α -Emp47p in der Golgi- und Zytosol-haltigen Überstandfraktion verblieben, konnte die geschnittene Form des Reporters dagegen ausschließlich in der Pelletfraktion (ER) nachgewiesen werden. Die Prozessierung findet demnach lediglich im ER statt und ist somit ein Beleg für einen erfolgten retrograden Vesikeltransport *in vitro*.

Zur Optimierung des *In vitro*-Systems wurde der Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Effizienz des Assays (= Produkt aus Proteolyse- und Transporteffizienz) näher untersucht. Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wurde die Inkubation der *In vitro*-Assays bei Temperaturen zwischen 0 °C bis 50 °C durchgeführt (Abbildung 4.18). Die maximale Prozessierung des α -Emp47p-Reporters (rund 20% der Gesamtmenge) wurde bei 30 °C, der optimalen Wachstumstemperatur der Bäckerhefe *S.cerevisiae*, erreicht. Eine Temperaturerhöhung auf 37 °C ließ die Effizienz lediglich geringfügig sinken, während eine Erniedrigung auf 25 °C sie deutlich stärker beeinträchtigte (lediglich circa 10% der Reporterproteine gespalten). Jenseits von circa 40 °C kam es zu

einer drastischen Reduktion der Prozessierung, während sie bei Temperaturen zwischen 25 °C und 0 °C deutlich langsamer absank. Der *In vitro*-Assay bildet demnach die Temperaturabhängigkeit des Wachstums der Bäckerhefe ab, was der Überlegung entspricht, daß unter günstigen Wachstumsbedingungen der vesikuläre Proteintransport in maximalem Umfang abläuft. Unterhalb von 30 °C werden die vesikulären Transportprozesse nicht gänzlich gehemmt, sondern laufen vermutlich mit dem Absinken der Inkubationstemperatur langsamer ab. Der abrupte Einbruch der Transporteffizienz jenseits von 40 °C ist dagegen wahrscheinlich in der hitzebedingten Inaktivierung einzelner Proteinfaktoren des Transportsystems begründet.

Neben der Temperatur wurde in weiteren *In vitro*-Experimenten auch die Inkubationszeit im Transportsystem variiert (Abbildung 4.19). Die graphische Darstellung der Zeitabhängigkeit ergab eine Sättigungskurve (Abbildung 4.19.B), wobei die maximale Signalstärke nach 45 Minuten erreicht wurde (t^{1/2} = 22 Minuten). Der zeitliche Ablauf der Prozessierung ist somit weitaus schneller, als beim "Enriched ER assay" (Baker et al., 1988), welcher für den anterograden ER-Golgi-Transport entwickelt wurde und wo die höchste Transporteffizienz erst nach 120 Minuten beobachtet werden konnte. Damit liegt die Kinetik der beobachteten Spaltung sehr nahe an der Halbwertszeit, die *in vivo* für den Rücktransport von Emp47p vom Golgi zum ER beobachtet wurde (ca. 30 Minuten; Schröder et al., 1995). Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis auf die Effizienz und Abbildungstreue des Assays.

Eine weitere Anforderung an ein *In vitro*-System für den retrograden Vesikeltransport stellte die Abbildung etablierter Funktionen bekannter Transportfaktoren dar. In den abschließenden *In vitro*-Experimenten dieser Arbeit der Einfluß wurde daher der Einfluß zytosolischer Proteinfaktoren des anterograden bzw. retrograden Vesikeltransportes auf das Transportsystem getestet. Im Ergebnis (Abbildung 4.20) zeigte sich, daß die Verwendung von Zytosol aus der *sec18-1-* bzw. der *sec27-1-*Mutante bereits bei 25 °C zu einer schwachen Reduktion der Effizienz führte. In Relation zum *In vitro*-Assay mit Wildtyp-Zytosol lag diese bei rund 58% (*sec18-1*) bzw. 80% (*sec27-1*). Bei restriktiver Temperatur sank die Effizienz sogar auf lediglich 26% (*sec18-1*) bzw. 25% (*sec27-1*) des Wildtyp-Wertes. Die Tatsache, daß bei 37 °C kein völliges Ausbleiben der Prozessierung beobachtet wurde, kann vermutlich auf eine Restaktivität von Sec18- bzw. Sec27-Proteine im mutanten Zytosol bzw. auf eine geringfügige Kontamination der Membranfraktionen mit Wildtyp-Zytosol zurückgeführt werden. Eine Verwendung (mit einer adäquaten Salzlösung) gewaschener Membranen könnte zur Reduktion des Kontrollwertes beitragen. Im Gegensatz zu Sec18p und Sec27p führt die Abwesenheit des COPII-Hüllproteins Sec23p zu keiner signifikanten Änderung in der Prozessierungsrate des Reportermoleküls. Die *In vitro*-Assays mit Zytosol aus der *sec23*-Mutante weisen die gleiche Temperaturabhängigkeit (Effizienz bei 25 °C > Effizienz bei 37 °C) wie die Assays mit Wildtyp-Zytosol auf. Mehrfache Zyklen von *Myc*- α -Emp47p zwischen ER und Golgi-Komplex können demnach ausgeschlossen werden, was infolge des Erreichens der maximalen Transporteffizienz nach nur 40 Minuten (siehe oben) bereits vermutet werden konnte. Zusammenfassend bestätigen die Beobachtungen, daß der *In vitro*-Assay die bekannten Funktionen von Sec18p/27p/23p abbildet und die geforderte COPII-Unabhängigkeit aufweist. Zudem unterstreicht die Tatsache, daß die Prozessierungsrate von der Anwesenheit des Proteins Sec23p unabhängig ist, daß die Spaltung des Reporters nicht durch anterograden Transport der Protease zum Substrat im Golgi-Komplex zustande kommt.

5.1.3.4 Das *In vitro*-Transportsystem im Vergleich – Möglichkeiten und Ausblick

Zellfreie In vitro-Systeme zur Darstellung intrazellulärer Transportprozesse basieren auf einer zeitabhängigen Bestimmung der Lokalisation bzw. Modifikation eines spezifischen Reporterproteins, welches als Fracht im jeweils interessierenden Transportschritt fungiert. Beispiele für derartige molekulare Reporter sind z.B. das virale VSV-G-Protein für den intra-Golgi-Transport (Balch et al., 1984; Happe und Weidman, 1998) oder die Carboxypeptidase CPY für den Golgi-Vakuole-Transport (Vida et al., 1990; Vida und Gerhardt, 1999). Der 1988 von Baker et al. für den anterograden ER-Golgi-Vesikeltransport konzipierte "Enriched ER assay" fand als methodische Grundlage für eine ganze Reihe weiterer In vitro-Systeme für diesen speziellen Transportschritt Verwendung. Je nachdem, welcher Aspekt des anterograden Vesikeltransportes dabei untersucht werden sollte, enthielten diese In vitro-Assays spezielle Änderungen bzw. Erweiterungen des in Abschnitt 1.7 skizzierten Versuchsprinzips. In allen Fällen diente jedoch genau wie beim "Enriched ER assay" das Glykosylierungsniveau eines radioaktiv markierten Reportermoleküls ([³⁵S]-prepro-α-Faktor kurz [³⁵S]ppα) als Indikator für dessen subzelluläre Lokalisation. So entwickelten Latterich und Schekman (1994) einen In vitro-Assay zur Rekonstitution homotypischer ER-Fusion, wobei ER-Membranen aus Wildtyp-Hefe sowie aus einer *gls1-1-*Mutante eingesetzt wurden. Unter Verwendung von aufgereinigten Proteinfaktoren anstelle einer vollständigen Zytosolfraktion, konnte Barlowe (1997) Uso1p, Sec18p und LMA1 als essentielle und genügende Komponenten der Fusion von COPII-Vesikeln mit dem Golgi-Apparat nachweisen. Cao und Barlowe (2000) nutzten Akzeptor- und Donormembranen aus verschiedenen Hefemutanten, um die intrazelluläre Wirkungsstätte bestimmter SNARE- bzw. Rab-Proteine zu identifizieren.

Während der Arbeit an vorliegender Dissertation publizierten A.Spang und R.Schekman (Spang & Schekman, 1998) einen alternativen *In vitro*-Assay zur Rekonstitution des retrograden Vesikeltransportes (siehe Abbildung 5.1). Dieser Assay (im weiteren Verlauf der Diskussion als Spang-Assay bezeichnet) basiert auf dem Nachweisverfahren des ursprünglichen "Enriched ER assay" und soll - im Sinne einer vergleichenden Betrachtung - an dieser Stelle kurz erläutert werden (Abbildung 5.1).

Zentraler Punkt des Systems ist eine Fusion des [35S]-ppa-Reportermoleküls mit einem HDEL-Signal (siehe Abschnitt 1.4.2), wodurch das resultierende Konstrukt nach erfolgtem anterograden Vesikeltransport einer Erd2p-abhängigen Rückführung in das ER-Kompartiment unterliegt. Die erste Phase des Assays besteht aus der In vitro-Translation des $[^{35}S]$ -markierten pp α -HDEL-Reporterproteins, sowie aus dessen anschließender Translokation in das Lumen isolierter ER-Membranen (Abbildung 5.1.A). Die Präparation der ER-Membranen erfolgte hierfür aus einem gls1-1-Hefestamm, um die Oligosaccharid-Seitenketten der ppa-HDEL-Moleküle auch nach der Translokation im glukosylierten Zustand zu halten. Zudem fehlt dem ER-Kompartiment in Folge einer zusätzliche kar2-133-Mutation die Fähigkeit zur homotypischen Fusion. Eine Inkubation der nun [³⁵S]-ppα-HDEL-haltigen ER-Membranen mit aufgereinigten COPII-Proteinfaktoren (Sec23p/Sec24p; Sec13p/Sec31p; Sar1p), GTP, sowie einem ATP-Regenerationssystem führt in Phase II des Assays zur Bildung von COPII-Vesikeln, welche das Reporterprotein als Frachtmolekül enthalten (Abbildung 5.1.B). Nachfolgend dient eine kurze Zentrifugation dazu, ER (Pelletfraktion) und Vesikel (Überstand) zu trennen. Phase III beinhaltet eine Inkubation der so gewonnenen COPII-Vesikel mit perforierten Spheroblasten eines GLS1-Hefestammes, ATP, GTP sowie mit den Proteinfaktoren LMA1, Uso1p und NSF (Sec18p). Hierdurch kommt es im Versuchsansatz zur Fusion der COPII-Vesikel mit den Membranen des Golgi-Komplexes (Abbildung 5.1.C). Anschließend wird in Phase IV durch Zugabe von Zytosol bzw. von aufgereinigten Coatomer-Faktoren sowie von Arf1p für dreißig Minuten bei 30 °C der retrograde Vesikeltransport induziert (Abbildung 5.1.D).



Abbildung 5.1: Aufbau des retrograden Transport-Assays nach Spang & Schekman (1998). Eine Erläuterung zu den Schemata findet sich im begleitenden Text.

Lediglich die vierte und letzte Phase des Spang-Assays beinhaltet somit die eigentliche Rekonstitution des Golgi-ER-Proteintransportes. Nach Beendigung der *In vitro*-Reaktion werden die *GLS1*-ER-Membranen pelletiert, die darin inkorporierten [³⁵S]-ppα-HDEL-Moleküle mittels Immunpräzipitation isoliert und das resultierende Sediment einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Aus dem Verhältnis zwischen der ursprünglich im Überstand der Zentrifugation von Phase II (d.h. in den COPII-Vesikeln) vorhandenen Reportermenge und der Menge deglukosylierten Reporters im *GLS1*-ER berechnet sich schließlich die Effizienz des Assays. Letztere lag in den von Spang und Schekman (1998) durchgeführten Experimenten bei einem Nettowert von circa 1% bis 2%, was einer mittleren Effizienz der beiden Transportschritte von jeweils 10% bzw. 20% entspricht. Damit unterscheidet sich die Effizienz der einzelnen Transportschritte des Spang-Assays nicht von den beim "Enriched ER assay" sowie beim Transportsystem dieser Arbeit (Proteolyse-Assay) gemessenen Werten. Tabelle 5.1 stellt einen Vergleich zwischen den grundlegenden Konzepten der beiden zellfreien Systeme für den retrograden Vesikeltransport an.

	<i>In vitro</i> -Assay nach Spang und Schekman (1998) <i>JCB</i> 143:589	Proteolytisches Nachweis- system
Reportermolekül	[³⁵ S]-prepro-α-Faktor- <i>myc</i> -HDEL	<i>Myc</i> -α-Emp47p
Vorbereitende Schritte:	 In vitro-Translation des Reporters ER-Translokation COPII-Bildung (+ Sec23/24p, Sec31/13p, Sar1p) Fusion mit Golgi-Membranen (+ Sec18p, Uso1p, LMA1) 	Nicht notwendig
Retrograder	+ Zytosol bzw. + Coatomer,	+ Zytosol
Transport	+ATP	+ ATP
-	30 °C	30 °C
Nachweisprinzip	 Prozessierung des Reporters durch Glukosidase im ER SDS-Page, Autoradiographie (Flourographie) 	 Proteolyse von Myc-α-Emp47p im ER SDS-Page, Immunoblot- Analyse
Herkunft der	ER-Membranen aus einem	Golgi-Membranen mit dem
aufgereinigten	<i>gls1-1, kar2-133-</i> Stamm	<i>Myc</i> -α-Emp47p-Reporter
Membranen:	• Donor- und Akzeptor- membranen als Wildtyp-Hefe (<i>GLS1</i>)	ER-Membranen mit Bar1- Cne1p

Tabelle 5.1: Vergleich der zentralen Charakteristika des Transportsystems nach A.Spang (Spang und Schekman, 1998) und des *In vitro*-Transport-Assays über Proteolyse (diese Arbeit).

Tatsache,

daß

Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden In vitro-Systemen besteht in der zwei subzelluläre der Spang-Assay gleich Transportschritte rekonstituieren muß und somit als eine Art "Enriched ER assay" mit zusätzlicher Rückführung des Reporterproteins angesehen werden kann. Die Zielsteuerung des molekularen Reporters zum Golgi-Apparat macht im Spang-Assay daher einen Großteil des Experimentes aus (siehe Abbildung 5.1.A bis 5.1.C; Phase I bis III), während sie im Falle des proteolytischen In vitro-Systems komplett entfallen kann, da hier das rekombinante *Myc*-α-Emp47p-Konstrukt bereits mehrheitlich im Golgi-Komplex lokalisiert. In Folge der Konzentration auf lediglich einen Transportschritt ist die

Effizienz des Proteolyse-Assays im Vergleich zum Spang-Assay um den Faktor 5 bis 10 erhöht, was ein entsprechend gutes Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund (welcher in beiden Transportsystemen annähernd identisch ist) ermöglicht. Aus dem gleichen Grund stellt das proteolyische In vitro-System eine erhebliche praktische Erleichterung bei der Rekonstitution des retrograden Vesikeltransportes dar, zumal zeit- und arbeitsaufwendige Reaktionen wie die Radioaktive Markierung, die In vitro-Translation sowie die ER-Translokation des Reporters hierfür nicht notwendig sind.

Eine Limitation des Spang-Assays ergibt sich aus dessen Verwendung von perforierten Spheroblasten bei der Rekonstitution des retrograden Vesikeltransportes (Phase IV; siehe oben), wodurch Golgi- und ER-Membranen zwingend aus einer einzigen Quelle stammen. Dagegen bedingt die Methodik des Proteolyse-Assays eine Membranpräparation aus zwei verschiedenen Hefestämmen, welche sich keineswegs ausschließlich bezüglich der An- bzw. Abwesenheit des Reporter- bzw. Bar1p-Konstruktes unterscheiden müssen. In Analogie zum Assay von Cao und Barlowe (2000) sollte es daher mit Hilfe des proteolytischen In vitro-Systems prinzipiell möglich sein, eine Aussage darüber zu treffen, in welchem zellulären Kompartiment die Funktion eines Proteinfaktors des retrograden Vesikeltransportes erforderlich ist. Praktisch wäre hierfür lediglich eine Transformation der Reporters- und Bar1p-Fusionsgens in die jeweils interessierende Hefemutante notwendig. Alternativ könnte auch eine Inaktivierung des zu untersuchenden Gens in den Myc-a-Emp47p- und Bar1-Cne1pproduzierenden Hefestämmen erfolgen oder ein entsprechender Antikörper (bzw. Fab-Fragment) im In vitro-Assay eingesetzt werden. Die Nachteile des Proteolyse-Assays bestehen in der Notwendigkeit, Membranen und Zytosol aus emp47A-Stämmen zu isolieren, sowie in der relativ aufwendigen Aufreinigung der Membran-Komponenten. Zudem müßen die Gene für das Reporter- und das Protaesekonstrukt zunächst in die jeweils zu untersuchenden Hefestämme transformiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der proteolytische *In vitro*-Assay eine einfache Handhabung ermöglicht und ein breites Spektrum von Anwendungsgebieten eröffnet. Zukünftige Experimente mit Membranenfraktionen bzw. Zytosol aus Transportmutanten, mit Antikörpern, aufgereinigten Proteinfaktoren oder auch mit speziellen Chemikalien (wie z.B. Brefeldin A) können dazu beitragen, weitere Einblicke in die Funktionsmechanismen des retrograden Vesikeltransportes zu erhalten.

5.2 Yet1p und Yet2p

Das ER-Membranprotein BAP31, welches zusammen mit dem zu 47% homologen BAP29 einen Heterodimer ausbildet, assoziiert in B-Lymphozyten mit naszierenden Immunglobulinen (mIgD) und ist ein wesentlicher Faktor bei deren Zielsteuerung Richtung Golgi-Apparat (Kim et al., 1994; Adachi et al., 1996). Bei MHC-Proteinen der Klasse I (Spiliotis et al., 2000) sowie beim *v*-SNARE Cellubrevin (Annaert et al., 1997) konnte ebenfalls eine BAP31/29-Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation gezeigt werden. Für die Hefehomologen Yet1p und Yet2p (siehe Abschnitt 1.8 der Einleitung) lag insofern eine analoge oder zumindest ähnliche Sortierungsfunktion beim anterograden ER-Golgi-Vesikeltransport nahe. Neben der Entwicklung eines *In vitro*-Transportsystems für den retrograden Vesikeltransport (Abschnitt 4.1) bestand eine weitere Zielstellung dieser Arbeit daher in einer Charakterisierung dieser beiden Proteine (Abschnitt 4.2), über deren Funktion und intrazelluläre Lokalisation zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Daten vorlagen.

Sowohl die Einzelmutanten, als auch die *yet1 yet2*-Doppelmutante wiesen keinerlei erkennbaren Phänotyp auf. Das Wachstumsverhalten der Hefen blieb unabhängig von der Temperatur (15 °C bis 37 °C) und der Art des Mediums (YPEG bzw. SD) stets gleich. Auch unter Zugabe von Chemikalien, welche den Redox- (DTT) bzw. den Phosphorhaushalt (Na₃VO₄) der Hefezelle beeinflussen, zeigten sich diesbezüglich keinerlei Unterschiede (Abschnitt 4.2.2). Die Hefe ist demnach entweder in der Lage, unter den untersuchten Umweltbedingungen die fehlende Funktion von Yet1p und Yet2p durch eine erhöhte zelluläre Konzentration anderer Proteine zu kompensieren, oder den Yet1p/Yet2p-abhängigen Sortierungsprozeß komplett zu umgehen. Die Substitution einer essentiellen Funktion von Yet1p durch Yet2p (bzw. umgekehrt) in den Einzelmutanten kann dagegen durch die Lebensfähigkeit der Doppelmutante ausgeschlossen werden.

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Yet1p und Yet2p wurde zunächst vergeblich versucht, mit Hilfe von Peptiden spezifische Antikörper gegen die beiden Proteine zu erhalten, um dann schließlich auf eine N-terminale Fusionierung mit GFP zurückgreifen. Unter dem Floureszenzmikroskop zeigte sich sowohl in der Wildtyp-Hefe, als auch in den verschiedenen Yet-Mutanten eine für das perinukläre ER der Bäckerhefe typische ringförmige Struktur (Abbildung 4.26). Zusätzliche durchgeführte Zellfraktionierungs-Experimente deuteten ebenfalls auf einen Aufenthalt der GFP-Konstrukte im ER-Kompartiment hin, auch wenn Yet1p-GFP und Yet2p-GFP hierbei ein signifikant anderes Verteilungsmuster als Kar2p aufweisen (Abbildung 4.27). Eine mögliche Erklärung für diese Musterverschiebung besteht in der Tatsache, daß es sich bei den Yet-Fusionen im Gegensatz zum luminalen Kar2p um integrale Membranproteine handelt. Eine Abhängigkeit der intrazellulären Lokalisation von der Anwesenheit der endogenen Yet-Proteine konnte weder bei der Lebendfärbung, noch bei der Fraktionierung festgestellt werden (Abschnitt 4.2.2). Yet1p-GFP und Yet2p-GFP lokalisieren somit im gleichen Zellorganell wie die Säugerhomologen BAP31/BAP29, eine abweichende intrazelluläre Lokalisation der endogenen Proteine kann anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zur Verifizierung der Annahme, daß die Lokalisation der GFP-Konstrukte tatsächlich die Lokalisation der endogenen Yet-Proteine wiederspiegelt, könnte (neben der Synthese spezifischer Antikörper) eine Mutation des di-Lysin-Signals von Yet1p/2p dienen, welche eine Fehllokalisation (möglicherweise inklusive rascher Degradation) der beiden Proteine zur Folge haben müßte.

Infolge des Wegfalls der postulierten Sortierungsfunktion von Yet1p und Yet2p (bzw. durch eine lediglich unvollkommende Kompensierung dieser Funktion) bestand in der *yet1 yet2*-Doppelmutante die Möglichkeit einer Verschiebung des intrazellulären Verteilungsmusters von Proteinfaktoren des vesikulären Membrantransportes. Um einen weiteren Einblick in die Funktion von Yet1p und Yet2p zu erhalten, wurde daher die Lokalisation einiger solcher Proteinfaktoren (Bet1p, Bos1p, Pep12p, Rer1p, Sec22p, Sed5p, Snc2p, Ssso2p, Ufe1p) in der Doppelmutante überprüft (Abschnitt 4.2.3). Hierzu erfolgte eine Auftrennung von Totallysat aus dem Stamm BY4741 *yet1 yet2* im Dichtegradienten sowie eine anschließende Analyse der resultierenden Fraktionen bezüglich ihres Gehalt am jeweils interessierenden Protein. Emp47p und Kar2p dienten

dabei als Markerproteine für den Golgi-Apparat bzw. für das ER-Kompartiment (Abbildung 4.28). Lediglich im Falle des *t*-SNAREs Sed5p konnte in den Fraktionierungs-Experimenten eine deutliche Änderung der intrazellulären Lokalisation festgestellt werden (Abbildung 4.29). Sed5p übt seine Funktion bei der Fusion von COPII-Vesikel mit dem Golgi-Komplex, d.h. im anterograden Vesikeltransport, aus. Unter Wildtyp-Bedingungen liegt Sed5p nahezu ausschließlich im Golgi-Komplex (Banfield et al., 1994) vor, zykliert aber zwischen cis-Golgi und ER (Wooding & Pelham, 1998). Sed5p unterliegt daher sowohl dem anterograden, COPII-abhängigen Vesikeltransport, als auch der COPI-vermittelten Rezyklierung. In der yet1 yet2-Doppelmutante ist der Anteil der Sed5p-Moleküle im ER um über 200% erhöht (Abbildung 4.29.A und 4.29.B). In abgeschwächter Form (circa 100% Zuwachs) ließ sich dieser Effekt auch in beiden Einzelmutanten nachweisen, wobei zwischen BY4741 yet1 und BY4742 yet2 kein signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte (Abbildung 4.29.C). Eine Expression der GFP-YET1/2-Fusionsgene in den Einzelmutanten führte zur Wiedererlangung des Wildtyp-Verteilungsschemas von Sed5p (Abschnitt 4.2.4), was die Funktionalität dieser Chimären belegt. Weiterführende Experimente könnten z.B. zeigen, welche Auswirkung die stärkere ER-Lokalisation der Sed5p-Moleküle auf den anterograden Vesikeltransport in der Hefezelle hat (z.B. ob bestimmte Frachtproteine ebenfalls fehllokalisieren) oder in welcher Weise (direkt/indirekt) die Yet-Proteine mit Sed5p interagieren.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Ergebnissen der Fraktionierungs-Experimente das folgende Bild: Die ER-Proteine Yet1p und Yet2p sind Komponenten eines zellulären Sortierungsmechanismus für Sed5p. Inaktivierung beider Gene führt zu einer partiellen Fehllokalisation von Sed5p in das ER, möglicherweise verursacht durch eine verlangsamte Inkorporation des *t*-SNAREs in COPII-Vesikel. Das Ausmaß der Fehllokalisation von Sed5p reduziert sich um rund fünfzig Prozent, wenn lediglich *YET1* oder *YET2* keine Expression erfahren. Yet1p und Yet2p können demnach unabhängig voneinander mit Sed5p interagieren, wobei die Effekte ihrer Sortierungsfunktion kumulativ sind. Für die in Analogie zu BAP31/29 postulierte Ausbildung eines Yet1p/Yet2p-Heterodimers liefern die Versuchsergebnisse dagegen keinen Hinweis. Da die durchgeführten Fraktionierungs-Experimente mit Hilfe von Sucrose-Dichtegradienten jedoch erhebliche intrinsische Limitationen aufweisen (z.B. ist eine Unterscheidung zwischen Plasmamembran- und ER-Lokalisation unmöglich und kann in *PEP4*-Hefestämmen eine erhöhte Proteindegradation durch Fehllokalisation zur Vakuole nicht ausgeschlossen werden), sind für eine eindeutige Funktionsbestimmung von Yet1p/Yet2p weitere Experimente notwendig. Diese könnten z.B. Immunfloureszenz-Untersuchungen, eine GFP-Fusionierung von Sed5p sowie von anderen Proteinfaktoren des anterograden/retrograden Transportes sowie Fraktionierungen mit alternativen Gradientensystemen umfassen. Eine Expression von *GFP-YET1/2* in der Doppelmutante bzw. von *YET1/2* in allen drei Yet-Mutanten könnte eine weitere Möglichkeit zur Verifizierung der bisherigen Versuchsergebnisse darstellen.

6. Zusammenfassung

Die Zielstellung dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines zellfreien In vitro-Transport-Assays für den retrograden Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Komplex. Unter Verwendung von Methoden des "Enriched ER assay" (Baker et al., 1988) sollte das lektinähnliche Hefeprotein Emp47p in diesem Assay als molekularer Reporter dienen. In Folge eines Cterminalen di-Lysin-Signals zykliert Emp47p zwischen Golgi-Komplex und ER, lokalisiert im Gegensatz zur Mehrzahl bekannter di-Lysin-Proteine jedoch überwiegend im Golgi-Komplex, dem Zielkompartiment des retrograden Vesikeltransportes. Das grundlegende Verfahren zum Nachweis einer subzellulären Umverteilung von Emp47p beinhaltete eine differentielle Zentrifugation zur Trennung von ER- und Golgi-Membranen, erlaubte aber nicht den Ausschluß von Adhäsionseffekten. Zum eindeutigen Beleg eines Transportereignisses wurde Emp47p in einer ersten Strategie mit einem Glykoprotein (Cne1p, pCPY, Spc3p) fusioniert, um das Glykosylierungsniveau der resultierenden Chimäre als Indikator für deren subzellulären Lokalisation ausnutzen zu können. Aufgrund einer unerwarteten Hyperglykosylierung der Hybridproteine wurde diese Strategie jedoch schließlich aufgegeben. Das letztlich für den In vitro-Assay verwendete Nachweisverfahren basiert auf einer proteolytischen Spaltung des Reportermoleküls durch eine im Zielkompartiment verankerte Protease. Das Reporterkonstrukt *Myc*-α-Emp47p wurde *in vivo* durch Bar1p erkannt und besitzt das gleiche intrazelluläre Verteilungsmuster wie Emp47p. Die Proteasefusion Bar1-Cne1p spaltete Myc-α-Emp47p in vivo und lokalisiert stabil im ER. Eine Untersuchung zur Zeitabhängigkeit der Bar1-Cne1p-Aktivität deutete auf zwei kinetisch unterschiedliche Prozesse hin, welche vermutlich auf einer cotranslationale Prozessierung sowie auf einer Prozessierung nach erfolgtem retrograden Vesikeltransportes basieren. Im In vitro-Assay wird eine Effizienz zwischen 10% und 25% beobachtet, welche von Temperatur, Zeit, Energie und der An- bzw. Abwesenheit spezifischer Proteinfaktoren des retrograden Vesikeltransportes abhängig ist. Eine Kopplung des Transportsystems mit einer Sedimentationsanalyse verdeutlichte zudem, daß der Spaltungsprozeß ausschließlich im ER stattfindet. Das in dieser Arbeit entwickelte In vitro-System für den retrograden Vesikeltransport erlaubt eine einfache Handhabung und eröffnet durch die Möglichkeit, ER- und Golgi-Membranen aus verschiedenen Hefestämmen zu verwenden, breite Anwendungsgebiete.

Ein Teilprojekt dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der BAP31/29-Homologen Yet1p/Yet2p, für die eine Sortierungsfunktion im anterograden Transport postuliert werden konnte. Weder die Einzelmutanten, noch die Yet-Doppelmutante zeigten unter den getesten Bedingungen einen erkennbaren Phänotyp. N-terminale GFP-Fusionen von Yet1p/Yet2p lokalisieren im ER, weisen im Zellfraktionierungs-Experiment jedoch andere Verteilungsmuster als das luminale Kar2-Protein auf. Die intrazelluläre Lokalisation des *t*-SNAREs Sed5p ist in der Yet-Doppelmutante signifikant geändert, der relative Anteil der Sed5p-Moleküle im ER zeigte

sich hierbei um über 100% erhöht. Dieser Effekt konnte in reduzierter Form auch in beiden Einzelmutanten nachgewiesen werden. Eine Transformation der Einzelmutanten mit der entsprechenden Yet1- bzw. Yet2-GFP-Fusion führte zur Wiederherstellung der Wildtyp-Verteilung von Sed5p. Die Proteine Yet1p und Yet2p sind daher vermutlich Komponenten eines zellulären Sortierungsmechanismus für Sed5p, wobei die Effekte ihrer unabhängigen Funktionen kumulativ sind.

7. Literaturverzeichnis

Adachi, T., Schamel, W., Kim, K., Watanabe, T., Becker, B., Nielsen, P. J., Reth, M. (1996) "The specificity of association of the IgD molecule with the acessory proteins BAP31/BAP29 lies in the IgD transmembrane sequence." EMBO J. **15**: 1534-1541.

Anderson, R. G., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1977) "Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts" Cell **10**: 351-364.

Annaert, W. G., Becker, B., Kistner, U., Reth, M., Jahn, R. (1997) "Export of Cellubrevin from the endoplasmic reticulum is controlled by BAP31." J. Cell Biol. **139:** 1397-1410.

Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., Hauri, H. P. (1999) "The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins." Nature Cell Biol. **1:** 330-334.

Aridor, M., Fish, K.N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T.H., Lippincott-Schwartz, J., Balch, W.E. (2001): "The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly." J. Cell. Biol. **152:** 213-219.

Baker, D., Hicke, L., Rexach, M., Schleyer, M., Schekman, R. (1988) "Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport." Cell **54**: 335-344.

Balch, W.E., Dunphy, W.G., Braell, W.A., Rothman, J.E. (1984) "Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine." Cell **39**: 405-416.

Balch, W.E., McCaffery, J.M., Plutner, H., Farquhar, M.G. (1994) "Vesicular stomatitis-virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum." Cell **76**: 841-852.

Ballensiefen, W., Schmitt, H. D. (1997) "Periplasmic Bar1 protease of *Saccharomyces cerevisiae* is active before reaching its extracellular destination." Eur. J. Biochem. **247:** 142-147.

Ballou, L., Hitzeman, R. A., Lewis, M. S., Ballou, C. E. (1991) "Vanadate-resistant yeast mutant are defective in protein glycosylation" Proc. Natl. Acad. Sci. **88**: 3209 – 3212.

Banfield, D. K., Lewis, M. J., Rabouille, C., Warren, G., Pelham, H. R. (1994) "Localization of Sed5p, a putative vesicle targeting molecule, to the *cis*-Golgi network involves both its transmembrane and cytoplasmic domains." J. Cell Biol. **127:** 357 – 71.

Barlowe, C., d'Enfert, C., Schekman, R. (1993) "Purification and characterization of Sar1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum." J. Biol. Chem. **268:** 873-879.

Barlowe, C. and Schekman, R. (1993) "*SEC12* encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER." *Nature* 365: 347-349.

Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosibuchi,M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., 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. (2000) "Traffic COPs of the early secretory pathway" Traffic 1: 371-377.

Becker, B. and Melkonian, M. (1996) "The secretory pathway of protists: spatial and functional organization and evolution". Microbiol. Rev. **60:** 697-721.

Belden, W. J., Barlowe, C. (2001) "Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles." Science **294:** 1528-1531.

Bennett, M. K. and Scheller, R. H. (1993) "The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 2559-2563.

Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T. (1997) "Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface." Science **278**: 1806-1809.

Birnboim, H., Doly, J. (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucl. Acids Res. **7:** 1513-1523.

Boehm, J., Ulrich, H. D., Ossig, R., Schmitt, H. D. (1994) "Kex2-dependent invertase secretion as a tool to study the targeting of transmembrane proteins which are involved in ER-Golgi transport in yeast." EMBO J. **13**: 3696-3710.

Bonfanti L., Mironov Jr, A. A., Martinez-Menarguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H. J., Mironov, A. A., Luini, A. (1998) "Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cistaernae: evidence for cisternal maturation". Cell 95: 993-1003.

Bonfanti, L., Martella, O., Miranov, A., Luini, A. (1999) "Comparative analysis of Procollagen I and VSV G protein in the same cell." Mol. Biol. Cell (Suppl.) **10**, 114a.

Broach, J.R., Strathern, J.N., Hicks, J.B. (1979) "Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the CAN1 gene." Gene **8:** 121-33.

Cao, X., Ballew, N., Barlowe, C. (1998) "Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins." EMBO J. **17:** 2156-2165.

Cao, X., Barlowe, C. (2000) "Asymmetric requirements for a rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes." J. Cell Biol. **149:** 55-65.

Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jenings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., Young, R.A. (2001) "Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes." Mol. Biol. Cell **12**: 323-337.

Chardin P., McCormick F. (1999) "Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive." Cell **97**: 153-155.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W., Prasher, D. (1994) "Green flourescent protein as a marker for protein expression." Science **263**: 802-805.

Clary, D. O., Griff, I. C., Rothman, J. E. (1990) "SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane-fusion in animals and yeast." Biochim. Biophys. Acta **1404**: 211-230.

Cosson, P. and Letourneur, F. (1994) "Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs." Science **263:** 1629-1631.

Cosson, P., Schröder-Köhne, S., Sweet, D. S., Demolliere, C., Hennecke, S., Frigerio, G., Letourneur, F. (1996) "The Sec20/Tip20p complex is involved in ER retrieval of dilysine-tagged proteins." Eur. J. Cell Biol. **73**: 93-97.

Cosson, P. and Letourneur, F. (1997) "Coatomer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting." Current Opinion in Cell Biology **9:** 484-487.

Cowles, C. R., Snyder, W. B., Burd, C.G., Emr, S.D. (1997) "Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast – identification of a sorting determinant and required transport component". EMBO J. **16**: 2769-2782.

Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.P., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., Nilsson, T. (1998) "gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi-network bind both COPI and II coatomer." J. Cell. Biol. **140:** 751-765.

Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P., Kreis, T.E. (1991) " β -COP, a 110-kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to β -adaptin." Cell **64**: 649-665.

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

Esmon, B., Esmon P.C., Schekman, R. (1984) "Early steps in processing of yeast glycoproteins." J. Biol. Chem. **259:** 10322-10327.

Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S., Jahn, R. (1999) "Mixed and noncognate SNARE complexes – Characterization of assembly and biophysical properties." J. Biol. Chem. **274:** 15440-15446.

Faulstich, D., Auerbach, S., Orci, L., Ravazzola, M., Wegehingel, S., Lottspeich, F., Stenbeck, G., Harter, C., Wieland, F. T., Tschochner, H. (1996) "Architecture of coatomer – molecular characterization of δ -COP and protein interactions with the complex." J. Cell Biol. 135: 53-61.

Ferro-Novick, S. and Jahn, R. (1994) "Vesicle fusion from yeast to man". Nature 370: 191-193.

Fiebig, K. M., Rice, L. M., Pollock, E., Brunger, A. T. (1999) "Folding intermediates of SNARE complex assembly." Nat. Struct. Biol. **6:** 117-123.

Fiedler, K., Simons, K. (1995) "A putative novel class of animal lectins in the secretory pathway homologous to leguminose lectins." Cell **81:** 309-312.

Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M.A., Rothman, J. E. (1996) "Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors." Science **273:** 1396-1399.

Fullekrug, J., Scheiffele, P., Simons, K. (1999) "VIP36 localisation to the early secretory pathway." J. Cell Science **112**: 2813-2821.

Gassen, H., Sachse, G., Schulte, A. (1994) "PCR – Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion." Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

Gaynor, E., te Heesen, S., Graham, T., Aebi, M., Emr, S. (1994) "Signal-mediated retrieval of membrane protein from the Golgi to the ER in yeast." J. Cell Biol. **127:** 653-665.

Gietz, R. and Sugino, A. (1988) "New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites." Gene **74:** 527-534.

Glick, B., Malhotra, V. (1998) "The curious status of the Golgi apparatus." Cell 95: 883-9.

Goldberg, J. (1999) "Structural and functional analysis of the ARF1-ARF-GAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis." Cell **96:** 893-902.

Goldberg, J. (2000) "Decoding of sorting signals by coatomer through a GTPase switch in the COPI coat complex." Cell **100**: 671-679

Gorelick, F.S. and Shugrue, C. (2001) "Exiting the endoplasmic reticulum." Mol. Cell. Endocrinol. 177: 13-18.

Graham, T. R., Emr, S. D. (1991) "Compartmental organization of golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast *sec18* (NSF) mutant." Journal of Cell Biology **114:** 207 – 218.

Grossmann, M., Zimmermann, F. (1979) "The structural genes of internal invertases in *Saccharomyces cerevisisae.*" Mol. Gen. Genet. **175**: 223-229.

Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., 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.

Happe, S. and Weidman, P. (1998) "Cell-free transport to distinct golgi cisternae is compartment specific and ARF independent." J. Cell Biology **140**: 511-523.

Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehingel, S., Tschochner, H., Wieland, F. (1996) "Nonclathrin coat protein- γ , a subunit of coatomer, binds to cytoplasmic dilysine motif of membraneproteins of the early secretory pathway." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 1902-1906.

Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H., Appenzeller, C. (2000) "ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway." J. Cell Science 113: 587-596.

Helenius, A. and Aebi, M. (2001) "Intracellular functions of N-linked glycans." Science 291: 2364-2369.

Herscovics, A. and Orlean, P. (1993) "Glycoprotein biosynthesis in yeast." FASEB J. 7: 540-550.

Hicks, J., Herskowitz, I. (1976) "Evidence for a new diffusible element of pheromones in yeast." Nature **260**: 246-248.

Higashio, **H., Klimata, Y., Kiriyama, T., Hirata, A., Kohno, K.** (2000) "Sfb2p, a yeast protein related to Sec24p, can function as a constituent of COPII coats required for vesicle budding from the endoplasmic reticulum." J. Biol. Chem. **275:** 17900-17908.

Hirst, J., Robinson, M. (1998) "Clathrin and adaptors". Biochim. Biophys. Acta. 1404: 173-193.

Ho, S., Hunt, H., Horton, R., Pullen, J., Pease, L. (1989) "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." Gene **77**: 51-59.

Hobman, T.C., Zhao, B., Chan, H., Farquhar, M.G. (1998) "Immunisolation and characterization of a subdomain of the endoplasmic reticulum that concentrates proteins involved in COPII vesicle biogenesis." Mol. Biol. Cell **9**: 1265-1278.

Horvath, A., Riezman, H. (1994) "Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast 13: 1305-1310.

Itin, C., Roche, A. C., Monsigny, M., Hauri, H. P. (1996) "ERGIC-53 is a functional mannoseselective and calcium-dependant human homologue of leguminous lectins." Mol. Biol. Cell. **7:** 483-493.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983) "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." J. Bacteriol. 153: 163-168.

Jackson, M., Nilsson, T., Peterson, P. (1990) "Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum." EMBO J. **9**: 3153-3162.

Kaiser, C.A., Schekman, R. (1990) "Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway." Cell **61:** 723-733.

Kanik-Ennulat, C., Neff, N. (1990) "Vanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show alterations in protein phosphorylation and growth control." Mol. Cell Biology **10:** 898-909.

Kappeler, F., Klopfenstein, D. R., Foguet, M., Paccaud, J. P., Hauri, H. P. (1997) "The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII." J. Biol. Chem. **272:** 31801-31808.

Kelleher, D. and Gilmore, R. (1994) "The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides." J. Biol. Chem. **269:** 12908-12917.

Kim, K. M., Adachi, T., Nielsen, P. J., Terashima, M., Lamers, M. C., Kohler, G., Reth, M. (1994) "Two new proteins preferentially associated with membrane immunoglobulin D". EMBO J. **13:** 3793-3800.

Kirchhausen (2000) "Three ways to make a vesicle". Nat.Rev.Mol. Cell Biol. 3: 187-198.

Klionsky, D.J., Emr, S. (1990) "A new class of vacoular protein sorting signals." J. Biol. Chem. **265:** 5349-5352.

Klumperman, J. (2000) "Transport between ER and Golgi". Current Opinion in Cell Biology **12**: 445-449.

Kuehn, M. J., Schekman, R., Ljungdahl, P.O. (1996) "Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles in vitro." J. Cell. Biol. **135**: 585-95

Kuehn, M.J., Herrmann, J.M., Schekman, R. (1998) "COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles." Nature **391:** 187-190.

Kurihara, T., Hamamoto, S., Gimeno, R. E., Kaiser, C. A., Schekman, R., Yoshihisa, T. (2000) "Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol. Biol. Cell **11**: 983-998.

Lämmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4." Nature 227: 680-685.

Lanoix, J., Ouwendijk, J., Lin, C. C., Stark, A., Love, H. D., Ostermann, J., Nilsson, T. (1999) "GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COPI vesicles." EMBO J. **18**: 4935-4948.

Latterich, M., Schekman, R. (1994) "The karyogamy gene *KAR2* and novel proteins are required for ER-Membrane fusion." Cell **78**: 87-98.

Lazar, T., Götte, M., Gallwitz, D. (1997) "Vesicular transport: how many ypt/rab-GTPases make a eukaryotic cell?" Trends Biochem. Sci. **22**: 468-472.

Lederkremer, G.Z., Cheng, Y., Petre, B.M., Vogan, E., Springer, S., Schekman, R., Walz, T., Kirchhausen, T. (2001) "Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 10704-10709.

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

Lewis, M. J., Pelham, H. R. (1990) "A human homologue of the yeast HDEL receptor." Nature **348**: 162-163.

Lewis, M. J., Pelham, H. R. (1992) "Ligand-induced redistribution of the human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum." Cell **68**: 353-364.

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

Lian, J. P., Stone, S., Jiang, Y., Lyons, P., Ferro-Novick, S. (1994) "Ypt1p implicated in v-SNARE activation." Nature **372**: 698-701.

Lupashin, V.V. and Waters, M. G. (1997) "t-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphate." Science **276:** 1255-1258.

Lyman, S. and Schekman, R. (1997) "Binding of the secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP." Cell **88**: 85-96.

Manley, H. A. and Lennon, V. A. (2001) "Endoplasmic Reticulum membrane-sorting protein of lymphocytes (BAP31) is highly expressed in neurons and discrete endocrine cells." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **49**: 1235-1243.

Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R., Yeung, T. (1998) "COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically definied liposomes." Cell **93**: 263-275.

Mayer, A. and Wickner, W. (1997) "Docking of yeast vacuoles is catalyzed by the Ras-like GTPase Ypt7p after symmetric priming by Sec18p (NSF)." J. Cell Biol. **136**: 307-317.

Meyer, H. and Hartmann, A. (1997) "The yeast SPC22/23 homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity." J. Biol. Chem. **272:** 13159-13164.

Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C. S., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. (2003) "Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles." Cell **114**: 497 – 509.

Mosser, J., Sarde, C., Vicaire, S., Yates, J.R.W, Mandel., J. (1994) "A new human gene (DXS1357E) with ubiquitous expression, located in Xq28 adjacent to the adrenoleukodystrophy gene." Genomics **22:** 469-471.

Mossessova, E., Bickford, L. C., Goldberg, J. (2003) "SNARE selectivity of the COPII coat". Cell 114: 483 – 495.

Muniz, M., Morsomme, P., Riezman, H. (2001) "Protein sorting upon exit from the Endoplasmic reticulum." Cell **104**: 313-320.

Nakamura, N., Yamazaki, S., Sato, K., Nakano, A., Sakaguchi, M., Mihara, K. (1998) "Identification of potential regulatory elements for the transport of Emp24p." Mol. Biol. Cell 9: 3493-3503.

Nakano, Y.S. and Nakano, A. (2000) "Sed4p functions as a positive regulator of Sar1p probably through inhibition of the GTPase activation by Sec23p." Genes to Cells **5:** 1039-1048.

Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R., Smith, T.F. (1994) "The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins." Nature **371:** 297-300.

Nichols, B. J., Lippincott-Schwartz, J. (2001) "Endocytosis without clathrin coat". Trends Cell Biol. **10:** 406-412.

Niedenthal, R., Riles, L., Johnston, M., Hegemann, J. (1996) ",Green flourescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast." Yeast **12:** 773-786.

Nishimura, N. and Balch, W. E. (1997) "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic treiculum." Science **277:** 556-558.

Nishimura, N., Bannykh, S., Slabough, S., Matteson, J., Altschuler, Y., Hahn, K., Balch, W. E. (1997) "A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum." J. Biol. Chem. **274:** 15937-15946.

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

Orci, L., Glick, B.S., Rothman, J. E. (1986) "A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack." Cell **46**: 171-184.

Orci, L., Perrelet, A., Ravazzola, M., Wieland, F. T., Schekman, R., Rothman, J. E. (1993) "BFA bodies: a subcompartment of the endoplasmic reticulum." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 11089–11093.

Ossig, R., Schmitt, H.D., de Groot, B., Riedel, D., Keranen, S., Ronne, H., Grubmuller, H., Jahn, R. (2000) "Exocytosis requires asymmetry in the central layer of the SNARE complex." EMBO J. **19:** 6000-6010.

Ostermann, J., Orci, L., Tani, K., Amherdt, M., Ravazzola, M., Elazar, Z., Rothman, J. E. (1993) "Stepwise assembly of functionally active-transport vesicles." Cell **75:** 1015-1025.

Otto, H., Hanson, P. I., Jahn, R. (1997) "Assembly and disassembly of a ternery complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94:** 6197-6201.

Palade, G. (1975) "Intracellular aspects of the process of protein secretion". Science 189: 347-358.

Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J., Thomas, D. (1995) "*Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum membrane protein with with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as an constituent of the ER quality control apparatus." J. Biol. Chem. **270**: 244-253.

Pearse, B. M. F. (1975) "Coated vesicles from big rain: Purification and biochemical characterization". J. Mol. Biol. **97:** 93-98.

Pearse, B. M. F. (1976) "Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**: 1255-1259.

Pelham, H. R. (1990) "The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum." Trends Biochem. Sci. **15**: 483-486.

Pelham, H. R. (1998) ",Getting through the Golgi complex". Trends Cell Biology 8: 45-49.

Pelham, H. R. and Rothman, J. E. (2000) "The debate about transport in the Golgi – two sides of the same coin?" Cell **102**: 713-719.

Peng, R. W., De Antoni, A., Gallwitz, D. (2000) "Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members." J. Biol. Chem. **275:** 11521-11528.

Pfeffer, S.R. and Rothman, J. E. (1987) "Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi." Ann. Rev. Biochem. **56**: 829-852.

Pfeffer, S. R. (1999) "Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs." Nature Cell Biology **1**: E17-E22.

Pilon, M., Schekman, R., Romisch, K. (1997) "Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation." EMBO J. **16**: 4540-4548.

Pishvaee, B. and Payne, G. S. (1998) "Clathrin coats – threads laid bare". Cell 95: 443-446.

Poon, P. P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R. A., 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.

Pryer, N.K., Salama, N.R., Schekman, R., Kaiser, C.A. (1993) "Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum *in vitro*." J. Cell. Biol. **120**: 865-875.

Rehling, P., Darsow, T., Katzmann, D. J., Emr, S. (1999) "Formation of AP-3 transport intermediates requires VPS41 function". Nat. Cell. Biol. **1:** 346-353.

Roberg, K. J., Crotwell, P., Espenshade, R., Gimeno, R., Kaiser, C. A. (1999) "*LST1* is a *SEC24* homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum." J. Cell Biol. **145**: 659-672.

Robinson, M. S. (1987) "100-kd coated vesicle proteins: molecular heterogenity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies" J. Cell. Biol. **104:** 887-895.

Robinson, M. S. and Bonifacino, J. S. (2001) "Adaptor-related protein". Current Opinion in Cell Biology **13**: 444-453.

Rossanese, O., Soderholm, J., Bevis, B., Sears, I., O'Connor, J., Williamson, E., Glick, B. (1999) "Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in Pichia pastoris and Saccharomyces cerevisiae." J. Cell Biol. **145:** 69-81.

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H. (1988) "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239:** 487-491.

Salama, N. R., Yeung, T., Schekman, R. (1993) "The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins." EMBO J. 12: 4073-4082.

Salama, N. R., Chuang, J.S., Schekman, R. (1997) "SEC31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum." Mol. Biol. Cell **8**: 205-217.

Sambrook, J., Gething, M. J. (1989) "Proteine structure. Chaperones, paperones." Nature 342: 224-225.

Santamaria, I., Velasco, G., Pendas, A. M., Fueyo, A., Lopez-Otin, C. (1998) "Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location." J. Biol. Chem. **273:** 16816-16823.

Sato, M., Sato, K., Nakano, A. (1996) "Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain." J. Cell. Biol. **134**: 279-293.

Schindler, R., Itin, C., Zerial, M., Lottspeich, F., Hauri, H. P. (1993) "ERGIC-53, a membrane protein of the ER-Golgi-intermediate compartment, carries an ER retention motif." Eur. J. Cell Biol. **61:** 1-9.

Schmid, S. L. (1997) "Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process". Annu. Rev. Biochem. **66**: 511-548.

Shen, S., Chretien, P., Bastien, L., Slilaty, S. (1991) "Primary sequence of the glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica*. Expression and purification of the enzyme from *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. **266**: 1058-1063.

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.

Söllner, T., whitehart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J. E. (1993) "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**: 318-324.

SØgaard, M., Tani, K., Ye, R. R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J. E., Söllner, T. (1994) "A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in docking of transport vesicles." Cell **78**: 937-948.

Schröder, S., Schimmöller, F., Singer-Krüger, B., Riezman, H. (1995) "The golgi localisation of yeast Emp47p depends on its di-lysine-motif but is not affected by the *ret1-1* mutation in α -COP." J. Cell Biol. 131: 895-912.

Schröder-Köhne, S., Letourneur, F., Riezman, H. (1998) " α -COP can discriminate between distinct, functional di-lysine signals *in vitro* and regulates access into retrograde transport." J. Cell Science **111**: 3459-3470.

Schweizer, A., Fransen, J. A., Bachi, T., Ginsel, L., Hauri, H. P. (1988) "Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kd protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus." J. Cell Biol. 53: 185-196.

Schweizer, A., Fransen, J. A., Matter, K., Kreis, T. E., Ginsel, L., Hauri, H. P. (1990) "Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus." Eur. J. Cell Biol. **53**: 185-196.

Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., Rothman, J. E. (1991) "ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived cop-coated vesicles – a novel role for a GTP-binding protein." Cell **67:** 239-253.

Shaywitz, D.A., Espenshade, P.J., Gimeno, R.E., Kaiser, C.A. (1997) "COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat." J. Biol. Chem. **272:** 25413-25416.

Sherman, F., Fink, G.R., Lawrence, C.W. (1979) "Methods in yeast genetics". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

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

Spiliotis, E.T., Manley, H., Osorio, M., Zuniga, C., Edidin, M. (2000) "Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP." Immunity **13**: 841-851.

Springer, S. and Schekman, R. (1998) "Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs." Science **281:** 698-700.

Springer, S., Spang, A., Schekman, R. (1999) "A primer on vesicle budding" Cell 97: 145-148.

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A. T. (1998) "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2,4 A resolution." Nature **395:** 347-353.

Teasdale, R. D., Jackson, M. R. (1996) "Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus." Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **12:** 27-54.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) "Electophorectic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications." Proc. Natl. Acad. Sci. **76**: 4350-4354.

Te Heesen, S. and Aebi, M. (1992) "The yeast *WBP1* is esential for oligosaccharyl transferase activity *in vivo* and *in vitro*." EMBO J. **11:** 2071-2075.

Ungermann, C., Sato, K., Wickner, W. (1998) "Defining the functions of trans-SNARE pairs." Nature **396:** 543-8.

Ungermann, C., Nichols, B.J., Pelham, H.R., Wickner W. (1998) "A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion." J. Cell Biol. **140:** 61-69.

Ungewickell, E., Branton, D. (1981) "Assembly units of clathrin coats". Nature 289: 420-422.

VanRheenen, S. M., Cao, X., Sapperstein, S. K., Chiang, E. C., Lupashin, V. V., Barlowe, C., Waters, M. G. (1999) "Sec34p, a protein required for vesicle tethering to the yeast Golgi apparatus, is in complex with Sec35p." J. Cell Biol. 147: 729-742.

Veldhuisen, G., Saloheimo, M., Fiers, M.A., Punt, P.J., Contreras, R., Penttila, M., van den Hondel, C.A. "Isolation and analysis of functional homologues of the secretion-related SAR1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei.*" Mol. Gen. Genet. **256**: 446-55

Vida, T. and Gerhardt, B. (1999) "A cell-free assay allows reconstitution of Vps33p-dependent transport to the yeast vacuole/lysosome." J. Cell Biology **146**: 85-97.

Vigers, G. P., Crowther, R. A., Pearse, B. M. F. (1986) "Location of the 100-kd-50kd acessory proteins in clathrin coats". EMBO J. 5: 2079-2085.

Votsmeier, C. and Gallwitz, D. (2001) "An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export."

Warren, G. and Mellman, I. (1999) "Bulk flow redux?" Cell 98: 125-127.

Weimbs, T., Mostov, K., Low, S. H., Hofmann, R. (1998) "A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships." Trends Cell Biol. **8**: 260-262.

Wilson, D. W., Whitehart, S. W., Wiedmann, M., Brunner, M., Rothman, J. E. (1992) "A multisubunit particle implicated in membrane-fusion." J. Cell Biol. **117**: 531-538.

Wooding, S., Pelham, H.R. (1998) "The dynamics of golgi protein traffic visualized in living yeast cells." Mol. Biol. Cell **9:** 2667 – 80.

Wuestehube, L. J. and Schekman, R. (1992) "Reconstitution of transport from the endoplasmic reticulum to Golgi complex using endoplasmic reticulum-enriched membrane fraction from yeast." Methods in Enzymology **219**: 124-136.

Yang, B., Steegmaier, M., Gonzales Jr, L. C., Scheller, R. H. (2000) "n-Sec1 binds a closed conformation of syntaxin1A." J. Cell Biol. 148: 247-252.

Young, B., Craven, R., Reid, P., Willer, M., Stirling, C. (2001) "Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum *in vivo*." EMBO J. **20:** 262-271.

Zhao, L., Helms, J. B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J., Wieland, F. T. (1997) "Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 4418-4423.

Zhao, L., Helms, J. B., Brunner, J., Wieland, F. T. (1999) "GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatomer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23." J. Biol. Chem. **274:** 14198-14203..

8. Anhang

Präfix:	Abkürzung:	Faktor:
exo-	E	1018
peta-	Р	10 ¹⁵
tera-	Т	1012
giga-	G	10 ⁹
mega-	Μ	106
kilo-	k	10 ³
hecto-	h	10 ²
deca-	da	10 ¹
centi-	С	10-2
milli-	m	10-3
micro-	μ	10-6
nano-	n	10 ⁻⁹
pico-	р	10-12
femto-	Ī	10 ⁻¹⁵
atto-	а	10-18

Tabelle 8.1: Präfixe zur Bezeichnung von	Vielfachen der Maßeinheiten
--	-----------------------------

Tabelle 8.2: Basiseinheiten des internationalen Einheitensystems (SI)

Zu messende Größe:	Einheit:	Symbol:
Länge	Meter	m
Masse	Kilogramm	kg
Zeit	Sekunde	s
Elektrische Stromstärke	Ampere	A
Temperatur	Kelvin	К
Stoffmenge	Mol (= $6,02205 \times 10^{23}$	mol
-	Teilchen)	
Leuchtstärke	Candela	cd

Tabelle 8.3: Abgeleitete SI-Einheiten

Zu messende Größe:	Einheit:	Symbol:	
Druck	Pascal	kg x m ⁻¹ x s ⁻²	
Energie	Joule	$\mathbf{J} = \mathbf{kg} \mathbf{x} \mathbf{m}^2 \mathbf{x} \mathbf{s}^{-2}$	
Leistung	Watt	$\mathbf{W} = \mathbf{J} \mathbf{x} \mathbf{s}^{-1}$	
Elektrische Ladung	Coulomb	C = A x s	
Elektrische Potentialdifferenz	Volt	$\mathbf{V} = \mathbf{W} \mathbf{x} \mathbf{A}^{-1}$	
Elektrische Kapazität	Farad	$\mathbf{F} = \mathbf{C} \mathbf{x} \mathbf{V}^{-1}$	
Elektrischer Widerstand	Ohm	$\Omega = \mathbf{V} \mathbf{x} \mathbf{A}^{-1}$	
Frequenz	Hertz	S ⁻¹	
Radioaktivität (atomare	Becquerel	S ⁻¹	
Ereignisse pro Zeiteinheit)	-		
Zu messende Größe:	Einheit:	Symbol:	Entsprechendes SI-Maß:
--------------------	--------------	---------	-----------------------------
Zeit	Minute	min	60 s
	Stunde	h	3600 s
	Tag	d	86400 s
	Jahr	а	3,15569 x 10 ⁷ s
Volumen	Liter	1	1 dm ³
Temperatur	Grad Celsius	°C	K + 273,15
Druck	Bar	bar	10 ⁵ Pa
Radioaktivität	Curie	Ci	3,7 x 10 ¹⁰ Bq

 Tabelle 8.4: Gebräuliche Nicht-SI-Einheiten und ältere Maßeinheiten

 Tabelle 8.5:
 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APAdaptorproteinAPSAmmoniumperoxodisulfatARFADP-ribosylierender FaktorASAminosäureATPAdenosin-5'-triphosphatBpBasenpaarBSARinderserumalbumincKonzentrationCOPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredTTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTTBesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTTDithiothreitolgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-O(-3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	Amp	Ampicillin	
APSAmmoniumperoxodisulfatARFADP-ribosylierender FaktorASAminosäureATPAdenosin-5'-triphosphatBpBasenpaarBSARinderserumalbumincKonzentrationCOPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitolgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGPPGuanosin-5'-diphosphatGTPASGuanosin-5'-diphosphatGTPASGuanosin-5'-diphosphatGTPASGuanosin-5'-diphosphatGTPASGuanosin-5'-diphosphatGTPASGuanosin-5'-diphosphatGTPASGuanosin-5'-diphosphatGTPAGuanosin-5'-diphosphatGTPAGuanosin-5'-diphosphatGTPASGuanosin-5'-diphosphatGTPASGuanosin-5'-diphosphat <td>AP</td> <td>Adaptorprotein</td>	AP	Adaptorprotein	
ARFADP-ribosylierender FaktorASAminosäureATPAdenosin-5'-triphosphatBpBasenpaarBSARinderserumalbumincKonzentrationCOPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithothreitoldTTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGEFGuanosin-5'-diphosphatGTP γ SGuanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio- β -D-galaktosid	APS	Ammoniumperoxodisulfat	
ASAminosäureATPAdenosin-5´-triphosphatBpBasenpaarBSARinderserumalbumincKonzentrationCOPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4´, θ-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphatdCTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphatDTDithiothreitoldTTP2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphatgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-triphosphatGTP γ SGuanosin-5´-triphosphatIEFGuanosin-5´-diphosphatGTP γ SGuanosin-5´-diphosphatGTP γ SGuanosin-5´-diphosphatGTP γ SGuanosin-5´-triphosphatIEFGuanosin-5´-diphosphatGTP γ SGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	ARF	ADP-ribosylierender Faktor	
ATPAdenosin-5'-triphosphatBpBasenpaarBSARinderserumalbumincKonzentrationCOPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZefälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-do-(3-thio	AS	Aminosäure	
BpBasenpaarBSARinderserumalbumincKonzentrationCOPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4´,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphatdCTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatgEndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-triphosphatEFFGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGDPGuanosin-5´-diphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-	ATP	Adenosin-5´-triphosphat	
BSARinderserumalbumincKonzentrationCOPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGDPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTP	Вр	Basenpaar	
cKonzentrationCOPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxytosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTTBesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTTBesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGDPGuanosin-5'-diphosphatGEFGuaninnukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPYSGuanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio- β -D-galaktosid	BSA	Rinderserumalbumin	
COPI/COPIIVesikelhüllen-Proteinkomplex I/IIcpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase Y Δ (Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10 ⁻²⁴ gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'.Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'.Desoxytosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'.Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'.Desoxytukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'.Desoxytukleosid-5'-triphosphatDTTBesoxyribonukleinsäuredNTP2'.Desoxytukleosid-5'-triphosphatDTTBesoxyribonukleinsäuredNTP2'.Desoxytukleosid-5'-triphosphatDTTBithiothreitoldTTP2'.Desoxythymidin-5'-triphosphatgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGDPGuanosin-5'-diphosphatGEFGuaninnukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5'-triphosphatGTP\SGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio- β -D-galaktosid	С	Konzentration	
cpmZerfälle pro MinuteCPYCarboxypeptidase YΔ(Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10-24 gDAPI4´,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphatdCTP2´-Desoxycytosin-5´-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-triphosphatGEFGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-diphosphatGTPGuanosin-5´-diphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTP	COPI/COPII	Vesikelhüllen-Proteinkomplex I/II	
CPYCarboxypeptidase YΔ(Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10^{-24} gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxycytosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatgErdbeschleunigunggErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGEFGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	cpm	Zerfälle pro Minute	
Δ(Gen-) DeletionDaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10^{-24} gDAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxycytosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTTBithiothreitolgEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGEFGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGEFGuanosin-5'-diphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	ĊPY	Carboxypeptidase Y	
DaDalton = Eine Atommasseneinheit (u) = 1,6605655 x 10^{-24} gDAPI4´,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphatdCTP2´-Desoxycytosin-5´-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	Δ	(Gen-) Deletion	
DAPI4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochloriddATP2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphatdCTP2'-Desoxycytosin-5'-triphosphatdddoppelt destilliertdddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-triphosphatGEFGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatGTPGuanosin-5'-triphosphatJIgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	Da	Dalton = Eine Atommasseneinheit (u) = $1,6605655 \times 10^{-24} \text{ g}$	
dATP2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphatdCTP2´-Desoxycytosin-5´-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-triphosphatGEFGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatIgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	DAPI	4´,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid	
dCTP2´-Desoxýcytosin-5´-triphosphatdddoppelt destilliertdGTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	dATP	2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphat	
dddoppelt destilliertdGTP2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGFFGuanosin-5'-triphosphatGTPySGuanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	dCTP	2´-Desoxycytosin-5´-triphosphat	
dGTP2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphatDICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	dd	doppelt destilliert	
DICNomarski-KontrastDMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuanosin-5´-triphosphatGTP γ SGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	dGTP	2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphat	
DMSODimethylsulfoxidDNADesoxyribonukleinsäuredNTP2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	DIC	Nomarski-Kontrast	
DNADesoxyribonukleinsäuredNTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGEFGuanosin-5'-triphosphatGTPγSGuanosin-5'-triphosphatIgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	DMSO	Dimethylsulfoxid	
dNTP2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphatDTTDithiothreitoldTTP2'-Desoxythymidin-5'-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5'-diphosphatGEFGuanosin-5'-triphosphatGTPγSGuanosin-5'-triphosphatIgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	DNA	Desoxyribonukleinsäure	
DTTDithiothreitoldTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEDTAEndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuaninnukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	dNTP	2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphat	
dTTP2´-Desoxythymidin-5´-triphosphatEDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuanosin-5´-triphosphatGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	DTT	Dithiothreitol	
EDTAEthylendiamintetraessigsäureEREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuaninnukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	dTTP	2´-Desoxythymidin-5´-triphosphat	
EREndoplasmatisches RetikulumgErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuaninnukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5´-triphosphatGTP γ SGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
gErdbeschleunigungGAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuaninnukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	ER	Endoplasmatisches Retikulum	
GAPGTPase aktivierendes ProteinGDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuanonukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	g	Erdbeschleunigung	
GDPGuanosin-5´-diphosphatGEFGuaninnukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	GAP	GTPase aktivierendes Protein	
GEFGuaninnukleotid-AustauschfaktorGTPGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	GDP	Guanosin-5´-diphosphat	
GTPGuanosin-5´-triphosphatGTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor	
GTPγSGuanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)IgImmunglobulinIPTGIsopropylthio-β-D-galaktosid	GTP	Guanosin-5´-triphosphat	
Ig Immunglobulin IPTG Isopropylthio-β-D-galaktosid	GTPγS	Guanosin-5´-O-(3-thiotriphosphat)	
IPTG Isopropylthio-β-D-galaktosid	Ig	Immunglobulin	
	IPTG	Isopropylthio-β-D-galaktosid	

kb	Kilobasen	
λ	Wellenlänge	
LB	Luria-Bertani	
M _w	Molekulargewicht	
MESNA	Mercaptoethansulfonsäure	
NEM	N-Ethylmaleimid	
NSF	NEM-sensitiver Faktor	
OD	Optische Dichte	
ORF	Open reading frame	
PBS	Phosphate buffered saline	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	
PEG	Polyethylenglykol	
RNA	Ribonukleinsäure	
rpm	<i>Rotations per minute</i> (= upm)	
RT	Raumtemperatur	
Σ	Summe	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
SNAP	Soluble NSF attachment protein	
SNARE	SNAP-Rezeptor	
TAE	Tris/Acetat/EDTA	
TE	Tris/EDTA	
TCA	Trichloressigsäure	
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin	
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk	
TMD	Transmembran-Domäne	
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan	
ts	temperatursensitiv	
U	Einheit für spezifische Enzymaktivität	
upm	Umdrehungen pro Minute	
UV	Ultraviolett	
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis	
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis	
wt	Wildtyp	
X-Gal	$5\text{-}Bromo\text{-}4\text{-}chloro\text{-}3\text{-}indolyl\text{-}\beta\text{-}D\text{-}galaktopyranosid$	

Α	Ala	Alanin
С	Cys	Cystein
D	Asn	Asparaginsäure
Е	Gln	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
н	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
Μ	Met	Methionin
Ν	Asp	Asparagin
Р	Pro	Prolin
Q	Glu	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
Т	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Tabelle 8.7: Einbuchstabenkode für Nukleotide

Α	Adenin
С	Cytosin
G	Guanin
Т	Thymin
U	Uracil

Danksagung:

Diese Arbeit entstand in der anregenden und freundlichen Atmosphäre der Abteilung für molekulare Genetik unter der wissenschaftlichen Betreuung von Dr. Stephan Schröder-Köhne. Ihm möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die geduldige Hilfe sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft herzlich danken.

Mein Dank gilt zudem Dr. Hans-Dieter Schmitt für die vielen Gespräche und sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gallwitz möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine Unterstützung danken.

Dr. Ralf Kölling-Paternoga danke ich für die Übernahme der offiziellen Betreuung.

Bei meinen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen möchte ich mich für das wunderbare Arbeitsklima und die problemlose Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie, welche mich stets tatkräftig unterstützte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.