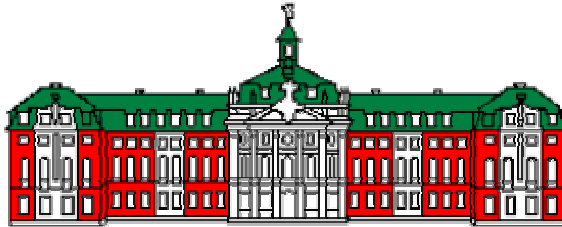


Biologie

„Molekulare und biochemische Charakterisierung von
Iporin, einem neuen Interaktionspartner der kleinen
GTPase Rab1“



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Magdalena Konczal

aus Ruda Śląska (Polen)

- 2005 -

Dekan:
Erste Gutachterin:
Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. A. Steinbüchel
Prof. Dr. A. Barnekow
Prof. Dr. K.-H. Klempnauer

Tag der mündlichen Prüfung:
Tag der Promotion:

02.12.2005
16.12.2005

Für meine Eltern, Babcia und Nico

Teile dieser Promotionsschrift wurden veröffentlicht:

Poster:

Iporin, a direct interacting partner of Rab 1b plays a role during spermatogenesis

Magdalena Konczal, Jörg Gromoll, Viktoria von Schönfeld, Jan-Bernd Stukenborg und Angelika Barnekow

(DGZ-Jahrestagung Heidelberg, 16. – 19. März 2005)

Publikationen:

Konczal, M., Gromoll, J., von Schönfeldt, V., Stukenborg, J.-B. und Barnekow, A. (2005):

Iporin, a direct interacting partner of Rab 1b plays a role during spermatogenesis.

Europ.J.Cell Biol. **84S1**: 71

Bayer, M., Fischer, J., Kremerskothen, J., Ossendorf, E., Matanis, T., Konczal, M., Weide, T. and Barnekow, A. (2005):

Identification and characterisation of Iporin as a novel interaction partner for rab 1.

BMC Cell Biol. **6**:15

Inhaltverzeichnis

<i>Inhaltverzeichnis</i>	5
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	8
<i>Tabellenverzeichnis</i>	9
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	10
1. Einleitung	13
1.1. Vesikulärer Transport in eukaryotischen Zellen	13
1.2. Rab GTPasen	17
1.3. Struktur der Rab Proteine	20
1.4. Rab Zyklus	22
1.5. Rab1	23
1.6. Rab1 Effektoren	24
1.7. Neuer Rab1 Interaktionspartner: Iporin	26
1.8. GM130	28
1.9. Tesmin	28
2. Zielsetzung	32
3. Material	33
3.1. Chemikalien	33
3.2. Antibiotika	37
3.3. Reagenziensysteme und „Kits“	37
3.3.1. „Kits“ zur Aufreinigung von DNA	37
3.3.2. Sequenzierung	37
3.3.3. Transiente Expression	37
3.3.4. Proteinbestimmung	38
3.3.5. „Western Blot“ Entwicklung	38
3.3.6. Immunhistochemie	38
3.4. Stammlösungen	39
3.5. Kulturmedien	41
3.5.1. Kulturmedium für Bakterien	41
3.5.2. Kulturmedium für Hefen	41
3.5.3. Kulturmedium für eukaryotische Zellen	42
3.6. Enzyme und Marker	43
3.6.1. Restriktionsendonukleasen	43
3.6.2. Sonstige Enzyme	43
3.6.3. DNA-Marker	43
3.6.4. Protein-Marker	44
3.7. Antikörper	44
3.8. „Primer“	46
3.9. Ausgangsvektoren	47
3.9.1. Prokaryotische Klonierungsvektoren	47
3.9.2. „yeast two-hybrid“ Klonierungsvektoren	47
3.9.3. Eukaryotische Klonierungsvektoren	48

3.10. Plasmidkonstrukte	49
3.10.1. Plasmidkonstrukte für die bakterielle Expression	49
3.10.2. Plasmidkonstrukte für das „yeast two-hybrid“ System	50
3.10.3. Plasmidkonstrukte für die Expression in Säugetierzellen	54
3.11. Organismen	55
3.11.1. Bakterienstämme	55
3.11.2. Hefestämme	55
3.11.3. Eukaryotische Zelllinien	56
3.12. DNA-Genbank	56
4. Methoden	57
4.1. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien, Hefen und eukaryotischen Zellen	57
4.1.1. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien	57
4.1.2. Kultivierung und Stammhaltung von Hefen	57
4.1.3. Kultivierung und Stammhaltung von eukaryotischen Zellen	58
4.2. Arbeiten mit DNA	59
4.2.1. Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i>	59
4.2.2. Isolierung von Plasmid DNA aus <i>S.cerevisiae</i>	59
4.2.3. Amplifikation von DNA mittels PCR	60
4.2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA	60
4.2.5. Restriktion von DNA	60
4.2.6. Elektrophoretische Auftrennung von DNA	61
4.2.7. Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	61
4.2.8. Ligation von DNA	62
4.2.9. Transformation von Bakterien	62
4.2.9.1. Calciumchlorid-Methode	62
4.2.9.2. Elektroporation	63
4.2.10. Überprüfung einer Klonierung	64
4.2.11. Sequenzierung	64
4.3. Das „yeast two-hybrid“ System	66
4.3.1. Herstellung kompetenter Hefen	67
4.3.2. Kotransformation von Hefen	67
4.3.3. β -Galaktosidasetest	67
4.3.4. Amplifikation einer cDNA Genbank	68
4.3.4.1. Re-Tritrierung der Genbank	68
4.3.4.2. Amplifikation	68
4.3.5. „large scale“ Transformation	69
4.3.6. Isolierung potentieller Interaktionspartner	69
4.3.7. Überprüfung potentieller Interaktionspartner	69
4.3.8. Charakterisierung potentieller Interaktionspartner	70
4.4. Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	70
4.4.1. Transfektion eukaryotischer Zellen mit PolyFect [®]	70
4.4.2. Herstellung von Zellextrakten	70
4.4.2.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten	71
4.4.3. Zytosol-Membran-Fraktionierung	71
4.4.4. Percoll-Gradient	72
4.4.5. Immunpräzipitation	73
4.4.6. Bestimmung der Proteinkonzentration	74
4.5. Analyse exprimierter Proteine	74
4.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	74
4.5.2. Coomassie-Färbung	74
4.5.3. „Western Blot“	75
4.5.4. Immunfluoreszenz	76
4.6. Proteinexpression in Geweben	77
4.6.1. Herstellung von Gewebeextrakten	77
4.6.2. Immunhistochemie	77

4.7. Protein-Interaktionsstudien „GST-pull down“ Test	80
4.7.1. Expression von GST-Fusionsproteinen	80
4.7.2. Herstellung des Bakterienlysats	81
4.7.3. Kopplung der GST-Fusionsproteine an „Glutathion-Sepharose beads“	81
4.7.4. Inkubation mit Zellextrakten	82
5. Ergebnisse	83
5.1. Detektion von Iporin in Gewebelysaten	85
5.2. Immunfluoreszenzanalysen zur intrazellulären Lokalisation transfizierter Iporin Mutanten	88
5.3. Iporin Homodimerisierung	90
5.4. Neuer Interaktionspartner von Iporin: GM130	94
5.5. Zelluläre Lokalisation von Iporin, Rab1B und GM130 in murinem und humanem Hodengewebe	97
5.6. Neuer Iporin spezifischer Interaktionspartner: Tesmin	105
5.7. Tesmin-Translokation nach Behandlung mit Cadmiumchlorid	114
5.8. Subzelluläre Verteilung von Iporin und Tesmin	117
5.9. Analyse der Membranassoziation von Tesmin „full length“	119
6. Diskussion	121
6.1. Detektion von Iporin in Gewebelysaten	121
6.2. Lokalisation von transfizierten Iporin Verkürzungsmutanten	123
6.3. Dimerisierung von Iporin	125
6.4. Iporin interagiert mit GM130	127
6.5. Zelluläre Lokalisation von Iporin, Rab1B und GM130 in murinem und humanem Hodengewebe	129
6.6. Neuer Iporin Interaktionspartner: Tesmin	132
6.7. Translokation von Tesmin nach Behandlung mit Cadmiumchlorid	134
6.8. Subzelluläre Verteilung von Iporin und Tesmin	136
6.9. Ausblick	137
7. Zusammenfassung	140
Literaturverzeichnis	141
Anhang	162
Danksagungen	181
Lebenslauf	182

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Intrazellulärer Transport	14
Abb. 1.2: Modell des vesikulären Membrantransports	15
Abb. 1.3: Intrazelluläre Lokalisation unterschiedlicher Rab Proteine	18
Abb. 1.4: Rab Prenylierung und der GTPase Zyklus	22
Abb. 1.5: Schematische Struktur von Iporin	27
Abb. 5.1: Expression von Iporin in murinem und humanem Hodengewebe	85
Abb. 5.2: Expression von Iporin in murinem und humanem Gehirngewebe	86
Abb. 5.3: Entwicklungsabhängige Expression von Iporin in murinem Ovariengewebe	87
Abb. 5.4: Iporin und Verkürzungsmutanten	88
Abb. 5.5: Intrazelluläre Expression der Iporin $\Delta N847$ und $\Delta C853$ Mutanten in HeLa SS6 Zellen	89
Abb. 5.6: Intrazelluläre Expression der Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ Mutante in HeLa SS6 Zellen	90
Abb. 5.7: Bestätigung einer Iporin Homodimerisierung mittels eines in vitro „GST pull down“ Tests	93
Abb. 5.8: Intrazelluläre Koloalisationsstudien der neuen Interaktionspartner Iporin und GM130 in HeLa SS6 Zellen	96
Abb. 5.9: Immunpräzipitation von Rab1B aus murinem Hodengewebe	98
Abb. 5.10: Expression von GM130 in murinem und humanem Hodengewebeextrakt	98
Abb. 5.11: Spezifische Detektion von Rab1B und GM130 in Tubuli seminiferi (Samenkanälchen)	100
Abb. 5.12: Spezifische Detektion von Iporin in Tubuli seminiferi (Samenkanälchen)	102
Abb. 5.13: Expression von Iporin in SK11 Zellen	103
Abb. 5.14: Spezifische Detektion von Rab1B, GM130 und Iporin in Epididymis (Nebenhoden)	104
Abb. 5.15: Schematische Darstellung des Klons 56, Tesmin A und Tesmin „full length“.	107
Abb. 5.16: Amplifizierte cDNA-Fragmente mittels Tesmin spezifischer „primer“	108
Abb. 5.17: Ehemaliger „open reading frame“ der humanen Tesmin A cDNA Sequenz (900 bp; Acc.: NM_004923)	108
Abb. 5.18: Expression von EGFP-IJ-Tesmin A und der „GST-pull down“ Test zur Bestätigung der Interaktion zwischen Tesmin A und Iporin	111
Abb. 5.19: Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins EGFP-IJ-Tesmin A bzw. EGFP-IJ-Tesmin „full length“ in HeLa SS6 Zellen	113
Abb. 5.20: Lokalisation des endogenen Iporins in HeLa SS6 Zellen nach Induktion mit Cadmiumchlorid	115
Abb. 5.21: Translokation von EGFP-IJ-Tesmin A in den Zellkern nach Induktion mit Cadmiumchlorid	116
Abb. 5.22: Translokation von EGFP-IJ-Tesmin „full length“ in den Zellkern nach Induktion mit Cadmiumchlorid	117
Abb. 5.23: Dichtegradienten-Zentrifugation	118
Abb. 5.24: Zytosol-Membran-Fraktionierung des rekombinanten Tesmin „full length“ Proteins ohne bzw. nach Cadmiumchloridbehandlung und des endogenen Iporins	120

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 5.1: Überprüfung der Homodimerisierung des humanen Iporin Proteins mittels eines in vivo „yeast two-hybrid assays“</i>	92
<i>Tab. 5.2: Bestimmung der Iporin Bindungsdomäne für GM130 mittels eines in vivo „yeast two-hybrid assays“</i>	95
<i>Tab. 5.3: Kotransformation zur Verifizierung der pACT 56-Iporin Interaktion mittels eines in vivo „yeast two-hybrid assays“</i>	106
<i>Tab. 5.4: Kotransformation zur Verifizierung der pGADT7 Tesmin A-Iporin Interaktion mittels eines in vivo „yeast two-hybrid assays“</i>	109
<i>Tab. 5.5: Kotransformation zur Verifizierung der pGADT7 Tesmin „full length“-Iporin Interaktion mittels eines „yeast two-hybrid assays“</i>	112

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Acc. No.	„accession number“
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APP	„β-amyloid precursor protein“
APS	Ammoniumpersulfat
AR	β-adrenerger Rezeptor
Arf	„ADP-ribosylation factor“
AS	Aminosäure
AT	3-amino-1,2,3-triazol
AT1R	„angiotensin II type 1A receptor“
ATP	Adenosintriphosphat

B

b	Basen
BDNF	„brain-derived neurotrophic factor“
BHK	„baby hamster kidney“
BICD	Bicaudal
bidest	2-fach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise

C

C	Cystein
°C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
cc	„coiled-coil“
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCP	„clathrin coated pits“
CCV	„clathrin coated vesicles“
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
Cdk	„Cyclin-dependent kinase“; auch p34 ^{Cdc2} genannt
CDR	„complementary-determining regions“
cfu	„colony forming units“
CGN	„cis-Golgi network“
CH	Calponin Homologie
CHO	„chinese hamster ovary“
CK	„casein kinase“
COG	„conserved oligomeric Golgi complex“
CO ₂	„Kohlendioxid“
COPI/II	„coat protein complex I/II“
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
CSP	„cystein string protein“

D

D	Aspartat
Δ	deletiert

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Dest.	Destilliert
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	1,4-Dithiothreitol

E

E	Glutamat
E	„epithelial cell type specific expression“
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	„early endosome antigene 1“
EGFP	„enhance green fluorescent protein“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERES	„ER export sites“
ERGIC	ER-Golgi „intermediate compartment“
et al.	et altera
EtOH	Ethanol

F

F	Phenylalanin
FAD bd3	Flavoprotein Monooxygenase Domäne
FKS	fötales Kälberserum

G

g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
g	Gramm
gal4-AD	gal4-DNA-Aktivierungsdomäne
gal4-BD	gal4-DNA-Bindungsdomäne
GAP	„GTPase activating protein“
GARP	„Golgi-associated retrograde protein“
GDF	„GDI displacement factor“
GDI	„GDP dissociation inhibitor“
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“
GFP	„green fluorescent protein“
ggf.	gegebenfalls
GGPP	Geranylgeranylphosphat
GRASP65	„Golgi reassembly stacking protein 65“
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat

H

H/His	Histidin
h	Stunde

HA	Hämagglutinin	NLS	„nuclear localization signal“
HBS	Hepes „buffered saline“	Nnr	„neonatal rat ventricular“
HCL	Salzsäure	NSF	N-ethylmaleimid sensitive Faktor
HOPS	„homotypic fusion and vacuole protein sorting“	NSMR	„X-linked non-syndromic mental retardation“
HRP	„horse radish peroxidase“	NT-3	Neurotrophin-3
I		O	
I	Isoleucin	OD	optische Dichte
IC	„intermediate compartment“	orf	„open reading frame“
Ig	Immunglobulin	P	
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas	p	pico
<i>in vivo</i>	im lebenden System	P	Prolin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	p.a.	pro analysis
J		PBS	„phosphate buffered saline“
JNK	c-Jun N-terminale Kinase	PCR	„polymerase chain reaction“
K		PEG	Polyethylenglycol
K	Lysin	Plk	„polo-like kinase“
Kb	Kilobasen	PNS	„post nuclear supernatant“
KCL	Kaliumchlorid	PRA	„prenylated Rab acceptor“
kDa	Kilodalton	PtdIns(3)P	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
kV	Kilovolt	PVDF	Polyvinylidendifluorid
L		Q	
L	Leucin	Q	Glutamin
l	Liter	R	
LB	Luria Broth	R	Arginin
LDL	„low density lipoprotein“	Rab	„Ras analog in brain“
LIM	Lin-11, Isl-1 und Mec-3	RabF	„Rab family“
M		RabSF	„Rab superfamily“
μ	mikro	Ran	„Ras analog in nucleus“
M	Melanosom	REP	„Rab escort protein“
M	Methionin	Rho	„Ras homolog“
m	milli	RGGTase	Rab Geranylgeranyltransferase
M	Mol pro Liter	rmp	„rounds per minute“
mA	milli Ampere	RNA	Ribonukleinsäure
MAP	„merlin-associate protein“	RPIP	„ RaP2 interacting protein 8 “
MCS	„multiple cloning site“	RT	Raumtemperatur
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	RT-PCR	reverse Transcriptase PCR
MGF	mitotisches Golgi Fragment	RUSC	„RUN and SH3 domain containing“
min	Minute	S	
MKK	MAP Kinase Kinase	S	Serin
MRE	„metal-responsive element“	SD	„synthetic dropout“, Minimalmedium für Hefe
mRNA	„messenger RNA“	SDS	Sodiumdodecylsulfat
ms	milli Sekunde	sec	Sekunde
MT	Metallothioneine	SH3	„src homology-3“
MTOC	„microtubule organizing center“	SNAP	„soluble NSF attachment protein“
MVB	„multivesicular body“	SNARE	„soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor“
N		SV	„simian virus“
N	Asparagin	T	
N-	Amino-	t-	„target-“
NaCl	Natriumchlorid	T	Threonin
NaOH	Natriumhydroxid	Tab.	Tabelle
NC	„neuronal cell specific“	TAE	Tris-Acetat Puffer
NESCA	„new molecule containing SH3 at the carboxyl-terminus“		
NGF	„nerve growth factor“		

TBC	Tre-2/Bub2/CDC16	vgl.	vergleiche
TE	Tris-EDTA	VSV G	„vesicular stomatitis virus glycoprotein“
TE	„transitional element“; Übergangselement	VTC	„vesicular tubular cluster“
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin	W	
TGN	„ <i>trans</i> -Golgi network“	W	Tryptophan
TRAPP	„transport protein particle“	wt	Wildtyp
trkA	„NGF receptor tyrosine kinase“	X	
Trp	Tryptophan	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
TSSC	„tongue squamous cell carcinoma“	Y	
TSSK	Testis-spezifische Serin-Threonin Kinase	Y	Tyrosin
U		YFP	„yellow fluorescent protein“
U	„unit“	YIP	„Ypt interacting protein“
u.a.	unter anderem	YPD	„yeast-peptone-dextrose“, Vollmedium für Hefe
ÜN	über Nacht	Ypt	„yeast protein two“
UV	Ultraviolett	YT	„yeast-tryptone“
V		Z	
V	Valin	Z	Glutamin oder Glutaminsäure
V	Volt	z.B.	zum Beispiel
v-	„vesicle-“		
VAMP	„vesicle associated membrane protein“		

1. Einleitung

Eukaryoten besitzen von Membranen umschlossene funktionelle Einheiten, die Organellen, wodurch eine Organisation in einzelne Kompartimente und somit eine Trennung biochemischer Reaktionen voneinander gewährleistet wird (Mellman und Warren, 2000). Das größte Membransystem in der Zelle ist das Endoplasmatische Retikulum (ER), das teilweise mit Ribosomen (raues ER) besetzt ist. Hier werden neue Proteine gebildet, die während der Translation in das Lumen zurücktransportiert werden, wo sie gefaltet, ggf. glykosyliert und einer Qualitätskontrolle unterzogen werden. So erfolgt eine Lipid-, Cholesterol- und Steroid-Synthese, Detoxifikation, Calcium-Regulation und die Segregation von Kernkomponenten aus dem Zytosol (Pahl, 1999; Pfeffer, 2003).

Die neu synthetisierten Proteine werden an Ribosomen-freien Arealen, auch als Übergangselemente (TE = „transitional elements“) oder ERES („ER export sites“) bezeichnet, entlassen und gelangen auf dem sekretorischen Weg über die VTCs („vesicular tubular clusters“), auch ERGIC („ER-Golgi intermediate compartment“) genannt, wo ein weiterer Sortierungsschritt geschieht, in den Golgi Apparat (Saraste und Svensson, 1991; Bannykh et al., 1996; Presley et al., 1997; Martinez-Menarguez et al., 1999; Klumperman, 2000a; Klumperman, 2000b; Barlowe, 2002). So fungiert der Golgi Apparat als das zentrale Sortierungselement in eukaryotischen Zellen, gelegen an dem Schnittpunkt des exo- und endozytotischen Transportweges (Jackson, 2003; Short et al., 2005). Eine Subkompartimentisierung des Golgi Apparates, resultierend in polarisierten *cis*, *medial* und *trans* angeordneten abgeflachten Zisternen, mit einem dem ER zugewandten *cis*-Golgi Netzwerk (CGN) und dem gegenüberliegenden *trans*-Golgi Netzwerk (TGN), ermöglicht stufenweise effektive Glykosylierungen (Farquhar und Palade, 1981; Griffiths und Simons, 1986; Schweizer et al., 1988; Allan et al., 2002; Puthenveedu und Linstedt, 2005). Diese posttranslationalen Modifikationen ermöglichen eine exakte Sortierung im TGN und die Proteine werden entsprechend ihrer Destination zum weiteren Transport verpackt. Hierfür ist die Aufrechterhaltung des ER und des Golgi Apparates sowie der Transport zwischen beiden Organellen unerlässlich, um das Gleichgewicht in der Zelle zu erhalten (Ward et al., 2001).

1.1. Vesikulärer Transport in eukaryotischen Zellen

Neu synthetisierte Proteine werden auf dem sekretorischen Weg, auch Exozytose genannt, bis hin zu Lysosomen, bzw. der Plasmamembran gebracht, wobei die Endozytose, überwiegend von Endosomen vermittelt, eine Aufnahme von Substanzen aus der Umgebung über die Plasmamembran gewährleistet (Burgoyne und Morgan, 2003). Dieser dynamische konstitutive Transport bedarf keiner externer Stimuli, muss aber exakt reguliert werden, um die zelluläre Organisation aufrechtzuerhalten. Hierzu gehören die selektive Sortierung des Cargomaterials in einzelne Vesikel und die Kontrolle der Transportrichtung, sowie die Spezifität der Anheftung und der Fusion an die entsprechende Membran (Palade, 1975). Die Koordination einzelner sekretorischer Schritte trägt wesentlich zum Gleichgewicht, bzw. zu einem stabilen Zustand der Morphologie der Zellkompartimente bei (Segev, 2001). Einer der effektivsten Ansätze war die Studie der Sekretion in *Saccharomyces cerevisiae*, indem Proteine in genetischen „screens“ auf Mutanten mit Defekten in der Sekretion untersucht wurden. Entsprechend erhielten die Proteine die Bezeichnung Sec und wurden der Reihenfolge nach durchnummeriert (Novick et al., 1981). Unser heutiges Verständnis von zellulären Membranen als hochdynamische Strukturen und von den einzelnen antero- und retrograden Transportprozessen in eukaryotischen Zellen bedarf, trotz enormer Fortschritte der Wissenschaft, weiterer Aufklärung (Pelham und Rothman, 2000; Tuvim et al., 2001).

Die folgende Abbildung 1.1 verdeutlicht den vesikulären Transport zwischen den einzelnen Organellen in Abhängigkeit der gebildeten Vesikel-Proteinhüllen.

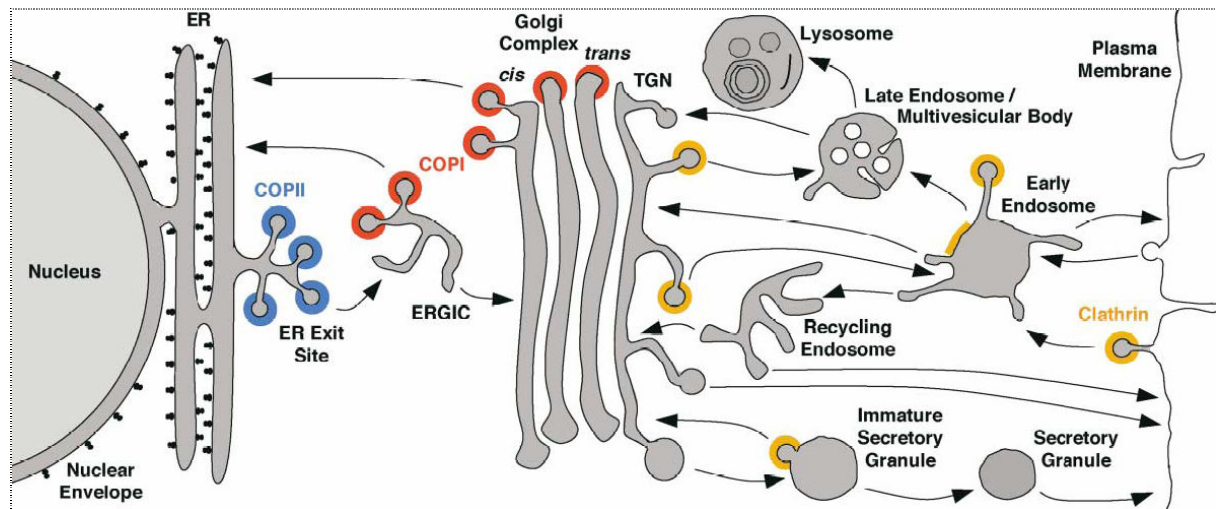


Abb. 1.1: Intrazellulärer Transport

In einer Zelle laufen geregelte Transportprozesse ab, die in den sekretorischen, lysosomal/vakuolären und endozytotischen Weg eingeteilt werden können. Die einzelnen Transportschritte, dargestellt durch Pfeile, werden durch die Ausbildung einer Proteinhülle spezifiziert, welche die Bildung und selektive Aufnahme des Transportguts dirigiert (Kirchhausen, 2000; Bonifacino und Lippincott-Schwartz, 2003). So befindet sich die Clathrin-Hülle (gelb) an Vesikeln der Plasmamembran, des *trans*-Golgi „networks“ (TGN) und der Endosomen. COPII (blau) bedeckte Vesikel vermitteln den Transport vom ER zum ER-Golgi „intermediate compartment“ (ERGIC) oder zum Golgi Apparat. Der Proteinhüllkomplex COPI (rot) ist in den *intra*-Golgi Transport und den retrograden Transport involviert. (aus: Bonifacino und Glick, 2004).

Die Bewegung von Cargomolekülen in Zellen geschieht größtenteils in Transportvesikeln, die von evolutionär konservierten Hüllproteinen gebildet werden. Man unterscheidet zwischen den COPI und II „coats“, Clathrin und Caveolin (Antonny und Schekman, 2001; Stephens und Pepperkok, 2001; Lafer, 2002; Barlowe, 2003; Williams und Lisanti, 2004). Damit die Vorgänge akkurat ablaufen, darf jeder „coat“ nur an bestimmten Vesikeln akkumuliert werden und diese werden dann, gesteuert durch Motorproteine und Anheftungsfaktoren, gezielt an die entsprechende Membran geliefert (Munro, 2004). Entscheidend hierbei ist die Auflösung der Proteinhülle („uncoating“), um folgend eine Membranfusion zu ermöglichen (Bonifacino und Glick, 2004). Zwei große Proteinfamilien nehmen bei der Regulierung des Vesikeltransports eine wichtige Funktion ein, die Rab GTPasen und die SNAREs („soluble *N*-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor“) (Seabra et al., 2002; Deneka et al., 2003; Hong, 2005). Da die Rab GTPasen einen Hauptaspekt dieser Arbeit darstellen, werden sie im Kapitel 1.2. „Rab GTPasen“ noch genauer beschrieben.

Der vesikuläre Transport beinhaltet 4 Schritte: Bildung eines Vesikels an der Donormembran („budding“), Transport, die Annäherung und die Anheftung („tethering“ und „docking“) an die Zielmembran sowie die Verschmelzung („fusion“) (Tuvim et al., 2001; Zerial und McBride, 2001; Bonifacino und Glick, 2004).

Ein vereinfachtes Schema, welches die grundlegenden Schritte des vesikelvermittelten Transportes verdeutlicht, ist der Abbildung 1.2 zu entnehmen.

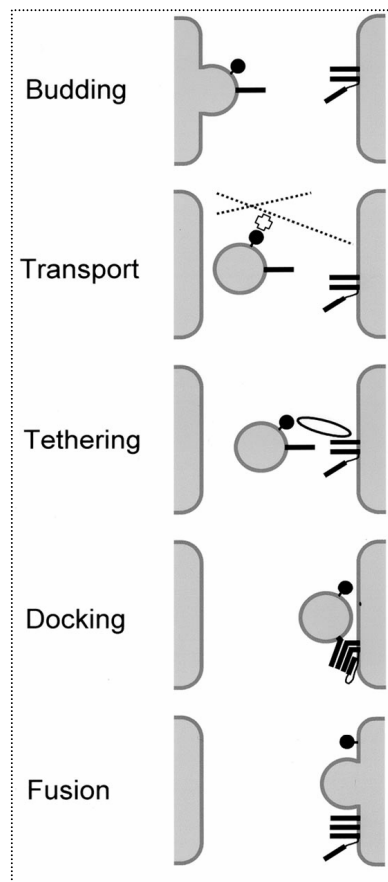


Abb. 1.2: Modell des vesikulären Membrantransports

Im ersten Schritt der Vesikelbildung an der Donormembran („budding“) wird eine kleine GTPase (•) an die Membran rekrutiert und dirigiert Vesikel-assoziierte SNAREs (v-SNAREs;—) und Cargomoleküle an den sich formenden „coat“. Durch diese Aufkonzentrierung wird die Membran immer stärker gebeugt, bis der Vesikel geformt und abgeschnürt wird. Nach der Abschnürung dissoziiert der „coat“ ab und das Vesikel wird durch das Zytoskelett mittels Diffusion oder direkten Transport tlw. durch Interaktion von Rab Effektorproteinen (⊕) mit Elementen des Zytoskeletts (--) weitergeleitet. Während der Annäherung („tethering“) heften sich große Komplexe elongierter Proteine (⊖) unter Regulation von Rab GTPasen locker an die Zielmembran. In der Anheftungsreaktion („docking“) formen ein v- und drei t-SNAREs ein paralleles 4-Helix Bündel und sorgen so für die Annäherung und anschließende Fusion der Membranen („fusion“). (aus: Tuvim et al., 2001)

Im ersten Schritt, dem so genannten „budding“, wird ein „priming complex“ aus einer kleinen GTPase, Membranproteinen, wie z.B. den v-SNAREs und Untereinheiten der Vesikelhülle geformt (Springer et al., 1999). Für einen Rücktransport der ER Proteine, gekennzeichnet durch die KDEL Sequenz, und insbesondere der Transportmaschinerieproteine zum ER sind Vesikel zuständig, die eine andere Hülle tragen (Pelham, 1990). In diesem Zusammenhang konnte eine Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne KKXX von Membrancargoproteinen, welche ebenfalls ein Motiv für die Rückholung in das ER sind, und der γ -Untereinheit des COPI Komplexes beschrieben werden (Cosson und Letourneur, 1994; Harter et al., 1996). COPI ist ein heptamerer Coatomer-Komplex, der mitunter aus der kleinen GTPase Arf1 besteht und der den retrograden Transport vermittelt, der selektiv Proteine vom *cis*-Golgi zum ER recycelt (Waters et al., 1991; Orci et al., 1993; Rothman und Wieland, 1996; Gaynor et al., 1998). Zusätzlich übernehmen die Arf Proteine eine Rolle im *intra*-Golgi Transport und sind zuständig für die Struktur des Golgi Apparates von Säugetierzellen (Duden, 2003).

Anhand einzelner Beispiele konnte gezeigt werden, dass der Golgi-ER Transport, vermittelt durch kleine GTPasen, in Abhängigkeit vom Zytoskelett steht (Pfeffer, 1999; Chen und Scheller, 2001; Zerial und McBride, 2001). So konnte z.B. eine Interaktion von Rabkinesin-6, einem „kinesin-like protein“, bzw. der humanen Form RB6K/Rab6-KIFL und dem GTP-gebundenen Rab6 Protein gezeigt werden (Martinez et al., 1997; Echard et al., 1998; Hill et al., 2000; Fontijn et al., 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte neue Rab1 spezifische Interaktionspartner, MICAL 1-3 beschreiben (Weide et al., 2003; Fischer et al., 2005). Eine Behandlung von Zellen mit Nocodazol, das die Depolarisation von Mikrotubuli bewirkt,

fürte zur Dispersion des MICAL Signals, so dass zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen Rab1 und dem Zytoskelett beschrieben werden konnte (Fischer et al., 2005).

Die initiale Erkennung von Vesikel- und Zielmembran wird durch Anheftungsfaktoren, wie „coiled-coil“ Proteinen, und großen Proteinkomplexen vermittelt. Zu den „coiled-coil“ Anheftungsfaktoren, die im ER zum Golgi und *intra*-Golgi Transport involviert sind, gehören Usa1p/p115, GM130, Giantin und Golgin-84 (Lupashin und Sztul, 2005). Da sie als Rab1 Interaktionspartner beschrieben werden konnten, wird im Kapitel 1.6. „Rab1 Effektoren“ näher auf sie eingegangen. TRAPPI/II („transport protein particle“) und COG („conserve oligomeric Golgi complex“) sind zwei Komplexe, bestehend aus zahlreichen Untereinheiten, die ebenfalls beim ER-Golgi und *intra*-Golgi Transport eine Rolle spielen (Sacher et al., 1998; Ungar et al., 2002; Oka und Krieger, 2005). Am Transport von den Endosomen zum TGN ist Golgin97 beteiligt und EEA1 („early endosome antigen 1“) am endosomalen Weg (Christoforidis et al., 1999; Lu et al., 2004). Zusätzlich sind der HOPS („homotypic fusion and vacuole protein sorting“) und der GARP („Golgi-associated retrograde protein“) Komplex in den TGN-endosomal-vakuolären Transport in der Hefe und der Exocyst Komplex in die Fusion mit der Plasmamembran involviert (Guo et al., 1999; Conibear und Stevens, 2002; Hsu et al., 2004). Während also die Vesikelbildung und die Cargo-Auswahl von der Proteinhülle vermittelt werden, hängt die Vesikelanheftung und die Verschmelzung der Membranen von den SNARE Proteinen ab (Bonifacino und Glick, 2004; Ungermann und Langosch, 2005). SNARE Proteine wurden zuerst in neuronalen Zellen, wo sie eine notwendige Komponente der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran darstellen, und parallel als Komponenten des sekretorischen Weges in Hefezellen gefunden (Bennett und Scheller, 1994; Rothman, 1994). SNAREs sind kleine integrale sowie auch periphere Membranproteine mit einer hydrophoben „coiled-coil“ Domäne und einem evolutionär konserviertem SNARE Motiv von ca. 60 Aminosäureresten (Söllner et al., 1993; Weimbs et al., 1997). Die distinkte Lokalisation der verschiedenen SNAREs an bestimmte Membrankompartimente spezifiziert die Anheftungs- bzw. Fusionsreaktion des ankommenden Vesikels mit der Zielmembran (Advani et al., 1998; Chao et al., 1999; Duman und Forte, 2003). So werden SNARE Proteine funktionell in einem Modell in zwei Gruppen eingeteilt, die v-SNAREs („vesicular“), die am ankommenden Vesikel präsentiert werden und t-SNAREs („target“), die an dem Zielkompartiment lokalisiert sind. Zum Teil kann dieses Modell variieren, da v-SNAREs ebenso an der Zielmembran und t-SNAREs am Vesikel existieren können (Kee et al., 1997). Die Bezeichnung „v-“, und „t-“, bezieht sich auf heterotypische Fusionsereignisse und trifft so nicht auf homotypische Fusionen zu. Entsprechend wurden SNAREs in Abhängigkeit des Aminosäurerestes in der alpha-Helix, die an der Fusion beteiligt ist, neu in Q- (Glutamin) und R- (Arginin) SNAREs klassifiziert (Fasshauer et al., 1998; Tishgarten et al., 1999; Antonin et al., 2000; Ungar und Hughson, 2003). Basierend auf der Strukturhomologie und der Domänenstruktur wurden die bekannten SNARE Proteine als Mitglieder der VAMP (V-SNARE), Syntaxin und SNAP-25 (zwei t-SNAREs) Familie eingeteilt (Chen und Scheller, 2001).

Typischerweise wird ein energetisch günstiger SNARE-Komplex aus vier SNAREs, drei Q und ein R, gebildet (Sutton et al., 1998; Tuvim et al., 2001). Dadurch werden beide Membranen reißverschlussartig zueinander gezogen und Energie für die Umformung des Lipid-Bilayers während der Fusion bereitgestellt (Puthenveedu und Linstedt, 2005). Nach der Fusion beider Membranen entsteht der *cis*-SNARE Komplex in dem Zielkompartiment (Hong, 2005). *In vitro* ist eine minimale Fusionsmaschinerie, der stabile SNARE_{pin} Komplex notwendig, der zwischen Q- und R-SNAREs geformt wird, wobei *in vivo* weitere Proteine benötigt werden (Weber et al., 1998). Kürzlich konnte eine neue Gruppe, die „inhibitory class of SNAREs“ i-SNAREs, beschrieben werden, die inkorrekte Fusionen verhindert (Antonin et al., 2002; Short und Barr, 2004; Varlamov et al., 2004).

Direkt nach der Fusion dissoziieren die SNARE Proteine, um für weitere Vorgänge wieder frei zu sein. Da der SNARE Komplex jedoch durch zahlreiche nicht-kovalente intermolekulare Wechselwirkungen sehr stabil ist, werden weitere Proteine und eine Zufuhr von Energie benötigt, um diese Dissoziation zu bewältigen. Für diese Regeneration der SNARE Proteine werden der ATPase N-ethylmaleimid sensitive Faktor (NSF) und die SNAPs („soluble NSF attachment proteins“) benötigt (Söllner et al., 1993; Acharya et al., 1995; Nichols und Pelham, 1998). NSF assoziiert mit Hilfe von drei α -SNAPs an den SNARE Komplex und es bildet sich ein so genannter 20 S Komplex (Hohl et al., 1998). NSF hydrolysiert ATP, um so genügend Energie bereitzustellen, wodurch sich sowohl der 20 S sowie der *cis*-SNARE Komplex lösen und die endgültige Verschmelzung beider Membranen vollzogen wird (Malhotra et al., 1988; Clary et al., 1990; Sudhof et al., 1993).

Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Neurotoxin bedingte Spaltung von SNAREs an Synapsen keinen Effekt auf die Vesikel Anheftung hat, so dass postuliert wird, dass eher Rabs sowie auch Anheftungsfaktoren den ersten Membrankontakt vermitteln und SNARE Proteine die späten Schritte der Membranfusion katalysieren (Hunt et al., 1994; Schiavo et al., 2000).

Als eine weitere Komponente, welche die Spezifität der späten Schritte der Membranfusion reguliert, kann die Sec1/Munc18 Familie (SM) angesehen werden, wovon die meisten Proteine eine hohe Affinität zu dem SNARE Protein Syntaxin aufweisen (Pevsner et al., 1994; Toonen und Verhage, 2003; Weimer und Richmond, 2005). Bis dato konnte den SM Proteinen keine genaue Rolle zugewiesen werden. Aus der Beobachtung jedoch, dass hoch homologe Proteine des gleichen Transportweges durch die entsprechenden anderer Spezies ersetzt werden können, nicht aber durch SM Proteine anderer Transportwege der gleichen Spezies, wurde postuliert, dass sie in distinkten Transportvorgängen eine entscheidende hoch spezifische Rolle spielen (Gengyo-Ando et al., 1996).

1.2. Rab GTPasen

Rab Proteine bilden eine Unterfamilie der Superfamilie regulatorischer GTP-Hydrolasen (G Proteine), welche in drei Gruppen kategorisiert werden können: kleine monomere G-Proteine, die eine Homologie zu dem Ras Protein aufweisen, G Proteine, die eine Rolle in der ribosomalen Proteinsynthese einnehmen, wie der Elongationsfaktor Tu, und die α -Untereinheiten (G_{α}) der heterotrimeren G Proteine (Bourne et al., 1991; Wennerberg et al., 2005).

Die Richtlinien zur Einteilung der Ras-ähnlichen GTPasen wurden in der FASEB Konferenz festgesetzt, so dass die Superfamilie in folgende fünf Familien eingeteilt werden kann: Ras, Rho/Rac, Rab, Arf und Ran, wobei die Rab/Ypt Proteine den größten Zweig darstellen (Kahn et al., 1992; Lazar et al., 1997; Novick und Zerial, 1997; Olkkonen und Stenmark, 1997). In den frühen 80er Jahren wurden Rab/Ypt GTPasen als Proteine identifiziert, die eine Homologie von 30-40 % zu dem Ras Onkogen aufweisen. Das erste beschriebene Mitglied der Rab Familie war das Hefeprotein Sec4, welches als Paradigma für die Funktion der Rab GTPasen in Vesikelanheftungsvorgängen steht (Salminen und Novick, 1987; Zahraoui et al., 1989). Im Allgemeinen kennzeichnet diese Proteinfamilie das niedrige Molekulargewicht von ca. 20-40 kD und die Möglichkeit, als molekulare Schalter biochemische Vorgänge in Zellen zu steuern (Takai et al., 2001).

Die Anzahl der Mitglieder der Rab Familie korreliert mit der evolutionär bedingten, erhöhten Membran-Komplexität der Organismen, in denen sie vorkommen: *Schizosaccharomyces pombe* (7 Mitglieder), *Saccharomyces cerevisiae* (11 Mitglieder), *Caenorhabditis elegans* (29 Mitglieder), *Drosophila melanogaster* (29 Mitglieder), *Arabidopsis thaliana* (57 Mitglieder) und *Homo sapiens* (70 Mitglieder) (Pereira-Leal und Seabra, 2000 und 2001; Colicelli, 2004; Gurkan et al., 2005). Rab Proteine ähneln sich zwar stark in ihrem Gesamtaufbau und ihrer Struktur, teilen allerdings eine Aminosäureidentität von 35-80 % und weisen feine

Die folgende Auflistung fasst einige Rab vermittelte Transportwege zusammen und gibt ihre Funktionsweisen wieder.

So spielen Rab1 und Rab2 in dem exozytotischen Weg im ER-Golgi Transport eine Rolle (Tisdale et al., 1992; Tisdale und Balch, 1996). Es wird postuliert, dass Rab1 den vesikulären Transport zum *cis*-Golgi vermittelt, während Rab2 den Anheftungsprozess an den *medialen*-Golgi unterstützt, und in den Zusammenbau der Golgistapel involviert ist (Pfeffer, 2003). Während Rab1 und sein Partner p115 in allen Eukaryoten präsent sind, ist die Expression von Rab2 und Golgin-45 auf Vertebraten beschränkt (Short et al., 2005). Da Rab1 im zentralen Interesse dieser Arbeit steht, wird es im folgenden Kapitel 1.5. „Rab1“ näher beschrieben.

Während die meisten Proteine ubiquitär im Gewebe vorkommen, sind Rab3A und 3C hauptsächlich in Neuronen lokalisiert, überwiegend an synaptischen Vesikeln (Fischer von Mollard et al., 1990). Mit Hilfe von Maus „knockout“ Experimenten konnte festgestellt werden, dass sie die Regulation der Neurotransmitter-Freisetzung kontrollieren (Castillo et al., 1997; Geppert et al., 1997).

Rab4 und Rab5 sind beide im Transport endozytotischer Vesikel zu frühen Endosomen involviert, wobei Rab4 ebenso wie Rab11 an „recycling“ Endosomen zu finden ist und beide am Recycling des Transferrin Rezeptors zurück zur Plasmamembran beteiligt sind (van der Sluijs et al., 1992b; Ullrich et al., 1996; Sönnichsen et al., 2000; de Renzis et al., 2002). Das bis dato am besten untersuchte Rab Protein ist Rab5, so dass bislang bereits 30 verschiedene Effektoren beschrieben werden konnten (Zerial und McBride, 2001; Pfeffer, 2005c). Endosomen-assoziiertes, GTP-gebundenes Rab5 interagiert mit dem Anheftungsfaktor Rabaptin-5 und dem GEF Rabex-5, wobei Rabaptin-5 über zwei Rab GTPase-Bindungsstellen verfügt, so dass der Kontakt von zwei Endosomen ermöglicht wird (Stenmark et al., 1995; Horiuchi et al., 1997; Vitale et al., 1998). Eine Überexpression von dauerhaftem Rab5 führt zu vergrößerten Endosomen (Stenmark et al., 1994). Ebenso konnte für Rab5 ein Zusammenwirken mit dem Zytoskelett nachgewiesen werden, indem Rab5 die Assoziation von Endosomen mit Mikrotubuli stimuliert, so dass diese zum Minusende der Mikrotubuli wandern können (Nielsen et al., 1999). Ein neu beschriebener Effektor, Rabankyrin-5 konnte zusätzlich eine Verbindung zur Makropinozytose aufzeigen (Schnatwinkel et al., 2004). Rab11 ist in BHK („baby hamster kidney“) Zellen mit dem Golgi assoziiert, in CHO („Chinese hamster ovary“) Zellen am TGN und in PC12 Zellen am TGN sowie an *post*-Golgi Kompartimenten lokalisiert (Urbé et al., 1993; Ullrich et al., 1996; de Graaf et al., 2004). Unsere Arbeitsgruppe konnte einerseits zeigen, dass Rab11 und sein Hefehomolog Ypt11 in Zellen kolokalisieren und mit Hilfe von Transportassays andererseits, dass Ypt11 im Membran-Recyclingsystem in Säugetierzellen funktionell aktiv ist (Kail et al., 2005).

Ein weiteres Rab Protein, das im Zentrum der Charakterisierung kleiner GTPasen steht, ist das am retrograden Transport beteiligte Protein Rab6. Rab6 ist am Golgi Apparat und an den Membranen des TGN lokalisiert und am *intra*-Golgi sowie dem Golgi-ER in Abhängigkeit COPI bedeckter Vesikel beteiligt (Goud et al., 1990; Mayer et al., 1996; Martinez et al., 1997; Girod et al., 1999; White et al., 1999). Wie bereits erwähnt, besteht eine Verbindung zwischen dem Rab6 vermitteltem Transport und dem Zytoskelett. Als weiteres Beispiel kann angeführt werden, dass Rab6 mit Bicaudal-D (BICD) interagiert, welches am Transport durch Dynein beteiligt ist (Hoogenraad et al., 2001; Matanis et al., 2002). Des Weiteren kann Rab6 den Dynactinkomplex durch Bindung der p150^{glued} Untereinheit an Membranen rekrutieren (Short et al., 2002; Young et al., 2005).

Teber et al. konnten kürzlich einen Zusammenhang zwischen der Alzheimer Erkrankung, bzw. APP („amyloid precursor protein“), mint3 und Rab6A herstellen, wobei postuliert wird, dass mint3 in den Transport von APP, der von kleinen GTPasen rekrutiert wird, involviert ist (Dugan et al., 1995; McConlogue et al., 1996; Greenfield et al., 2002; Teber et al., 2005).

Rab27 ist in Melanozyten für die Anbindung von Melanosomen an Myosin Va verantwortlich, welches mit dem Zytoskelettprotein Aktin über das Adaptorprotein Melanophilin wechselwirkt (Hammer und Wu, 2002; Seabra und Coudrier, 2004). Rab27 ist ein sehr populäres Beispiel, das verdeutlicht, in wieweit eine Störung des vesikulären Transports zu Erkrankungen führen kann. So führen Defekte im *Rab27A* Gen zum Griscelli-Syndrom (Ménasché et al., 2000; Bahadoran et al., 2003; Ménasché et al., 2003).

Eine Verbindung zwischen Rab GTPasen und autonomen Organellen konnte für Rab32 gezeigt werden, das es mit Mitochondrien assoziiert ist und dynamische mitochondriale Membranprozesse reguliert (Alto et al., 2002).

1.3. Struktur der Rab Proteine

Rab Proteine sind eng mit anderen Ras GTPasen verwandt und zeichnen sich durch eine ähnliche Struktur aus sechs hochkonservierten Domänen aus. Sie bestehen aus einem sechskardeligem β -Faltblatt mit fünf parallelen und einem anti-parallelen Strang, flankiert von fünf α -Helices (Pfeffer, 2005b). Die strukturelle Grundlage der Rab Proteine als molekulare Schalter zu fungieren, ist die Möglichkeit, zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Status und einem inaktiven, GDP-gebundenen Status zu zirkulieren (Vetter und Wittinghofer, 2001). Diese gegenseitige Umkehrung wird von zahlreichen Enzymen reguliert, die entweder die GDP-Ablösung oder die GTP-Hydrolyse stimulieren. Bedingt ist diese Änderung durch die so genannten „switch“-Regionen der Rab Proteine. Analog zu Ras kommen zwei solcher Motive in jedem Protein vor, „switch I“ und „switch II“, wobei ihre Orientierung in Ras Proteinen im Gegensatz zu Rab Proteinen umgekehrt sein kann (Stroupe und Brunger, 2000; Constantinescu et al., 2002; Pasqualato et al., 2004). Diese Regionen verändern ihre Form in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids, wodurch es zu einer Konformationsänderung des gesamten Proteins kommt und somit zu veränderten Affinitäten zu den Interaktionspartnern (Stroupe und Brunger, 2000). In der aktiven Form binden die Rab Proteine an spezifische Rab-Effektorproteine, um so ihre entsprechenden Funktionen ausführen zu können (Pereira-Leal und Seabra, 2001; Pfeffer, 2001; Zerial und McBride, 2001).

Da sich die Rab Proteine strukturell stark ähneln, müssen sich einzelne Sequenzen soweit voneinander unterscheiden, dass sie die Spezifität der einzelnen Proteine gewährleisten. Ihnen gemeinsam sind Regionen, die in Guanin und Phosphat/Mg²⁺ Bindung involviert sind (Barbacid, 1987; Bourne et al., 1991). So bindet Guanin an die Sequenzmotive G1, G2 und G3 und Phosphat/Mg²⁺ an die Regionen PM1, PM2 und PM3 (Valencia et al., 1991).

Pereira-Leal und Seabra konnten fünf so genannte Rab Familie Sequenzen, F1 bis F5, beschreiben, wobei F1 Teil der „switch“-Domäne I und F3 und F4 Teil der „switch“-Domäne II sind. Diese Sequenzen sind innerhalb der Rab Proteine, nicht aber bei den Ras und Rho GTPasen konserviert. Weiterhin konnten sie vier konservierte Rab Subfamilie-Regionen (RabSF) identifizieren, von denen postuliert wird, dass sie Effektor-Interaktions-Motive enthalten (Pereira-Leal und Seabra, 2000). Drei der RabSF Motive (RabSF1, 3 und 4) befinden sich nicht in einer der beiden „switch“-Regionen und stehen so frei für weitere Bindungen, wie es im Fall von Rab3A und seinem Effektor Rabphilin gezeigt werden konnte (Stahl et al., 1996). Da Effektoren aber mit GTP gebundenen Rab Proteinen interagieren, müssen sie ebenso bestimmte Regionen in den „switch“-Regionen erkennen. So konnte ebenfalls für Rab3A, bzw. allgemeingültig für alle Rab Proteine beschrieben werden, dass es weitere drei Rab Untereinheiten gibt, die als CDRs („complementary-determining regions“) bezeichnet werden, und diese z.B. bei Rab3A wichtig für die Bindung mit Rabphilin sind. Sie weisen eine ähnliche Verteilung wie die RabSF1, 3 und 4 Motive auf (Ostermeier und Brunger, 1999).

Ein stark ausgeprägter Unterschied innerhalb der Rab Proteine besteht in der hypervariablen Region am C-Terminus (Chavrier et al., 1990). Der C-Terminus ist größtenteils unstrukturiert, wobei sich die Sequenzvariabilität von der letzten α -Helix bis zum C-Terminus erstreckt.

Insbesondere die Länge der letzten α -Helix variiert stark innerhalb der Rab Familie, wodurch die Diversität der Rab Proteine und ihre unterschiedliche Affinität zu Effektorproteinen erklärt werden kann. Aufgrund der einzigartigen Zusammensetzung der C-Termini wurde postuliert, dass dieser, bzw. die hypervariable Region mitunter zusätzlich für die Lokalisation der einzelnen Proteine mit verantwortlich ist (Chavrier et al., 1991; Neu et al., 1997; Ostermeier und Brunger, 1999). Es wird allerdings kontrovers diskutiert, dass dies nicht für alle Proteine gilt, denn ein Austausch der hypervariablen Domäne von Rab5a gegen die von Rab1A, Rab2a, Rab7 oder Rab27a hatte keinen Effekt auf die Lokalisation oder die Funktion von Rab5a (Ali et al., 2004).

Rab Proteine werden als lösliche Proteine neu synthetisiert und unterliegen einer posttranslationalen Modifikation am C-Terminus, wodurch eine reversible Membrananheftung ermöglicht wird (Seabra, 1996a; Sönnichsen et al., 2000; Calero et al., 2003). Die hypervariable Domäne ermöglicht hierbei eine räumliche Trennung von der Prenylierungsstelle und der globulären GTPase Domäne (Pfeffer, 2005a). Zuerst werden sie von dem Chaperon-ähnlichen Protein REP („Rab escort protein“) erkannt und gebunden, um so der RGGTase („Rab geranylgeranyl transferase“) präsentiert zu werden (Alexandrov et al., 1994; Casey und Seabra, 1996a; Thoma et al., 2001). REP, die RGGTase und ein Geranylgeranylphosphat (GGpp) gehen einen Komplex ein, so dass eine bzw. zwei Prenylgruppen (CXXX, CC, CXC, CCXX oder CCXXX; X stellt eine beliebige Aminosäure dar) mittels kovalenter Thioether-Bindungen an Cystein-Reste angeheftet werden können (Andres et al., 1993; Anant et al., 1998; Alexandrov et al., 1999). Es wird postuliert, dass REP die prenylierten Rabs folgend an die Ziellmembran führt, wobei noch ungeklärt ist, ob die Zielfindung der „richtigen“ Membran von REP oder dem prenyliertem Rab aktiv gesteuert wird (Alory und Balch, 2001; Ali und Seabra, 2005). Die Trennung des Komplexes wird von einem Membran-gebundenen Rab Akzeptor unterstützt (Alexandrov et al., 1994). Die Wichtigkeit der korrekten Funktion von REP wird verdeutlicht, indem eine „loss of function“ Mutation von REP-1 zu der Erkrankung Choroideremia führt (Seabra, 1996b).

Rak und Mitarbeiter konnten mit Hilfe der kristallinen Struktur des monoprenylierten Rab7 Proteins, gebunden an ein REP Protein, nachweisen, dass sich der Rab C-Terminus über die Oberfläche des REP Proteins erstreckt. Die gleiche Beobachtung konnte ebenfalls für Ypt1 und GDI („GDP dissociation inhibitor“), das aufgrund einer sequenziellen und funktionellen Verwandtschaft zu REP zur GDI/CHM Superfamilie gezählt wird, gemacht werden (Alory und Balch, 2001). Neben zwei hydrophoben Resten innerhalb der C-terminalen hydrophoben Region trägt ein erhöhter Gehalt an Prolin- und Glycin-Resten, die zu einer ausgestreckten Struktur führen, zur bevorzugten GDI Bindung und Prenylierung bei (Rak et al., 2003; Rak et al., 2004).

1.4. Rab Zyklus

Prenylierte Rab Proteine befinden sich im Zytosol in ihrem inaktiven, GDP-gebundenen Status an GDI, über die Rab Bindeplattform und eine Rezeptorinteraktions Region („mobile effector loop“), gebunden (Pfeffer et al., 1995; Wu et al., 1996; Alory und Balch, 2001). Zusätzlich trägt unterhalb dieser Bindeplattform eine Rille innerhalb einer hydrophoben Oberfläche zur Erkennung und Bindung von prenylierten Proteinen bei (Pfeffer und Aivazian, 2004). Das humane Genom kodiert für zwei GDI Isoformen, GDI α und GDI β , wobei GDI α im Gehirn und GDI β ubiquitär exprimiert wird. GDI ist in der Lage, alle Rab Proteine über ihre intrafamiliär stark konservierten „switch“-Regionen zu binden (Shisheva et al., 1994; Alory und Balch, 2001; Rak et al., 2003). Der GDI-Rab Komplex beinhaltet alle Informationen, um die Rab Proteine an das richtige Membran-Kompartiment zu bringen (Soldati et al., 1994; Ullrich et al., 1994; Pfeffer und Aivazian, 2004).

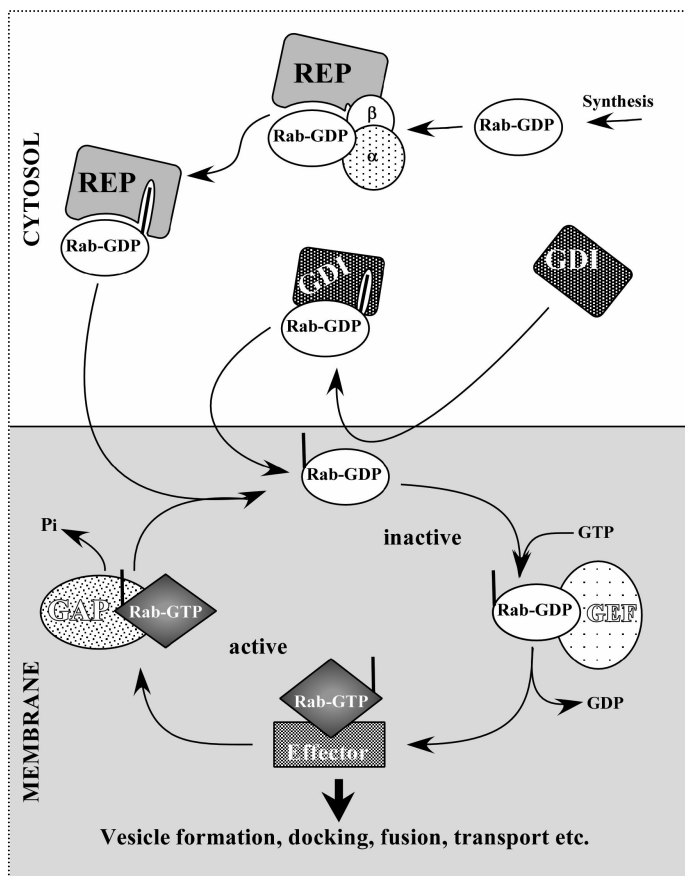


Abb. 1.4: Rab Prenylierung und der GTPase Zyklus

Ein neu synthetisiertes Rab Protein bedarf einer posttranslationalen Modifikation, einer Isoprenylierung, um anschließend in den Rab Zyklus eingeschleust zu werden. Hierfür wird es von **REP** („Rab escort protein“) erkannt und der **RGGTase** (Rab geranylgeranyltransferase; bestehend aus der Untereinheit α und β) präsentiert. Prenylierte Rabs werden an ein Donor-Kompartiment eskortiert und mit Hilfe eines **GEFs** („guanine nucleotide exchange factor“) in den aktiven Status versetzt. Durch eine Interaktion mit spezifischen Effektoren können sie folgend z.B. eine Vesikelbildung, deren Transport und Anheftungsprozessen vermitteln. Nach der Membranfusion wird die niedrige intrinsische Rate der GTP-Hydrolyse durch ein **GAP** („GTPase activating protein“) überwunden. Das Rab Protein in seinem inaktiven, GDP-gebundenem Status wird mittels **GDI** („GDP dissociation inhibitor“) von der Membran extrahiert und wartet im Zytosol auf einen neuen Zyklus (aus: Goody et al., 2005).

Ein aktuelles Modell beschreibt, dass Rab-GDI Komplexe durch membranassoziierte Proteine, GDFs („GDI displacement factors“), erkannt werden, welche die Rab Proteine vom GDI löst und an die entsprechende Membran liefert (Dirac-Svejstrup et al., 1997). So wird ein membranlokalisierter Chaperon Komplex, bestehend aus hsp90, hsp70 und CSP („cystein string protein“) als potentiell GDF für die Membrananheftung des zytoplasmatischen Rab-RabGDI Komplexes diskutiert (Sakisaka et al., 2002). Bisher konnte nur ein GDF, das Yip3 („Ypt interacting protein“) identifiziert werden, welches spezifisch für die endosomalen Rab5 und Rab9 Proteine ist (Sivars et al., 2003). Das humane Analogon hierfür ist PRA1 (Hutt et al., 2000). An der Membran wird das Rab Protein durch ein GEF („guanine nucleotide exchange factor“) aktiviert und durch Anbindung spezifischer Effektoren in seiner stationären Lokalisation stabilisiert. Stößt das Rab Protein nicht auf das entsprechende GEF und die verwandten Effektoren, wird es von einem unbesetzten GDI komplexiert und kann an eine

neue Membran gebracht werden (Pfeffer und Aivazian, 2004; Pfeffer, 2005a). Da GEFs allerdings Proteine sind, die aus dem Zytosol rekrutiert werden müssen, liegt es nahe, dass weitere Faktoren die Verbindung von Rab Proteinen und ihren GEFs initiieren (Ali und Seabra, 2005).

Somit ist neben der Anlieferung eines Rabs an eine Membran auch die Ablösung ein entscheidender Schritt im vesikulären Prozess. Damit die Rab Proteine also wieder für einen neuen Zyklus bereit stehen, müssen sie wieder in den inaktiven, GDP-gebundenen Status übergehen. Rab Proteine haben eine sehr niedrige intrinsische Aktivität, so dass es weiterer Enzyme bedarf, welche die GTP Hydrolyse katalysieren. Diese Rolle übernehmen die GAPs („GTPase activating proteins“) (Martinez und Goud, 1998). Ihnen gemeinsam ist die konservierte „TBC“ (Tre-2/Bub2/CDC16) Domäne, worüber mit Hilfe von BLAST und Sequenzhomologien insgesamt 51 verschiedene GAPs in humanen Zellen beschrieben werden konnten (Strom et al., 1993; Albert et al., 1999; Bernards, 2003). Entscheidend hierbei ist eine Insertion des Argininfingermotivs in die aktive Seite des Rabs, um so den Übergangszustand zu stabilisieren (Scheffzek et al., 1998; Rak et al., 2000). Ein gut beschriebenes GAP ist das GapCenA (Gap und Zentrosom-assoziiertes Protein), welches spezifisch mit Rab6 interagiert (Cuif et al., 1999). In ihrem inaktiven Status gehen die Rab Proteine im Zytosol wieder einen Komplex mit einem GDI Protein ein (Ullrich et al., 1993). Die Wichtigkeit dieses Proteins wird deutlich, wenn man bedenkt, dass eine Rab GDI Deletion in Hefezellen lethal ist und ein Basenaustausch (192P) im humanen α -Rab GDI Gen zu der Erkrankung NSMR („X-linked non-syndromic mental retardation“) führt (Garrett et al., 1994; D’Adamo et al., 1998).

Das folgende Beispiel verdeutlicht, dass ein Effektor keine Rab Spezifität besitzen muss. So konnte gezeigt werden, dass Rabphilin nicht nur mit den unterschiedlichen Rab3 Isoformen A, B, C und D über Teile des N- und C-Terminus, sondern auch mit Rab8, Rab15 und Rab27A/B interagiert (Ostermeier und Brunger, 1999; Fukuda, 2003). Ein weiteres Effektorprotein EEA1 (= „early endosome antigen 1“), welches sowohl mit Rab5A, B und C, sowie mit Rab22 interagiert, ist wichtig für eine Endosom-Endosom Fusion (Simonsen et al., 1998; Christoforidis et al., 1999). Aufgrund der Diversität der Rab Proteine, die von denselben Effektoren gebunden werden, kann ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion über die variable Region vermittelt wird, sondern eher über konservierte Motive (Merithew et al., 2003).

Es wird postuliert, dass Mitglieder der Rab Familie über eine Interaktion mit ihren spezifischen Effektoren zu Schlüssel molekülen werden. Sie steuern zahlreiche Signaltransduktionswege, wie Zell-Proliferation, Zell-Versorgung, die angeborene Immunantwort und die Fragmentierung einzelner Kompartimente während meiotischer und apoptotischer Vorgänge und nehmen so einen direkten Einfluss auf den Transport in den Kern (Bucci und Chiariello, 2006). So können stetig weitere Effektoren beschrieben werden, die spezifisch mit einem definierten Rab Protein oder einer kleinen Anzahl verschiedener Rabs interagieren, die zwar unterschiedliche Gewebespezialität aufweisen, aber eng miteinander verwandt sind. Um jedoch vollständig klären zu können, wie diese Interaktionen vermittelt werden und wie dadurch zelluläre Funktionen vermittelt werden, bedarf es noch viel Arbeit (Ali und Seabra, 2005).

1.5. Rab1

Im Zentrum meiner Arbeit steht die kleine GTPase Rab1 und sein direkter Interaktionspartner Iporin, der im Kapitel 1.7. näher beschrieben wird. In Säugetierzellen kommen zwei Isoformen, Rab1A und Rab1B vor, die eine Homologie von 92% zueinander aufweisen und funktionell austauschbar sind (Touchot et al., 1987; Touchot et al., 1989; Vielh et al., 1989; Nuoffer et al., 1994). Da Rab1A jedoch eine Konsensussequenz enthält, die während mitotischer Vorgänge von der Kinase Cdc-p34 phosphoryliert wird, ist es möglich, dass beide

Proteine während der Zellteilung unterschiedliche Aufgaben haben (Bailly et al., 1991; Saraste et al., 1995).

Bereits 1983 konnte das erste Rab Gen *ypt1* beschrieben werden, wobei Ypt1p und Rab1 zu 71% homolog zueinander sind (Gallwitz et al., 1983; Schmitt et al., 1986; Haubruck et al., 1987). Rab1A ist in der Lage, Ypt1p in mutierten Hefezellen zu ersetzen, was auf einen entwicklungsbedingten, konservierten Mechanismus schließen lässt (Haubruck et al., 1989). Unterschiede werden aber ersichtlich. So wurde Gyp1p als Ypt1p GAP beschrieben, bis heute konnte aber noch kein Rab1 GAP gefunden werden (Du und Novick, 2001; De Antoni et al., 2002; Lafourcade et al., 2004). Eine Membrananheftung von Ypt1p steht im Zusammenhang mit Yip1 („Ypt-interacting protein“), denn die Expression einer generierten Temperatursensitiven Mutante führte bei einer nicht-permissiven Temperatur zum raschen Verlust einer Membrananheftung (Calero et al., 2003).

Rab1A und B sind am ER und dem Golgi Apparat lokalisiert und regulieren den anterograden ER-Golgi, sowie den *intra*-Golgi Transport z.B. des LDL-Rezeptors, von APP („ β -amyloid precursor protein“) und CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) (Plutner et al., 1991; Tisdale et al., 1992; Nuoffer et al., 1994; Wilson et al., 1994; Castellano et al., 1995; Dugan et al., 1995; Yoo et al., 2002). Ebenso konnte mit Hilfe von doppelt-negativen Mutanten (Rab1B S25N und N124I) sowie siRNA und einer dadurch bedingten Rab1 Verarmung im zellulären System gezeigt werden, dass Rab1 für den Transport von AT1R („angiotensin II type 1A receptor“) vom ER über den Golgi Apparat notwendig ist (Wu et al., 2003).

Rab1 reguliert den COP II vermittelten Transport zwischen dem ER und dem Golgi Apparat und rekrutiert hierbei während des „budding“ Vorgangs des Vesikels den Anheftungsfaktor p115, der wiederum mit einem Komplex aus den SNARE Proteinen Membrin, Rbet1 und Syntaxin5 interagiert (Allan et al., 2000; Deneka et al., 2003). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass Ypt1p in späte Schritte des Vesikeltransportes vom ER zum Golgi Apparat involviert ist (Cao und Barlowe, 2000). Alvarez et al. zeigten, dass Rab1 ebenfalls eine Rolle im Arf1 vermittelten Transportweg COPI bedeckter Vesikel übernimmt, da die Nukleotidfreie Rab1B Mutante N121I zu einer Dissoziation von β -COP von Membranen führte (Alvarez et al., 2003). Das lässt den Schluss zu, dass Rab1 Proteine mehrere Funktionen während des ER-Golgi Zyklusses übernehmen, indem unterschiedliche Effektormoleküle an Rab1 binden (Moyer et al., 2001).

Die Wichtigkeit dieser Interaktionen wird durch einige veröffentlichte Studien deutlich, die einen Zusammenhang zwischen Gewebeerkrankungen und einer gestörten Rab1 Expression beschreiben. So konnte in einem Mausmodell, in dem eine kongestive Kardiomyopathie durch Überexpression des β -adrenergen Rezeptors (AR) ausgelöst wurde, ein deutlicher Anstieg der Rab1B Expression detektiert werden (Liggett et al., 2000). Ein anderer Ansatz zeigte, dass transgene Mäuse, die Rab1 überexprimieren, im Alter von 6 Wochen Herzfehler sowie ein vergrößertes Herz mit erweiterten Herzkammern und verstopften Arterien aufwiesen (Wu et al., 2001). Ebenso konnte eine Hochregulierung des Rab1A im Zusammenhang mit dem Plattenepithelkarzinom der Zunge (TSSC = „tongue squamous cell carcinoma“) beschrieben werden (Shimada et al., 2005). Inwieweit Rab1 allerdings Erkrankungen auszulösen vermag, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden (Muslin, 2001).

1.6. Rab1 Effektoren

Die drei funktionell am besten untersuchten Golgine, die an Membranbindungsprozessen beteiligt sind, sind p115, GM130 und Giantin. Allgemein weisen Golgine eine ausgeprägte „coiled-coil“ Struktur auf und spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Golgi Struktur. Viele Mitglieder dieser Familie interagieren mit Rab GTPasen (Jackson, 2003). Sie wurden ehemals identifiziert als Antigene, die von Autoantikörpern in Seren von

Patienten detektiert wurden, die an Autoimmunerkrankungen, wie z.B. dem Sjögren Syndrom litten (Kooy et al., 1992). Golgine sind unterschiedlich mit der Golgi Membran assoziiert, so unterscheidet man z.B. Transmembran-Golgine (Giantin, Golgin-84), Adaptor-assoziierte Golgine (GRASP65-GM130) und Rab-rekrutierte Golgine (p115 durch Rab1, BICD1/2 durch Rab6) (Short et al., 2005).

Da GM130 als direkter Interaktionspartner von Iporin beschrieben werden konnte, wird es im folgenden Kapitel 1.8. „GM130“ genauer beleuchtet (Bayer et al., 2005).

Der Anheftungsfaktor p115 wurde ehemals in einem von Rothman beschriebenen *intra*-Golgi „assay“ identifiziert und ist größtenteils als peripheres Membranprotein an den VTCs und am *cis*-Golgi lokalisiert (Waters et al., 1992; Nelson et al., 1998). Es handelt sich hierbei um ein Homodimer mit einer aminoterminalen, globulären Kopfdomäne, einem „coiled-coil“ Schwanz (cc1-cc4) der Länge 45 nm und einem C-Terminus, an dem sich eine kurze saure Sequenz von 28 Aminosäuren befindet (Sapperstein et al., 1995). Das Hefehomolog Uso 1p ist ähnlich in der Struktur, jedoch mit 150 nm größer (Yamakawa et al., 1996). Die Funktion von p115 und Uso1p umfasst die Regulation der COPII umhüllten Vesikel an den Golgi Apparat und die Initiierung der Bildung eines SNARE Komplexes im ER-Golgi Transport (Sapperstein et al., 1996; Barlowe, 1997; Cao et al., 1998; Shorter und Warren, 2002; Hong, 2005). Zusätzlich wurde postuliert, dass p115 wichtig für die Anheftung COPI bedeckter Vesikel ist (Sönnichsen et al., 1998).

Das zytosolische Phosphoprotein p115 bindet über seine C-terminale Region, hauptsächlich aber über die „coiled-coil“ Domäne 1, an die kleine GTPase Rab1 und wird so für den COPII bedeckten vesikulären ER-Golgi Transport benötigt. Experimente mit einzelnen p115 Verkürzungsmutanten ließen den Schluss zu, dass eine p115/Rab1 Bindung erst durch eine gleichzeitige Anheftung von GM130 oder Giantin an den Schwanzbereich ermöglicht wird und die p115/Rab1 Interaktion zusätzlich durch eine Interaktion von GM130 oder Giantin mit Rab1 stimuliert wird. So wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem p115 erst durch eine Anheftung von GM130, bzw. Giantin aus einer geschlossenen Form in eine offene Form übergeht und erst dann mit Rab1 interagieren kann (Beard et al., 2005). Weiterhin spielt p115 eine Rolle im *intra*-Golgi Transport und im Wiederaufbau des Golgi Apparates nach mitotischen Vorgängen, wobei sogar vermutet wird, dass diese Funktion für p115 entscheidender ist als die Funktion als Anheftungsfaktor. So führte eine Mikroinjektion von anti-p115 Antikörpern zu einem Kollaps der Golgi Struktur (Sohda et al., 1998; Alvarez et al., 1999; Alvarez et al., 2001; Puthenveedu und Linstedt, 2004). Eine weitere positive Regulation des vesikulären Transportes wird durch die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne von p115 durch CKII („casein kinase II“) oder eines „CKII-like“ Enzyms erreicht, wodurch p115 ins Zytosol abgegeben wird. Beim erneuten Zusammenschluss der Golgifragmente, z.B. nach der Mitose, wird die Bindung an GM130 bevorzugt (Sohda et al., 1998; Dirac-Svejstrup et al., 2000). So interagiert in *in vitro* Versuchen p115 als multifunktionelle Plattform zuerst mit Giantin an COPI umhüllten Vesikeln und folgend mit GM130 am *cis*-Golgi (Sönnichsen et al., 1998; Shorter und Warren, 2002). Giantin ist ein Säugetier-spezifisches, Stab-ähnliches (Typ II) integrales Membranprotein, das Homodimere bildet und über den C-Terminus mit dem Golgi Apparat verbunden ist, wobei eine große, „coiled-coil“-reiche Domäne ins Zytoplasma hineinragt (Linstedt und Hauri, 1993; Misumi et al., 2001).

Ein weiteres Typ II integrales Transmembran-Golgin, das als Rab1 Interaktionspartner beschrieben werden konnte, ist das „coiled-coil“ Protein Golgin-84, das ebenfalls in der Lage ist, Homodimere auszubilden (Bascom et al., 1999). Golgin-84 ist am CGN lokalisiert und es konnte gezeigt werden, dass es an Tubuli und den lateralen Enden der Golgistapel angereichert ist, bzw. mit ihnen in Verbindung steht. So konnten Untersuchungen zeigen, dass eine Überexpression oder eine Reduzierung des Golgin-84 Proteins zur Fragmentierung des Golgibandes führt und Golgin-84 Antikörper eine Zusammenlagerung der zisternalen Membranen in einem zellfreien Test verhindern. Eine Überexpression der C-terminalen

Domäne stimuliert dagegen die Zusammenlagerung und führt so zu verlängerten Zisternen. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass Golgin-84 an der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Golgi Apparates beteiligt ist (Diao et al., 2003; Satoh et al., 2003). Golgi-84 interagiert weder mit p115 noch mit GM130 und seine exakte Funktion muss noch bestimmt werden (Lupashin und Sztul, 2005).

Unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, eine neue Proteinfamilie von Rab1 Interaktionspartnern zu charakterisieren, die eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der kleinen GTPase Rab1 aufzeigt. Die MICAL Proteine zeigen eine starke Interaktion mit der GTP-gebundenen Form von Rab1B, weisen aber auch eine schwache Affinität zu der inaktiven, GDP-gebundenen Rab1 Form (Rab1A N124I und Rab1B N121I) auf. Die Interaktion zwischen Rab1 und MICAL 1 ist abhängig von der N- und der C-terminalen hypervariablen Domäne, wobei der C-Terminus nicht zu der Spezifität der Bindung beiträgt, da Chimäre, bestehend aus dem N-Terminus von Rab1 und dem C-Terminus von Rab6 ebenfalls mit MICAL 1 interagierten (Weide et al., 2003; Fischer et al., 2005). MICAL konnte ehemals als ein Bindungspartner von CasL und Vimentin beschrieben werden und aufgrund einer Interaktion mit Plexin wurde eine Verbindung zur Axonwegfindung postuliert (Suzuki et al., 2002; Terman et al., 2002). MICAL 1 zeigt überwiegend eine zytosolische Verteilung und besteht aus einer Flavoprotein Monooxygenase Domäne (FAD bd3), einer Calponin Homologie Domäne (CH), einer LIM Domäne, die von zwei Prolin reichen Sequenzen und einer Glutamin reichen Sequenz flankiert wird, und zwei „coiled-coil“ Domänen am C-Terminus (Suzuki et al., 2002; Weide et al., 2003). MICAL 1-3 zeigen insbesondere im C-terminalen Bereich, der als Rab1 Bindedomäne eingegrenzt werden konnte, eine hohe Homologie auf, während der N-terminale Bereich recht unterschiedlich zwischen den einzelnen Proteinen ist (Fischer et al., 2005). Die genaue Rolle, welche MICAL Proteine im sekretorischen Weg übernehmen, muss in weiteren Experimenten noch erforscht werden.

1.7. Neuer Rab1 Interaktionspartner: Iporin

Trotz intensiver Recherchen konnte die Rolle von Rab1 im ER-Golgi Transport noch nicht vollständig geklärt werden. Da die Funktionen von Rab1 über zahlreiche Interaktionen mit Effektoren vermittelt werden, ist es unerlässlich, weitere Interaktionspartner näher zu identifizieren und zu charakterisieren. So ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen, mit Hilfe eines „yeast two-hybrid“ Systems und der daueraktiven Mutante Rab1B Q67R als „bait“ eine humane Plazenta cDNA Bank nach möglichen interagierenden Proteinen zu überprüfen und drei Interaktionspartner von Rab1 aufzuspüren: GM130, MICAL (siehe 1.6. „Rab1 Effektoren“ und 1.8. „GM130“) und Iporin, abgeleitet von „interacting protein of rab“ (Weide et al., 2001; Weide et al., 2003; Bayer et al., 2005). Details zu Iporin sind bereits veröffentlicht und können der Publikation entnommen werden (Bayer et al., 2005, siehe Anhang).

Die genomische Sequenz von Iporin umfasst ca. 14 kb des chromosomalen Abschnitts 9p13, wobei die kodierende Sequenz von 4548 bp auf 11 Exons verteilt ist. Somit resultiert ein Protein von 1516 Aminosäuren und einer berechneten Größe von ca. 160 kDa, was im Gegensatz zu der beobachteten Größe von 220 kDa steht (siehe 5.1. „Endogene Detektion von Iporin im Gewebe“; Bayer et al., 2005). Mit Hilfe von BLAST und ExPasy konnte ein murines Protein (Q80U22) mit einer Homologie von 86,9 % zum humanen Iporin (Q8N2Y8) gefunden werden (Huang und Müller, 1991). Das Maus Iporin besteht aus 1514 Aminosäuren und kommt in zwei Isoformen vor, wobei der Isoform 2 die Aminosäuren 1454-1514, d.h. ein großer Teil der SH3 Domäne fehlen. Eine ähnliche „splice“ Variante konnte für das humane Iporin nicht gefunden werden (Katoh und Katoh, 2004).

Strukturanalysen zeigten, dass der N-Terminus von Iporin lediglich einen Prolin reichen Abschnitt an Position AS 429-442 besitzt und alle weiteren Motive bzw. Domänen im C-

Terminus liegen. Zum besseren Verständnis ist der schematische Aufbau von Iporin in der folgenden Abbildung **1.5** dargestellt.

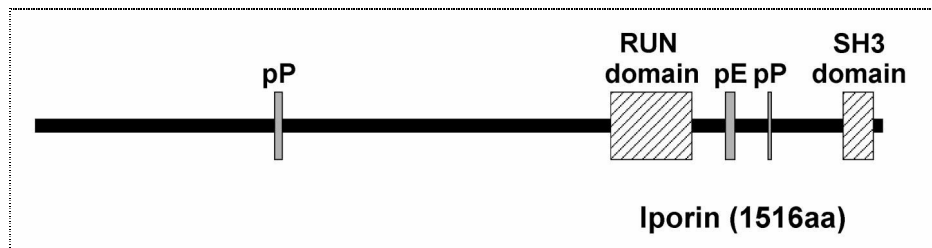


Abb. 1.5: Schematische Struktur von Iporin

Iporin besteht aus 1516 Aminosäuren und kann in einen motivarmen N-Terminus und einen stark strukturierten C-Terminus unterteilt werden. An Position AS 429-442 und AS 1311-1319 sind zwei poly P-„stretches“ (pP) und an Position AS 1236-1252 ein poly E-„stretch“ (pE) lokalisiert. Das zentrale Element von Iporin ist die RUN Domäne (AS 1031-1175), welche als Rab1B Bindedomäne ermittelt werden konnte. Am C-Terminus befindet sich eine SH3 Domäne, die weitere mögliche Protein/Proteininteraktionen vermitteln könnte (aus Bayer et al., 2005)

Ein weiterer poly P-„stretch“ ist an Position AS 1311-1319 und ein poly E-„stretch“ bei AS 1236-1252. Es ist bekannt, dass Prolin reiche Sequenzen, durch Bindung an SH3 Domänen oder WW Domänen, und poly E „stretches“ Protein/Proteininteraktionen vermitteln, bzw. der poly E-„stretch“ zur Stabilisierung des Proteins aufgrund seiner starken negativen Ladung führt (Cicchetti et al., 1992; Ren et al., 2003; Yu et al., 1994; Sudol, 1996; Ermekova et al., 1997; Kang et al., 2004). Zwei zentrale Motive des Iporinproteins sind die RUN Domäne (AS 1031-1175) und eine SH3 Domäne am Ende des C-Terminus (AS 1447-1500). Katoh und Katoh konnten in virtuellen Analysen mit Hilfe von tBLAST neue Proteine identifizieren, die SH3 Domänen enthalten. So beschrieben sie zwei „RUN and SH3 domain containing“ Proteine RUSC1 und RUSC2, die eine Homologie von 42% aufweisen, wobei RUSC1 ebenfalls unter dem Namen Nesca bekannt ist und RUSC2 Iporin repräsentiert (Katoh und Katoh, 2004).

Da die RUN Domäne ein zentrales Motiv in Iporin darstellt und mögliche regulatorische Funktionen in meiner Arbeit diskutiert werden, wird sie im Folgenden näher beschrieben. Allgemein sind RUN Domänen in zahlreichen Proteinen vorhanden, die im Zusammenhang mit den kleinen GTPasen der Rap und Rab Familien und so mit zellulären Proliferationsprozessen, Differenzierung und Bewegung stehen. Ihre Bezeichnung leitet sich von **R**PIP8 („**Ra**P2 interacting protein **8**“), **U**NC-14 und **N**ESCA („**n**ew molecule containing **S**H3 at the **c**arboxyl-terminus“) ab (Ogura et al., 1997; Janoueix-Lerosey et al., 1998; Matsuda et al., 2000; Sakamoto et al., 2005). Den RUN Domänen ist ein Kerngerüst einer globulären Struktur aus 6 konservierten Blöcken mit einer Homologie von $\geq 10\%$ innerhalb der unterschiedlichen Proteine gemeinsam (Callebaut et al., 2001). Mit Hilfe von Verkürzungsmutanten von Iporin (siehe Abbildung **5.4** „Iporin und Verkürzungsmutanten“) konnte die RUN Domäne als Rab1B Bindedomäne eingegrenzt werden (Bayer et al., 2005). Auf Seiten von Rab1B konnte mit Hilfe von Rab1/Rab6 Chimären gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich von Rab1 und insbesondere die hypervariable Domäne sowie die Rab Subfamilie-Regionen 1 und 2 für eine Bindung an Iporin notwendig sind und die Prenylierungsstelle für die Interaktion nicht benötigt wird (siehe **1.4**. „Rab Zyklus“; Bayer et al., 2005).

Interessant ist, dass alle bis heute bekannten Bindungspartner von Rab1 eine Interaktion über einen „coiled-coil“ Bereich eingehen und Homodimere bilden. Iporin fehlt zwar ein „coiled-coil“ Bereich, jedoch konnte mit Hilfe von www.predictprotein.org und insbesondere des Programms „PROF predicted secondary structure“ für einen Teilbereich der RUN Domäne, und zwar AS 1152-1173 eine helikale Struktur vorhergesagt werden (Rost und Liu, 2003;

Rost et al., 2004). Zusätzlich beschrieben Katoh und Katoh mit Hilfe des Genetyx Programms sowohl für RUSC1 als auch für RUSC2 in diesem Bereich ein mögliches Leucin-,zipper“ Motiv, das zwar im Zusammenhang mit Bildung von Homodimeren steht, dessen Relevanz allerdings in weiteren Experimenten erforscht werden muss (Katoh und Katoh, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Iporin mit einer weiteren Komponente des vesikulären Transports, dem *cis*-Golgi Matrixprotein GM130 interagiert, auf das im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

1.8. GM130

GM130 kommt in Säugetierzellen vor und seine Expression ist limitiert auf höher entwickelte Organismen (Short et al., 2005). Es wurde ehemals in Antiseren autoimmunerkrankter Patienten gefunden und als Golgin-95 beschrieben (Fritzler et al., 1993). GM130 ist ein peripheres, Stab-ähnliches Membranprotein, bestehend aus 6 „coiled-coil“ Domänen und kommt als Homodimer vor (Nakamura et al., 1995; Nakamura et al., 1997). Die distinkte Lokalisation am *cis*-Golgi wird über eine Interaktion des C-Terminus von GM130 mit der PDZ-Domäne des myristoylierten membranverankerten Proteins GRASP65 („Golgi reassembly stacking protein“) vermittelt (Barr et al., 1997; Barr et al., 1998). Interessanterweise kann die Myristoylgruppe an jede beliebige Membran anheften, so dass es noch einen weiteren spezifischen Rezeptor geben muss, der spezifisch GM130-GRASP65 an die *cis*-Golgi Membran dirigiert (Yoshimura et al., 2001). Die Organisation und die Sortierung der Enzyme bzw. Proteine innerhalb der Golgizisternen etabliert die *cis/trans* Polarisation, so dass eine Anheftung der „richtigen“ Vesikel streng kontrolliert werden muss. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass GM130 in der Anheftung, bzw. Fusion COPII umhüllter Vesikel im ER-Golgi Transport über die Interaktion mit Rab1 eine Rolle spielt. Die Anheftung wird zusätzlich durch eine Interaktion mit dem Anheftungsfaktor p115 vermittelt, welche auf Seiten von GM130 auf den N-terminalen Bereich eingeschränkt werden konnte. Interessanterweise ist die Rab1-GM130 Interaktion unabhängig von p115 (Nakamura et al., 1995; Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001). Für eine Interaktion zwischen GM130 und Rab1 wird die C-terminale, hypervariable Domäne der kleinen GTPase benötigt, die wiederum an die „coiled-coil“ Domäne 3 von GM130 bindet (Weide et al., 2001). GM130 zählt allerdings nicht zu den Rab1 spezifischen Effektoren, denn es konnten ebenso Interaktionen mit Rab2 und Rab33b beschrieben werden (Short et al., 2001; Valsdottir et al., 2001).

1.9. Tesmin

Für eine detaillierte Charakterisierung des neuen Rab1 spezifischen Interaktionspartners Iporin ist es hilfreich, weitere interagierende Proteine zu identifizieren, um so Rückschlüsse auf die Funktion ziehen zu können und den Wirkort zu bestimmen. Im Hinblick auf die hohe mRNA Expressionsrate von Iporin im Hodengewebe, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems eine humane Testis cDNA Genbank auf neue Interaktionspartner hin überprüft. So konnte Tesmin isoliert und als neuer Bindungspartner von Iporin experimentell bestätigt werden (siehe 5.6. „Neuer Iporin spezifischer Interaktionspartner: Tesmin“). Tesmin ist ein erst kürzlich beschriebenes Protein, dessen Name „testis-specific metallothionein like protein“ sich aus einer strukturellen Ähnlichkeit zu Metallothioneinen, begründet in zwei Cystein-reichen Abschnitten, ableitet (Sugihara et al., 1999). Metallothioneine (MTs) sind ubiquitär vorkommende, nieder-molekulare, hochkonservierte und Cystein-reiche Proteine (Margoshes und Vallee, 1957). Sie besitzen keinerlei enzymatische Aktivität, können aber Spurenelemente wie Zink oder Cadmium binden, wodurch sie Zellwachstum und Differenzierungsvorgänge steuern. Ebenso wird ihre Bildung in Organismen durch Schwermetalle induziert, die sie anschließend binden können, um so eine toxische Wirkung auf zahlreiche Stoffwechselprozesse zu unterbinden (Ren et al.,

2003). Im Mausgenom konnten bis jetzt 4 MT Gene auf Chromosom 8 und im humanen Genom 16 Gene, auf Chromosom 16 verteilt, gefunden werden (West et al., 1990; Quaife et al., 1994). Im Hodengewebe kommen vermehrt die Isoformen 1 und 2 vor, wobei die zeit- und entwicklungspezifische 10-fach erhöhte Expression von Metallothioneinen, bzw. deren mRNA in männlichen Keimzellen im Vergleich zu anderen Geweben auf eine Funktion während der Spermatogenese hindeutet (Hunziker und Kägi, 1985; De et al., 1991; Salehi-Ashtiani et al., 1993; Suzuki et al., 1998). Es konnte jedoch keine Hochregulierung von MTs in Testis nach Exposition mit Schwermetallen, bzw. mit Cadmiumchlorid detektiert werden, so dass eine Existenz von weiteren, Metall bindenden Proteinen wie z.B. Tesmin postuliert wurde (Durnham und Palmitter, 1981; Waalkes und Perantni, 1986; Abel et al., 1991; McKenna et al., 1996). Ein entscheidender Unterschied ist, dass Tesmin ein für Metallothioneine typisches Element, das MRE („metal-responsive element“) fehlt, so dass es nicht in die Gruppe der Metallothioneine eingegliedert wird (Stuart et al., 1985; Sutou et al., 2003). Wie bereits erwähnt, sind zwei Cystein-reiche Sequenzen charakteristisch für Tesmin, bzw. für Tesminhomologe wie das *Arabidopsis thaliana* Tso1 und drei weitere uncharakterisierte Proteine, das *Glycine max* CPP1 Protein, ein Protein in *Drosophila melanogaster* (Acc. No.: AAF58365) und zwei bisher uncharakterisierte *Caenorhabditis elegans* Proteinvarianten (Acc. No.: CAB05228 bzw. CAB05229), was auf eine konservierte biologische Funktion schließen lässt (Cvitanich et al., 2000; Hauser et al., 2000; Song et al., 2000). So werden sie aufgrund dieser „CXC-hinge-CXC“ Abfolge zu der CHC Familie gezählt (Sutou et al., 2003).

Alle bis heute erschienenen Veröffentlichungen beziehen sich auf das murine Tesmin, da dieses allerdings eine Homologie von ca. 60 % zu dem humanen Tesmin aufweist, können die Daten größtenteils auf das humane Protein übertragen werden. Mit Hilfe der „Northern Blot“ Analyse konnten zwei Maus spezifische Transkripte der Größe 2,2 und 1,8 kb und ein humanes Transkript von 2,1 kb detektiert werden (Sugihara et al., 1999). Die beiden Maustranskripte enthalten zwar denselben „open reading frame“, entstehen aber aufgrund unterschiedlicher Polyadenylierungs Signale. Das 1,8 kb große Haupttranskript hat eine kürzere 3'UTR und enthält ein nicht-kanonisches Signal (ATAAAA) im Gegensatz zu dem kanonischen Signal (AATAAA) in dem größeren Transkript, dessen Bedeutung bis heute nicht geklärt werden konnte (Gautheret et al., 1998; Beaudoin et al., 2000; Paran et al., 2000; Sutou et al., 2003). Das Maus Tesmin besteht aus 475 AS und weist eine Größe von ca. 50 kDa auf, wobei durch posttranslationale Modifikationen ein Protein der Größe 60 kDa detektiert werden kann (vgl. Acc. No.: AB057423; Protein: Q8VIE1 bzw. BAB64935.1; Sutou et al., 2003). Die kodierende Sequenz des humanen Tesmins hat eine Länge von 1527 bp, verteilt auf 9 Exons, resultierend in einem 508 AS und ca. 55 kDa großen Protein (vgl. Acc. No.: NM_004923.2; Protein: Q6P2E2 bzw. NP_004914). Die Mausequenz ist auf Chromosom 19B und die humane Sequenz auf Chromosom 11q13.2-q13.3 lokalisiert, wobei es sich hierbei um homeologe Segmente handelt (Sugihara et al., 1999). Interessanterweise konnte in sterilen Mäusen eine reziproke Translokation des Genabschnitts von Chromosom 19 zu 11 beobachtet werden (Evans, 1977). Das humane Protein enthält eine Cystein-reiche Sequenz an Position AS 307-331 und die zweite, innerhalb der Proteine der CHC Familie stark konservierte Sequenz an Position AS 365-406. So weist das zweite CXC-Motiv des murinen Tesmins an Position AS 332-375 eine Homologie zu dem Motiv des humanen Proteins von über 90 % auf.

Tesmin ist als Testis spezifisches Protein beschrieben worden und mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung in Gewebeschnitten erfolgte eine Zuordnung zu bestimmten Stadien der Spermatogenese. Die Spermatogenese ist definiert als Differenzierung von Keimzellen zu männlichen Geschlechtszellen, also Spermien. So entstehen nach der Pubertät in Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) aus Spermatogonien durch eine mitotische Teilung primäre Spermatozyten, welche im Preläptotän/Leptotän Stadium von der basalen Membran

nach Überquerung der Blut-Hoden-Schranke, die anatomisch von den Sertolizellen gebildet wird, in den adluminalen Bereich migrieren (Bellvé et al., 1977; Byskov und Hoyer, 1994). Hier entwickeln sich aus den Spermatozyten über zwei aufeinanderfolgende meiotische Teilungen Spermatiden (Russell, 1977; de Kretser und Kerr, 1988; Santiemma et al., 1992; Cheng und Mruk, 2002; Mruk und Cheng, 2004). Die Reifung der Spermien erfolgt in den Epididymis (Nebenhoden).

So konnte eine schwache Tesminexpression in den runden Spermatozyten der Maus am Tag 8 nach der Geburt, d.h. zu einem Zeitpunkt, an dem die Keimzellen durch meiotische Vorgänge differenzieren, detektiert werden, die stetig während der Prophase I bis zum Tag 42 nach der Geburt, das entspricht dem mittleren bis späten Pachytänstadium, ansteigt (Don et al., 1994). Dieses konnte durch weitere Methoden, wie des „imprintings“ und der Immunhistochemie bestätigt werden. Es konnte kein Tesminsignal in fötalem Hodengewebe detektiert werden (Olesen et al., 2004). Diese Beobachtung führt zu der These, dass Tesmin als ein früher Marker der Keimzellendifferenzierung während der Spermatogenese definiert werden kann (Sugihara et al., 1999). Im späten Pachytän bis zum Leptotänstadium, d.h. dem Eintritt der Zellen in die Meiose, wandert Tesmin in den vergrößerten Kern (Matsuura et al., 2002). Tesmin ist allerdings keine Komponente der Chromosomen während der meiotischen Teilung, da keine Kolkalisation mit kondensierenden Chromosomen stattfindet. Nach Abschluss der Meiose kommt es zu einer Retranslokation von Tesmin und während der Spermio-genese konnte ein schwächeres Tesminsignal unterhalb des sich bildenden akrosomalen Vesikels, welches an der Oberfläche der Kernmembran lokalisiert ist, detektiert werden. Tesmin akkumuliert an der Kernoberfläche während der Entwicklung der Spermatiden und wandert in elongierten Spermatiden zu dem kaudalen Ende. Diese Bewegung entlang der Kernmembran könnte ein Hinweis darauf sein, dass Tesmin ebenso eine Rolle in der Spermienreifung sowie der Spermienmorphogenese spielt (Sutou et al., 2003).

Olesen et al. konnten kürzlich beschreiben, dass mit Hilfe der „Northern Blot“ Analyse ein Tesmintranskript der Größe 2,4 kb in Maus Ovarien sowie Transkripte im fötalen und adulten Herzen detektiert werden konnten. Während der Oogenese differenzieren Oogonien zu Oozyten 1. Ordnung und verbleiben bis zur Geburt in einem Ruhestadium zwischen der Pro- und Metaphase, dem späten Diplotänstadium (Peters, 1970). So konnte ein schwaches Tesminsignal in fötalen Ovarien zum Zeitpunkt der ersten meiotischen Teilung detektiert werden, das sich verstärkte, als sich nahezu alle Keimzellen in der Prophase I befanden, wobei es nicht möglich war, das Signal einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen (McClellan et al., 2003; Olesen et al., 2004). So postulierten Olesen et al., dass Tesmin sowohl während der Spermatogenese, d.h. in Hodenkanälchen adulter Mäuse und während der Oogenese in fötalen Ovarien eine Rolle spielt, wobei der Entwicklungszeitpunkt sowie der Level der mRNA Akkumulierung während der Meiose I auf zwei unterschiedliche Kontrollmechanismen der Tesmin Transkription sowie zwei unterschiedliche Proteinfunktionen schließen lässt (Olesen et al., 2004).

Ebenso konnte mit Hilfe des Maus Tesmin-GFP Fusionsproteins, exprimiert in Cos1 Zellen, eine zytoplasmatische Verteilung gezeigt werden. Diese Ergebnisse konnten durch eine Zytosol-Membran-Fraktionierung von CHO Zellen, die Maus Tesmin überexprimieren, bestätigt werden (Sutou et al., 2003). Für die Untersuchung, ob die CXC Regionen sensitiv auf Schwermetallbehandlung reagieren, wurden die Zellen mit 100 μ M Cadmiumchlorid behandelt. Dies führte nach 5 Stunden zu einer Translokation des Tesminsignals in den Zellkern. Entsprechend wurde der Effekt von Cadmiumchlorid *in vivo* in Gewebeschnitten des Mausstammes DBA/2J, anfällig für CdCl_2 , der mit 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CdCl_2 behandelt worden ist, beobachtet (Matsuura et al., 2002). Diese Cadmiumchlorid Konzentration führte bereits in Rattenhoden zu einigen apoptotischen Zellen, um so durch der Apoptose nicht mehr notwendige oder beschädigte Zellen zu eliminieren, um Entzündungsreaktionen zu verhindern

und so die genetische Stabilität zu wahren (Zhou et al., 1999; Ferri und Kroemer, 2001; Reed et al., 2004). So konnte eine Translokation etwa 6 Stunden nach Behandlung und eine Lokalisation im Kern spätestens nach 12 Stunden beobachtet werden. Es konnten keine histologischen Veränderungen beobachtet werden, höchstwahrscheinlich aufgrund zahlreicher Kontrollmechanismen der Spermatogenese, welche beschädigte Keimzellen entweder reparieren oder mittels Apoptose eliminieren. Parallel wurden von Sutou et al. Versuche durchgeführt, wobei Mäuse mit Kobaltchlorid, das einen ähnlichen Effekt wie Cadmiumchlorid hat, behandelt wurden. Es konnten sporadisch apoptotische, vielkernige Zellen beobachtet werden, wobei das Tesminsignal in den vergrößerten Zellen sowohl im Zytoplasma und im Kern lokalisiert war (Sutou et al., 2003). So wird postuliert, dass Testis als ein hochsensitives Organ über einen spezifischen Überwachungsmechanismus verfügt. Tesmin und insbesondere die Cysteinreste könnten als *in vivo* Sensoren des Proteins dienen (Matsuura et al., 2002).

2. Zielsetzung

Es ist allgemein bekannt, dass Rab Proteine eine Schlüsselposition im Membrantransportprozessen eukaryotischer Zellen, insbesondere durch Interaktionen mit spezifischen Effektoren, übernehmen (Pfeffer, 2005b). So ist Rab1 mitunter in die ersten Schritte der Exozytose involviert und wird für den Proteintransport von ER zum *cis*-Golgi und für den *intra*-Golgi Transport benötigt (Tisdale et al., 1992; Nuoffer et al., 1994; Martinez und Goud, 1998; Segev, 2001). In der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zu Iporin, dem neuen direkten Interaktionspartner der kleinen GTPase Rab1 im Mittelpunkt.

Die domänen- und motivreiche Struktur von Iporin impliziert, dass es unterschiedliche Interaktionen mit verschiedenen Proteinen eingehen kann und hierbei die zentral gelegene RUN Domäne eine Schlüsselrolle einnimmt (Callebaut et al., 2001; Bayer et al., 2005). Im Zentrum meiner Arbeit stand die detaillierte Charakterisierung von Iporin und seiner weiteren Interaktionspartner.

Wie bereits erläutert, konnte die höchste mRNA Expressionsrate von Iporin im Gehirn und Hodengewebe detektiert werden. Diese Beobachtung sollte auf Proteinebene mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse bestätigt werden und eine entwicklungsabhängige Expression im Hoden- und Ovariengewebe untersucht werden. Die zelluläre Verteilung von Iporin ist ubiquitär, wobei eine Akkumulierung des Signals am Zellkern detektiert werden kann. Da der aminoterminal Bereich von Iporin im Gegensatz zu dem C-Terminus motiv- und domänenarm ist, sollte neben der zellulären Lokalisation der entsprechenden Mutanten mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse das Proteinmotiv ermittelt werden, welches hauptsächlich für die Lokalisation bzw. eine Kolo-kalisation mit Rab1B verantwortlich ist. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zeigten, dass Iporin ein Leucin-„zipper“ Motiv enthält, durch welches Proteine Homodimerisierungen eingehen können (Katoh und Katoh, 2004). So sollte untersucht werden, ob Iporin, wie zahlreiche andere Rab1 Interaktionspartner, ebenfalls in der Lage ist, über dieses Motiv eine Dimerisierung einzugehen.

Es konnte gezeigt werden, dass der COPII vermittelte vesikuläre ER-Golgi Transport durch die Proteine Rab1B, p115 und GM130 reguliert wird (Allan et al., 2000; Weide et al., 2001). In diesem Zusammenhang interessierte es mich, ob Iporin während der Anheftungsreaktion zu dieser Spezifität beiträgt und neben Rab1B auch mit dem Golgi Apparat-assoziierten Protein GM130 interagiert. Mit Hilfe der Immunhistochemie sollten die drei Interaktionspartner Rab1B, Iporin und GM130 in Gewebeschnitten der Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) und der Nebenhodens (Epididymis) detektiert werden und ihre Rolle während der Spermatogenese sowie Spermiogenese untersucht werden.

Eine Suche mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems sollte spezifische Interaktionspartner in der humanen Hoden cDNA Genbank hervorbringen, um so Rückschlüsse auf die Iporinfunktion ziehen zu können. So konnte zu ersten Mal das humane Tesmin, das präferenziell während der Spermatogenese und Oogenese exprimiert wird, als neuer Iporin Bindungspartner beschrieben werden. Bereits für das murine Tesmin konnte eine Translokation aus dem Zytosol in den Zellkern als Folge einer Schwermetallinduktion gezeigt werden. So sollte eine Signalverlagerung des humanen Tesmins und ggf. von Iporin nach Cadmiumchloridbehandlung von Zellen, die Tesmin überexprimieren, untersucht werden (Matsuura et al., 2002; Sutou et al., 2003). Eine subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe des Percoll Gradienten sollte anschließend analysiert werden, ausserdem welchen Zellkompartimenten Tesmin zugeordnet werden kann und ob diese Lokalisation mit der von Iporin übereinstimmt. Zusätzlich sollten diese Ergebnisse und auch die Cadmiumchlorid bedingte Translokation mit der Zellfraktionierungstechnik bestätigt werden.

3. Material

3.1. Chemikalien

CHEMIKALIEN	HERSTELLER
Aceton p.A.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
30 % Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agar (Select)	Invitrogen®Life Technologies, Karlsruhe
Agarose	SeaKem LE Agarose, Cambrex über Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf
3-Amino-1,2,3-triazol (3AT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA) p.A.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau (BPB)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Brilliant Blau R 250	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Cadmiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Herring testis carrier DNA	Clontech Laboratories AG, Basel
Complete®Mini EDTA-frei, Proteinase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako Faramount Aqueous Mounting Medium	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Desoxycholsäure (DOC)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Applied Biosystems, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	ICN Biomedicals, Eschwege
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen®Life Technologies, Karlsruhe
Eisessig	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

CHEMIKALIEN	HERSTELLER
Ethidiumbromid	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Pan Systems GmbH, Nürnberg
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Glukose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare Bio-Sciences, Freiburg
Glyzerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt
Hefeextrakt (Select)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, dioxanfrei (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
L-Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Arginin HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
L-Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
L-Histidin HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Leucin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Lithiumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
L-Lysin HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Methionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Threonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

CHEMIKALIEN	HERSTELLER
L-Uracil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
L-Valin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Magermilchpulver	De-Vau-Ge Gesundheitswerk, Lüneburg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Merckoglas	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol p.A.	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
3-Morpholinopropansulfonsäure (MPS)	Merck KGaA, Darmstadt
Moviol (4-88)	Aventis, Frankfurt am Main
Natriumacetat (NaAc)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
NP-40, Igepal CA 630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Orange-G	Merck KGaA, Darmstadt
Paraclear [®]	ProTaqClear, über Quartett, Berlin
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Pepton (Select)	Merck KGaA, Darmstadt
Percoll [™]	GE Healthcare Bio-Sciences, Freiburg
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Merck KGaA, Darmstadt
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Protein G [™] Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare Bio-Sciences, Freiburg
LiChrosolv-Wasser	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

CHEMIKALIEN	HERSTELLER
SD-Hefe-Basis-Medium	BD Biosciences DIFCO™, Hamburg
Sigma Fast™ DAB (3,3'-Diaminobenzidine) Peroxidase Substrate Tablet Sets	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
(Natrium) Orthovanadat	Merck KGaA, Darmstadt
TBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Trasylol	Bayer, Leverkusen
Trichloressigsäure (TCA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton-X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Yeast Extract (Hefeextrakt)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ziegenserum	DakoCytomation GmbH, Hamburg

3.2. Antibiotika

ANTIBIOTIKA	HERSTELLER
Ampicillin (100 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kanamycin (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

3.3. Reagenziensysteme und „Kits“

3.3.1. „Kits“ zur Aufreinigung von DNA

„KIT“	HERSTELLER
Miniprep Express Matrix Bio 101	Bio 101, Rutherford Road, Carlsbad, California; bezogen über: Dianova, Hamburg
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAfilterPlasmid Giga Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden

3.3.2. Sequenzierung

„KIT“	HERSTELLER
Thermo Sequenase II Dye terminator cycle sequencing kit	GE Healthcare Bio-Sciences, Freiburg
DYEnamic ET Terminator Kit	GE Healthcare Bio-Sciences, Freiburg
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystem; bezogen über: Applera Deutschland GmbH, Darmstadt

3.3.3. Transiente Expression

REAGENZ	HERSTELLER
PolyFect [®] Transfection Reagents	Qiagen GmbH, Hilden

3.3.4. Proteinbestimmung

REAGENZ	HERSTELLER
BCA Protein Assay Reagent	Perbio Science, Bonn; Vertrieb: KMF, Sankt Augustin

3.3.5. „Western Blot“ Entwicklung

REAGENZ	HERSTELLER
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrat	Perbio Science, Bonn; Vertrieb: KMF, Sankt Augustin
Uptilight HRP Blot Substrat	Uptima; Vertrieb: KMF, Sankt Augustin

3.3.6. Immunhistochemie

REAGENZ	HERSTELLER
DakoCytomation LSAB 2 [®] System-HRP	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Dako EnVision [®] , Alkaline Phosphatase	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Dako [®] Fuchsin + Substrate – Chromogen System For Immunohistochemistry And In Situ Hybridisation	DakoCytomation GmbH, Hamburg

3.4. Stammlösungen

STAMMLÖSUNG	KONZENTRATION (Molarität)
3-Amino-1,2,3-triazol (3AT)	1 M
Ammoniumchlorid	0,05 M
Cadmiumchlorid	1 M
Calciumchlorid	0,1 M, 1 M
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	0,5 M
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	0,1 M
Hepes/KOH pH 7,4	0,1 M, 0,5 M
Kaliumchlorid	1 M
Lithiumacetat	1 M
Magnesiumchlorid	1 M
3-Morpholinopropansulfonsäure (MPS)	1M
Natriumchlorid	1M, 5 M
(Natrium) Orthovanadat	0,002 M
Tris/HCl pH 6,8	1 M
Tris/HCl pH 7,4	1 M
Tris/HCl pH 8,0	1 M
Tris/HCl pH 8,8	1 M

STAMMLÖSUNG	KONZENTRATION (proz. Anteil)
Glukose	40 % (w/v)
Glyzerin	50 % (w/v)
PEG	50 % (w/v)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	20 % (w/v)
Sucrose	50 % (w/v)

MEHRFACH KONZENTRIERTE STAMMLÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
10 x TBS	50 mM Tris-hydroxymethylaminomethan in 900 ml H ₂ O lösen pH auf 7,6 einstellen ad 1 l mit H ₂ O _{bidest} auffüllen
2 x HBS pH 7,05	280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O 12 mM Dextrose 50 mM Hepes pH auf 7,05 einstellen
10 x PBS pH 7,4	1370 mM NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O 20 mM KH ₂ PO ₄ pH auf 7,4 einstellen
50 x TAE pH 8,0	2 M Trisacetat 50 mM pH auf 8,0 einstellen
100 x L-Leucin	1 g L-Leucin ad 100 ml H ₂ O _{bidest}
100 x Histidin HCl	200 mg L-Histidin HCl ad 100 ml H ₂ O _{bidest}
X-Gal	20 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal) lösen in Dimethylformamid (DMF) Lagerung erfolgt lichtgeschützt bei -20°C
Z-Puffer pH 7,0	60 mM Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O 40 mM Na ₂ HPO ₄ • H ₂ O 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ • 7 H ₂ O pH auf 7,0 einstellen

3.5. Kulturmedien

3.5.1. Kulturmedium für Bakterien

Für die Anzucht von Bakterien werden normalerweise reichhaltige Medien verwendet. In dieser Arbeit wurde das 2YT-Medium, bzw. der 2YT-Agar eingesetzt. Für eine Selektion der angezogenen Plasmide wurden entsprechend Antibiotika wie Ampicillin oder Kanamycin nach Abkühlung des Mediums, bzw. Agars auf etwa 50°C zugesetzt.

2YT-Medium / Agar

16 g Pepton (tryptisch verdaut)
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ggf. 15 g/l Agar
ad 1 l H₂O_{bidest}
autoklavieren

Für die Re-Titrierung der „human testis library“, Matchmaker-System, BD Biosciences Clontech, Heidelberg, wurden die Bakterien auf Mangelmedium LB (Luria Broth)-Agarplatten ausgestrichen.

LB-Medium / Agar

10 g Pepton (tryptisch verdaut)
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ggf. 15 g/l Agar
ad 1 l H₂O_{bidest}
autoklavieren

3.5.2. Kulturmedium für Hefen

In dieser Arbeit wurde der Hefestamm Y190 eingesetzt (siehe 3.11.2. „Hefestämmen“). Die Anzucht der Hefen erfolgte routinemäßig im YPD-Medium, bzw. Agar, welchem nach dem Autoklavieren Glukose (Endkonzentration 2%) zugesetzt wurde.

YPD-Medium / Agar

20 g Pepton (tryptisch verdaut)
10 g Hefeextrakt
ad 950 ml H₂O_{bidest}
pH auf 5,8 mit HCl einstellen
ggf. 20 g/l Agar
autoklavieren

Zur Selektion auf eine Aminosäureauxotrophie wurde SD („synthetic dropout“)-Medium verwendet. Nach Komplettierung mit Glukose (Endkonzentration 2%) und „drop out“ (Endkonzentration 1-fach) wurden dem Medium, bzw. dem Agar individuell essentielle Aminosäuren wie Tryptophan, Histidin und Leucin als 100 x Stammlösung (siehe 3.4. „Stammlösungen“), zugesetzt. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurde entsprechend das Festmedium (Agarplatten) mit Histidin (SD-T-L+H) ergänzt.

SD-Medium / Agar

6,7 g DIFCO (Hefe-Basis-Medium)
 ad 850 ml H₂O_{bidest}
 pH auf 5,8
 ggf. 20 g/l Agar
 autoklavieren

10x „drop-out“

200 mg	L-Adeninhemisulfat
200 mg	L-Arginin HCl
300 mg	L-Isoleucin
300 mg	L-Lysin HCl
200 mg	L-Methionin
500 mg	L-Phenylalanin
2000 mg	L-Threonin
300 mg	L-Tyrosin
200 mg	L-Uracil
1500 mg	L-Valin
ad 1000 ml	H ₂ O _{bidest}
autoklavieren	

Für das „yeast two-hybrid“ System wurden zusätzlich Selektionsplatten benötigt, denen alle drei Auxotrophiemarker fehlten. Um die natürliche schwache His3p-Expression des Y190 Hefestammes zu unterdrücken, wurde 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) als kompetitiver Inhibitor des His3 Proteins in einer Endkonzentration von 50 mM nach Abkühlung des Agars auf etwa 50°C eingesetzt. Die 3AT-Stammlösung wird lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt und ist so etwa 4 Wochen haltbar.

3.5.3. Kulturmedium für eukaryotische Zellen

Alle verwendeten eukaryotischen Zelllinien (siehe 3.11.3. „Eukaryotische Zelllinien“) wurden im sterilen Standardmedium kultiviert.

DMEM Medium

Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)
 37 g NaHCO₃/l
 ad 10 l H₂O_{bidest}
 pH auf 7,2 einstellen
 sterilfiltrieren

Vor der Benutzung muss das Medium mit 1 % Glutamin (Endkonzentration 2 mM) und 10 % fötalem Kälberserum (FKS) komplettiert werden. Das FKS muss vor der Benutzung bei 56°C für 30 min im Wasserbad erwärmt werden, wodurch das Komplementsystem inaktiviert wird.

3.6. Enzyme und Marker

3.6.1. Restriktionsendonukleasen

RESTRIKTIONS- ENDONUKLEASE	KONZENTRATION	HERSTELLER
Bam HI	20 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Bgl II	10 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Eco RI	20 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Hind III	20 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Nco I	10 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Nde I	20 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Not I	10 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Xho I	20 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main

3.6.2. Sonstige Enzyme

ENZYM	KONZENTRATION	HERSTELLER
<i>T4</i> DNA-Ligase	1 U/ μ l	Fermentas GmbH, Mannheim
Taq Polymerase	5 U/ μ l	New England Biolabs, Frankfurt am Main

3.6.3. DNA-Marker

MARKER	HERSTELLER
O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder	Fermentas GmbH, Mannheim
O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus	Fermentas GmbH, Mannheim
O'GeneRuler™ DNA ladder mix	Fermentas GmbH, Mannheim
1 kb DNA ladder	Invitrogen® Life Technologies, Karlsruhe
λ <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III Marker	Invitrogen® Life Technologies, Karlsruhe

3.6.4. Protein-Marker

MARKER	HERSTELLER
BenchMark™ Proteinladder	Invitrogen® Life Technologies, Karlsruhe
PageRuler™ Proteinladder	Fermentas GmbH, Mannheim

3.7. Antikörper

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper wurden in „Western Blot“- und Immunfluoreszenz-Analysen sowie in der Immunhistochemie eingesetzt.

WB = „Western Blot“ IF = Immunfluoreszenz IH = Immunhistochemie

PRIMÄRER ANTIKÖRPER	EINGESETZTE VERDÜNNUNG	REFERENZ
anti-GM130 monoklonales Maus-IgG, gegen den C-Terminus von GM130 gerichtet	WB 1:250 IF 1:200 IH 1:100, bzw. 1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
anti-HA (16B12) monoklonales Maus-IgG, gegen das HA-Epitop gerichtet	WB 1:1000 IF 1:1000	Tan et al., 1998; BABCO, Berkley Antibody Company; bezogen über: HISS Diagnostics GmbH, Freiburg i.Br.
anti-Iporin Aip519 polyklonales Kaninchen-IgG gegen die AS 848-991 des humanen Iporins gerichtet, Serum	WB 1:100	Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow
anti-Iporin Aip519 polyklonales Kaninchen-IgG gegen die AS 848-991 des humanen Iporins gerichtet, affinitätsgereinigt (18.08.03)	WB 1:100	Bayer et al., 2005; Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow
anti-Iporin 1179 polyklonales Kaninchen-IgG gegen die AS 848-991 des humanen Iporins gerichtet, affinitätsgereinigt (15.03.04)	WB 1:4000 IF 1:1000 IH 1:25, bzw. 1:10	Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow
anti-myc (9E10) monoklonales Maus-IgG, gegen das myc-Epitop gerichtet, affinitätsgereinigt (18.03.01)	IF 1:100	Evan et al., 1985; Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow

PRIMÄRER ANTIKÖRPER	EINGESETZTE VERDÜNNUNG	REFERENZ
anti-PDI monoklonales Maus-IgG, gerichtet gegen den C- Terminus der Protein Disulfidomerase, Hybridomaüberstand	WB 1:10	Dr. D. Vaux, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford University
anti-Rab1B (1E7) monoklonales Maus-IgG, gegen den C-Terminus von Rab1B gerichtet, Hybridomaüberstand	WB 1:50	Elazar et al., 1994; Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow
anti-Rab1B (1E7) monoklonales Maus-IgG, gegen den C-Terminus von Rab1B gerichtet, affinitätsgereinigt (25.06.01)	WB 1:1000 IF 1:250 IH 1:100	Elazar et al., 1994; Konczal, 2001 Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Barnekow

SEKUNDÄRER ANTIKÖRPER	EINGESETZTE VERDÜNNUNG	REFERENZ
anti-Maus IgG „horse radish peroxidase“ HRP	WB 1:1000	GE Healthcare Bio- Sciences, Freiburg
anti-Kaninchen IgG „horse radish peroxidase“ HRP	WB 1:1000	GE Healthcare Bio- Sciences, Freiburg
anti-Maus IgG-Alexa Flour 488 gekoppelt	IF 1:1000	Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
anti-Maus IgG-Alexa Flour 568 gekoppelt	IF 1:1000	S. Bogdan, Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
anti-Maus IgG-Alexa Flour 594 gekoppelt	IF 1:1000	Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen
anti-Kaninchen IgG Cy3	IF 1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

3.8. „Primer“

Für eine Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte mittels PCR („polymerase chain reaction“ = Polymerasekettenreaktion) werden Oligonukleotidprimer, sogenannte Amplimere benötigt. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize („template“) sind.

Die jeweiligen Tesmin „primer“ sind von der Firma Qiagen GmbH, Hilden synthetisiert worden.

tes 1for „forward primer“ zur Amplifikation von Tesmin A, bzw. B 5´- TTG AAT TCC ATA TGG TGA TAT GCC AAT TGA AAG G -3´	34mer
tes 1rev „reverser primer“ zur Amplifikation von Tesmin A, bzw. B 5´- TTG GAT CCC TAC TCC ATT TTC AAT CCC TTA G -3´	31mer
tes f.l. „forward primer“ zur Amplifikation von Tesmin „full length“ 5´- TTG AAT TCC ATA TGG AGG AGG GCC CTC TGC C -3´	31mer
tes xba „reverser primer“ zur Amplifikation von Tesmin „full length“ 5´- TAT CTG TTA AGA TCT TGT TCT CTT G -3´	25mer

Die jeweiligen pAS, pACT, bzw. pGADT7 Sequenzierungsprimer sind von der Firma Invitrogen® Life Technologies, Karlsruhe synthetisiert worden.

„fish primer“ wurden für die Sequenzierung von pACT, bzw. pGADT7 Konstrukten eingesetzt, während „bait primer“ für die Sequenzierung von pAS Plasmiden genutzt wurden
F = „forward“, R = „reverse“

fish 1F 5´- ATA CCA CTA CAA TGG ATG -3´	18mer
fish 2R 5´- CAG TTG AAG TGA ACT TGC GGG G -3´	22mer
fish 3F 5´- CTA TTC GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC -3´	29mer
fish 4R 5´- GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG AT -3´	32mer
bait 1F 5´- TCA TCG GAA GAG AGT AG-3´	17mer
bait 2R 5´- CGT TTT AAA ACC TAA GAG TCA C -3´	22mer

3.9. Ausgangsvektoren

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Vektoren eingesetzt, entsprechend dem Organismus, in dem sie vermehrt wurden bzw. der inklinierten DNA-Sequenz, die transkribiert wurde. So wurden für die Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien pGEX KG Vektoren eingesetzt und für die Expression in Hefen und eukaryotischen Zellen „shuttle“ Vektoren. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Gentechnisch veränderten Organismen (GVO) sind in die Sicherheitsstufe S1 einzuordnen; entsprechend ergibt sich die Risikogruppe RG1.

3.9.1. Prokaryotische Klonierungsvektoren

VEKTOR	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pGEX KG	GST-Gen-Fusionsvektor, enthält das Glutathion S-Transferase Gen aus <i>Schistosoma japonicum</i>	Guan und Dixon, 1991
pGEX KG 42	modifizierter pGEX KG Vektor; Klonierung über <i>Nde</i> I und <i>Bam</i> HI möglich	AG Barnekow; siehe Diplomarbeit Bilbilis, 2002

3.9.2. „yeast two-hybrid“ Klonierungsvektoren

VEKTOR	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pAS 2-1	Köder („bait“) Vektor des Matchmaker II Systems, enthält die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsaktivators Gal4	Harper et al., 1993
pACT 2	Beute („prey“) Vektor des Matchmaker II Systems, enthält die DNA-Aktivierungsdomäne des Hefe-Transkriptionsaktivators Gal4	Li und Fields, 1993
pGADT7	Beute („prey“) Vektor des Matchmaker III Systems, enthält die DNA-Aktivierungsdomäne des Hefe-Transkriptionsaktivators Gal4	Chien et al., 1991

3.9.3. Eukaryotische Klonierungsvektoren

VEKTOR	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pSV Sport 1	Expressionsvektor mit integriertem SV 40 Promoter	Crouse, 1993
pSV 42	Derivat des pSV Sport1 Vektors, die <i>Nde</i> I Schnittstelle (Position 629) und die <i>Bam</i> HI Schnittstelle (Position 1013) sind durch eine „fill in“ Ligation entfernt worden	AG Barnekow; siehe Dissertation Bode, 2000
pSV 42 HA	Modifizierter pSV Sport1 Vektor, welcher in der 5' „upstream“ Region vor der <i>Nde</i> I Schnittstelle ein HA-„tag“ besitzt. So enthalten alle exprimierten Proteine eine aminoternale HA-Markersequenz und können mit Hilfe des spezifischen, gegen das HA-„Taq“ gerichteten Antikörpers 16B12 (siehe 3.7.„Antikörper“) detektiert werden (HA = Epitop des Influenzavirus Hämagglutinins)	AG Prof. Dr. A. Barnekow
pSV 42 myc	Modifizierter pSV Sport1 Vektor, der ein myc-„tag“ vor der <i>Nde</i> I Schnittstelle besitzt. Die exprimierten Proteine können indirekt mit Hilfe des myc-spezifischen Antikörpers 9E10 (siehe 3.7.„Antikörper“) detektiert werden	AG Prof. Dr. A. Barnekow
pEGFP-IJ-Δ4	Modifizierte Form des GFP- („green fluorescence protein“) C2 Vektors. Durch eine „fill in“ Reaktion wurde die interne <i>Nde</i> I Schnittstelle zerstört, dann wurde der Vektor <i>Bgl</i> II/ <i>Bam</i> HI geschnitten, um die ursprüngliche „MCS“ zu entfernen. Anschließend wurde eine neue „MCS“ über <i>Bgl</i> II aus pACT-X11L2Δ4 (~1 kb) eingefügt. Vor der <i>Nde</i> I Schnittstelle befindet sich nun eine HA-kodierende Sequenz	BD Biosciences Clontech, Heidelberg; AG Barnekow

3.10. Plasmidkonstrukte

3.10.1. Plasmidkonstrukte für die bakterielle Expression

PLASMID	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pGEX KG ΔN847ΔC1239 (Δ3)	Es wird ein GST-Fusionsprotein gebildet, bestehend aus einem GST-„tag“ am N-Terminus und dem C-Terminus von „full length“ Iporin ohne polyE-, polyP-„stretch“ und ohne SH3 Domäne	AG Barnekow
pGEX KG ΔN1430 (Δ9)	Es wird ein GST-Fusionsprotein gebildet, bestehend aus einem GST-„tag“ am N-Terminus und am C-Terminus der SH3 Domäne von Iporin und flankierenden AS	Bayer et al., 2005

3.10.2. Plasmidkonstrukte für das „yeast two-hybrid“ System

„bait“ PLASMID	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pAS Iporin Δ N847 (Δ 1)	enthält den C-Terminalen Bereich von „full length“ Iporin	AG Barnekow
pAS Iporin Δ N847 Δ C1450 (Δ 2)	enthält den C-Terminalen Bereich von „full length“ Iporin ohne SH3 Domäne	AG Barnekow
pAS Iporin Δ N847 Δ C1239 (Δ 3)	enthält den C-Terminalen Bereich von „full length“ Iporin ohne polyE-, polyP-„stretch“ und ohne SH3 Domäne	AG Barnekow
pAS Iporin Δ N847 Δ C992 (Δ 4)	enthält die 443 AS lange Sequenz „upstream“ der RUN Domäne	AG Barnekow
pAS Iporin Δ N991 Δ C1177 (Δ 5)	enthält die RUN Domäne von Iporin	AG Barnekow
pAS Iporin Δ N991 Δ C1239 (Δ 6)	enthält neben der RUN Domäne von Iporin 61 AS „downstream“	AG Barnekow
pAS Iporin Δ N991 Δ C1450 (Δ 7)	enthält die RUN Domäne von Iporin, den polyE- und den polyP-„stretch“	AG Barnekow
pAS Iporin Δ N1122 (Δ 8)	enthält den C-Terminus der RUN Domäne, den polyE- und polyP-„stretch“ und die SH3 Domäne	AG Barnekow
pAS Iporin Δ N1430 (Δ 9)	enthält die SH3 Domäne von Iporin und flankierende AS	AG Barnekow
pAS GM130 Δ C213	GM130 Mutante, bestehend aus der p115 „binding site“ und cc1	AG Barnekow
pAS GM130 Δ N370 (Golgin-95)	GM130 Mutante, bestehend aus einem Teil der cc2, cc3 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“; entspricht dem humanem Golgin-95	AG Barnekow
pAS GM130 Δ N433	GM130 Mutante, bestehend aus cc3 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“	AG Barnekow
pAS GM130 Δ N679	GM130 Mutante, bestehend aus cc4 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“	AG Barnekow
pAS GM130 Δ N761	GM130 Mutante, bestehend aus einem Teil der cc3, cc4 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“	AG Barnekow

„bait“ PLASMID	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pAS GM130 ΔN830	GM130 Mutante, bestehend aus einem Teil der cc5, der cc6 und der GRASP65 „binding site“	AG Barnekow
pAS Rab1A Q70L	daueraktive Mutante von Rab1A (human)	AG Barnekow
pAS Rab1B wt	„full length“ Sequenz des Wildtyps von Rab1B (Ratte)	Weide et al., 2001
pAS Rab1B S22N	dauerinaktive Mutante von Rab1B (Ratte)	Weide et al., 2001
pAS Rab1B Q67R	daueraktive Mutante von Rab1B (Ratte)	Weide et al., 2001
pAS Rab1B Q67L	daueraktive Mutante von Rab1B (Ratte)	Weide et al., 2003
pAS Tesmin A	C-Terminus der humanen Tesmin Sequenz BC064579 ab Base 735-1634 (insgesamt 900 bp)	AG Barnekow; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pAS Tesmin B	C-Terminus der humanen Tesmin Sequenz BC064579 ab Base 735-1634 mit einer Deletion von Base 1266 bis 1322 (insgesamt 9843 bp). Das Insert weist einen Basenaustausch an Stelle 849 auf	AG Barnekow; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit

„prey“ PLASMID	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pGADT7 Iporin „full length“	enthält den „orf“ des KIAA0375 Klons bestehend aus 4548 bp	AG Barnekow
pGADT7 Iporin Δ N847 (Δ 1)	enthält den C-Terminalen Bereich von „full length“ Iporin	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ N847 Δ C1450 (Δ 2)	enthält den C-Terminalen Bereich von „full length“ Iporin ohne SH3 Domäne	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ N847 Δ C1239 (Δ 3)	enthält den C-Terminalen Bereich von „full length“ Iporin ohne polyE-, polyP-„stretch“ und ohne SH3 Domäne	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ N847 Δ C992 (Δ 4)	enthält die 443 AS lange Sequenz „upstream“ der RUN Domäne	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ N991 Δ C1177 (Δ 5)	enthält die RUN Domäne von Iporin	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ N991 Δ C1239 (Δ 6)	enthält neben der RUN Domäne von Iporin 61 AS „downstream“	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ N991 Δ C1450 (Δ 7)	enthält die RUN Domäne von Iporin, den polyE- und den polyP-„stretch“	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ N1122 (Δ 8)	enthält den C-Terminus der RUN Domäne, den polyE- und polyP-„stretch“ und die SH3 Domäne	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ N1430 (Δ 9)	enthält die SH3 Domäne von Iporin und flankierende AS	Bayer et al., 2005
pGADT7 Iporin Δ C853 (Δ 10)	enthält den N-Terminus von Iporin	Bayer et al., 2005
pGADT7 GM130 Δ C213	GM130 Mutante, bestehend aus der p115 „binding site“ und cc1	Weide et al., 2001
pGADT7 GM130 Δ N370 (Golgin-95)	GM130 Mutante, bestehend aus einem Teil der cc2, cc3 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“; entspricht dem humanene Golgin-95	Weide et al., 2001
pGADT7 GM130 Δ N433 (hinge)	GM130 Mutante, bestehend aus cc3 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“	Weide et al., 2001

„prey“ PLASMID	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pGADT7 GM130 Δ N370 Δ C887	GM130 Mutante, bestehend aus einem Teil der cc2, cc3 bis cc6, GRASP65 „binding site“ fehlt	Weide et al., 2001
pGADT7 GM130 Δ N679	GM130 Mutante, bestehend aus cc4 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“	Weide et al., 2001
pGADT7 GM130 Δ N761	GM130 Mutante, bestehend aus einem Teil der cc3, cc4 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“	Weide et al., 2001
pGADT7 GM130 Δ N830	GM130 Mutante, bestehend aus einem Teil der cc5, der cc6 und der GRASP65 „binding site“	Weide et al., 2001
pGADT7 Tesmin A	C-Terminus der humanen Tesmin Sequenz BC064579 ab Base 735-1634 (insgesamt 900 bp); siehe Anhang „Plasmidkarten“	AG Barnekow; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pGADT7 Tesmin „full length“	Enthält die „full length“ cDNA des humanen Tesmins, BC064579 ab Base 106 bis 2434; siehe Anhang „Plasmidkarten“	AG Barnekow; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pACT Klon 56	Dieser Klon wurde als potentieller Interaktionspartner von pAS Iporin Δ N847 in einem „screen“ mit der „human testis library“ (Matchmaker-System, BD Biosciences Clontech, Heidelberg) gefunden. Es handelt sich um den C-terminalen Bereich der humanen Tesmin Sequenz BC064579 Base 1224 bis 1843	AG Barnekow; gefunden im Rahmen dieser Arbeit
pACT Tesmin „full length“	Enthält die „full length“ cDNA des humanen Tesmins, BC064579 ab Base 106 bis 2434. Das Insert wurde über <i>Nco I/Eco RI</i> aus dem Klon pCMV SPORT6 IMAGp998E1812764Q in pACT inkloniert	AG Barnekow; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pACT GM130 Δ N224 (K18)	GM130 Mutante, bestehend aus cc2 bis cc6 und der GRASP65 „binding site“	AG Barnekow; siehe Diplomarbeit Bayer, 1999; Weide et al., 2001

3.10.3. Plasmidkonstrukte für die Expression in Säugetierzellen

PLASMID	BESCHREIBUNG	REFERENZ
pSV HA Iporin "full length"	enthält den „orf“ des KIAA0375 Klon bestehend aus 4548 bp	Bayer et al., 2005
pSV HA Iporin Δ N847 (Δ 1)	enthält den C-Terminalen Bereich von „full length“ Iporin mit einem N-terminalen HA-„tag“	Bayer et al., 2005
pSV myc Iporin Δ N847 Δ C1239 (Δ 3)	enthält den C-Terminalen Bereich von „full length“ Iporin ohne polyE-, polyP-„stretch“ und ohne SH3 Domäne mit einem N-terminalen myc-„tag“	AG Barnekow
pSV HA Iporin Δ C853 (Δ 10)	enthält den N-Terminus von „full length“ Iporin mit einem N-terminalen HA-„tag“	Bayer et al., 2005
pEGFP-IJ-Tesmin A	C-Terminus der humanen testis Sequenz BC064579 ab Base 735-1634 (insgesamt 900 bp); siehe Anhang „Plasmidkarten	AG Barnekow; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pCMV SPORT6 IMAGp998E1812764Q	Clone-ID = 5743865 Das Konstrukt enthält die einklonierte Sequenz BC064579 (humanes Tesmin)	RZPD, Berlin
pEGFP-IJ-Tesmin "full length"	Enthält die „full length“ cDNA des humanen Tesmins, BC064579 ab Base 106 bis 2434; siehe Anhang „Plasmidkarten	AG Barnekow; hergestellt im Rahmen dieser Arbeit

3.11. Organismen

3.11.1. Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme sind *Escherichia coli* K-12 Derivate. Sie wurden zur Klonierung, Amplifikation von DNA und zur Herstellung von rekombinanten Proteinen verwendet.

STAMM	GENOTYP	REFERENZ
DH5 α	F' Tn10 pro A ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal _r) thi hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) supE44 relA1 lac	Hanahan, 1983
BL21	F-ompT hsdS _B (rB- mB-) gal dcm (DE3)	Studier und Moffat, 1986
DH10B	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80dlacZ M15 lacX74 deoR recA1 araD139 (ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG].	Grant et al., 1990
BNN132 = JM107/IKC	F' traD36 proA+ proB+ lacIq lacZ.M15/endA1 gyrA96 (Nal _r) thi hsdR17 supE44 relA1 .(lac- proAB) mcrA Cre+	Elledge et al., 1991

3.11.2. Hefestämme

Der in dieser Arbeit verwendete Hefestamm ist ein Derivat der Bäcker- und Brauhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces*; wörtlich = „Zuckerpilz; cerevisia, lat. = das Bier).

STAMM	GENOTYP	REFERENZ
Y190	MATa , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4.</i> , <i>met-</i> , <i>gal80.</i> , <i>cyh2</i> LYS2:: <i>GAL1</i> _{UAS} - <i>HIS3</i> _{TATA} - <i>HIS3</i> URA3:: <i>GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i>	Flick und Johnston, 1990; Harper et al., 1993

3.11.3. Eukaryotische Zelllinien

ZELLINIE	BESCHREIBUNG	REFERENZ
Cos7	Ursprüngliche Zelllinie: CV1 Zellen, Affennierenfibroblasten aus der grünen Meerkatze. Transformiert durch den SV40 Virus mit defektem „origin of replication“	Gluzman, 1981 zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Gerke, Med. Biochemie, ZMBE, Münster
HeLa SS6	Epithel-artige Zelllinie, deren Ursprung ein humanes Cervix-Karzinom ist	Gey et al., 1952 zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. V. Gerke, Med. Biochemie, ZMBE, Münster
SK11	Maus Sertoli Zelllinie, modifiziert durch das SV40 T-Antigen	Walther et al., 1996

3.12. DNA-Genbank

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Genbank „human testis library“ des Matchmaker-System wurde über BD Biosciences Clontech, Heidelberg bezogen. Es handelt sich hierbei um cDNA Fragmente von DNA-Sequenzen Testis-spezifischer Gene, die in den „prey“ Vektor pACT inkloniert sind.

4. Methoden

4.1. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien, Hefen und eukaryotischen Zellen

Eine der Grundvoraussetzungen für die Reproduzierbarkeit von biologischen Experimenten ist eine sorgfältige Anzucht, Kultivierung und Stammhaltung der zu verwendenden Organismen. So sollten gleichbleibende Bedingungen geschaffen werden, die ein optimales Wachstum gewährleisten.

4.1.1. Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

Es wurden die Stämme DH5 α , BL21 und DH10B der Bakterienart *Escherichia coli* verwendet (siehe 3.11.1. „Bakterienstämme“), wobei die Anzucht und Kultivierung in Flüssig- oder Festmedien, d.h. in Schüttelkulturen oder auf Agarplatten, erfolgte. Hierfür werden 5 ml 2YT-Medium mit Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie, die von einer bewachsenen Agarplatte „gepickt“ wird, angeimpft und bei 37°C bei 250 rpm auf einem Rundschtüttler inkubiert (siehe 3.5.1. „Kulturmedium für Bakterien“). Die Anzucht einer Reinkultur eines transformierten Bakterienstammes erfordert die Zugabe von Selektionsmarkern, für welche das eingebrachte Plasmid Resistenzgene trägt. Als Selektionsmarker wurden Ampicillin (Endkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$) oder Kanamycin (Endkonzentration 35 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt (siehe 3.2. „Antibiotika“).

Für die Anzucht von Klonen, z.B. für eine Selektion nach einer Transformation mit rekombinanter Plasmid DNA, oder für eine kurzfristige Lagerung von etwa 3 Monaten bei 4°C, werden Plattenkulturen, ebenso mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, angelegt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Brutschrank für etwa 12 Stunden.

Zur dauerhaften Lagerung werden Glycerinkulturen von Übernachtskulturen angelegt und bei -20°C bzw. -70°C gelagert.

Anlegen einer Glycerinkultur

700 μl einer frischen, dichten Schüttelkultur
300 μl 50%-iges steriles Glycerin
(Endkonzentration 15% Glycerin)
→ gründlich in einem autoklaviertem
Glasröhrchen mischen
→ einfrieren

4.1.2. Kultivierung und Stammhaltung von Hefen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hefestamm Y190 im YPD-Vollmedium, komplettiert mit 2% Glukose, angezogen (siehe 3.5.2. „Kulturmedium für Hefen“). Die Anzucht kann entweder von einer Agarplatte, aus einer Glycerinkultur oder aus einer Hefesuspension, die bei 4°C mehrere Wochen gelagert wird, erfolgen. Die inokulierte Schüttelkultur wird bei 30°C bei 250 rpm auf einem Rundschtüttler über Nacht inkubiert. Das Wachstum der Hefen kann einerseits durch die Messung der optischen Dichte (OD_{600}) erfolgen, die nach etwa 12 Stunden 1,3 bis 1,5 betragen sollte. Andererseits kann der Zustand der Hefen mikroskopisch beurteilt werden. In der Wachstumsphase, auch logarithmische Phase genannt, weisen die Zellen eine deutliche Knospung auf.

Die Anzucht von Hefen, die für den Einsatz im „yeast two-hybrid large scale screen“ mit einem „bait“ Plasmid transformiert worden sind, und entsprechend isolierte potentielle

Interaktionspartner, die „prey“ Plasmide tragen, erfolgte im SD-Medium, bzw. Agarplatten, denen die Aminosäuren Leucin und Histidin zugesetzt worden sind. Sie werden mit SD-T-L bezeichnet. Die Anzucht erfolgte für etwa 36-48 Stunden bei 30°C und bei 250 rpm.

Beimpfte Agarplatten wurden im Brutschrank bei 30°C für 2-4 Tage inkubiert.

Eine kurzfristige Lagerung erfolgte auf Agarplatten bei 4°C für etwa 3 Monate, während für eine langfristige Lagerung Glycerinkulturen, ähnlich wie bei Bakterien, angelegt wurden. Die Endkonzentration des Glycerins beträgt in den Dauerkulturen 25 %. Die Kulturen können bei -80°C mehrere Jahre gelagert werden.

4.1.3. Kultivierung und Stammhaltung von eukaryotischen Zellen

Die in dieser Arbeit eingesetzten Zellen Cos7, HeLa SS6 und SK11 werden als adhärente Zelllinien bezeichnet, d.h. sie wachsen in einem „monolayer“ mit stetem Kontakt zum Untergrund. Die Zellen werden in DMEM („Dulbeccos Modified Eagle Medium“), komplettiert mit fötalem Kälberserum (FKS) und Glutamin, in Gewebekulturschalen gehalten, die mit einer spezifischen Matrix benetzt sind (siehe **3.5.3.** „Kulturmedium für eukaryotische Zellen“). Die Temperatur im Brutschrank ist entsprechend dem Ursprungsgewebe der Zellen gewählt, d.h. Cos7 und HeLa SS6 werden bei 37°C gehalten, während SK11 Zellen, die aus Maushoden kultiviert wurden, bei 33°C gehalten werden.

Da Zellen essentielle Bestandteile des Mediums verbrauchen, wird das Medium arm an Nährstoffen und reich an Sekundärmetaboliten, die das Medium ansäuern. Um dem Prozess entgegenzuwirken, werden die Zellen bei 5% CO₂ inkubiert und das Medium enthält zusätzlich HCO₃⁻ als Puffersystem. Um eine Austrocknung im Brutschrank zu vermeiden, ist zusätzlich eine gleichmäßig hohe Luftfeuchtigkeit erforderlich.

Man bezeichnet eine Zellkultur als konfluent, wenn zwischen den Zellen keine freie Substratoberfläche mehr zu erkennen ist und sie sich gegenseitig berühren. Normalerweise unterliegen sie einer Kontaktinhibition und stellen das Wachstum ein, sobald sie die Konfluenz erreicht haben. Im Regelfall sollten die Zellen subkultiviert werden, bevor die Kultur vollständig konfluent ist. Durch wiederholtes Passagieren verändern sich die Zellen morphologisch und physiologisch, so dass man darauf achten sollte, eine entsprechende Anzahl an Aliquots von Zellen mit gleichen niedrigen Passagenummern einzufrieren.

Passagieren der Zellen

Für die Passagierung, d.h. Ablösung von der Kulturschale und eine erneute, verdünnte Aussaat, werden die Zellen zunächst gründlich in PBS („phosphat buffered saline“) gewaschen, um abgestorbene Zellen und Mediumreste zu entfernen. Um die Zellen vom Untergrund zu lösen, werden sie kurz mit einer 0,05% (w/v) Trypsin und, nach Bedarf, 2 mM EDTA Lösung benetzt und zur Unterstützung der enzymatischen Reaktion für 30 sec im Brutschrank inkubiert. Trypsin ist eine Protease, die Proteine des Zytoskeletts an der C-terminalen Seite von Lysin- und Argininresten spaltet. Zusätzlich komplexiert EDTA Ca²⁺ und Mg²⁺ Ionen, die Teil der von Zellen ausgebildeten Adhäsionsplaques sind. Durch leichtes Klopfen an der Zellkulturschale werden die Zellen gelöst und anschließend in frischem Medium aufgenommen, wodurch die enzymatische Reaktion gestoppt wird. Um EDTA Reste zu entfernen, werden die Zellen bei 5min/37°C/1000 x g abzentrifugiert, das Zell-Pellet in frischem Medium resuspendiert und in entsprechender Verdünnung auf neue Gewebekulturschalen überführt.

Zählen der Zellen

Für eine genaue Planung der Versuche ist es notwendig, mit einer definierten Zellzahl zu arbeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für diese Bestimmung ein „Coulter Counter“ der Firma Coulter eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen von der Gewebekulturschale abgelöst und mit PBS in einem Verhältnis von 1/100 verdünnt, wovon jeweils die Zellzahl in 1 ml

berechnet werden konnte. Durch eine Hochrechnung konnte so die exakte Zahl der Zellen pro ml Zellsuspension ermittelt werden.

Lagerung der Zellen

Zur Sicherung der Zelllinien und Aufbewahrung von Zellen einer niedrigen Passagezahl ist es möglich, diese bei -196°C im flüssigen Stickstoff einzufrieren. Eine konfluent bewachsene Gewebekulturschale wird entsprechend, wie unter „Passagieren der Zellen“ bis zum Zentrifugationsschritt beschrieben, behandelt. Das Pellet wird in 90% (v/v) FKS aufgenommen, um so eine Stabilisierung der Zellproteine gewährleisten zu können und Tropfen-weise Dimethylsulfoxid (DMSO) (Endkonzentration 10%) zugefügt. Das DMSO bewirkt eine Porosität der Zellmembran und somit einen Wasseraustritt aus der Zelle, um so eine Kristallisierung während des Einfriervorgangs zu vermeiden. 1,8 ml dieser Suspension werden in ein Kryoröhrchen überführt, langsam innerhalb von etwa 24 Stunden auf -70°C abgekühlt und in einen Stickstofftank überführt.

4.2. Arbeiten mit DNA

Die Gentechnik erlaubt das Klonieren von DNA Fragmenten, indem DNA Sequenzen in einen Vektor integriert werden. Das Plasmid mit der zu untersuchenden DNA wird anschließend in einen Wirt transformiert. Ziel einer Klonierung ist, die DNA Sequenz zu vermehren, entweder um diese näher zu untersuchen oder um das entsprechende Protein rekombinant in großen Mengen herzustellen.

4.2.1. Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli*

Das Prinzip der Plasmidisolierung beruht auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Nach Aufschluss der Bakterienzellen mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden durch Zugabe von NaOH sämtliche Proteine und DNA unter stark alkalischen Bedingungen denaturiert. Die folgende Neutralisationsreaktion führt zur Renaturierung der DNA, wodurch eine Trennung der Plasmid DNA von der genomischen/chromosomalen DNA erfolgen kann, da diese größer ist, einzelsträngig bleibt und ausfällt. Im folgenden Schritt kann die Plasmid DNA entweder durch Zentrifugation oder durch Filtration abgetrennt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sind „ready-to-use kits“ eingesetzt worden, wie unter **3.3.1. „Kits zur Aufreinigung von DNA“** aufgelistet. Entsprechend der aufzureinigenden Plasmid DNA wurden Mini- und Midipräparationen durchgeführt. Nach der Amplifikation der „human testis library“ der Firma BD Biosciences Clontech, Heidelberg (siehe **3.12. „DNA-Genbanken“**) wurde die Plasmid DNA mittels der Gigapräparation aufgereinigt. Die Durchführungen aller hier genannten DNA-Präparationen erfolgte laut Angaben des Herstellers, die dem „QIAGEN[®] Plasmid Purification Handbook“ zu entnehmen sind.

4.2.2. Isolierung von Plasmid DNA aus *S.cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte aus Hefen, die im SD-Selektionsmedium angezogen worden sind (siehe **4.1.2. „Kultivierung und Stammhaltung von Hefen“**) mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ und ebenfalls nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Hierfür wurden 4 ml der Kultur für 3 min bei RT und 15000 rpm abzentrifugiert, in 250 μl Puffer1 resuspendiert und anschließend in 250 μl Puffer2 aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde nach der Zugabe von Glasperlen und 2 min „vortexen“ unterstützt. Anschließend erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 350 μl Puffer N3 und eine Trennung der Plasmid DNA von der genomischen/chromosomalen DNA durch Zentrifugation. Die weitere Durchführung ist dem „QIAprep[®] Miniprep Handbook“ zu entnehmen.

4.2.3. Amplifikation von DNA mittels PCR

Die PCR („polymerase chain reaction“ = Polymerase-Kettenreaktion) ist eine „in vitro“ Technik, mit der man gezielt Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Abschnitte, die von zwei bekannten DNA Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann (Newton und Graham, 1994). Hierfür werden zwei spezifische, zueinander antiparallel gerichtete Oligonukleotidprimer eingesetzt, die sich nach der Denaturierung bei 94°C an die komplementäre, nun einzelsträngige DNA Matritze („template“) anlagern können. Die DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die „primer“ entlang der Matritze und synthetisiert so neue DNA Stränge. Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine neue Vermehrungsrunde, wobei auch die neu synthetisierten DNA Stränge als Matritze genutzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *Taq*-Polymerase, ein hitzestabiles Enzym aus *Thermus aquaticus* für die Amplifikation von Tesmin A/B aus der „human testis library“ BD Biosciences Clontech, Heidelberg, eingesetzt (Saiki et al., 1998). Im Folgenden ist das Pipettierschema und das Programm der hier eingesetzten PCR aufgelistet.

PCR Ansatz	Programm
5 µl Thermo Pol Puffer (10x) 4 µl Nukleotid-Mix (2,5 mM je Nukleotid) 50 pmol „primer forward“ 50 pmol „primer reverse“ 3,0 µl „template“ DNA 1 µl <i>Taq</i> -Polymerase ad 50 µl PCR-H ₂ O	94°C/2 min 94°C/1 min 60°C/1min 72°C/2 min 72°C/5 min ∞ 4°C <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> } 35 Zyklen </div>

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte durch Auftrennung auf einem Agarosegel (siehe 4.2.6. „Elektrophoretische Auftrennung von DNA“), eine anschließende Isolierung aus dem Gel und Reinigung mit Hilfe des „QIAquick Extraction Kits“ (siehe 4.2.7. „Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen“).

4.2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der gereinigten Plasmid DNA bzw. einer RNA Probe wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Photometer der Firma Eppendorf, Hamburg verwendet. Die zu messende Probe wurde 1/30 im EB-Puffer verdünnt und in einer Einmalküvette in das Photometer gestellt. Nach Messung der Grundabsorption bei 230 nm Wellenlänge wurde anschließend die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen, da hier das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. Das Verhältnis beider Werte zueinander gibt die Proteinkontaminationen in der Lösung an und sollte bei einer reinen Probe bei 1,8 liegen.

4.2.5. Restriktion von DNA

Für die Klonierung neuer Plasmidkonstrukte ist es notwendig, sowohl Vektor- und „insert“-Fragmente herzustellen, um sie anschließend wieder fest miteinander zu verbinden. Das Aufschneiden der DNA geschieht mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Diese gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und spalten Doppelseitige-Desoxyribonukleinsäuren (dsDNA) durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung bestimmter Erkennungssequenzen, meistens 4-8 bp lange Palindrome. Die hier eingesetzten Restriktionsendonukleasen der Klasse II können entweder glatte („blunt“) oder klebrige („sticky“) Enden erzeugen. In den meisten Fällen sind DNA-Sequenzen gleichzeitig mit zwei Enzymen geschnitten worden.

Für eine optimale enzymatische Reaktion werden dem Restriktionsansatz die vom Hersteller der Endonukleasen mitgelieferten Puffer eingesetzt und der Gesamtansatz für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Rahmen dieser Arbeit betrug das Endvolumen 30 µl.

Restriktionsansatz

1-5 µg Plasmid DNA
1U/1 µg DNA Restriktionsendonuklease
3,0 µl 10 x Puffer
ad 30 µl H₂O_{bidest}

4.2.6. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es möglich, DNA Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen (Reisfeld et al., 1962; Ornstein, 1964). Hierfür wird Agarose mit TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) gemischt und durch Erhitzen gelöst. Das Gel wird in einen Gelschlitten gegossen, wodurch sich nach Erkalten ein flächiges großporiges Maschenwerk in Abhängigkeit der Agarosekonzentration, in der Regel 1%, bildet. Folgend werden die DNA bzw. die einzelnen Fragmente aufgetrennt, indem die negativ geladene DNA aufgrund des Molekulargewichts unterschiedlich schnell vom Plus- zum Minuspol wandert. Um die Lauffront sichtbar machen zu können, wird dem Agarosegel ein Markierungsfarbstoff, hier Orange G, zugesetzt.

Orange G

(6-fach konzentriert)
0,25 % Orange-G (w/v)
30 % Glycerin (v/v)

Um die DNA Fragmente im UV Licht sichtbar machen zu können, wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist eine aromatische organische Verbindung, die in den DNA Strang interkaliert. Regt man diese Verbindung mit UV Strahlung der Wellenlänge 312 nm an, kommt es zur Emission von orangefarbenem Licht.

Die Größe und die Konzentration der einzelnen Fragmente können anhand eines Molekularstandards abgeschätzt werden, da die aufgetrennten Banden des Standards ein definiertes Molekulargewicht besitzen (siehe 3.6.3. und Anhang „DNA Marker“). Eine Dokumentation erfolgte mit Hilfe der elektronischen Bildverarbeitung (Intas, Göttingen).

4.2.7. Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Wiedergewinnung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ laut Herstellerangaben angewendet. Prinzipiell werden bei der Gelextraktion Wasserstoffbrückenbindungen der Agarosepolymere durch Erwärmen und unter Einfluss chaotroper Salze gelöst, wobei die DNA aus der Lösung verdrängt und im Folgenden über ein Säulchen gereinigt wird.

Die so gereinigte DNA kann für weitere Versuche, wie z.B. die Ligation, eingesetzt werden.

4.2.8. Ligation von DNA

Mit Hilfe von DNA-Ligase und unter ATP-Verbrauch werden DNA Fragmente durch Verknüpfung von 3', 5'-Phosphodiesterbindungen katalysiert (Crouse et al., 1983). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Konstruktion neuer Plasmide ein Vektor und ein „gene of interest“, die mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen linearisiert worden sind, miteinander verbunden.

Ligationsansatz

50 ng Vektor DNA
 3-fach molarer Überschuss „Insert“-DNA
 2 µl 10x Ligasepuffer
 1 µl T4-Ligase
 ad 20 µl H₂O_{bidest}

Neben dem Ligationsansatz mit Vektor- und „Insert“-DNA sollte stets ein Ansatz ohne „insert“ DNA zur Kontrolle des prozentualen Anteils einer Re-Ligation des Vektors mitgeführt werden. Diese Ansätze werden als lig+ bezeichnet.

Die Ligasereaktion erfolgt über Nacht bei 16 °C.

4.2.9. Transformation von Bakterien

Transformation bedeutet im Sinne der Gentechnologie die Aufnahme von Genen, d.h. „nackter“ DNA in einen Wirtsorganismus, hier Bakterien. So eingeführte Plasmid DNA repliziert sich unabhängig von der chromosomalen/genomischen DNA. Um die natürliche Transformationseffizienz der Bakterien zu steigern, müssen sie mit chemischen oder physikalischen Methoden behandelt werden, d.h. kompetent gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist der *E.coli* Stamm DH5α mit Hilfe der Calciumchlorid-Methode und der BL21 Stamm mittels Elektroporation kompetent gemacht worden.

4.2.9.1. Calciumchlorid-Methode

Mit Hilfe von CaCl₂ wird die eingebrachte Plasmid DNA an die Bakterienzelle angeheftet und die eigentliche Aufnahme erfolgt durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 42°C (Dagert und Ehrlich, 1979; Brown, 1999).

- Ansetzen einer 2YT-ÜN Kultur, angeimpft mit DH5α; Inkubation bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschtüttler
- 50 ml 2YT-Medium mit 1/100 der ÜN-Kultur animpfen, Inkubation bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschtüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6
- Abzentrifugieren der Bakteriensuspension 15 min/4°C/2000 x g
- Überstand verwerfen
- Pellet in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufnehmen, Inkubation für 30 min auf Eis
- Abzentrifugieren der Bakterienlösung 15 min/4°C/2000 x g
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufnehmen, Inkubation für 1-2 Stunden auf Eis zur Erhöhung der Kompetenz

Die so hergestellten CaCl₂-kompetenten Bakterien können maximal ÜN gekühlt aufbewahrt werden, wobei sich ihre Kompetenz innerhalb von 24 Stunden erhöht.

Ein weiterer Ansatz ermöglicht, sich einen Vorrat an eingefrorenen CaCl₂-kompetenten DH5α anzulegen, die bei einer Temperatur von -70°C ca. 1 Monat ihre erlangte Kompetenz nicht verlieren.

- Ansetzen einer 2YT-ÜN Kultur, angeimpft mit DH5 α ; Inkubation bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschtüttler
- 500 ml 2YT-Medium mit 1/100 der ÜN-Kultur animpfen, Inkubation bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschtüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4
- die Bakteriensuspension wird auf 50 ml Falcon-„tubes“ verteilt und 10 min auf Eis ruhen lassen
- Abzentrifugieren der Bakteriensuspension 7 min/4°C/2000 x g
- Überstand verwerfen
- Pellet in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufnehmen, Inkubation für 30 min auf Eis
- Abzentrifugieren der Bakterienlösung 5 min/4°C/1500 x g
- Überstand verwerfen
- Pellet in 2 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung aufnehmen, Glycerin als Gefrierschutzmittel beifügen (Endkonzentration 10%)
- Lösung à 100 μ l aliquotieren und bei -70°C lagern

Transformation

Für die Transformation der CaCl₂-kompetenten Bakterien wird aufgereinigte oder Plasmid DNA benötigt.

- 1-5 ng Plasmid DNA bzw. 10 μ l des Ligationsansatzes werden zu 100 μ l kompetenten DH5 α hinzugefügt, Inkubation für 30 min auf Eis
- Hitzeschock 5 min bei 37°C oder 1 min bei 42°C
- Kälteschock für 5 min auf Eis
- Zugabe von 150 μ l 2YT-Medium, Inkubation für 45 min bei 37°C und 250 rpm; ermöglicht die Ausbildung der Antibiotikaresistenz
- Ausplattieren auf 2YT-Agarplatten mit entsprechender Antibiotikaresistenz
- Inkubation ÜN bei 37°C im Brutschrank

4.2.9.2. Elektroporation

Eine weitere effiziente Methode zum Transfer von DNA ist die Elektroporation, die im Rahmen dieser Arbeit zur Transformation von pGEX KG-Konstrukten in BL21 mit Hilfe eines Elektroporators der Firma BIO-RAD genutzt wurde. Durch kurze Hochspannungspulse werden „Löcher“ in der Zellhülle verursacht, durch die exogene DNA in die Zellen aufgenommen werden kann. Um einen elektrischen Durchschlag der zu transformierenden DNA zu vermeiden, sollte sich diese in einer niedrigen Konzentration von 1-10 ng und in einer weitgehend Ionen-freien Lösung befinden.

- Ansetzen einer 2YT-ÜN Kultur, angeimpft mit BL21; Inkubation bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschtüttler
- 500 ml 2YT-Medium mit 1/100 der ÜN-Kultur animpfen, Inkubation bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschtüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7
- Abzentrifugieren der Bakteriensuspension 10 min/4°C/2000 x g
- Überstand verwerfen
- Pellet in sterilem, eisgekühltem H₂O_{bidest} waschen
- Abzentrifugieren der Bakterienlösung 10 min/4°C/2000 x g
- Überstand verwerfen
- Vorgang wiederholen
- Pellet in 10 ml 10% (v/v) Glycerin suspendieren
- Lösung à 100 μ l aliquotieren und bei -70°C lagern

Transformation

- 100 µl elektrokompente BL21 auf Eis auftauen und mit DNA mischen
- in sterile Küvette überführen
- Elektroporation bei 1,8 kV für 5 ms
- sofort in 400 µl vorgewärmtes 2YT-Medium, angereichert mit 1% Glukose, überführen
- Inkubation bei 37°C für 60 min auf einem Rundschtüttler
- Ausplattieren auf 2YT-Agarplatten mit entsprechender Antibiotikaresistenz
- Inkubation ÜN bei 37°C im Brutschrank

4.2.10. Überprüfung einer Klonierung

Die Effizienz der Transformation kann etwa 12 Stunden nach Ausplattieren anhand der gewachsenen Kolonien bestimmt werden. Es wird jeweils eine Einzelkolonie in 3 ml 2YT-Medium, inklusive dem entsprechenden Antibiotikum, überführt und ÜN bei 37°C auf einem Rundschtüttler inkubiert. Anschließend wird die Plasmid DNA isoliert (siehe 4.2.1. „Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli*“), restringiert (siehe 4.2.5. „Restriktion von DNA“) und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.2.6. „Elektrophoretische Auftrennung von DNA“). Nach einer positiven Überprüfung wird eine Glycerinkultur angelegt (siehe 4.1.1. „Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien“).

4.2.11. Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidabfolge einer bestimmten DNA-Sequenz. Hierfür wurde die „Kettenabbruch-Synthese“ nach Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Es werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide im Verlauf des „cycle-sequencing“ genutzt, wobei in dem Gemisch auch Analoga ohne Hydroxygruppe vorhanden sind. So wird die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verhindert und die Verlängerung durch eine DNA-Polymerase ist nicht mehr möglich, es kommt zum Kettenabbruch. Da die dNTPs zufällig eingebaut werden, bricht die DNA Synthese an verschiedenen Stellen ab. Im Rahmen dieser Arbeit sind das „Thermo Sequenase II Dye terminator cycle sequencing kit“ und das „DYEnamic ET Terminator Kit“ der Firma GE Healthcare Bio-Sciences, Freiburg eingesetzt worden. Die Proben wurden nach einem Standardprogramm im „Thermo Cycler“ amplifiziert und anschließend gefällt. Folgende Ansätze sind je nach verwendetem „kit“ für eine Sequenzierungsreaktion wie folgt zusammenpipettiert und gefällt worden:

Sequenzierung mit dem „Thermo Sequenase II Dye terminator cycle sequencing kit“	
Ansatz	2,5 µl „primer“ (1 pmol/µl) 2 µl Mix A+B 100-400 ng DNA ad 10 µl PCR-Wasser
Programm (49 Zyklen)	96 °C → 30 sec 50 °C → 15 sec 60 °C → 1 min
Fällung nach Sequenzierung mit dem „Thermo Sequenase II Dye terminator cycle sequencing kit“	10 µl Ansatz + 1 µl Na-Acetat-EDTA-Puffer + 34 µl Ethanol (100 % p.a.) → Inkubation 15 min auf Eis → Zentrifugation 20 min/4°C/10000 x g → Pellet in 250 µl Ethanol (70 %) waschen → Zentrifugation 5 min/4°C/10000 x g → Pellet 1 min/95°C trocknen

Sequenzierung mit dem „DYEnamic ET Terminator Kit“	
Ansatz	5-10 pmol „primer“ 4 µl ET-Mix 400 ng DNA ad 10 µl PCR-Wasser
Programm (49 Zyklen)	95 °C → 20 sec 50 °C → 15 sec 40 °C → 1 min
Fällung nach Sequenzierung mit dem „DYEnamic ET Terminator Kit“	10 µl Ansatz + 1 µl Na-Acetat-EDTA-Puffer + 40 µl Ethanol (100 % p.a.) → Inkubation 15 min/RT → Zentrifugation 15 min/RT/10000 x g → Pellet in 250 µl Ethanol (70 %) waschen → Zentrifugation 5 min/4°C/10000 x g → Pellet 1 min/95°C trocknen

Sequenzierung mit dem „BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“	
Ansatz	1,5 µM „primer“ 2 µl BigDye 2 µl 5 x Sequenzierungspuffer 150-400 ng DNA ad 10 µl PCR-Wasser
Programm (26 Zyklen)	96 °C → 15 sec 50 °C → 15 sec 60 °C → 4 min
Fällung nach Sequenzierung mit dem „BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“	10 µl Ansatz + 2,5 µl 125 mM EDTA + 25 µl Ethanol (100 % p.a.) → Inkubation 15 min/RT → Zentrifugation 15 min/RT/10000 x g → Pellet in 30 µl Ethanol (70 %) waschen → Zentrifugation 5 min/4°C/10000 x g → Pellet lichtgeschützt trocknen → Pellet in 15-20 µl H ₂ O _{bidest} aufnehmen, bei -20 °C lagern

Die Analyse erfolgte je nach eingesetztem „kit“ in einem ABI PRISM[®] 310 (Perkin Elmer ABI, Weiterstedt), MegaBACE 500 DNA Analysis System, GE Healthcare Bio-Sciences, Freiburg oder in dem Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer.

4.3. Das „yeast two-hybrid“ System

Interaktionen zwischen Proteinen bilden im Wesentlichen die Grundlage für das Funktionieren von zellulären Mechanismen, so sind Proteinkomplexe wichtig für die DNA-Synthese, Aktivierung der Transkription, Proteinlokalisierung und Signaltransduktion (Gietz et al., 1997).

Die „yeast two-hybrid“ Methode, auch „interaction trap“ genannt, repräsentiert ein elegantes „in vivo“ System zum Nachweis von Protein/Proteininteraktionen. Es wurde von Fields und Song entwickelt und bietet folgende Anwendungsmöglichkeiten (Fields und Song, 1989):

- Identifizierung neuer Bindungspartner
- Verifizierung, bzw. Charakterisierung bereits bekannter Interaktionen
- Manipulation von Interaktionen, d.h. Charakterisierung von spezifischen Domänen, die für die Bindung verantwortlich sind, durch Anwendung spezifischer Mutanten (Fields und Sternglanz, 1994).

Der Vorteil des „yeast two-hybrid“ Systems im Gegensatz zu „in vitro“ Experimenten und Systemen, die auf prokaryotischen Expressionssystemen basieren, ist, dass Hefe als Organismus in der Entwicklung den höheren Eukaryoten näher steht. Ein weiterer Vorteil gegenüber bakteriellen Systemen ist, dass posttranslationale Modifikationen in Hefen stattfinden, die gegebenenfalls für eine Interaktion notwendig sind.

Die zentrale Komponente des Matchmaker Gal4 „Two-Hybrid“-Systems der Firma Clontech ist das Transaktivatorprotein, der Hefe-Faktor Gal4, der definierte UAS („upstream activating sequences“) erkennt und die damit assoziierten Gene, in diesem Fall *His3*- und das *lacZ*-Gen, aktiviert. Er besteht aus 2 Domänen, der DNA-Bindungsdomäne (BD), die wichtig ist für die Bindung des Faktors an die Ziel-DNA in der Promoterregion und der Aktivierungsdomäne (AD), die benötigt wird, um die RNA-Polymerase an der Zielregion zu aktivieren und somit die Transkription des Zielgens vermittelt. Bindungsdomäne und Aktivierungsdomäne müssen nicht kovalent gebunden sein, eine Transkription kann induziert werden, wenn sich beide Domänen in räumlicher Nähe zueinander befinden (Keegan et al., 1986). Um so eine mögliche Interaktion von zwei Proteinen zu untersuchen, stellt man Fusionsproteine her, die einerseits Protein A und die Gal4-BD enthalten und andererseits Protein B und die Gal4-AD. „Bait“ Plasmide, wie pAS 2-1, enthalten die Gal4-BD, ein „gene of interest“ und als Selektionsmarker ein Enzym zur Tryptophan-Synthese. „Prey“ Plasmide, wie pACT 2 oder pGADT7, beinhalten die Gal4-AD, ein weiteres „gene of interest“ und ein Enzym zur Leucinsynthese.

Die Transformationseffizienz beider Vektoren in Hefe kann dadurch überprüft werden, indem die Hefen ohne Tryptophan und ohne Leucin im Medium kultiviert werden. Der in dieser Arbeit verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Y190 des Matchmaker II Systems der Firma BD Biosciences Clontech, Heidelberg, weist eine Mutation im Gen *His3* auf, so dass nur geringe Mengen Histidin synthetisiert werden können. Für eine stringenter Selektion auf tatsächliche Interaktion wird die Histidin-Synthese durch Zugabe ins Medium von 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) komplett unterdrückt.

Interagieren beide Fusionsproteine miteinander, so entsteht ein funktionsfähiger GAL4-Transkriptionsfaktor und die nachgeschalteten Gene, *His3*- und das *lacZ*, können nun abgelesen werden. Die Reporter-Gen-Aktivität kann zum einen durch Wachstumskontrolle auf Platten, denen Histidin als essentielle Aminosäure fehlt, und zum anderen durch Tests auf Galaktosidaseaktivität überprüft werden.

Eine wichtige Voraussetzung der Funktionalität des „yeast two-hybrid“ Systems ist, dass keines der beiden eingesetzten Fusionsproteine autoaktiv ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems Interaktionen zweier Proteine, Iporin und GM130, direkt untersucht werden und ein neuer Interaktionspartner von Iporin, das humane Tesmin, durch einen „yeast two-hybrid screen“

mit einer humanen Testis-Expressionsbank des Matchmaker II Systems der Firma BD Biosciences Clontech, Heidelberg, gefunden werden.

4.3.1. Herstellung kompetenter Hefen

Die Voraussetzung einer Untersuchung von Protein/Proteininteraktionen in Hefen, ist das Einbringen von Fremd-DNA (Plasmid DNA) in die Hefen. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wurden die kultivierten Hefen mit Hilfe von Chemikalien kompetent gemacht. Eine weit verbreitete und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Methode ist die von Gietz et al. beschriebene Permeabilisierung der Hefezellwand mit Hilfe von Lithiumacetat (Gietz et al., 1997).

Für ein optimales Wachstum der Hefen wurden 10 ml YPD-Medium, komplettiert mit 2% Glukose und mit 1/100 Hefesuspension des Stammes Y190 (siehe 3.11.2. „Hefestämme“) in einem Schikanekolben bei 30°C unter gleichmäßigem Schütteln ÜN angezogen. Je nach Anzahl der benötigten kompetenten Hefeansätze (10-30) wurden 50-150 ml YPD-Medium, komplettiert mit 2% Glukose, mit der Übernachtskultur inokuliert, so dass die OD₆₀₀ 0,1 bis 0,2 betrug. Die Hefen wurden für etwa 4 Stunden bei 30°C in einem Rundschüttler inkubiert, bis sich die OD₆₀₀ mindestens 2-mal verdoppelt hat. Zur Trennung des Anzuchtmediums von den Hefen wurde die Kultur für 5 min/1500 x g/RT abzentrifugiert und das Pellet anschließend mit 25 ml H₂O_{bidest} gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (5 min/1500 x g/RT) wurden die Hefen für die Aufnahme der DNA vorbereitet, indem sie in 100 mM Lithiumacetat (3 ml pro 10 Ansätze) für 15 min bei 30°C inkubiert wurden. Entsprechend der Anzahl der einzelnen Ansätze wird ein Mix der einzelnen Komponenten hergestellt und davon jeweils 345 µl zu dem abzentrifugierte Pellet (5 min/1500 x g/RT) hinzu gegeben:

REAGENZ	Anzahl der Ansätze		
	10	20	30
50 % PEG	2,4 ml	4,8 ml	7,2 ml
1M Lithiumacetat	0,36 ml	0,72 ml	1,08 ml
Carrier DNA	0,05 ml	0,1 ml	0,15 ml
H₂O_{bidest}	0,69 ml	1,38 ml	2,07 ml

4.3.2. Kotransformation von Hefen

Zu den Ansätzen werden 0,5-1 µg „bait“ Plasmid und 0,5-1 mg „prey“ Plasmid oder, als Vorbereitung für den „yeast two-hybrid screen“ (siehe 4.3.5. „large scale Transformation“), ein Plasmid pipettiert. Die Ansätze werden für 30 min bei 30°C auf einem Rundschüttler inkubiert und anschließend ein Hitzeschock bei 42°C für 30 min durchgeführt, um so die Aufnahme der DNA durch die Hefen zu unterstützen. Die Hefesuspension wird für etwa 30 sec in einer Picofuge abzentrifugiert und das gesamte Pellet in 200 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Ein halber Ansatz wird auf einer Kontrollplatte, gekennzeichnet als SD-T-L, und die andere Hälfte auf der SD-T-L-H + 3AT Platte ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 30°C für etwa 3-7 Tage im Brutschrank.

4.3.3. β-Galaktosidasetest

Die transformierten Hefen besitzen das bakterielle *lacZ* Gen (siehe 4.3. „Das yeast two-hybrid System“), welches für die β-Galaktosidase kodiert und so eine indirekte Detektion einer Protein/Proteininteraktion ermöglicht. Die Aktivität des Enzyms kann in dem eingesetzten Hefestamm Y190 im Fall einer positiven Interaktion kolorimetrisch überprüft werden.

Für den β -Galaktosidasetest wird ein Filterpapier in einer Petrischale mit ca. 5 ml einer Xgal-Lösung (siehe 3.4., „Stammlösungen“) benetzt, so dass das Papier gut durchtränkt ist.

<p>Xgal-Lösung</p> <p>10 ml Z-Puffer</p> <p>167 μl Xgal-Stammlösung</p> <p>27 μl β-Mercaptoethanol</p> <p>→ Lösung jeweils frisch vor Gebrauch ansetzen</p>

Um die Hefezellen aufzuschließen, überträgt man die auf SD-T-H-L + 3AT gewachsenen Kolonien auf ein Filterpapier und taucht sie für etwa 20 sec in flüssigen Stickstoff. Das Filterpapier wird kurz bei Raumtemperatur aufgetaut und mit der Kolonien-Seite nach oben auf das Xgal-getränkte Filterpapier luftblasenfrei gelegt. Eine Umwandlung von Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid), katalysiert durch β -Galaktosidase, führt zur Blaufärbung der Hefekolonien. Die Intensität der Blaufärbung sowie die Inkubationszeit erlauben subjektive Aussagen über die Stärke der Interaktion.

4.3.4. Amplifikation einer cDNA Genbank

Im Rahmen dieser Arbeit ist das „yeast two-hybrid“ System ebenfalls zum Aufspüren neuer Interaktionspartner des humanen Iporin Proteins herangezogen worden. Als Genbank wurde die „human testis library“, Matchmaker-System, BD Biosciences Clontech, Heidelberg gewählt. Die cDNA Abschnitte einzelner Hoden-spezifischer Gene sind in den Matchmaker „prey“ Vektor pACT inkloniert und liegen in dem Bakterienstamm *E.coli* BNN132 vor. Vor der Amplifikation ist es notwendig, den Titer der einzusetzenden Genbank zu bestimmen.

4.3.4.1. Re-Tritrierung der Genbank

1 μ l der zu testenden Genbank wird gründlich in 1 ml LB-Medium (siehe 3.5.1., „Kulturmedium für Bakterien“) resuspendiert und in zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen von 1×10^3 und 1×10^6 auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgt bei 30°C für 26-48 Stunden im Brutschrank. Durch eine Hochrechnung der ausgezählten Einzelkolonien kann die Anzahl der unabhängigen Klone pro ml berechnet werden. Daraus kann ermittelt werden, wieviel μ l Genbank-Bakterienkultur für eine Amplifikation ausplattiert werden müssen. In der Regel liegt die Anzahl der unabhängigen Klone für Matchmaker Genbänke $>10^8$ cfu/ml. Um einen erfolgreichen „yeast two-hybrid screen“ durchführen zu können, sollte mindestens die doppelte Anzahl der unabhängigen Klone, die sich hier auf $3,5 \times 10^6$ beläuft, auf potentielle Interaktionspartner „durchgescreent“ werden.

4.3.4.2. Amplifikation

Im Rahmen dieser Arbeit sind aufgrund der besseren Handhabung 10 Bleche (1457 cm² pro Blech) mit insgesamt $2,5 \times 10^6$ unabhängigen Klonen, beimpft worden. Hierfür wurde 1 μ l der „human testis library“ Bakterienkolonien in 500 μ l 2YT-Medium mit Amp-Resistenz gründlich resuspendiert und anschließend in 30 ml 2YT-Amp-Medium aufgenommen. Pro Blech wurden 3 ml der Bakteriensuspension ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 30°C im Brutschrank. Die Inkubationstemperatur ist entscheidend, da bei 30°C ein heterogeneres Gemisch der unterschiedlich großen Klone entsteht.

Die abgeernteten Bakterien wurden in insgesamt 2 Litern 2YT-Amp-Medium resuspendiert, für 2-3 Stunden bei 37°C und 190 rpm auf einem Rundschüttler inkubiert und anschließend 20 min bei 4°C und 5000 x g abzentrifugiert. Die Bakterienpellets können entweder bei -70°C eingefroren werden oder es kann direkt eine Plasmidisolierung erfolgen. Die

Aufreinigung der Plasmid DNA wurde mit Hilfe des „QIAfilter Plasmid Giga Kits“ entsprechend der Angaben des „QIAGEN® Plasmid Purification Handbook“ durchgeführt (siehe 4.2.4. „Konzentrationsbestimmung von DNA“).

4.3.5. „large scale“ Transformation

Die „large scale“ Transformation wurde mit dem Köder Plasmid pAS Iporin Δ N847 (Δ 1) durchgeführt. Die Plasmid DNA wurde in den Hefestamm Y190 transformiert (siehe 4.3.1. „Herstellung kompetenter Hefen“) und bei 30°C auf SD-T Platten im Brutschrank inkubiert.

- 50 ml SD-T Medium mit einer Einzelkolonie pAS Iporin Δ N847 (Δ 1) animpfen, ÜN bei 30°C auf einem Rundschüttler bei 200 rpm inkubieren
- 150 ml SD-T Medium mit 1/50 SD-T pAS Iporin Δ N847 (Δ 1) Hefesuspension animpfen, ÜN bei 30°C auf einem Rundschüttler bei 200 rpm inkubieren
- 1 l Hauptkultur SD-T Medium mit SD-T pAS Iporin Δ N847 (Δ 1) Hefesuspension auf eine OD₆₀₀ 0,2-0,3 einstellen
- Inkubation bei 30°C in einem Rundschüttler bei 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,2
- Abzentrifugieren der Hefesuspension 3 min/25°C/1500 x g
- Pellet in 50 ml H₂O_{bidest} waschen, 4 min bei 25°C und 2000 x g abzentrifugieren
- Hefepellet in 10-20 ml 0,1 M Lithiumacetat für 15 min bei 30°C und 90 rpm inkubieren
- Abzentrifugieren der Hefelösung 4 min/25°C/2000 x g
- 7,2 ml 50 % PEG , 1,08 ml 1 M Lithiumacetat, 1 ml aufgereinigte „human testis library“ und zur Erhöhung der Transformationseffizienz 300 μ l „Hering Testes Carrier-DNA“ dazugeben, gut mischen und das Hefe-Pellet darin resuspendieren
- Inkubation für 30 min bei 30°C und 250 rpm im Rundschüttler
- Hitzeschock bei 42 °C für 30 min
- Abzentrifugieren der transformierten Hefen 4 min/25°C/2000 x g
- Pellet in 24 ml H₂O_{bidest} resuspendieren
- jeweils 5 ml der Hefesuspension auf SD-T-L-H + 30 mM 3AT Blechen (1457 cm² pro Blech) ausplattieren
- Inkubation für 1-3 Wochen bei 30°C im Brutschrank

Zur Ermittlung der Transformationseffizienz werden folgenden Kontrollansätze auf SD-T-L Agarplatten: 3 x 0,1 μ l, 2 x 1 μ l, 1 x 5 μ l der Hefesuspension.

Die Kontrollplatten werden 3-5 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert und anschließend werden die Einzelkolonien ausgezählt und hochgerechnet.

4.3.6. Isolierung potentieller Interaktionspartner

Die Isolierung potentieller Interaktionspartner erfolgt etwa 1-3 Wochen nach dem Ausplattieren. Hierfür werden die hochgewachsenen Hefekolonien von den Blechen „gepickt“ und auf SD-T-L-H + 50 mM 3AT Selektionsplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgt für etwa 5-7 Tage bei 30°C im Brutschrank. Zur Verifizierung der Interaktion gewachsener Klone wird ein β -Gal Test durchgeführt (siehe 4.3.3. „ β -Galaktosidase-Test“). Positive Klone werden zur weiteren Verifizierung isoliert und die Plasmid DNA aufgereinigt (siehe 4.2.2. „Isolierung von Plasmid DNA aus *S.cerevisiae*“).

4.3.7. Überprüfung potentieller Interaktionspartner

Zur Überprüfung potentieller Interaktionspartner wird die aufgereinigte DNA zur Abschätzung der „insert“-Größe mit *Hind* III kontrollrestringiert (siehe 4.2.5. „Restriktion von DNA“), da diese Schnittstelle im pACT Vektor vor und nach der einklonierten Sequenz enthalten ist. Danach wurde die aufgereinigte Plasmid DNA der isolierten Klone mit

unterschiedlichen Iporin-Mutanten in Hefen kotransformiert (siehe **4.3.1.** „Herstellung kompetenter Hefen“ und **4.3.2.** „Kotransformation von Hefen“) und ein β -Gal Test der gewachsenen Hefekolonien durchgeführt.

4.3.8. Charakterisierung potentieller Interaktionspartner

Potentielle positive Interaktionspartner werden mit Hilfe der pACT spezifischen „primer“ fish 3F und 4R (siehe **3.8.** „Primer“) sequenziert (siehe **4.2.11.** „Sequenzierung“). Das Leseraster kann durch virtuelle Translation der „forward“ sequenzierten Plasmid DNA mit Hilfe von expasy.ch festgestellt werden. Alle cDNA Sequenzen der „human testis library“ sind in den pACT Vektor am 5' über *Eco* RI einkloniert. Die Aminosäuresequenz der *Eco* RI Schnittstelle lautet „GRVD“. Die Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner erfolgt mit Hilfe von ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, indem die cDNA Sequenz mit Abschnitten bekannter Gensequenzen verglichen wird.

4.4. Proteinexpression in eukaryotischen Zellen

Die Analyse von endogenen oder überexprimierten Proteinen in Säugetierzellen hat den Vorteil, dass die zu untersuchenden Proteine korrekt gefaltet und posttranslational modifiziert werden, so dass ein Vergleich mit der *in vivo* Situation möglich wird. So kann die Expression endogener Proteine mit Hilfe von direkt gegen diese Proteine gerichteter Antikörper erfolgen. Ist jedoch kein geeigneter Antikörper vorhanden, kann das zu untersuchende Protein, rekombinant mit einem „tag“ gekoppelt, überexprimiert werden und die Detektion erfolgt mit Hilfe eines gegen das „tag“ gerichteten Antikörpers.

Hierfür werden die Zellen transient transfiziert, d.h. Fremd-DNA eingebracht, die im Zytoplasma verbleibt und im Gegensatz zu einer stabilen Transfektion nicht in das Genom eingebaut wird. Das eingebrachte Gen unterliegt der Kontrolle eines starken viralen Promoters, so dass es zur erhöhten Expression des Fremd-Proteins kommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die modifizierten pSV 42 HA, pSV 42 myc und pEGFP-IJ Vektoren eingesetzt (siehe **3.9.3.** „Eukaryotische Klonierungsvektoren“).

Es gibt unterschiedliche chemische und physikalische Verfahren der Transfektion wie z.B. Mikroinjektion und Liposomen-, bzw. Virosomen-vermittelte Transfektionen (Scangos et al., 1981). Eine der weit verbreiteten Methoden ist die Calcium-Phosphat-Präzipitation, im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich aber, dass die Transfektion mit dem Reagenz PolyFect[®] effizienter war (Graham und van der Elb, 1973).

4.4.1. Transfektion eukaryotischer Zellen mit PolyFect[®]

Die Durchführung der Transfektion mit PolyFect[®] erfolgte nach den Angaben der optimierten Protokolle für Cos7 und HeLa SS6 Zellen anhand des „PolyFect[®] Transfection Reagent Handbooks“, Qiagen GmbH, Hilden. PolyFect[®] ist ein aktiviertes dendrimeres Transfektionsreagenz, das mit Plasmid DNA eine komplexe Struktur eingeht. Diese Komplexe besitzen eine Netto-Positivladung und binden so effektiv an negativ geladene Rezeptoren, die außen an der Plasmamembran präsentiert werden. Nach endosomaler Aufnahme der DNA in die Zellen verhindert PolyFect[®] als Puffersystem, dass lysosomale Nukleasen gebildet werden, so dass die Stabilität der DNA bis zum Transport in den Zellkern gesichert wird.

4.4.2. Herstellung von Zellextrakten

Für die Analyse der zu untersuchenden endogenen oder überexprimierten Proteine müssen diese aus den Zellen isoliert werden. Für eine hohe Ausbeute der Proteinmenge, ist es unerlässlich, den optimalen Zeitpunkt zu wählen, an dem annähernd die größte Menge an Protein in den Zellen akkumuliert ist. In der Regel wurden die Zellen 24 Stunden nach der

Aussaat bzw. nach der Transfektion extrahiert. Einen Unterschied bildete das überexprimierte humane Tesmin A Protein, hier erfolgte die Aufarbeitung 30-36 Stunden nach Transfektion. Es wurden einerseits Gesamtzellextrakte hergestellt für *in vitro* Bindungsanalysen (siehe 4.4.2.1. „Herstellung von Gesamtextrakten“) und andererseits „post nuclear supernatant“ (PNS) Zellextrakte für die Zytosol-Membran-Fraktionierung (siehe 4.4.3. „Zytosol-Membran-Fraktionierung“) und die Dichtegradientenzentrifugation (siehe 4.4.4. „Percoll-Gradient“). Die einzelnen Methoden werden folgend näher beschrieben.

4.4.2.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Die Herstellung der Zellextrakte erfolgt auf Eis, um den Stoffwechsel der Zellen herabzusetzen und möglichen Abbau zu verhindern. Um detergenzlösliche Proteine aus der Zellstruktur herauszulösen, wird ein entsprechend angereicherter Puffer eingesetzt. Als Proteasehemmer wird Trasylol in einer Endkonzentration von 5 % zugesetzt.

Hierfür wird zuerst das Medium von den transient transfizierten Zellen in der Gewebekulturschale entnommen, die Zellen gründlich zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und letzte Flüssigkeitsreste abgesaugt. Die Zellen werden nun komplett mit „pull down“ Puffer benetzt und mit einem „rubber policeman“ gründlich von der Gewebekulturschale abgeschabt.

„pull down“ Puffer

10 mM Tris pH 7,4
 150 mM NaCl
 1 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 0,2 % Triton X-100
 5 % Trasylol
 100 µl à 6 cm Ø Gewebekulturschale
 300 µl à 10 cm Ø Gewebekulturschale

Die Zellsuspension wird 1 Stunde bei 4°C und 16000 x g abzentrifugiert, um so den Überstand, in dem sich die gelösten Proteine befinden, von den Zellrückständen zu trennen. Der Überstand kann mehrere Monate bei -70°C zwischengelagert werden.

4.4.3. Zytosol-Membran-Fraktionierung

Die Zytosol-Membran-Fraktionierung wird zur Trennung von zytosolischen und Membranproteinen durchgeführt, so dass sich Aussagen über die Lokalisation des zu untersuchenden Proteins machen lassen. Zuerst werden die Zellen zweier konfluent bewachsener Gewebekulturschalen mit 10 cm Ø gründlich zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und insgesamt in 1,5 ml CMF-Puffer („cytosol-membrane-fractionation“ Puffer) homogenisiert.

CMF-Puffer

250 mM Sucrose
 10 mM HEPES/KOH pH 7,4
 1 mM EDTA
 CompleteTM EDTA-frei
 ad 10 ml ml H₂O_{bidest}

Um mögliche Proteasen zu inhibieren sind dem Puffer CompleteTM_{EDTA-frei}, Protease Inhibitor Cocktail Tabletten, zugesetzt worden.

Die Zellsuspension wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend zehnmal durch eine 27G-Nadel gezogen, um so die Zellen aufzuschließen. Das Lysat wird 2 min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand, auch als „post nuclear supernatant“ (PNS) bezeichnet, wird mit 75 µl 50%-iger Sucrose unterschichtet. Im folgenden Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4°C und 14000 x g werden große Membranen, bzw. Membranteile vom Überstand abgetrennt. Das Pellet wird in insgesamt 1 ml CMF-Puffer gewaschen, 15 min bei 4°C und 14000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und schließlich in 2x HKT resuspendiert. Anschließend wird die gleiche Menge H₂O_{bidest} wie 2x HKT hinzugefügt.

<p>2x HKT</p> <p>20 mM Hepes/KOH pH 7,4</p> <p>200 mM KCl</p> <p>2 mM EDTA</p> <p>2mM DTT</p> <p>1 % Triton X-100</p> <p>CompleteTM_{EDTA-frei}</p>

Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 Stunde bei 4°C und 16000 x g befinden sich die Proteine der großen Membranen im Überstand (P14), der bei -70°C für weitere Analysen eingefroren wird.

Der Überstand, wird in ein Polycarbonatröhrchen überführt und 1 Stunde bei 4°C und 100.000 x g in der Beckmann optima L-60 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Im Überstand, als „supernatant 100“, kurz S100, bezeichnet, befinden sich alle zytosolischen Proteine. Er kann bei -70°C gelagert werden. Das entstandene Pellet, welches kleine Membranen enthält, wird in 1,5 ml CMF-Puffer gewaschen und für 15 min bei 4°C und 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 2x HKT aufgenommen, wodurch alle Detergenzlöslichen Membranproteine herausgetrennt werden. Anschließend wird die gleiche Menge H₂O_{bidest} wie 2x HKT hinzugefügt.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 1 Stunde bei 4°C und 16000 x g wird das Pellet verworfen und der Überstand mit herausgelösten Membranproteinen, als „supernatant P100“ (P100) bezeichnet, bei -70°C gelagert.

Somit hat man drei relevante Fraktionen erhalten, die Proteine der großen (P14) und kleinen (P100) Membranen und die löslichen (S100) Proteine enthalten. Die Verteilung der Proteine zwischen der Membranfraktion und dem Zytosol kann mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse (siehe 4.5.3. „Western Blot“) detektiert werden.

4.4.4. Percoll-Gradient

Eine Dichtegradientenzentrifugation ist ein Verfahren der Ultrazentrifugation, bei dem sich aufgrund der Zentrifugalkraft und des Percoll-Gradienten Proteine unterschiedlicher spezifischer Dichte, entgegengesetzt zu ihrer Tendenz, zu sedimentieren, entlang dieses Gradienten einordnen. Diese Methode ist insbesondere geeignet zur Trennung einzelner Bestandteile mit nur geringem Dichteunterschied. Zur Charakterisierung der einzelnen Fraktionen werden parallel Proteine bekannter Lokalisation detektiert. Die Fraktionierung mit Hilfe des Percoll-Gradienten wurde mit kleinen Abweichungen, wie von Czekay et al. beschrieben, durchgeführt (Czekay et al., 1997).

Für eine erfolgreiche Durchführung wird Zellmaterial von mindestens zwei konfluenten 10 cm Ø Gewebekulturschalen benötigt. Nach dem gründlichen Waschen der Zellen mit

eiskaltem PBS werden die Zellen in 2 ml PBS von der Kulturschale mit Hilfe eines „rubber policeman“ abgeschabt, aufgenommen und für 10 min bei 4°C und 1200 x g zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 2 ml Homogenisierungspuffer (HB) aufgenommen.

Homogenisierungspuffer (HB)

20 mM Hepes pH 7,4
150 mM NaCl
2 mM CaCl₂
1 mM PMSF
5 % Trasylol®

Nach Abzentrifugation bei 1200 x g und 4°C für 10 min wird das Pellet in 200 µl HB aufgenommen und zehnmal durch eine 27G-Nadel zur mechanischen Homogenisierung gezogen. Das Gemisch wird zweimal bei 1000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und der so hergestellte „post nuclear supernatant“ (PNS) auf die Percoll-Gradientmischung aufgetragen.

20 % Percoll-Gradient

20 % Percoll
10 mM Tris pH 8,0
150 mM NaCl

Die aufgetragene PNS-Lösung hat eine größere Dichte als das Percoll™ Medium, welches aus gallertartigen Kieselgelkügelchen, die mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichtet sind, besteht. Im folgenden Zentrifugationsschritt für 2 Stunden bei 4°C und 20000 x g in einer TL100 Beckmann Zentrifuge mit einem TLA Festwinkelrotor wandern die Partikel entsprechend ihrer Dichte und ihrem Sedimentationskoeffizienten wegen der Zentrifugalkraft, und bilden Zonen im Gradienten aus. Einzelne Fraktionen von 200 µl werden von oben nach unten entnommen und bei -70°C gelagert. Die Analyse der Verteilung bestimmter Proteine erfolgt mit Hilfe der „Western Blot“ Technik (siehe 4.5.3. „Western Blot“).

4.4.5. Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation ist es möglich, durch Bildung von Immunkomplexen aus spezifischen Antigenen und den korrespondierenden löslichen Antikörpern spezifische Proteine aus einem Proteingemisch zu isolieren. Im Rahmen dieser Arbeit ist die Methode zur Detektion von Rab1B aus Maushodengewebe angewandt worden.

Hierfür wurden zuerst Extrakte aus Maus-Hodengewebe in LP-E Puffer hergestellt (siehe 4.6.1. „Herstellung von Gewebeextrakten“). Der Gewebeextrakt wird mit dem entsprechenden Antikörper in einem Gesamtvolumen von 300 µl, aufgefüllt mit LP-E Puffer, für 2,5 Stunden auf Eis inkubiert. Folgend werden 5 µl „Protein G™ Sepharose beads“ zugesetzt und ÜN bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Protein G aus *S.aureus* bindet Antikörper reversibel über die Fc-Domäne in einem Verhältnis von 1 Mol Protein G zu 2 Mol IgG. Die Bindung von Protein G an die Sepharose-„beads“ lässt eine immobilisierte Matrix entstehen, wodurch die Aufreinigung des Antigen-Antikörper-Protein G-Komplexes möglich wird. Nach der ÜN Inkubation wird das Gemisch zweimal in 500 µl LP-E Puffer und einmal in 500 µl 20 mM Tris-Puffer, pH 7,4, gewaschen. Nach jedem Waschschrift wird die Lösung 1 min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 2x Probenpuffer aufgenommen, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse mit demselben eingesetzten Antikörper detektiert. Im Falle der Rab1B

Immunpräzipitation wurde unter nicht-denaturierenden Bedingungen gearbeitet, da Rab1B ein Molekulargewicht von etwa 23 kDa hat und so die Banden der leichten Ketten des Antikörpers, detektiert vom Sekundärantikörper, die spezifische Rab1B Bande überdecken würden.

4.4.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

Um jeweils definierte Proteinmengen in Experimenten einsetzen zu können, muss eine Proteinbestimmung durchgeführt werden. Es wird jeweils die Gesamtproteinmenge eines Extraktes bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Pierce BCA Test eingesetzt, der darauf basiert, dass Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in einem alkalischen Milieu einen Komplex in der so genannten Biuret-Reaktion eingehen und diese zu Cu^{1+} reduziert werden (Smith et al., 1985; Wiechermann et al., 1988). Jeweils ein einwertiges Kupfer-Ion bindet an zwei Bicinchoninsäure (BCA)-Moleküle und es kommt zu einem Farbumschlag von grün nach violett. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

4.5. Analyse exprimierter Proteine

4.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem Proteine im elektrischen Gleichspannungsfeld und in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) in Polyacrylamid-Gelen in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt werden (Laemmli, 1970). SDS bindet an Untereinheiten eines Proteins, wodurch die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziieren. In die denaturierten, durch Zufall geknäulten und gefalteten Polypeptidketten wird durch die SDS-Bindung eine starke negative Ladung eingeführt, die die vorhandenen Ladungen überdeckt.

Im Rahmen dieser Arbeit sind Minigelapparaturen der Firma Biorad eingesetzt worden, wobei das Flachbettgel aus einem 5 %-igem Sammelgel (5,5 x 8,5 cm) und einem Trenngel (3 x 8,5 cm) unterschiedlicher Konzentration besteht. Die Gele entstehen durch Polymerisation von SDS-Polyacrylamid (30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid), wobei Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin) als Reaktionsbeschleuniger eingesetzt wurden. Die Konzentration an Acrylamid entscheidet über den Trennbereich des Gels, d.h. je höher die Konzentration ist, desto engermaschiger ist die ausgebildete netzartige Struktur. Hochprozentige Gele, z.B. 12%, eignen sich zur Auftrennung von Proteinbanden von 10-60 kDa, während niederprozentige Gele, wie z.B. 7%, zur Separierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 70-220 kDa genutzt werden.

Die genaue Durchführung kann meiner Diplomarbeit entnommen werden (Konczal, 2001).

4.5.2. Coomassie-Färbung

Um einzelne Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen, wird dieses nach der Gelelektrophorese mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt.

Coomassie-Färbelösung

2,5 g Brillant Blue R250
100 ml Essigsäure
450 ml Methanol
ad 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Die Färbelösung bindet irreversibel an Proteine. Um die Färbung sichtbar zu machen, wird die Hintergrundfärbung zuerst etwa 1 Stunde im Entfärber I, dann im Entfärber II für ½ h ausgewaschen.

Entfärber I

100 ml Essigsäure
450 ml Methanol
ad 1 l H₂O_{bidest}

Entfärber II

50 ml Essigsäure
50 ml Methanol
ad 1 l H₂O_{bidest}

4.5.3. "Western Blot"

Das "Western Blotting" beschreibt eine Methode zum Transfer von Proteinen aus Gelen auf eine Trägermembran in einem elektrischen Feld. Im Rahmen dieser Arbeit ist Polyvinylidendifluorid (PVDF) als Membran eingesetzt worden und der „blot“ wurde als „semi-dry“ Methode durchgeführt (Towbin et al., 1979; Kyshe und Anderson, 1984; Gültekin und Heermann, 1988).

Hierfür wird das SDS-Polyacrylamidgel auf die Membran und zwischen „Blot“-Filterpapieren (W-P) gelegt, die in entsprechendem Puffer äquilibriert und in einer bestimmten Reihenfolge geschichtet werden.

- Puffer 1 (6 x W-P): 0,3 M Tris; 20 % Methanol
- Puffer 2 (3 x W-P): 25 mM Tris; 20% Methanol
- PVDF-Folie (30 sec in Methanol befeuchtet), SDS-Polyacrylamidgel
- Puffer 3 (3 x W-P): 25 mM Tris; 40 mM 6-Amino-n-hexanoic Säure; 20 % Methanol

Dieser Stapel wird zwischen zwei befeuchteten Graphitelektroden eingespannt und mit einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm² werden die Proteine vom Trenngel auf die Membran transferiert.

Das Methanol in den Puffern bewirkt die Ablösung von SDS aus den Proteinkomplexen, so dass die Affinität zwischen der Trägermembran und den Proteinen erhöht wird. Allerdings kann Methanol die Gelporengröße reduzieren, so dass der Transfer großer Proteine gestört sein kann. So sollte getestet werden, welche Pufferkombination für die Übertragung geeignet ist.

Der „blot“ Vorgang wird überprüft, indem die Proteinbanden mit Ponceau S reversibel eingefärbt werden.

Ponceau S

0,2 % Ponceau S
in 3 % (w/v) TCA

Um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wird die Membran 0,5 Stunden bei 37°C in 5 % Milchpulver, gelöst in PBS/0,1 % Tween, inkubiert. Anschließend werden endogene oder rekombinante Proteine, die entsprechend Teil des aufgetragenen und aufgespalteten Proteinextraktes sind, mit spezifischen Antikörpern detektiert (siehe 3.7. „Antikörper“). Hierfür wird die Membran unter leichtem Schütteln bei RT 1 Stunde mit dem Primärantikörper, gelöst in der Milchpulverlösung, inkubiert. Überschüssiger Antikörper wird in PBS/0,1 % Tween abgewaschen, wobei die Lösung mehrfach gewechselt wird. Dann erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der gegen ein Epitop des primären Antikörpers gerichtet ist und an die Peroxidase („horse radish peroxidase“ HRP) gekoppelt ist. Anschließend wird wieder gründlich mit PBS/0,1 % Tween gewaschen.

Die Detektion des Proteins erfolgt über eine Chemilumineszenz-Reaktion mit Hilfe des „SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrat“, bzw. des „Uptilight HRP Blot Substrat“ (siehe 3.3.5. „Western Blot Entwicklung“).

4.5.4. Immunfluoreszenz

Fluoreszenz definiert sich als Lichtemission von Molekülen oder Atomen, die dafür notwendige Energie erhalten sie durch Absorption von Lichtquanten. Sie lässt sich als lichtmikroskopische Technik in der Naturwissenschaft einsetzen, in der Licht von einzelnen Zellen bzw. Zellkompartimenten und Organellen, durch vorherige Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, emittiert wird.

Die Immunfluoreszenz wurde 1941 von Coons entwickelt und dient dem immunologischen Nachweis zur Lokalisation von endogenen und überexprimierten rekombinanten Proteinen. Bei der indirekten Form, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt worden ist, wird nach erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem Fluorochrom-markiertem Anti-Immunglobulin überschichtet und dies im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

Eine andere Möglichkeit ist die Expression von EGFP-Fusionsproteinen, in dem das Fluorochrom direkt an das gebildete Protein gekoppelt ist und bei Anregung grünes Licht sichtbar wird.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Analyse der Präparate mit Hilfe des Leitz Diaplan Fluoreszenzmikroskops und dem Konfokalen Leica DM RXE „Laser-Scanning“ Mikroskops. Der Vorteil der konfokalen „Laser-Scanning“ Mikroskopie liegt in der Betrachtung optischer Schnitte eines Präparates, so dass eine exaktere Lokalisation möglich ist.

Vorbereitung der Deckgläschen

Für eine bessere Anheftung der Zellen an die Deckgläschen ist es sinnvoll, diese chemisch so zu behandeln, dass die Oberfläche angeraut wird. Hierfür werden die Deckgläschen 3 Stunden in Aceton leicht geschüttelt, um eventuelle Verunreinigungen durch Fette zu entfernen. Danach werden sie gründlich in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült und $\ddot{\text{U}}\text{N}$ in 3 % Natriumhydrogencarbonat (Na_2CO_3) gelegt. Zur Entfernung der chemischen Lösung werden die Deckgläschen wiederholt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen und einzeln auf einem saugfähigen Papier ausgelegt. Eine Sterilisierung erfolgt für etwa 3 Stunden unter UV-Licht in einer sterilen Werkbank.

Immunfluoreszenz-Analyse

Vorbereitend wird eine bestimmte Anzahl Deckgläschen in eine Gewebekulturschale gelegt und eine definierte Zellzahl ausgesät. Die Zellen werden 24 Stunden nach Aussaat entweder transfiziert (siehe 4.4.1. „Transfektion eukaryotischer Zellen mit PolyFect[®]“) oder für eine Detektion endogener Proteine aufgearbeitet.

Hierfür werden die Deckgläschen in einem geeigneten Behältnis auf Eis gestellt, um so die Stoffwechselfvorgänge anzuhalten und möglichen Abbau zu verhindern. Danach werden die bewachsenen Deckgläschen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Fixierung der Proteine und zellulären Strukturen erfolgt in zwei Schritten auf Eis. Im ersten Schritt werden die Zellen 15 min mit 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) behandelt und folgend mit 8 %-igem PFA für 30 min. Hier kann die Versuchsdurchführung unterbrochen werden, indem die Deckgläschen einige Tage in PBS bei 4°C aufbewahrt werden.

Alle weiteren Schritte erfolgen bei RT. Zur Absättigung reaktiver Aldehydgruppen werden die Zellen mindestens 10 min in 50 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) inkubiert, d.h. „gequencht“. Die Behandlung wird durch dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS unterbrochen und die Zellen für die Behandlung mit der Antikörperlösung vorbereitet. Um eine Aufnahme zu ermöglichen, wird die Zellmembran permeabilisiert. Hierfür werden die Zellen 5 min in 0,2 % Triton X-100, gelöst in PBS, inkubiert und anschließend unspezifische Bindungsstellen in einem dreimaligen Waschschrift mit 0,2 % Gelatine/PBS gesättigt. Der erste Antikörper, der direkt gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, wird in 0,2 % Gelatine/PBS gelöst (siehe 3.7. „Antikörper“). Die Inkubationszeit ist abhängig vom eingesetzten Antikörper und beträgt 20-45 min. Der überschüssige Antikörper wird dann

dreimal mit 0,2 % Gelatine/PBS abgewaschen und die Zellen mit dem zweiten Antikörper für 20 min inkubiert. Zum Abschluss werden die Zellen dreimal in 0,2 % Gelatine/PBS und dreimal mit PBS gewaschen. Bevor die Deckgläschen in 25 µl Mowiol eingebettet werden, werden sie etwa 20 sec in H₂O_{bidest} eingetaucht, um so Salze abzuwaschen. Das Mowiol, welches zusätzlich DAPI zur Anfärbung des Zellkerns in einer Konzentration von 10 ng/ml enthalten kann, muss ÜN bei RT aushärten, bevor eine Auswertung mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops erfolgen kann.

4.6. Proteinexpression in Geweben

Für eine Analyse der Proteinexpression in einzelnen Gewebetypen ist es notwendig, aus dem frisch isolierten Gewebe eines Organismus, hier Maus, eine homogene Mischung herzustellen. Das Gewebe wird nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und kann entweder bei -70°C gelagert werden oder wird zerkleinert und im entsprechenden Puffer homogenisiert. Im Rahmen dieser Arbeit ist Gehirn- und Hodengewebe in einem Potter aufgearbeitet worden.

4.6.1. Herstellung von Gewebeextrakten

Hierfür wurde das Gewebestück in einem Mörser, unter Zuführung von flüssigem Stickstoff, zerkleinert. Etwa fünf Spatelspitzen werden in ein Dounce-Gefäß überführt, welches in ein Glasgefäß montiert wird, in dem sich ein Eis-Wasser-Gemisch zur Kühlung befindet. Zu dem gemörserten Gewebe wurden im Rahmen dieser Arbeit 2,5 ml LP-E Puffer hinzugefügt.

Lysis-Puffer E
50 mM Tris/HCl pH 7,4
150 mM NaCl
2 mM Natriumfluorid (NaF)
200 µM Natriumorthovanadat
1 % NP-40 (Igepal CA-630)
0,1 % SDS
0,1 % DOC
Complete TM EDTA-frei

Das Gewebe-Puffer-Gemisch wird homogenisiert, indem ein rotierender Stößel in das Dounce-Gefäß eingeführt wird und etwa 15-mal auf- und abbewegt wird. Das Lysat wird in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und 1 Stunde bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, wobei die Fettschicht, die sich auf der Suspension befindet, nicht mitgeführt wird. Er kann einige Monate bei -70°C zwischengelagert werden.

4.6.2. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dazu, mit Hilfe spezifischer Antikörper die Verteilung bestimmter Antigene in einem Gewebeschnitt sichtbar zu machen. Die Detektion erfolgt über spezifische Antikörper (siehe 3.7. „Antikörper“), ähnlich wie für die Immunfluoreszenzmethode beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sind die Streptavidin-Biotin-Methode und das 2-Schritt-Polymerdetektionssystem EnVisionTM System eingesetzt worden, wobei in beiden Fällen Meerrettichperoxidase („horse radish peroxidase“ HRP) als Enzym dient. Die Durchführung beider Methoden wird folgend genauer beschrieben, Hintergrundinformationen können der Broschüre „Handbuch Immunchemische Färbemethoden“, Thomas Boenisch, DakoCytomation GmbH, Hamburg, entnommen werden.

In Bezug auf die „Northern Blot“ Ergebnisse ist die höchste mRNA Expressionsrate von Iporin in Hoden- und Gehirngewebe zu verzeichnen (Bayer et al., 2005). So sind im Rahmen dieser Arbeit Immunohistochemische Analysen zur Lokalisation von Iporin und seinen Interaktionspartnern Rab1B und GM130 in Hodenschnitten adulter Mäuse und Menschen durchgeführt worden. Die hierfür eingesetzten Schnitte sind vom Institut für Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Münster gestellt worden. Sie weisen eine Dicke von 3-4 µm auf und sind zur Konservierung der Gewebe- und Zellmorphologie Paraffinfixiert worden.

LSAB („Labelled StreptAvidin-Biotin“-Methode

Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des DakoCytomation LSAB 2[®] System-HRP (siehe 3.3.6. „Immunhistochemie“).

Die einzelnen Schritte laufen wie folgt ab: 1. Maus- oder Kaninchen-Primärantikörper, 2. Anti-Maus oder Anti-Kaninchen Immunglobuline, biotinyliert, 3. Streptavidin-Enzym-Konjugat, d.h. Streptavidin mit HRP gekoppelt. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, so dass es zur Verstärkung des Signals kommt. Diese Methode ist somit vier- bis achtmal sensitiver als zuvor beschriebene Methoden (Giorno, 1984). Als Substrat für HRP wird 3-3'-Diaminobenzidin (DAB), Sigma Fast[™] DAB (3,3'-Diaminobenzidine) Peroxidase Substrate Tablet Sets (siehe 3.1. „Chemikalien“) eingesetzt, was zu einer Braunfärbung der markierten Strukturen führt.

Durchführung:

- Entparaffinisieren: jeweils 10 min in „Paraclear I“ und „Paraclear II“
- Absteigende Ethanol-Reihe: 10 min 100 % EtOH; 5 min 100 % EtOH; 5 min 96 % EtOH; 5 min 80 % EtOH; 5 min 70 % EtOH
- 10 min fließend in H₂O wässern
- 3 min in H₂O_{bidest} waschen
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen
- Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität: Schnitte mit Lösung 1, „Peroxidase Block“ 3 % H₂O₂, benetzen und 5 min in feuchter Kammer inkubieren
- Lösung abklopfen, 3 min in H₂O_{bidest} waschen
- Blocken: Schnitte mit 5 % Ziegenserum, gelöst in TBS („Tris-buffered saline“)/0,1 % BSA (bovines Serumalbumin), benetzen, 20-30 min in feuchter Kammer inkubieren
- Waschen: 3mal jeweils 3 min in TBS
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen
- Primärantikörper: Der primäre Antikörper wird in TBS/0,1 % BSA gelöst; pro Schnitt werden jeweils 50 µl der Antikörper-Lösung pipettiert und 60 min in einer feuchten Kammer inkubiert; je nach Antikörper kann sich die Inkubationsdauer um weiter 30 min verlängern; als Negativkontrolle werden die Schnitte mit einer TBS Lösung/0,1 % BSA ohne Zugabe des Primärantikörpers benetzt
- Waschen: 3mal jeweils 3 min in TBS
- Sekundärantikörper: Schnitte mit Lösung 2, „Biotinylated Link“, die ein Gemisch aus anti-Maus und anti-Kaninchen Antikörpern, gekoppelt an Biotin enthält, 15 min in einer feuchten Kammer inkubieren
- Waschen: 3mal jeweils 3 min in TBS
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen
- HRP-Streptavidin: Schnitte mit Lösung 3, HRP-Streptavidin, 15 min in einer feuchten Kammer inkubieren
- Waschen: 3mal jeweils 3 min in TBS
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen

- **Substrat:** die Substratlösung wird wie folgt vorbereitet: 1 Tablette Urease wird in 1 ml H_2O_{bidest} vollständig gelöst und 1 Tablette DAB dazugegeben; Schnitte mit der Substratlösung benetzen und in einer feuchten Kammer für max. 30 min inkubieren, zwischendurch anhand der entstehenden Braunfärbung überprüfen, ob die Reaktion vorzeitig abgebrochen werden soll
- Reaktion stoppen durch Überführen der Proben in H_2O_{bidest}
- **Gegenfärbung:** um einen Kontrasteffekt zur DAB-Färbung zu erzeugen, werden die Proben 20 sec in Hämalun unter Schütteln inkubiert
- 5 min fließend wässern
- **Aufsteigende Ethanolreihe:** 3 min 70 % EtOH; 3 min 80 % EtOH; 3 min 96 % EtOH; 3 min 100 % EtOH; 5 min 100 % EtOH
- **Ethanol-Entfernung:** damit das Einbettungsmedium Merckoglas an die Schnitte haftet, sollten die Proben jeweils 5 min in „Paraclear II“ und „Paraclear I“ inkubiert werden
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen
- Deckgläschen mit Merckoglas benetzen und die Proben darin einbetten
- Merckoglas ÜN bei RT aushärten lassen

EnVision™ System, HRP

Die Durchführung erfolgte mit dem Dako® Fuchsin + Substrate – Chromogen System For Immunohistochemistry And In Situ Hybridisation „kit“ (siehe 3.3.6. „Immunhistochemie“).

Das EnVision™ HRP-System ist eine Zwei-Schritt Technik, basierend auf der Inkubation mit einem Primärantikörper und einem HRP-gekoppelten Polymer, das an den Sekundärantikörper konjugiert ist. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch aus anti-Maus und anti-Kaninchen Antikörpern, ein sog. „Dual-Link-Reagenz“, was den Nachweis mono- und polyklonaler Primärantikörper aus Maus- und Kaninchen mit einer Lösung ermöglicht.

Das Konjugat-„Rückgrat“ besteht aus einem inerten Dextranmolekül, das durchschnittlich 70 Enzymmoleküle und 10 Moleküle Sekundärantikörper enthält. Der Vorteil dieser Methode ist, dass so, unabhängig von einer Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin, unspezifische Färbungen als Folge endogenen Biotins ausgeschlossen werden können. Als Substrat wird Neufuchsin umgesetzt, was zu einem rosaroten Reaktionsprodukt führt.

Durch eine Paraffin-Fixierung kann die Immunreaktivität vieler Antigene durch eine Konformationsänderung herabgesetzt werden. Das kann zu einem vollständigem oder partiellem Verlust der Immunreaktivität führen, was als „Maskierung“ des Epitops bezeichnet wird. Einer Verbesserung der Immunreaktivität, d.h eine „Epitopdemaskierung“, kann durch Erhitzen in einer definierten Pufferlösung mit Mikrowellen erreicht werden. Dieser Vorgang wird entsprechend hitzeinduziertes „Epitop-Retrieval“ (HIER) genannt. Im Rahmen dieser Arbeit sind parallel Präparate erhitzt bzw. kein Antigen-„Retrieval“ durchgeführt worden. Es konnten keine Unterschiede bei der Detektion spezifischer Proteine, bzw. der Anfärbung bestimmter Strukturen beobachtet werden.

Durchführung:

- **Entparaffinisieren:** jeweils 10 min in „Paraclear I“ und „Paraclear II“
- **Absteigende Ethanol-Reihe:** 10 min 100 % EtOH; 5 min 100 % EtOH; 5 min 96 % EtOH; 5 min 80 % EtOH; 5 min 70 % EtOH
- 10 min fließend in H_2O wässern
- 3 min in H_2O_{bidest} waschen
- **Antigen-„Retrieval“** (optional): Proben in einem geeigneten Gefäß in 0,05M L-Glycin Puffer tauchen, in der Mikrowelle bei 80°C für 12 min erwärmen, folgend 20 min abkühlen
- **Waschen:** 3mal jeweils 5 min in TBS
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen

- Blocken: Schnitte mit 5 % Ziegen Serum, gelöst in TBS („Tris-buffered saline“)/0,1 % BSA (bovines Serumalbumin), benetzen, 20-30 min in feuchter Kammer inkubieren
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen
- Primärantikörper: Der primäre Antikörper wird in TBS/0,1 % BSA gelöst; pro Schnitt werden jeweils 50 µl der Antikörper-Lösung pipettiert und 60 min in einer feuchten Kammer inkubiert; als Negativkontrolle werden die Schnitte mit einer TBS Lösung/0,1 % BSA ohne Zugabe des Primärantikörpers benetzt
- Waschen: 3mal jeweils 3 min in TBS
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen
- Sekundärantikörper: Schnitte mit der Lösung „Dako EnVision HRP“ benetzen und 30 min in einer feuchten Kammer inkubieren
- Substrat: Farbsubstrat ansetzen: 1 Tropfen „Fuchsin + Chromagen“ mit 1 Tropfen „Activating Agent“ mischen und 1 min bei RT inkubieren, 586,66 µl „Fuchsin Buffered Substrate: Naphthol Phosphate in Tris Buffer“ hinzufügen; Schnitte mit der Substratlösung benetzen und in einer feuchten Kammer für max. 30 min inkubieren, zwischendurch anhand der entstehenden Rotfärbung überprüfen, ob die Reaktion vorzeitig abgebrochen werden soll
- Reaktion stoppen durch überführen der Proben in H₂O_{bidest}
- Gegenfärbung: um einen Kontrasteffekt zur Neufuchsin-Färbung zu erzeugen, wurden die Proben 20 sec in Hämalun unter Schütteln inkubiert
- 5 min fließend wässern
- 3 min in H₂O_{bidest} waschen
- Objektträger und Probe mit einem saugfähigen Papier trocknen
- Deckgläschen mit Dako Faramount benetzen und die Proben darin einbetten
- Dako Faramount ÜN bei RT aushärten lassen und das Deckgläschen mit klarem Nagellack abdichten

Die Sichtanalyse der einzelnen Proben erfolgte mit dem Mikroskop Axiovert 200 der Firma Zeiss, Jena. Ein Vergleich beider Methoden zeigte, dass die LSAB-Methode eine distinktere Färbung und größere Sensitivität bei der Detektion von Iporin, Rab1B und GM130 erbrachte.

4.7. Protein-Interaktionsstudien „GST-pull down“ Test

Eine weitere Methode zum Nachweis von Protein/Proteininteraktionen ist die *in vitro* Methode „GST-pull down“. Hierbei werden bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine an immobilisierte Glutathion-Sepharose „beads“ gekoppelt und mit einem Zellextrakt behandelt, der den möglichen Interaktionspartner als überexprimiertes oder endogenes Protein enthält (Guan und Diao, 1991). Eine Induktion der GST-Fusionsproteine kann mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung (siehe 4.5.1. „SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese“ und 4.5.2. „Coomassie-Färbung“) überprüft werden, wobei eine Interaktion mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse nachgewiesen werden kann (siehe 4.5.3. „Western Blot“).

4.7.1. Expression von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden konstruiert, indem das „gene of interest“ in die MCS des pGEX-Vektors inkloniert wurde (siehe 3.10.1. „Plasmidkonstrukte für die bakterielle Expression“). Vor der MCS liegt das „tag“ GST, das *Glutathion-S-Transferase* Gen aus *Schistosoma japonicum*, was einen N-terminalen Anteil von 26 kDa des überexprimierten Proteins ausmacht. Die Expression ist unter die Kontrolle des *tac* Promoters gestellt und kann durch das Laktose-Analogen Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert werden. Alle pGEX Vektoren enthalten ebenfalls ein *lacIq* Gen, so dass ein Repressor-Protein gebildet

wird, was sich in Abwesenheit von IPTG an den *tac* Promoter heftet und so die Expression auf einem Basallevel hält.

Als Wirt wird der *E.coli* Stamm BL21 eingesetzt, da der Stamm *OmpT* und *Lon* defizient ist, so dass die überexprimierten Proteine nicht proteolytisch abgebaut werden können (Studier und Moffat, 1986).

Für die Expression werden die pGEX-Konstrukte mittels Elektroporation in BL21 Bakterien transformiert (siehe 4.2.9.2. „Elektroporation“).

Durchführung:

- Ansetzen einer 2YT-Amp-ÜN Kultur, angeimpft mit dem jeweiligen pGEX-Konstrukt, Inkubation bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschtüttler
- 50 ml 2YT-Medium mit 0,5 ml der ÜN-Kultur animpfen, Inkubation bei 37°C und 250 rpm auf einem Rundschtüttler bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,8
- die Bakteriensuspension auf RT abkühlen
- Induktion der GST-Fusionsproteine mit 0,1mM IPTG für 3 Stunden bei 30°C
- Negativkontrolle: zur Kontrolle werden 5 ml Bakteriensuspension ohne Zugabe von IPTG bei der entsprechenden Temperatur mitgeschüttelt
- Abzentrifugieren der Bakteriensuspension 5 min/4°C/3700 x g
- Überstand verwerfen; Pellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C lagern

Zur Überprüfung der Expression wird das Pellet von 1 ml Bakterienkultur in ca. 50µl Probenpuffer resuspendiert, 10 min bei 95°C aufgeköcht und 1/5 auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Gegensatz zu der Negativkontrolle sollte in der Spur der induzierten Probe ein deutliches Signal auf Höhe des errechneten Molekulargewichts des GST-Fusionsproteins erscheinen.

4.7.2. Herstellung des Bakterienlysats

Das bei -20°C gelagerte Pellet von 50 ml Bakteriensuspension wird in 2,5 ml eiskaltem PBS resuspendiert, 5 % Trasytol zugegeben und zur Unterstützung des Zellaufschlusses in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen der Lösung erfolgt die Lyse mittels Ultraschall, viermal für jeweils 10 sec. Anschließend wird 1 % Triton X-100 zugesetzt und die Lösung 30 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung der festen Bestandteile von den löslichen Proteinen erfolgt eine Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C für 60 min. Der Überstand, in dem sich zusätzlich zu den bakteriellen auch die induzierten Proteine befinden, kann bei -70°C zwischengelagert werden.

4.7.3. Kopplung der GST-Fusionsproteine an „Glutathion-Sepharose beads“

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgt mit Hilfe von „Glutathion Sepharose 4 Fast Flow“, GE Healthcare Bio-Sciences. Für die Kopplung der GST-Fusionsproteine werden jeweils 10 µl der „beads“ mit unterschiedlichen Volumina des isolierten Überstandes (siehe 4.7.2. „Herstellung des Bakterienlysats“) und PBS/1 % Triton X-100 auf 500 µl Endvolumen aufgefüllt und für 1,5 Stunden in einem Überkopf-Schtüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Ansätze bei 4°C und 1000 x g für 1 min abzentrifugiert und die „beads“ zweimal mit eiskaltem PBS/1 % Triton X-100 und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wird die Lösung 1 min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert.

Zur Konzentrationsbestimmung der GST-Fusionsproteine in dem Bakterienlysats werden die „beads“ in 50 µl 2x Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C für 10 min aufgeköcht und 1/5 auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zum Vergleich werden unterschiedliche Konzentrationen von 400-1600 ng BSA mitaufgetrennt. So kann abgeschätzt werden, welches Volumen des Bakterienlysats 10 µg Fusionsprotein entspricht.

4.7.4. Inkubation mit Zellextrakten

Für die Analyse der Interaktion von zwei Proteinen werden 10 µg des bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteins mit 10 µl der „beads“ für 2-4 Stunden in einem Überkopf-Schüttler bei 4°C inkubiert und anschließend gründlich gewaschen. Zu den „beads“ wird Zellextrakt, der den möglichen Interaktionspartner enthält, dazugegeben und das Volumen mit „pull down“ Puffer auf 500 µl aufgefüllt (siehe 4.4.2.1. „Herstellung von Gesamtzellextrakten“). Die Inkubation erfolgt bei 4°C in einem Überkopf-Schüttler für mehrere Stunden, bzw. über Nacht. Die „beads“ werden gründlich mit „pull down“ Puffer gewaschen, um überschüssige Proteine aus der Lösung zu entfernen. Nach jedem Waschschrift wird die Lösung 1 min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert und das Pellet anschließend in 15 µl 2x Probenpuffer aufgenommen. Die Denaturierung erfolgt für 10 min bei 95°C und das Gemisch wird für 1 min bei 16000 x g abzentrifugiert, wodurch sich die „beads“ am Boden absetzen. Der Überstand wird auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse und spezifischen Antikörpern, die gegen den Interaktionspartner gerichtet sind, detektiert.

5. Ergebnisse

Eukaryotische Zellen zeichnen sich durch eine Vielzahl von Kompartimenten und Organellen aus, die Lipide und Proteine tragen und miteinander über membranumhüllte Vesikel kommunizieren. Eine Proteingruppe, welche die Schritte des vesikulären Transports reguliert, ist die Gruppe der Rab Proteine (Zerial und McBride, 2001). Die kleine GTPase Rab1 übernimmt eine zentrale Rolle im COPII-abhängigen anterograden Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat, spielt aber auch eine Rolle im *intra*-Golgi Transport und beeinflusst die COPI Rekrutierung (Plutner et al., 1991; Alvarez et al., 2003; Deneka et al., 2003). Für die korrekte Funktionalität von Rab1 sind spezifische Faktoren zuständig, von denen einige in den letzten Jahren charakterisiert werden konnten. Hierzu gehören der Anheftungsfaktor p115, das *cis*-Golgi Matrixprotein GM130, das Golgi-Membran Protein Giantin, das integrale Membranprotein Golgin-84, MICAL 1 und 3 und das erst kürzlich beschriebene Iporin (Allan et al., 2000; Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001; Diao et al., 2003; Satoh et al., 2003; Weide et al., 2003; Bayer et al., 2005; Beard et al., 2005; Fischer et al., 2005). Im Zentrum dieser Arbeit stand die detaillierte Charakterisierung des neuen Interaktionspartners von Rab1, Iporin („interacting protein of rab“). Neben biochemischen und molekularbiologischen Ansätzen sollte die Funktion von Iporin durch das Auffinden und die Beschreibung neuer interagierender Proteine analysiert werden. Hierfür wurde die endogene Verteilung des humanen Iporin Proteins in Gehirn- und Hodengewebelysaten untersucht, da Northern Blot Analysen auf die höchste mRNA Expressionsrate in diesen Geweben hindeuten (Bayer et al., 2005). Eine exakte Zuordnung der Proteinexpression zu bestimmten Differenzierungsstadien bzw. Zelltypen konnte mit Hilfe der Immunhistochemie-Methode in Schnitten der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) und des Nebenhodens (Epididymis) gezeigt werden. Es handelt sich bei Iporin um ein Protein großen Molekulargewichts, welches schematisch in den motiv- und domänenarmen N-Terminus und den C-Terminus, der fast alle bekannten Motive und Domänen enthält, unterteilt werden kann. Interessanterweise zeigen entsprechende Verkürzungsmutanten unterschiedliche zelluläre Lokalisationen in HeLa SS6 Zellen. Wie bereits für andere Interaktionspartner von Rab1 p115, GM130 und Golgin-84 beschrieben, konnte ebenso eine Dimerisierung von Iporin gezeigt werden (Sapperstein et al., 1995; Nakamura et al., 1997; Bascom et al., 1999).

Ein wichtiger Ansatz zur Beschreibung eines neuen Proteins ist, direkte Interaktionspartner näher zu charakterisieren, um sowohl Aussagen über die genaue Position, bzw. den exakten Wirkort machen zu können sowie über die funktionelle Eingliederung in den zellulären Mechanismus der Signalweiterleitung. Die Zielfindung eines Transportvesikels zu der „richtigen“ Membran beinhaltet vier wichtige Schritte, die Formung eines Vesikels, sein Transport und die Annäherung und Anheftung an die Zielmembran (Zerial und McBride, 2001). Rab GTPasen sind ubiquitär verteilte Proteine, die neben SNARE Proteinen eine Schlüsselposition in der Vermittlung dieser Prozesse spielen (Tuvim et al., 2001).

Insbesondere die Anheftung ist ein essentieller Schritt, der zur Aufrechterhaltung der funktionellen und strukturellen Integrität der einzelnen Kompartimente wesentlich beiträgt. Er wird durch eine Ansammlung diverser Proteine vermittelt, insbesondere aber durch p115, GM130 und Rab1 (Barr und Short, 2003). GM130 ist ein „coiled-coil“ Golgi-Matrixprotein, welches am C-Terminus eine GRASP65-Bindungsstelle aufweist, worüber eine Anheftung an den *cis*-Golgi erfolgt (Barr et al., 1998; Yoshimura et al., 2001). Rab1 dirigiert p115 an COPII Vesikel und die Anheftung dieser Vesikel wird durch eine Interaktion von p115 und GM130 vermittelt (Nakamura et al., 1997). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass auch Iporin an GM130 bindet und beide Proteine in der Zelle teilweise eine überlappende Lokalisation aufweisen (Bayer et al., 2005).

Aufgrund der hohen Expressionsrate von Iporin im Hoden wurde ein neuer Interaktionspartner in einer humanen Hoden Genbank gesucht, da insbesondere im Hoden

während der Spermatogenese und Spermio-genese zahlreiche komplexe Umstrukturierungsprozesse ablaufen, bei denen der Golgi Apparat eine wichtige Rolle einnimmt (Moreno et al., 2000a; Ramalho-Santos und Moreno, 2001). Mit Hilfe des „yeast two-hybrid screens“ konnte ein neuer, Hoden-spezifischer Interaktionspartner, das humane Tesmin („testis-specific metallothionein-like protein“) gefunden werden. Tesmin ist ein erst kürzlich beschriebenes Protein, welches spezifisch während der Spermatogenese und auch Oogenese eine entscheidende Rolle spielt (Sugihara et al., 1999; Olesen et al., 2004). Immunohistochemische Analysen zeigten, dass Tesmin eine zytoplasmatische Verteilung in pachytänen Spermatozyten aufweist und während des G2/M Überganges in den Kern wandert (Matsuura et al., 2002). Nach einer Differenzierung der Spermatozyten zu Spermatischen wandert Tesmin wieder zurück in das Zytoplasma (Sutou et al., 2003). Bislang wurden keine funktionellen Daten über Tesmin veröffentlicht.

Hoden-spezifische Proteine reagieren sehr sensitiv auf Stress-auslösende Faktoren wie Hitze, oxidativen Stress und Schwermetalle (Mieusset und Bujan, 1995; Fisher und Aitken, 1997). Analysen mit Hilfe des Blast-Programms konnten für Tesmin zwei Cystein-reiche Bereiche charakterisieren, wodurch sich eine Ähnlichkeit in der Sequenz zu Metallothioneinen begründet (Hamer, 1986; Sugihara et al., 1999). Fusionsproteine aus GFP und dem murinen Tesminprotein zeigten unter normalen Bedingungen in Cos1 Zellen eine zytoplasmatische Verteilung. Nach Behandlung der Zellen mit der Schwermetallverbindung Cadmiumchlorid konnte eine Translokation von Tesmin in den Zellkern detektiert werden. So könnten die Cystein-reichen Regionen von Tesmin als Metall-Chelat-Motiv oder als Sensor für Stressfaktoren dienen (Matsuura et al., 2002).

In diesem Zusammenhang ist es mir gelungen, die Lokalisation des humanen Tesmins im Zytoplasma eukaryotischer Zellen zu bestätigen und eine Cadmiumchlorid bedingte Translokation zu induzieren. Hierbei interessierte es mich maßgeblich, welchen Einfluß die Behandlung der Zellen mit Cadmiumchlorid und insbesondere die Translokation von Tesmin auf das endogene Iporin hat. Zusätzlich zu Lokalisationsstudien in eukaryotischen Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik konnte mittels der Zytosol-Membran-Fraktionierung eine Verlagerung des Tesmin Signals aus dem Zytoplasma in Membran-umhüllte Kompartimente nachgewiesen werden. Da der biochemische Weg der Translokation noch nicht beschrieben werden konnte, wurde ein Percoll-Gradient mit Cos7 Zellen durchgeführt, die ohne bzw. unter Beeinflussung von Cadmiumchlorid standen. Zur genauen Charakterisierung wurden zahlreiche Proteine in den einzelnen Fraktionen detektiert, die eine distinkte zelluläre Lokalisation besitzen und wichtige Aufgaben im interzellulären Transport übernehmen und so Hinweise geben könnten, in welchen Kompartimenten Tesmin während der Wanderung in den Zellkern lokalisiert ist.

Mit Hilfe dieser Experimente konnte bestätigt werden, dass Iporin eine wichtige Rolle im vesikulären Transport übernimmt und einzelne Schritte durch die Interaktionen mit Rab1B und GM130 maßgeblich spezifiziert werden. Ebenso konnte bestätigt werden, dass Iporin in einzelne Schritte der Spermatogenese und der Spermio-genese involviert ist und deren Ablauf mit reguliert.

5.1. Detektion von Iporin in Gewebelysaten

„Northern Blot“ und RT-PCR Ergebnisse für den KIAA0375 Klon, die vom Kazuza DNA Research Institute, Japan, veröffentlicht worden sind, belegten, dass Iporin ubiquitär exprimiert wird, die höchste mRNA Expressionsrate jedoch in Gehirn, Niere, Hoden und in den Ovarien detektiert werden kann (Bayer et al., 2005). Um sowohl die Verteilung in unterschiedlichen Geweben und zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten ermitteln zu können, wurden gewebespezifische Analysen mit Hilfe der „Western Blot“ Methode (siehe 4.5.3. „Western Blot“) und dem affinitätsgereinigten polyklonalem Iporin Antikörper 1179 durchgeführt. Hierfür wurde Maus Hoden-, Gehirn- und Ovariengewebe jung-adulter (3 Monate), bzw. junger vorpubertärer (3 Tage) Tiere des Stammes C57 BL/6, gestellt vom Institut für Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Münster, steril entnommen und anschließend in Lysis-Puffer E aufgearbeitet (siehe 4.6.1. „Herstellung von Gewebeextrakten“). Parallel wurde die Expression des Iporin Proteins in humanem Hodengewebe und Gehirngewebe, das bereits lysiert vorlag, untersucht. Um vergleichbare Mengen an Protein auf dem SDS-Gel aufzutrennen (siehe 4.5.1. „SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese“), wurde ein BCA-Test zur Ermittlung des Proteingehalts durchgeführt (siehe 4.4.6. „Bestimmung der Proteinkonzentration“).

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die „Western Blot“ Analysen, dargestellt in den Abbildungen 5.1, 5.2 und 5.3, mehrfach wiederholt und konnten so bestätigt werden.

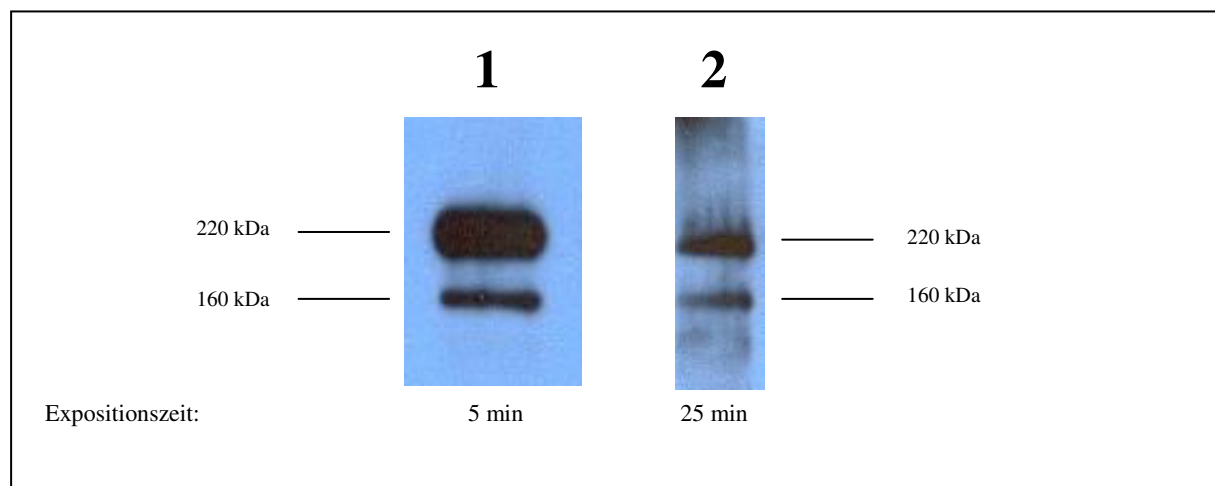


Abb. 5.1: Expression von Iporin in murinem und humanem Hodengewebe

Auf einem 7 %-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden 40 µg Maus- und 80 µg humanes Hodengewebe aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurde der polyklonale Iporin Antikörper 1179_{affi.} (1:4000) und als Sekundärantikörper HRP-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Spur 1: Maus-Hodengewebelysate; **Spur 2:** humanes Hodengewebelysate

Wie der Abbildung 5.1 zu entnehmen ist, konnten jeweils in dem Maus- (Spur 1) sowie humanen Hodengewebelysate (Spur 2) Signale der Größe ca. 160 und 220 kDa detektiert werden. Das errechnete Molekulargewicht, abgeglichen mit der Datenbank-Vorhersage www.expasy.org, des humanen Iporin Proteins beträgt ca. 160 kDa. Ein zweites Signal erscheint auf Höhe von 220 kDa, das ganz spezifisch für Iporin zu sein scheint, da es ebenfalls in lysierten HeLa SS6 Zellen (Daten nicht gezeigt) und in lysierten HeLa SS6 Zellen, die HA Iporin „full length“ überexprimieren (siehe Abbildung 5.7) neben dem 160 kDa Signal detektiert werden kann.

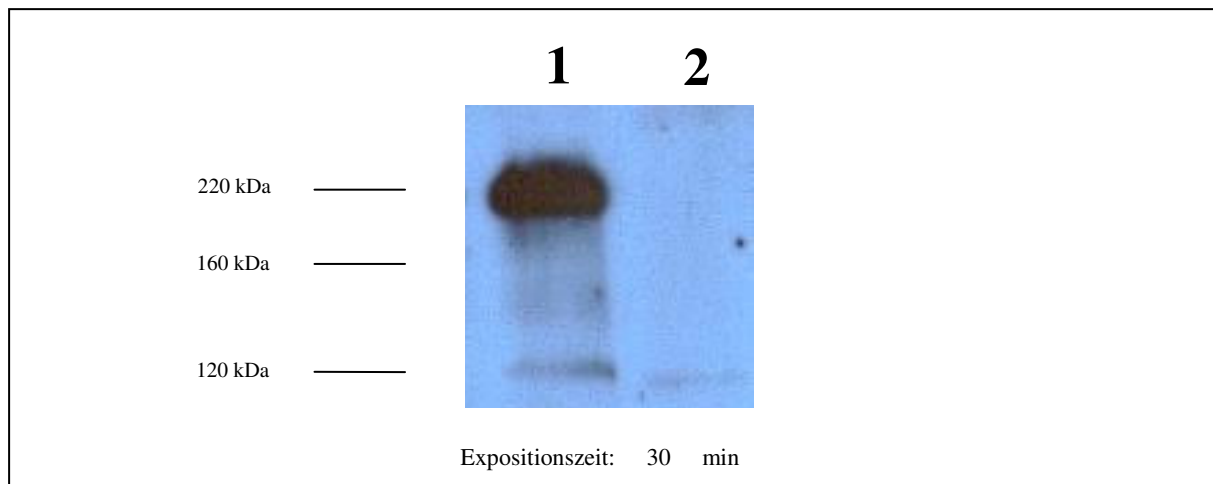


Abb. 5.2: Expression von Iporin in murinem und humanem Gehirngewebe

Auf einem 7 %-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 40 µg Maus- und 40 µg humanes Gehirngewebe aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurde der polyklonale Iporin Antikörper 1179_{aff.} (1:4000) und als Sekundärantikörper HRP-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Spur 1: Maus-Gehirngewebelysat; **Spur 2:** humanes Gehirngewebelysat

Bereits nach einer Expositionszeit von 5 min konnte ein schwaches 220 kDa Signal in der Spur detektiert werden, in welcher das murine Gehirngewebelysat aufgetrennt worden ist (Abbildung nicht gezeigt). Nach einer längeren Belichtungszeit von 30 min zeigte sich ein weiteres Signal bei ca. 120 kDa (siehe Abbildung 5.2 Spur 1). In der Spur 2, in der humanes Gehirngewebelysat aufgetrennt wurde, konnte nach längerer Expositionszeit nur ein sehr schwaches Signal auf der Höhe von ca. 120 kDa detektiert werden. Weder in der Spur 1 noch in der Spur 2 konnte ein Signal auf der Höhe von 160 kDa detektiert werden. So kann aus den Ergebnissen geschlossen werden kann, dass ein Protein der Größe 160 kDa präferenziell in Hodengewebe und ein Protein der Größe 120 kDa in Gehirngewebe vorhanden ist. Das 220 kDa Signal konnte sowohl in humanem Hodengewebe und in murinem Hoden- und Gehirngewebe detektiert werden, nicht aber in humanem Gehirngewebe.

Iporin scheint aber nicht nur eine Rolle während der Spermatogenese und Neurogenese, sondern auch während der Oogenese zu spielen. Um die RT-PCR Ergebnisse des Kazuza DNA Research Institute, Japan, zu bestätigen, wurde murines Ovariengewebe aufgearbeitet und Iporin mit Hilfe des affinitätsgereinigten Antikörpers 1179 detektiert. Zur Bestimmung einer entwicklungspezifischen Expression von Iporin, wurde Gewebe junger, 3 Tage alter, d.h. vorpubertärer Mäuse und Gewebe jung-adulter, 3 Monate alter Mäuse, die sich in der Pubertät befanden, aufgearbeitet.

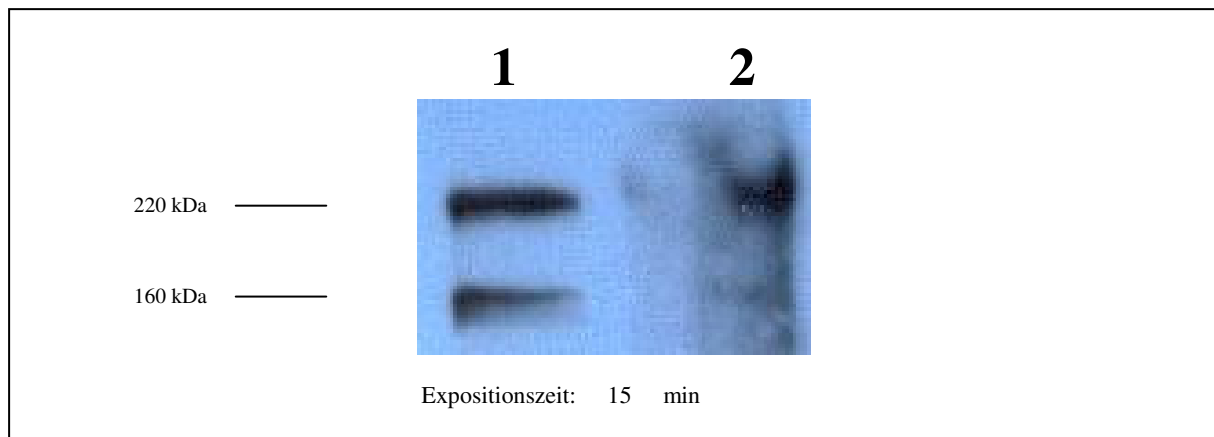


Abb. 5.3: Entwicklungsabhängige Expression von Iporin in murinem Ovariengewebe

Auf einem 7 %-igen SDS Polyacrylamidgel wurden jeweils 35 µl Ovariengewebe einer jungen, 3 Tage alten, und einer adulten 3 Monate alten Maus, lysiert in LP-E Puffer mit SDS und DOC, aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurde der polyklonale Iporin Antikörper 1179_{affi.} (1:4000) und als Sekundärantikörper HRP-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Spur 1: Ovariengewebelysat, 3 Tage alte Maus; **Spur 2:** Ovariengewebelysat, 3 Monate alte Maus

Vergleichbar mit den Ergebnissen des murinen Hodengewebes wird in den murinen Ovarien ein Signal der Größe 160 kDa und ein Signal von 220 kDa mit Hilfe des Iporin Antikörpers 1179 detektiert, wobei jeweils ein stärkeres Signal, dargestellt in der Abbildung 5.3 Spur 1, in dem Ovariengewebelysat neu geborener, 3 Tage alter Mäuse detektiert werden kann.

Unserer Arbeitsgruppe liegt ein zweiter polyklonaler Iporin Antikörper Aip519 vor, der gegen das gleiche Epitop wie der 1179 Antikörper in Kaninchen generiert wurde und bereits in der Veröffentlichung von Bayer et al. beschrieben worden ist (Bayer et al., 2005).

Alle dargestellten „Western Blot“ Ergebnisse (siehe Abbildung 5.1 bis 5.3) wurden ebenfalls mit dem Aip519 durchgeführt und konnten so bestätigt werden. Änderungen in der Intensität der detektierten Expressionssignale können auf die Charakteristika der vorhandenen polyklonalen Antikörper zurückgeführt werden.

5.2. Immunfluoreszenzanalysen zur intrazellulären Lokalisation transfizierter Iporin Mutanten

Iporin ist ein Protein, welches zahlreiche Motive und Domänen aufweist, die allerdings nicht gleichmäßig verteilt sind, sondern, bei Betrachtung der linearen Struktur im C-Terminus konzentriert sind. Zentral liegt eine RUN Domäne, welche als Bindungsdomäne für Rab1B beschrieben werden konnte (Bayer et al., 2005). Diese Domänen sind in zahlreichen weiteren Proteinen vorhandenen, wie z.B. in MAP („merlin-associated protein“), welches ebenfalls über seine RUN Domäne eine Interaktion für Merlin, einen Tumor Suppressor, eingeht (Callebaut et al., 2001; Lee et al., 2004). Wie bereits von Bayer et al. und Katoh und Katoh beschrieben, zeigt Iporin eine Homologie von etwa 42 % zu Nesca (Katoh und Katoh, 2004; Bayer et al., 2005). Beide Proteine besitzen im C-terminalen Bereich eine RUN Domäne und eine SH3 Domäne. Nesca weist eine ubiquitäre zytosolische Lokalisation auf und MacDonald et al. konnten zeigen, dass die RUN Domäne des Nesca Proteins entscheidend für eine Translokation des Proteins an die Kernmembran ist, z.B. nach „nerve growth factor“ (NGF) Induktion in Nnr5 Zellen, die den direkten Interaktionspartner trkA („NGF receptor tyrosine kinase“) überexprimieren (MacDonald et al., 2004). In diesem Zusammenhang war es interessant zu untersuchen, ob die RUN Domäne von Iporin ebenfalls eine Rolle in der Lokalisation des Iporinproteins spielt. So sollte geklärt werden, welcher Teil des Proteins seine zelluläre Lokalisation bestimmt und ob sich durch die Überexpression bestimmter Mutanten, die entweder den N- oder C-Terminus bzw. Teile davon repräsentieren, ein verändertes Expressionsmuster ergibt. Zum besseren Verständnis sind in der nachstehenden Abbildung das „full length“ Protein und alle generierten Verkürzungsmutanten schematisch dargestellt.

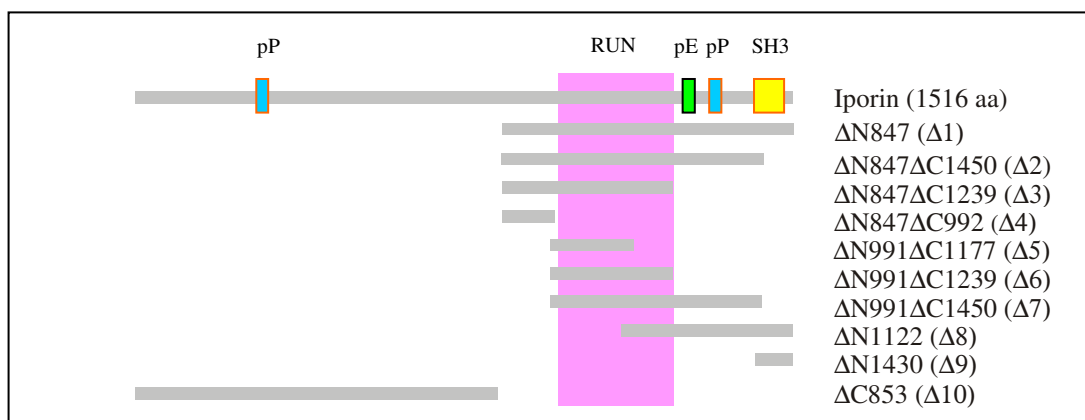


Abb. 5.4: Iporin und Verkürzungsmutanten

Iporin besteht aus 1516 Aminosäuren, wobei der N-terminale Bereich durch einen Poly P „stretch“ (pP) gekennzeichnet ist und der C-Terminus neben der RUN Domäne (RUN) noch einen weiteren Poly P „stretch“ (pP), einen Poly E „stretch“ (pE) und eine SH3 Domäne enthält. Die Bezeichnungen der Iporin Verkürzungsmutanten beziehen sich auf den ersten (ΔN), bzw. den letzten (ΔC) Aminosäurerest des „full length“ Iporin. In Klammern dahinter ist das jeweilige Synonym der Mutante aufgelistet.

Für die Analysen mussten die Mutanten in Säugerzellen exprimiert werden. Daher wurden HeLa SS6 Zellen mit der Deletionsmutante $\Delta N847$ ($\Delta 1$), die aus dem C-terminalen Bereich mit RUN-Domäne, Poly P- und Poly E-„stretch“ und SH3-Domäne besteht, und Iporin $\Delta C853$ ($\Delta 10$), die dem N-terminalen Bereich mit Poly P-„stretch“ entspricht, mittels Polyfect transient transfiziert (siehe 4.4.1. „Transfektion eukaryotischer Zellen mit Polyfect[®]“). Um die überexprimierten verkürzten Proteine deutlich von der zellulären Lokalisation des endogenen Iporin Proteins trennen zu können, wurden die Mutanten in den eukaryotischen Expressionsvektor pSV inkloniert, der zusätzlich ein HA-„tag“ (siehe 3.9.3. „Eukaryotische Klonierungsvektoren“), bestehend aus der Aminosäureabfolge –Y-P-Y-D-V-P-D-Y-A-, am

N-Terminus besitzt. So können die überexprimierten Mutanten mit Hilfe des 16B12 Antikörpers (siehe 3.7., „Antikörper“) detektiert werden.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion fixiert, aufgearbeitet und mittels des Konfokalen Leica DM RXE „Laser-Scanning“ Mikroskops analysiert, um so sicherzugehen, dass die detektierten Signale von einer Ebene kommen und keine Artefakte durch übereinander gelagerte Ebenen entstehen. In der folgenden Abbildung 5.5 A ist Iporin $\Delta N847$ ($\Delta 1$) grün dargestellt. Da der polyklonale Iporin Antikörper gegen das Epitop AS 848 bis 991 gerichtet ist, ist es möglich, in der Zelle sowohl Iporin $\Delta C853$ ($\Delta 10$), in Abbildung 5.5 B grün dargestellt, sowie das endogene Iporin, rot dargestellt, zu detektieren. Das „overlay“ zeigt durch eine gelb-gefärbte Darstellung Bereiche, in denen eine Überlagerung beider Signale deutlich wird.

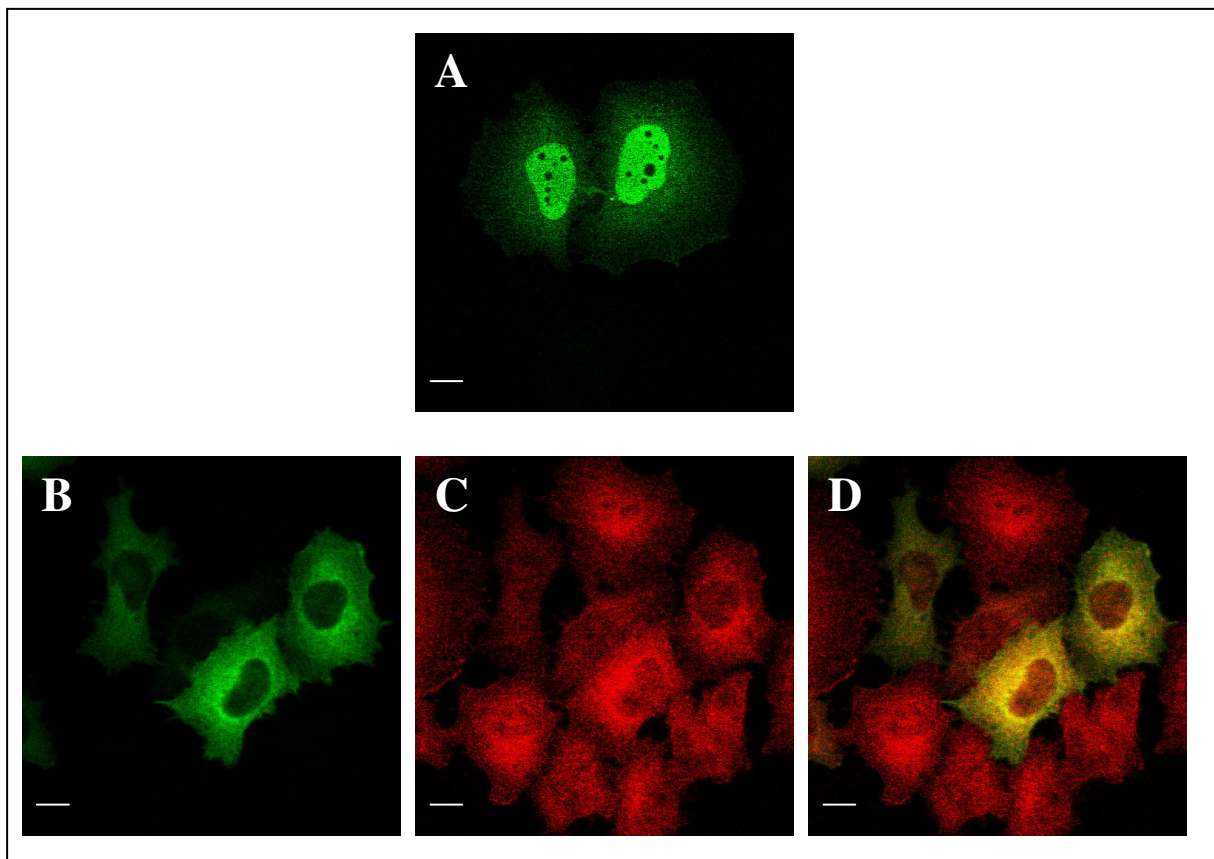


Abb. 5.5: Intrazelluläre Expression der Iporin $\Delta N847$ und $\Delta C853$ Mutanten in HeLa SS6 Zellen

HeLa SS6 Zellen wurden mittels Polyfect mit pSV HA Iporin $\Delta N847$ ($\Delta 1$) und pSV HA Iporin $\Delta C853$ ($\Delta 10$) transient transfiziert und 24 h danach fixiert. Die rekombinanten Proteine wurden mit dem monoklonalen HA-Antikörper 16B12 (1:1000) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper das Alexa 488 gekoppelte anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Detektion des endogenen Iporin-Proteins erfolgte mit dem polyklonalem Iporin Antikörper 1179_{affi} (1:1000) und dem Cy3-gekoppelten Sekundärintikörper anti-Kaninchen IgG (1:1000). Der Balken entspricht 10 μm .

A: HA Iporin $\Delta N847$ ($\Delta 1$); **B:** HA Iporin $\Delta C853$ ($\Delta 10$); **C:** endogenes Iporin; **D:** „overlay“ von B und C

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die überexprimierte Mutante Iporin $\Delta N847$ ($\Delta 1$) größtenteils im Zellkern lokalisiert ist und nur geringe Mengen im Zytosol detektiert werden können. Im Gegensatz hierzu weist der N-terminale Teil von Iporin eine ubiquitäre zytosolische Verteilung mit stärkerer Akkumulierung am Zellkern auf (siehe Abbildung 5.5 B), wobei kaum Signal im Zellkern detektiert werden konnte. Das Signal des endogenen Iporins (siehe Abbildung 5.5 C) ist diffus im Zytosol verteilt und am Zellkern stärker konzentriert, es sind aber auch deutliche Signale im Zellkern sichtbar. Eine Überlagerung

beider Bilder (siehe Abbildung 5.5 D) zeigt, dass eine Übereinstimmung beider Signale besonders in Kernnahen Regionen zu finden ist.

Die Mutante Iporin $\Delta N847$ ($\Delta 1$) repräsentiert den C-terminalen Bereich von Iporin, der neben der RUN-Domäne auch einen Poly P- und Poly E-„stretch“ und eine SH3-Domäne enthält. Um die eingangs gestellte Frage klären zu können, ob die RUN-Domäne für eine nukleäre Lokalisation verantwortlich ist, ist es notwendig gewesen, eine Mutante in Zellen überzuexprimieren, die hauptsächlich die RUN-Domäne im Bereich AS 1031-1175 repräsentiert. Hierfür wurden HeLa SS6 Zellen mittels Polyfect mit dem Konstrukt pSV myc Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) transient transfiziert. Durch die aminoterminalen Insertion des myc-Epitops mit der Aminosäureabfolge –M-E-E-K-L-I-S-E-D-L- ist es möglich, die rekombinanten Proteine mit Hilfe des monoklonalen myc-spezifischen Antikörpers 9E10 nachzuweisen. Eine Kennzeichnung des Zellkerns erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmarkers 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), der an DNA im Nukleus bindet (siehe 3.1. „Chemikalien“; 3.7. „Antikörper“).

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion fixiert, aufgearbeitet und mittels des Leitz Diaplan Fluoreszenzmikroskops analysiert. In der folgenden Abbildung ist Iporin $\Delta N847$ ($\Delta 1$) grün und der Zellkern blau dargestellt.

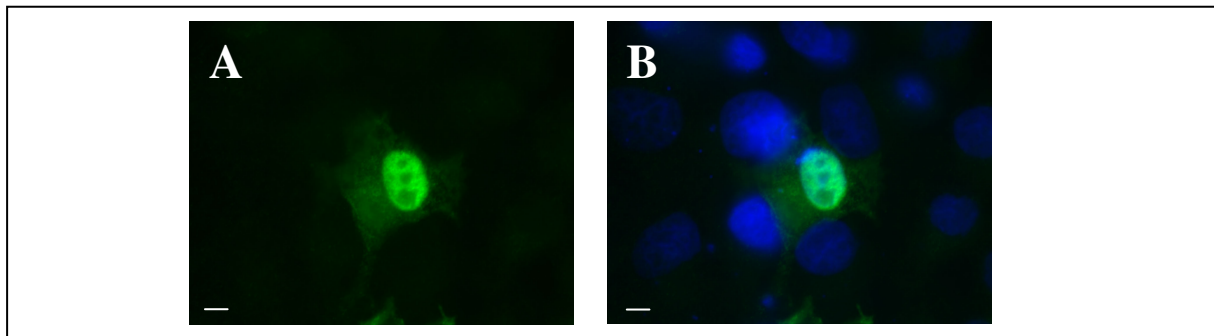


Abb. 5.6: Intrazelluläre Expression der Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ Mutante in HeLa SS6 Zellen

HeLa SS6 Zellen wurden mittels Polyfect mit pSV HA Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) transient transfiziert und 24 h danach fixiert. Die rekombinanten Proteine wurden mit dem monoklonalen HA-Antikörper 9E10_{affi} (1:100) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper das Alexa 488 gekoppelte anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Der Zellkern wurde mittels DAPI (1:10000) sichtbar gemacht. Der Balken entspricht 10 μm .

A: HA Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$); **B:** „overlay“ von A und DAPI-markierten Zellkernen

Wie der Abbildung 5.6 A zu entnehmen ist, zeigt das rekombinante myc-„getagte“ Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) ebenso eine nukleäre Lokalisation und eine schwache diffuse Verteilung in der Zelle wie das überexprimierte HA Iporin $\Delta N847$ ($\Delta 1$) (siehe Abbildung 5.5 A und B). So kann gezeigt werden, dass die RUN-Domäne für die Kernlokalisierung des Iporin Proteins verantwortlich ist. Ebenso kann ausgeschlossen werden, dass der Poly P-, Poly E-„stretch“ und die SH3-Domäne verantwortlich für die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation, insbesondere im Zellkern, sind.

5.3. Iporin Homodimerisierung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei Iporin um ein Protein mit einer Multi-Domänenstruktur, die impliziert, dass es sich um ein Adaptorprotein handeln könnte. Katoh und Katoh postulierten, dass Iporin ein Leucin-„zipper“ (=Reißverschluss) Motiv enthält, dessen Position ab AS 1152 bis 1173 mit Hilfe des Internet-Programms www.predictprotein.org bestätigt und bestimmt werden konnte (Rost und Liu, 2003; Katoh und Katoh, 2004; Rost et al., 2004). Leucin-„zipper“ sind Dimerisierungsdomänen mit einer linkshändigen helikalen Struktur, die umeinander gewunden sind und so regulatorische

Funktionen, überwiegend Transkriptionsereignisse, im Zellkern übernehmen können (Busch und Sassone-Corsi, 1990). Die Sequenzabschnitte können entweder als Superhelix oder „coiled-coil“ Struktur vorliegen und weisen charakteristischerweise an jeder siebten Position die Aminosäure Leucin auf, wobei die Anzahl der Wiederholungen zwischen 3 bis 6 variiert. Am häufigsten kommt die Variante mit vier Wiederholungen vor, was auch auf die Sequenzabfolge in Iporin zutrifft: –L-F-E-E-L-L-L-L-L-Q-P-L-A-L-L-P-F-S-L-D-L-L-; die entsprechenden Leucin-Reste sind fett hervorgehoben (Bornberg-Bauer et al., 1998).

Eine Suche nach einer „coiled-coil“ Struktur im Bereich des Leucin-„zipper“ Motivs konnte kein Ergebnis hervorbringen, aber mit Hilfe von www.predictprotein.org und insbesondere des Programms „PROF predicted secondary structure“ wurde für den Bereich AS 1152-1173 eine helikale Struktur vorhergesagt (Rost und Liu, 2003; Rost et al., 2004).

Bereits für andere Proteine, die Leucin-„zipper“ enthalten, konnte eine Homodimerisierung beschrieben werden, wie z.B. für c-Cbl oder die Arf GAP Proteine p95-APP1 und PKL/p95-APP2, Vogel-Homologe zu den humanen Proteinen GIT1 und GIT2, die involviert sind in die Organisation der Adhäsion und des Aktin-Zytoskeletts während der Migration (Bartkiewicz et al., 1999; Paris et al., 2003).

Obwohl die Sequenz des Iporin Proteins nur zum Teil die Bedingungen erfüllt, ein echtes Leucin-„zipper“ Motiv zu sein, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Motiv ausreichend ist, eine Homodimerisierung einzugehen. Hierfür wurden Kotransformationen des Hefestammes Y190 durchgeführt. Es wurden jeweils einzelne Iporin Mutanten (siehe Abbildung 5.4. „Iporin und Verkürzungsmutanten“), in den pAS Vektor inkloniert, eingesetzt. Zur Untersuchung, welcher Teil von Iporin für eine Interaktion notwendig ist, wurden diese Mutanten jeweils mit pGADT7 Iporin „full length“ als „bait“-Konstrukte in die Hefe kotransformiert. Weiterhin sollte überprüft werden, ob zwei gleiche Motive oder Domänen für eine Homodimerisierung verantwortlich sind, so dass einzelne pAS Iporin-Mutanten mit entsprechenden pGADT7 Iporin-Mutanten getestet wurden. In der folgenden Tabelle 5.1 werden diese in der Titelzeile als „pGADT7 Homodimerisierung“ bezeichnet und entsprechen jeweils der eingesetzten „prey“ Mutante. Ein weiterer Versuch sollte klären, in wieweit der C-terminale Bereich von Iporin, der neben einem Poly P-„stretch“ keine weiteren Domänen oder Motive enthält, für eine Dimerisierung notwendig ist. Jeweils pAS Iporin Δ C853 und pAS Iporin „full length“ konnten in den Ko-Transformationsversuchen nicht eingesetzt werden, da sie allein zu einer Aktivierung des *lacZ* und *His3* Gens führten und sich somit als autoaktiv herausstellten.

Die Kotransformationen wurden, wie bereits im Methoden-Kapitel beschrieben, durchgeführt (siehe 4.3.1. „Herstellung kompetenter Hefen“ und 4.3.2. „Kotransformation von Hefen“). Die Ergebnisse sind der nachstehenden Tabelle 5.1 zu entnehmen. Eine Grundvoraussetzung für einen erfolgreich durchgeführten „yeast two-hybrid“ Test ist das gute Wachstum beider eingebrachter Plasmidkonstrukte auf den Kontrollplatten, jeweils im „bait“ bzw. „prey“ Vektor. Da diese Voraussetzung erfüllt worden ist, wurde das Wachstum der Hefekolonien auf SD-T-L Platten nicht im Einzelnen aufgeführt.

Eine Blaufärbung innerhalb der ersten 6 Stunden gilt als signifikant.

Tab. 5.1: Überprüfung der Homodimerisierung des humanen Iporin Proteins mittels eines in vivo „yeast two-hybrid assays“

Die Kotransformationen des Hefestammes Y190 wurden mit den pAS Iporin-Mutanten und unterschiedlichen pGADT7-Konstrukten durchgeführt. Das Wachstum der Hefekolonien wird wie folgt bewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +: mittelmäßiges Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum; n.b.: nicht bestimmt. Entsprechend wird die Aktivität der β -Galaktosidase eingestuft: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb von 2 Stunden); ++: gute Blaufärbung (innerhalb von 6 Stunden); +: schwache Blaufärbung (innerhalb 12 Stunden); +/-: sehr schwache Blaufärbung (über Nacht); -: keine Blaufärbung; n.b.: nicht bestimmt

„bait“ Plasmid	„prey“ Plasmid					
	pGADT7 Iporin „full length“		pGADT7 Homodimerisierung		pGADT7 Iporin Δ C853	
	-His3	lacZ	-His3	lacZ	-His3	lacZ
pAS 2-1	+/-	-	n.b.	n.b.	+/-	-
pAS Iporin Δ N847	++	+++	+++	+++	+++	++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1450	+++	+++	+++	+++	+++	+
pAS Iporin Δ N847 Δ C1239	++	+++	+++	+++	+	-
pAS Iporin Δ N847 Δ C992	+/-	-	+/-	-	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1177	++	+++	+/-	-	+/-	-
pAS Iporin Δ 991 Δ C1239	+	++	+/-	-	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1450	+++	++	+++	++	++	+
pAS Iporin Δ N1122	+/-	-	+	+/-	+/-	-
pAS Iporin Δ N1430	+/-	-	+/-	-	+/-	-

Die Kotransformationsergebnisse der einzelnen Iporin-Mutanten im „bait“ Vektor mit pGADT7 Iporin „full length“ zeigen, dass alle Mutanten, welche die RUN Domäne (AS 1031-1175) enthalten, gut interagieren und im Gegensatz dazu die Mutanten ohne RUN Domäne keine Interaktion zeigen. Ebenso scheint die vollständige RUN Domäne mit flankierenden Aminosäuren für eine Homodimerisierung vonnöten zu sein. Die Iporin Mutante Δ N991 Δ C1177, die fast ausschließlich die RUN Domäne repräsentiert, interagiert nicht mit sich selbst, was aber aufgrund der Faltung der einzelnen verkürzten Proteine in den Hefezellen erklärt werden kann. Die Mutante Iporin Δ N1122 zeigte eine schwache Interaktion mit sich selbst, allerdings kann die Interaktion nicht als signifikant angesehen werden, da eine Blaufärbung der Hefekolonien erst über Nacht eintrat.

Überraschenderweise interagierten die Mutanten pAS Iporin Δ N847, pAS Iporin Δ N847 Δ C1450 und pAS Iporin Δ N991 Δ C1450 mit Iporin Δ C853, der Mutante, die den N-terminalen Teil von Iporin repräsentiert. Dieser Mutante fehlen bis auf den Poly P-„stretch“ alle Merkmale des C-Terminus, so dass eine Interaktion aufgrund Strukturgleicher Merkmale ausgeschlossen werden kann. Ebenso fehlt dieser Verkürzungsmutante die RUN-Domäne und

insbesondere das Leucin-„zipper“ Motiv, dass charakteristischerweise an Dimerisierungen beteiligt ist.

Um die Ergebnisse des „yeast two-hybrid assays“ zu bestätigen, wurde ein „GST-pull down“ (siehe 4.7. „Protein-Interaktionsstudien *GST-pull down assay*“) durchgeführt. Für den zellulären Extrakt wurden HeLa SS6 Zellen transient mit pSV HA Iporin „full length“ (siehe 3.10.3. „Plasmidkonstrukte für die Expression in Säugetierzellen“) mittels Polyfect transfiziert (siehe 4.4.1. „Transfektion eukaryotischer Zellen mit PolyFect®“) und 24 Stunden danach im „pull down“-Puffer lysiert (siehe 4.4.2.1. „Herstellung von Gesamtzellextrakten“). Für die bakterielle Proteinexpression wurden die pGEX KG Konstrukte Iporin Δ N847 Δ C1239, das eine RUN Domäne enthält und Iporin Δ N1430, bestehend aus einer SH3 Domäne, in den Stamm BL21 transformiert (siehe 3.11.1. „Bakterienstämme“ und 4.2.9. „Transformation von Bakterien“) und angezogen. Die Induktion erfolgte für 4 Stunden bei 30°C und einer IPTG Endkonzentration von 0,1 mM (siehe 4.7.1. „Expression von GST-Fusionsproteinen“). Nach der Aufreinigung der rekombinanten Proteine (siehe 4.7.2. „Herstellung des Bakterienlysats“) wurden 10 μ g GST-Fusionsprotein an „Glutathion-Sepharose beads“ für 1,5 Stunden gekoppelt und anschließend mit 100 μ l HeLa SS6 HA Iporin „full length“ Zellysate 4 Stunden inkubiert (siehe 4.7.3. „Kopplung der GST-Fusionsproteine an *Glutathion-Sepharose beads*“). Nach mehreren gründlichen Waschschritten wurde das Pellet in 15 μ l 2-fach Probenpuffer aufgenommen und die gebundenen Proteine 5 min bei 95°C von den „beads“ gelöst. Der Überstand wurde komplett auf einem 12 %-igem SDS-Gel aufgetrennt (siehe 4.5.1. „SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese“) und einer „Western Blot“ Analyse unterzogen (siehe 4.5.3. „Western Blot“).

Als Positivkontrolle dienten 5 μ l des HeLa SS6 HA Iporin „full length“ Zellextraktes, d.h. 1/20-stel der Menge, die im „pull down assay“ eingesetzt worden ist. Die Detektion erfolgte mit dem HA-spezifischen Antikörper 16B12 (siehe 3.7. „Antikörper“). Der „GST-pull down“ wurde insgesamt dreimal mit gleichem Ergebnis wiederholt und so bestätigt. Die Ergebnisse des „GST-pull downs“ sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

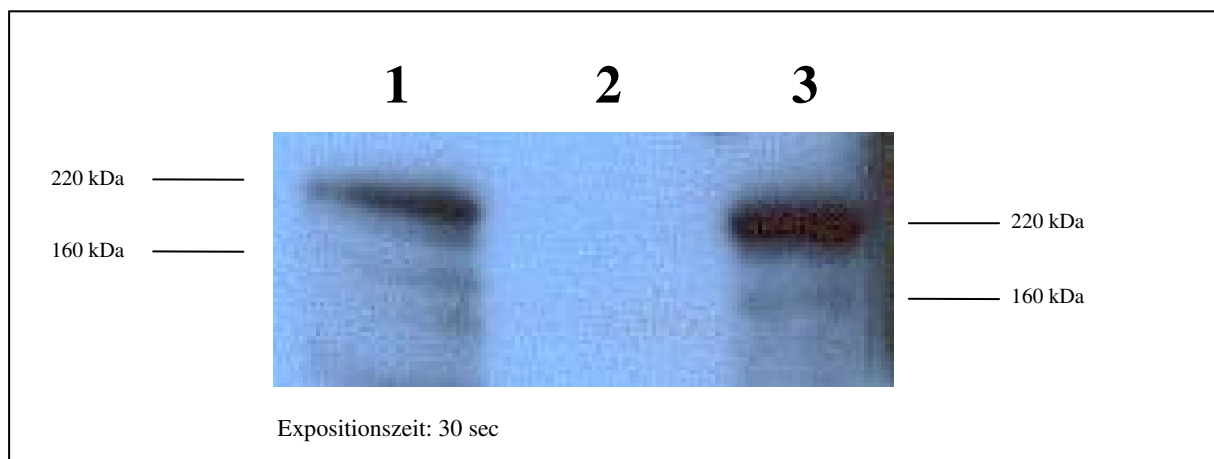


Abb. 5.7: Bestätigung einer Iporin Homodimerisierung mittels eines in vitro „GST pull down“ Tests

Auf einem 12%-igem SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 15 μ l der „GST-pull down“ Ansätze aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Positivkontrolle wurden 5 μ l des HeLa SS6 HA Iporin „full length“ Zellysates eingesetzt. Zur Detektion wurde der monoklonale anti-HA-Antikörper 16B12 (1:1000) und als Sekundärantikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Spur 1: GST-Iporin Δ N847 Δ C1239/HA Iporin „full length“; **Spur 2:** GST-Iporin Δ N1430/HA Iporin „full length“; **Spur 3:** Positivkontrolle HA Iporin „full length“

In dem *in vitro* „GST pull down“ Test ließ sich die Bindung der Iporin-Mutante $\Delta N847\Delta C1239$, die aus der RUN-Domäne und flankierenden Aminosäuren besteht, an HA Iporin „full length“ nachweisen, so dass die „yeast two-hybrid“ Ergebnisse bestätigt werden konnten. Im Gegensatz hierzu konnte keine Bindung von HA Iporin „full length“ an die Mutante Iporin $\Delta N1430$, die aus der SH3 Domäne besteht, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die RUN-Domäne für die Iporin Homodimerisierung eine entscheidende Rolle spielt und die SH3 Domäne hierbei unbeteiligt ist.

Wie bereits im Kapitel 5.1. „Detektion von Iporin in Gewebelysaten“ beschrieben, ist das berechnete Molekulargewicht für das humane Iporin-Protein ca. 160 kDa, was im Gegensatz zu dem detektierten Molekulargewicht des endogenen Proteins steht (siehe Abbildungen 5.1-5.3). Ebenso wird mit Hilfe des HA-spezifischen Antikörpers 16B12 ein Hauptsignal der Größe 220 kDa detektiert und ein schwächeres bei 160 kDa (siehe Abbildung 5.7 Spur 3). Es bindet hauptsächlich ein Protein der Größe 220 kDa an die Iporin-Mutante $\Delta N847\Delta C1239$ (siehe Abbildung 5.7 Spur 1). Des Weiteren ist auch eine 160 kDa Bande zu erkennen, jedoch viel schwächer als die 220 kDa Hauptbande. Da keine Anheftung von HA Iporin „full length“ an das Fusionsprotein Iporin $\Delta N1430$ (siehe Abbildung 5.7 Spur 2) stattfindet, kann eine Homodimerisierung über die SH3 Domäne ausgeschlossen werden.

Eine Homodimerisierung von Iporin konnte sowohl mit Hilfe des *in vivo* „yeast two-hybrid“ Systems sowie in einem *in vitro* „GST-pull down“ Ansatz gezeigt werden, und so die Hypothese, dass die RUN-Domäne eine entscheidende Rolle darin spielen könnte, bestätigt werden.

5.4. Neuer Interaktionspartner von Iporin: GM130

Das humane Iporin Protein konnte bereits als ein direkter und spezifischer Rab1 Interaktionspartner beschrieben werden, da es mit keiner anderen kleinen GTPase der Rab Familie eine Verbindung eingeht (Bayer et al., 2005). Es ist bekannt, dass kleine GTPasen und „coiled coil“ Proteine der Golgin-Familie entscheidend im vesikulären Transport zum Golgi Apparat zusammenwirken (Barr und Short, 2003). So interagiert Rab1 mit p115, GM130 und, wie erst kürzlich veröffentlicht wurde, Giantin (Beard et al., 2005). Während der COP II Vesikelbildung wird p115 an das neu entstehende Vesikel mit Hilfe von Rab1B rekrutiert und die Anheftung am *cis*-Golgi wird durch eine Bindung von p115 und GM130 vermittelt (Allan et al., 2000; Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001). Bei GM130 handelt es sich um ein 130 kDa großes, Golgi Matrixprotein, welches aus 6 „coiled coil“ Regionen besteht und über GRASP65 an der *cis*-Golgi Membran verankert ist (Nakamura et al., 1995; Barr et al., 1997). Allerdings sind neben p115 und Rab1B auch Rab2 und Rab33b Interaktionspartner von GM130 und die Vielfalt der einzelnen Interaktionen zwischen den zahlreichen Komponenten der Membran-Transportmaschinerie lassen darauf schließen, dass noch weitere Proteine an GM130 binden und dadurch die Vesikel-Membrananheftung spezifizieren könnten (Weide et al., 2001; Short und Barr, 2003).

Da die GM130-Iporin Interaktion bereits publiziert werden konnte (siehe Anhang), können die Daten aus der Veröffentlichung entnommen werden (Bayer et al., 2005). Im folgenden Abschnitt werden noch nicht veröffentlichte Ergebnisse präsentiert, welche die bereits vorliegenden Daten ergänzen sollen.

Die Iporinbindedomäne von GM130 konnte auf die „coiled-coil“ Domäne 6 eingegrenzt werden, während das Bindungsmotiv auf Seiten von Iporin noch unbekannt war. Hierfür erfolgten Kotransformationen des Hefestammes Y190 (siehe 4.3.1. „Herstellung kompetenter Hefen“ und 4.3.2. Kotransformation von Hefen) mit Iporin-Mutanten (siehe Abbildung 5.4 „Iporin und Verkürzungsmutanten“), inkloniert in den „bait“-Vektor pAS, und dem „prey“-Konstrukt pACT GM130 $\Delta N224$ (K18), welches aus der „coiled coil“ Domäne cc2 bis cc6 und der GRASP65 Bindungsstelle besteht (Weide et al., 2001; Bayer et al., 2005). Eine

Interaktion beider „full length“ Proteine konnte in der Hefe nicht untersucht werden, da beide als pAS Konstrukt autoaktiv sind.

Die inokulierten SD-T-L und SD-T-L-H + 3AT Platten wurden 5 Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert und die Interaktion mit Hilfe des β -Galaktosidase-Tests analysiert (siehe 4.3.3. „ β -Galaktosidase-Test“).

Die Ergebnisse des *in vivo* Ansatzes zur Charakterisierung der Iporin Bindungsstelle für GM130 sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Als Negativkontrolle diente der pAS 2-1 Leervektor und als Positivkontrolle die daueraktive Form des Rab1B Proteins pAS Rab1B Q67R.

Tab. 5.2: Bestimmung der Iporin Bindungsdomäne für GM130 mittels eines *in vivo* „yeast two-hybrid assays“

Die Kcotransformationen des Hefestammes Y190 wurden mit den pAS Iporin-Mutanten und pACT Δ N224 (K18) durchgeführt. Das Wachstum der Hefekolonien wird wie folgt bewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +: mittelmäßiges Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum. Entsprechend wird die Aktivität der β -Galaktosidase eingestuft: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb von 2 Stunden); ++: gute Blaufärbung (innerhalb von 6 Stunden); +: schwache Blaufärbung (innerhalb 12 Stunden); +/-: sehr schwache Blaufärbung (über Nacht); -: keine Blaufärbung

„bait“ Plasmid	„prey“ Plasmid pACT Δ N224 (K18)	
	-His3	lacZ
pAS 2-1	+/-	-
pAS Iporin Δ N847	+++	++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1450	+++	+++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1239	+++	+++
pAS Iporin Δ N847 Δ C992	+	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1177	++	+
pAS Iporin Δ N991 Δ C1239	++	+
pAS Iporin Δ N991 Δ C1450	+++	+++
pAS Iporin Δ N1122	+/-	-
pAS Iporin Δ N1430	+/-	-
pAS Rab1B Q67R	+++	+++

Die „yeast two-hybrid“ Experimente zeigten, dass alle Iporin-Mutanten mit pACT GM130 Δ N224 (K18) interagierten, dessen Teil die vollständige RUN-Domäne ist. Da die RUN-Domäne ebenso für Rab1B als Interaktionsmotiv bestätigt werden konnte, muss in weiteren Experimenten erfasst werden, ob GM130 und Iporin um eine Bindung zu Rab1B konkurrieren.

Iporin ist in der Zelle ubiquitär verteilt, weist jedoch eine Akkumulierung am Zellkern auf (Bayer et al., 2005). Entsprechende Lokalisationsstudien wurden mit unterschiedlichen, gegen GM130 gerichteten Antikörpern durchgeführt, wobei GM130 als *cis*-Golgi Matrixprotein eine perinukleäre Verteilung in den Zellen aufweist (Nakamura et al., 1995; Weide et al., 2001; Yoshimura et al., 2001). So sollten Lokalisationsstudien in Säugetierzellen eine mögliche Kolokalisation beider Proteine demonstrieren.

Hierfür wurden HeLa SS6 Zellen auf Deckgläschen ausgesät, 24 Stunden später fixiert und aufgearbeitet. Mit Hilfe des polyklonalen Iporin 1179_{affi} Antikörpers konnte das endogene Iporin und mittels des monoklonalen anti-GM130 Antikörpers das endogene GM130 detektiert werden (siehe 3.7. „Antikörper“).

Das Iporin-Signal ist in der folgenden Abbildung rot dargestellt und das in den Zellen endogen detektierte GM130 Protein grün. Die Analyse der Immunfluoreszenzpräparate erfolgte mit Hilfe des Konfokalen Leica DM RXE „Laser-Scanning“ Mikroskops.

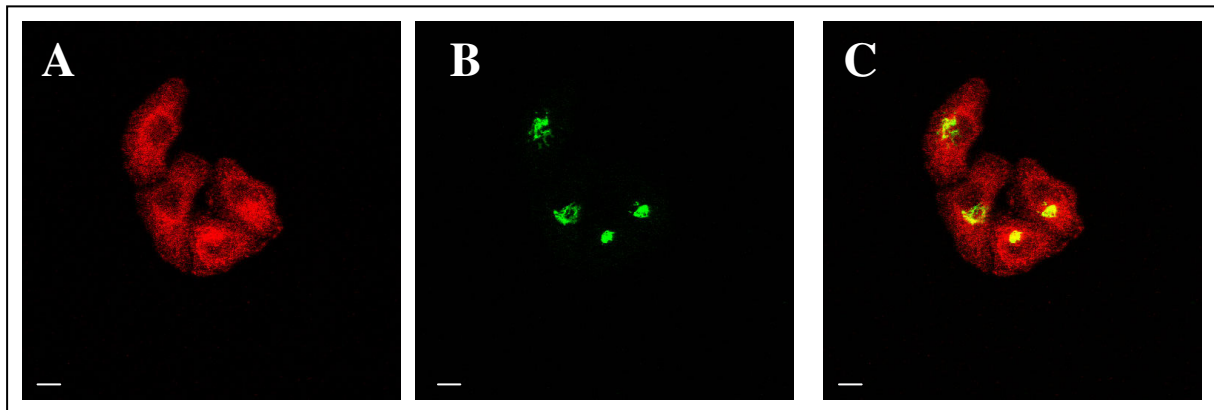


Abb. 5.8: Intrazelluläre Kolokalisationsstudien der neuen Interaktionspartner Iporin und GM130 in HeLa SS6 Zellen

HeLa SS6 Zellen wurden 24 h nach Aussaat auf Deckgläschen fixiert. Das endogene Iporin wurde mit dem polyklonalen 1179_{affi} (1:1000) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper das Cy3 gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Das endogene GM130 Protein wurde mit dem monoklonalen Antikörper anti-GM130 (1:250) und dem Alexa 488 gekoppelten anti-Maus IgG (1:1000) nachgewiesen. Der Balken entspricht 10 μm .

A: endogenes Iporin; **B:** endogenes GM130; **C:** „overlay“ von A und B

Die Kolokalisationsstudien beider endogen nachgewiesenen Proteine Iporin und GM130 konnten die bereits publizierte Interaktion bestätigen (Bayer et al., 2005). Das endogene Iporinprotein ist ubiquitär in der Zelle verteilt und weist eine Akkumulierung in Zellkernnähe auf (siehe Abbildung 5.8 A), während GM130 eine distinkte perinukleäre Verteilung zeigt (siehe Abbildung 5.8 B; Nakamura et al., 1995; Nakamura et al., 1997). In diesem begrenzten Raum um den Zellkern kolokalisieren beide Proteine miteinander, besonders hervorgehoben in der Abbildung 5.8 C durch eine Überlagerung der Abbildung A und B. Es wird aber auch deutlich, dass Iporin eine weitaus dispersere Lokalisation in den Zellen aufweist, was darauf schließen lässt, dass Iporin nicht nur eine wichtige Rolle im vesikulären Transport und insbesondere am *cis*-Golgi Apparat übernimmt, sondern auch andere wichtige Aufgaben in der Zelle übernimmt.

5.5. Zelluläre Lokalisation von Iporin, Rab1B und GM130 in murinem und humanem Hodengewebe

Wie bereits beschrieben, ist die höchste Iporin mRNA Expressionsrate im Gehirn und in Testis bzw. in Ovarien zu verzeichnen (Bayer et al., 2005). Im Kapitel 5.1. „Detektion von Iporin in Gewebelysaten“ konnte beschrieben werden, dass die Proteinexpression mit der mRNA Expression korreliert. In diesem Zusammenhang war Testis von besonderem Interesse, da sich während der Spermatogenese durch vielfältige, genau gesteuerte Schritte Spermien entwickeln und reifen (dann Spermio-genese). Die Spermatogenese ist ein komplexer zyklischer Prozess, der neben dem Umbau des Zellkerns auch zytoplasmatische Bewegungen und die Bildung neuer Organellen beinhaltet; so umfasst die Spermatogenese, z.B. in der Maus, 12 Stadien (I-XII) (Burgos und Fawcett, 1955; Russell et al., 1990; de Rooij, 2001).

Hierbei interessierte uns, in welchen Zelltypen bzw. Stadien der Spermatogenese die von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen Interaktionspartner Rab1B, GM130 und Iporin lokalisiert sind, um so möglicherweise ihr funktionelles Zusammenwirken während der Spermienentwicklung beschreiben zu können. Unreife Spermien und zahlreiche sezernierte Proteine werden aus den Tubuli seminiferi (Samenkanälchen) in die Epididymis (Nebenhoden) weitergeleitet. So sollte ebenso untersucht werden, welche der Proteine, die im Zentrum unseres Interesses standen, in den Nebenhoden einer Maus weitergeleitet werden und welche ggf. von den spezifischen Zelltypen des Epithels synthetisiert werden.

Hierfür wurde, wie bereits im Kapitel 5.1. „Detektion von Iporin in Gewebelysaten“ beschrieben, murines und humanes Hodengewebe aufgearbeitet (siehe 4.4.2.1. „Herstellung von Gewebeextrakten“) und die spezifische Proteinexpression mit Hilfe der „Western Blot“ Technik (siehe 4.5.3. „Western Blot“) analysiert. Die Detektion der jeweiligen Proteine erfolgte mit Hilfe der spezifischen Antikörper. Die Detektion von Iporin mittels des Antikörpers 1179 (siehe 3.7. „Antikörper“) wurde bereits ausführlich im Kapitel 5.1 behandelt. Das Ergebnis der Expressionsanalyse kann der Abbildung 5.1 entnommen werden.

Der direkte Interaktionspartner von Iporin, Rab1B wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 1E7 detektiert. Der Antikörper detektierte im murinen und humanen Hodengewebelysate aber neben dem spezifischen Rab1B Signal auf Höhe von etwa 23 kDa noch weitere Signale bei etwa 25 kDa und 50 kDa (Daten nicht gezeigt). Da das aufgearbeitete Hodengewebe ebenfalls neben spezifischen gelösten Proteinen noch Serumbestandteile, aufgrund der starken Durchblutung des Hodens, und Geweberückstände enthält, konnten unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers mit einzelnen Komponenten des Lysats nicht ausgeschlossen werden. Um diese Frage zu klären und Rab1B spezifisch aus dem Hodenlysat zu fällen, wurde eine Immunpräzipitation (siehe 4.4.5. „Immunpräzipitation“) durchgeführt. Der Versuch wurde mit Maushodenextrakt durchgeführt, da dort ein stärkeres Rab1B-spezifisches Signal detektiert wurde.

Der Rab1B-spezifische 1E7 Hybridomaüberstand wurde etwa 2,5 Stunden mit Maushodenextrakt inkubiert und ÜN an „Protein GTM Sepharose 4 Fast Flow slurry“ gekoppelt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, in dem nur der Maus-Hodengewebeextrakt mit den „beads“ inkubiert wurde. Die Detektion erfolgte mit dem 1E7 Hybridomaüberstand, da sowohl der Überstand sowie der affinitätsgereinigte Antikörper in der „Western Blot“ Analyse zu vergleichbaren Ergebnissen führten (Konczal, 2001).

Die Analyse erfolgte unter semi-denaturierenden Bedingungen, d.h. ohne Zugabe von β -Mercaptoethanol, um eine Aufspaltung des Antikörpers und somit eine Überlagerung des Rab1B Signals weitgehend zu unterbinden.

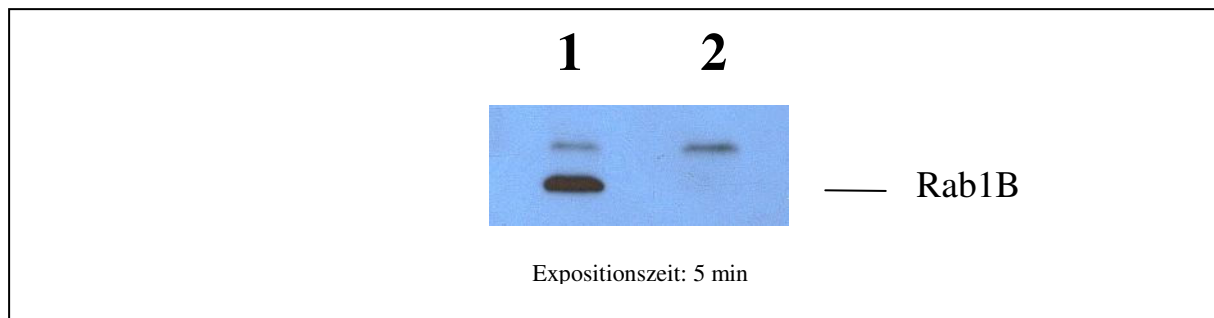


Abb. 5.9: Immunpräzipitation von Rab1B aus murinem Hodengewebe

20 µl des 1E7-Hybridomaüberstandes wurden mit 200 µg Maus-Hodenextrakt 2,5 h inkubiert und ÜN an die „Protein G™ Sepharose 4 Fast Flow“ gekoppelt. Als Negativkontrolle wurde parallel ein Ansatz mitgeführt, der keinen Antikörper enthielt. Die jeweiligen Pellets wurden gründlich gewaschen, in 2 x PP ohne β-Mercaptoethanol aufgenommen, auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Folie transferiert. Zur Detektion wurde der 1E7-Hybridomaüberstand (1:50) und als Sekundärantikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Spur 1: 1E7 + Maus-Hodengewebelysat; **Spur 2:** Negativkontrolle

Mit Hilfe der Immunpräzipitationsanalyse konnte gezeigt werden, dass Rab1B spezifisch aus dem Hodengewebelysat gefällt werden kann (siehe Abbildung 5.9, Spur 1) und somit eine Rolle, die bisher noch nicht charakterisiert werden konnte, in Testis spielt. Dieses spezifische Signal fehlt in Spur 2, in welcher die Negativkontrolle aufgetrennt worden ist. In beiden Spuren wurden zusätzliche Banden im hochmolekularen Bereich detektiert, die auf unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers, ggf. mit Serumrückständen des Hodengewebes, zurückzuführen sind und hier nicht weiter diskutiert werden sollen (Daten nicht gezeigt).

Parallel dazu erfolgte eine Detektion des GM130 Proteins im murinen und humanen Hodenextrakt, wie in der folgenden Abbildung dargestellt.

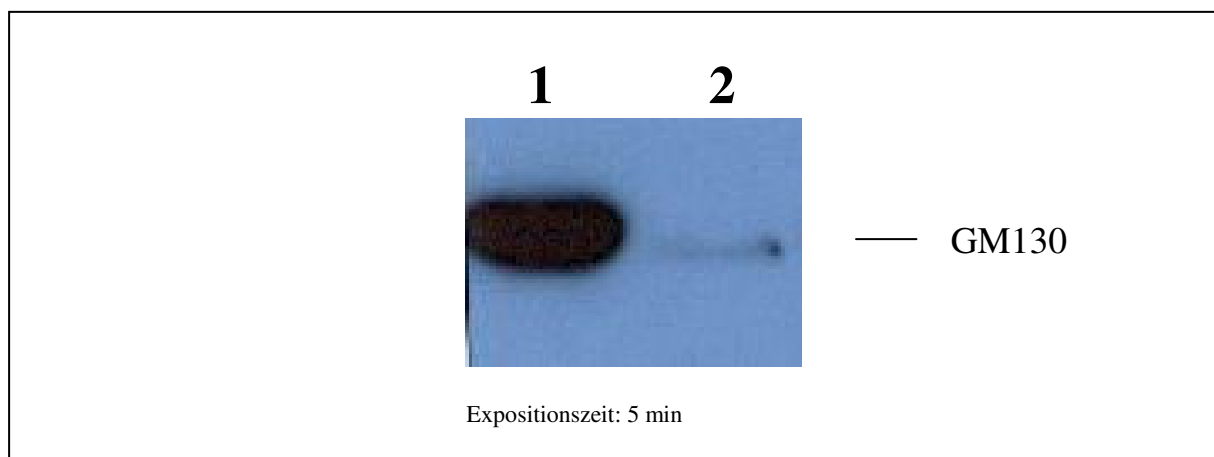


Abb. 5.10: Expression von GM130 in murinem und humanem Hodengewebeextrakt

Auf einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 40 µg Maus- und 40 µg humanes Hodengewebe, lysiert in LP-E Puffer aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurde der monoklonale anti-GM130 Antikörper (1:250) und als Sekundärantikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Spur 1: Maus-Hodengewebelysat; **Spur 2:** humanes Hodengewebelysat

Mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse konnte gezeigt werden, dass GM130 sowohl im murinen und im humanen Hodengewebe exprimiert wird (siehe Abbildung 5.10), wobei das

Signal in der Spur 1, in der lysiertes Maushodengewebe aufgetrennt worden ist, stärker ist als in Spur 2, in der das humane Gewebe aufgetrennt worden ist. Dieser Unterschied kann einerseits auf die Proteinexpression zurückzuführen sein, d.h. dass GM130 stärker im murinen als im humanen Hodengewebe exprimiert wird, oder andererseits, dass der Antikörper eine höhere Affinität zu dem testikulären Maus GM130 als zu dem humanen aufweist.

Durch die „Western Blot“ Analyse konnte gezeigt werden, dass sowohl Rab1B, GM130 und Iporin in Maus- und humanem Hodengewebe exprimiert wird. Mit dieser Voraussetzung wurden immunhistochemische Analysen an murinen und humanen Schnitten der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) und murinen Schnitten der Nebenhoden (Epididymis) wie im Kapitel 4.6.2. „Immunhistochemie“ beschrieben, durchgeführt. Die Mäuse des Stammes C57BJ/6 waren 31 Tagen alt, d.h. pubertierend, da die Pubertät in Mäusen 7 Tage „post-partum“ beginnt, wenn die ersten Spermatogonien in die Meiose gehen (Bellvé et al., 1977). Die humanen Schnitte der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) wurden mir vom Institut für Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Münster gestellt.

Zur Absicherung der Ergebnisse der Anfärbungen in den Samenkanälchen wurden parallel Ansätze nach der LSAB („Labelled StreptAvidin-Biotin“) -Methode und dem EnVision™ System, HRP, durchgeführt. Da beide Methoden gleiche Ergebnisse hervorbrachten, werden für Rab1B und GM130 die Ergebnisse der spezifischen DAB-Färbungen dargestellt und für Iporin, welches im Zentrum meiner Untersuchungen steht, sowohl die DAB- sowie die Neufuchsin-Färbung.

In der folgenden Abbildung 5.11 werden jeweils für das Rab1B und GM130 Protein die Anfärbungen in Schnitten menschlicher und muriner Gewebe zusammen dargestellt. Als Negativkontrolle wurde der Schnitt während der Antikörperbehandlung nur mit der entsprechenden Lösung, die für die Antikörperverdünnung eingesetzt worden ist, inkubiert. So kann unterschieden werden, ob ein Signal spezifisch durch die Antigen-Antikörper Reaktion, oder durch eine unspezifische Reaktion mit dem Färbereagenz entsteht.

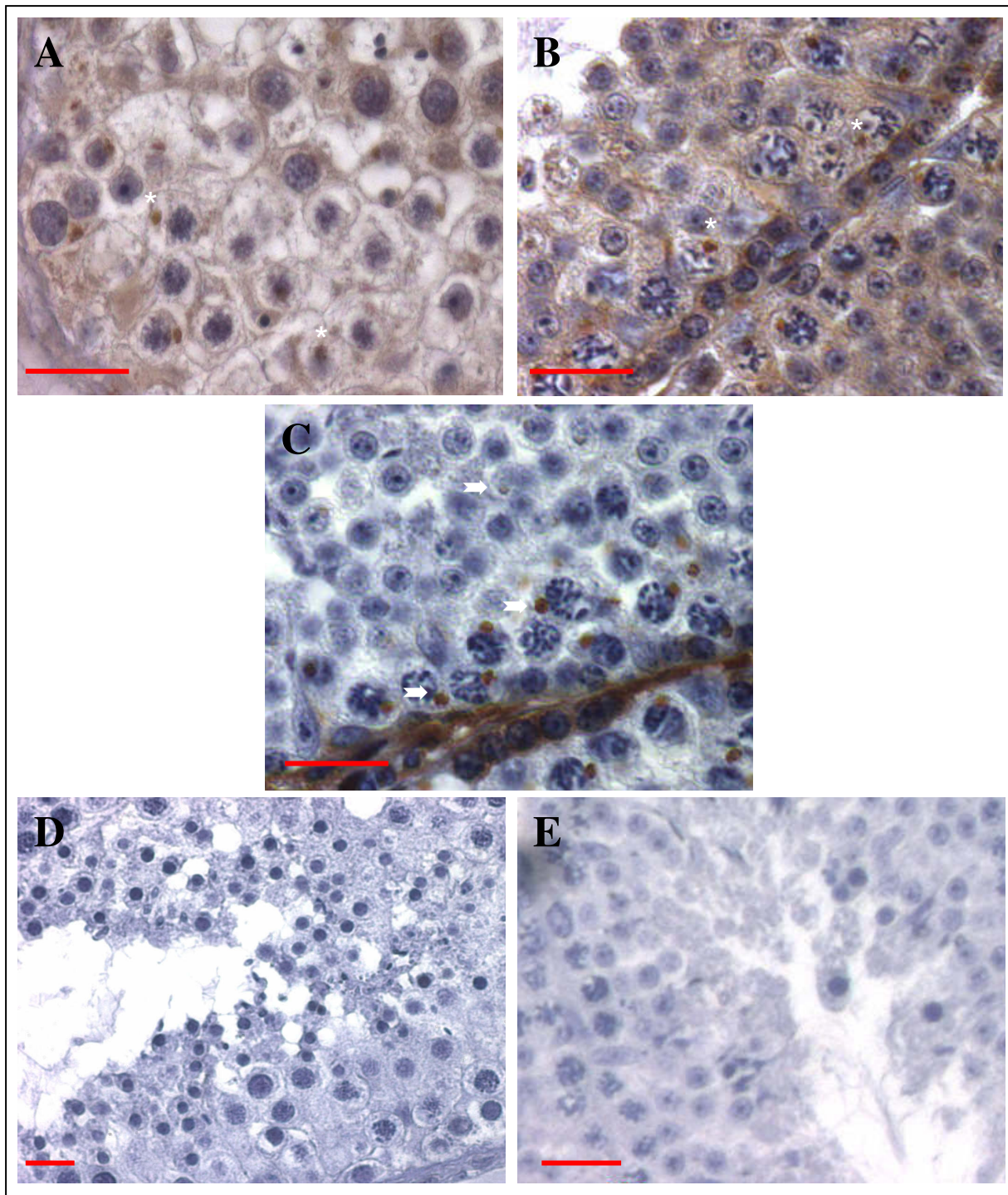


Abb. 5.11: Spezifische Detektion von Rab1B und GM130 in Tubuli seminiferi (Samenkanälchen)

3-4 μm dicke Schnitte von humanen und Maus Samenkanälchenschnitten wurden mit dem monoklonalen Rab1B Antikörper 1E7_{affi}, bzw. Maus-Samenkanälchenschnitten mit dem monoklonalen anti-GM130 Antikörper 60 min inkubiert und als Sekundärantikörper ein Gemisch aus anti-Maus und anti-Kaninchen IgG's eingesetzt. Als Substrat für HRP wurde 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) umgesetzt. Als Beispiel wurden einzelne Zellen, die Rab1B exprimieren, mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet und Zellen, die GM130 exprimieren, mit einem Pfeil (➔) markiert. Der Balken entspricht 10 μm .

A: Rab1B im humanen Gewebe (1E7_{affi} 1:100; DAB-Färbedauer 30 min); **B:** Rab1B im murinen Gewebe (1E7_{affi} 1:100; DAB-Färbedauer 15 min); **C:** GM130 im murinen Gewebe (anti-GM130 1:100; DAB-Färbedauer 20 min); **D:** Negativkontrolle humanes Gewebe (DAB-Färbedauer 30 min); **E:** Negativkontrolle murines Gewebe (DAB-Färbedauer 15 min)

Mit Hilfe des Rab1B spezifischen Antikörpers konnten einzelne distinkte Zelltypen in den Samenkanälchen angefärbt werden. Sowohl in den humanen als auch murinen Schnitten zeigt sich eine ähnliche Verteilung des Signals, das beispielhaft mit einem Sternchen (*; siehe Abbildung 5.11 A, B) in einzelnen Zellen markiert ist. Wie eingangs erläutert, laufen während der Keimzellendifferenzierung viele Transport- und Umorganisierungsvorgänge ab, denen zahlreiche vesikuläre Transportprozesse zugrunde liegen. Rab1B reguliert spezifisch den Transport zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi Apparat, so dass die beobachtete Anfärbung kernnaher Strukturen mit der Lokalisation von Rab1B in Zellen korreliert (Plutner et al., 1991). Neben einer deutlichen Anfärbung der Spermatozyten konnte das Rab1B Signal ebenfalls in runden Spermatiden beobachtet werden. Bis dato ist Rab1B im Zusammenhang mit der Spermatogenese noch nicht diskutiert worden, so dass diese Ergebnisse zum ersten Mal eine Expression dieser kleinen GTPase im Hodengewebe zeigen. Ähnlich dem Rab1B Signal verteilt sich das GM130 Signal, beispielhaft mit einem Pfeil (➔; siehe Abbildung 5.11 C) markiert, in den murinen Hodenkanälchen hauptsächlich in Spermatozyten, charakteristischerweise in Kernnähe. In humanen Schnitten konnte nur eine sehr schwache DAB-Färbung detektiert werden, die jedoch keinem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden konnte und auf die Unspezifität des Antikörpers für immunhistochemische Analysen zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Es konnte keine Anfärbung einzelner Strukturen in den jeweiligen Negativkontrollen detektiert werden, so dass die Markierungen der einzelnen Strukturen mittels des Rab1B-spezifischen 1E7 Antikörpers und des anti-GM130 Antikörpers spezifisch sind.

Entsprechend den immunhistochemischen Analysen der beiden direkten Interaktionspartner von Iporin, Rab1B und GM130, wurden Untersuchungen bezüglich der Zellspezifität von Iporin in humanen und murinen Schnitten der Samenkanälchen durchgeführt. Zur Verifizierung der Ergebnisse der spezifischen DAB-Färbung in humanen Schnitten wurden in einem parallelen EnVision™ System Iporin-markierte Strukturen mit Hilfe von Neufuchsin detektiert. In der folgenden Abbildung 5.12 sind die DAB-Färbungen von Iporin in murinen Schnitten sowie Neufuchsin-Färbungen des Iporin Proteins in humanen Schnitten dargestellt.

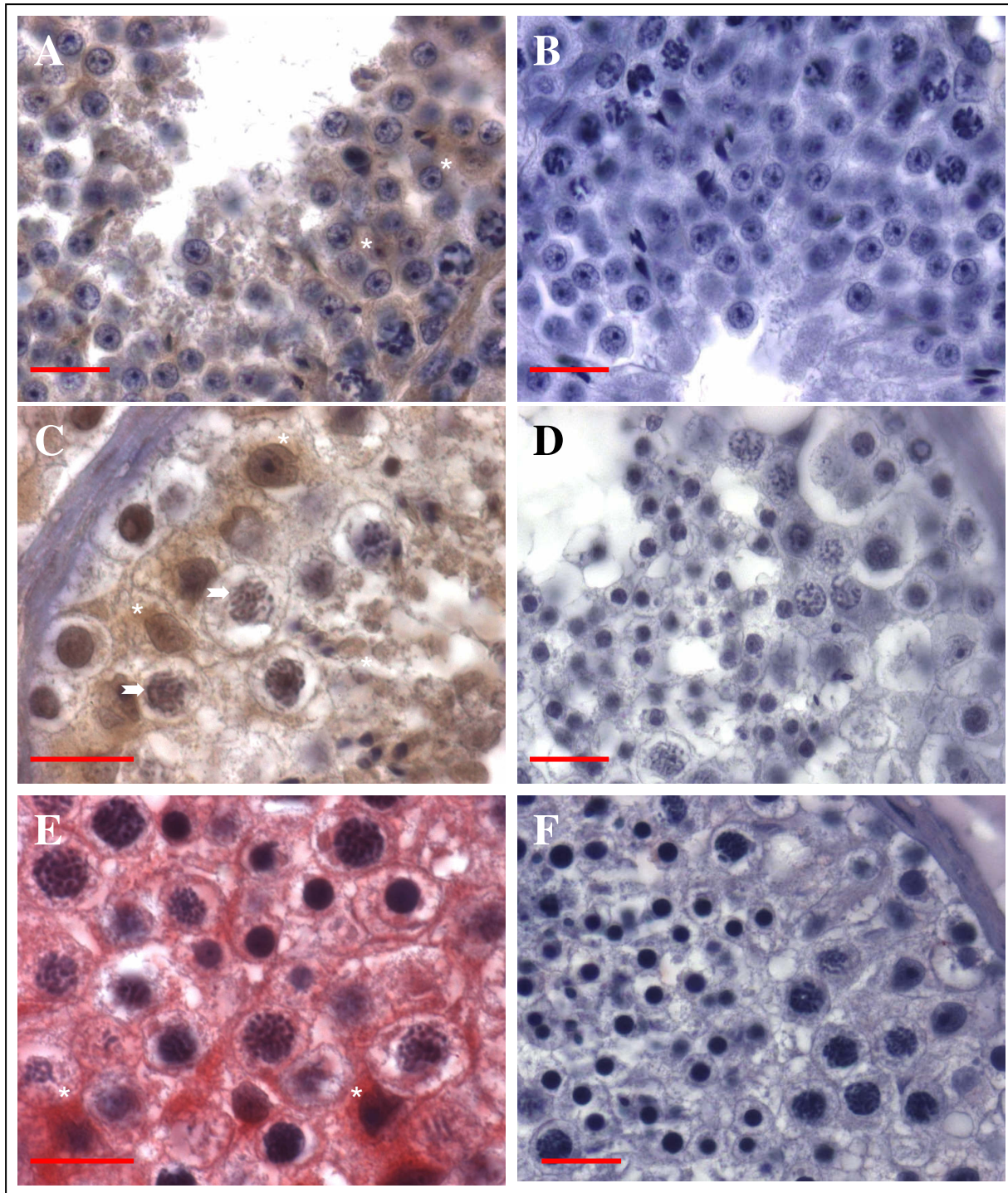


Abb. 5.12: Spezifische Detektion von Iporin in Tubuli seminiferi (Samenkanälchen)

3-4 μm dicke Schnitte von humanen und Maus Samenkanälchenschnitten wurden mit dem polyklonalen Iporin Antikörper 1179_{affi} 60 min inkubiert und als Sekundärantikörper ein Gemisch aus anti-Maus und anti-Kaninchen IgG's eingesetzt. Als Substrat für HRP wurde 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) bzw. Neufuchsin umgesetzt. Einige Sertolizellen, die Iporin exprimieren, sind beispielhaft mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet und Spermatozyten mit einem Pfeil (\rightarrow). Der Balken entspricht 10 μm .

A: Iporin im murinen Gewebe (1179_{affi} 1:10; DAB-Färbedauer 22 min); **B:** Negativkontrolle murines Gewebe (DAB-Färbedauer 22 min); **C:** Iporin im humanen Gewebe (1179_{affi} 1:25; DAB-Färbedauer 30 min); **D:** Negativkontrolle humanes Gewebe (DAB-Färbedauer 30 min); **E:** Iporin im humanen Gewebe (1179_{affi} 1:25; Neufuchsin-Färbedauer 20 min); **F:** Negativkontrolle humanes Gewebe (Neufuchsin-Färbedauer 20 min)

In den humanen Schnitten zeigen die Sertolizellen eine positive Iporinfärbung auf, einige Zellen sind beispielhaft mit einem Sternchen (*; siehe Abbildung 5.12 C und E) markiert. Im Gegensatz hierzu konnte nur vereinzelt ein schwaches Signal in einigen Spermatozyten, bzw. im Kern lokalisiert werden, beispielhaft mit einem Pfeil (➔; siehe Abbildung 5.12 C) markiert. Beide Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse, so dass das detektierte Signal spezifisch für das Iporin-Protein ist.

Das Iporinsignal ist in den murinen Schnitten schwächer, bzw. nicht eindeutig Sertolizellen zuzuordnen. Der Iporin Antikörper 1179 ist gegen das Epitop AS 848-991 generiert. Trotz der allgemeinen sehr hohen Homologie der Maus- und humanen Iporin Basensequenz befinden sich im Bereich dieses Epitops einige Unterschiede, welche die unterschiedliche Reaktivität des polyklonalen Antikörpers mit den Gewebeschnitten erklären könnte.

In den jeweiligen Negativkontrollen konnten keine distinkten Signale detektiert werden, so dass unspezifische Markierungen ausgeschlossen werden können.

Zur Unterstützung dieser Beobachtung wurden SK11 Zellen, eine Maus Sertoli Zelllinie (siehe 3.11.3. „Eukaryotische Zelllinien“), 24 Stunden nach Aussaat in LP-E Puffer lysiert und 15 µl des Überstandes auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion des endogenen Iporin Proteins erfolgte mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse (siehe 4.5.3. „Western Blot“) und dem Iporin Antikörper 1179_{affi}. Das Ergebnis ist der folgenden Abbildung zu entnehmen.

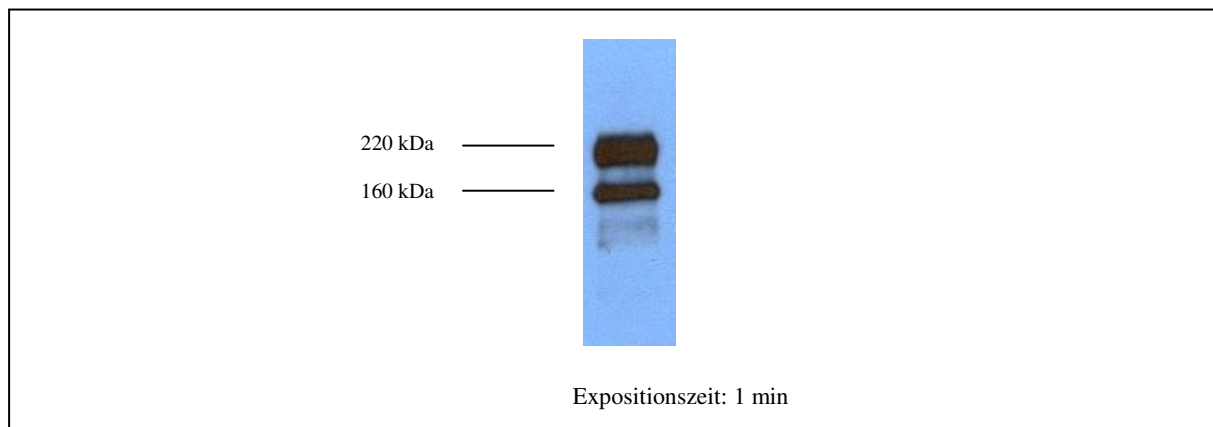


Abb. 5.13: Expression von Iporin in SK11 Zellen

Auf einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 15 µl SK11 Überstandes, lysiert in LP-E Puffer aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurde der polyklonale Iporin Antikörper 1179_{affi} (1:4000) und als Sekundäntikörper HRP-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Das Ergebnis der „Western Blot“ Analyse bestätigt, dass SK11 Zellen, d.h. Sertolizellen als angelegte Zellkultur, stark endogenes Iporin stark exprimieren (siehe Abbildung 5.13), wobei das 220 kDa Signal, ähnlich wie im aufgearbeiteten Hodengewebe (siehe Abbildung 5.1), stärker ist.

Die Reifung der Spermien erfolgt in den Nebenhoden, indem die elongierten Spermatozoen aus den Samenkanälchen in die Epididymis transportiert werden. In diesem Zusammenhang erfolgte eine immunhistochemische Analyse von Iporin, Rab1B und GM130 in murinen Nebenhodenschnitten. Da alle Schnitte aus dem gleichen Abschnitt eines Nebenhodens stammen, wird in der folgenden Abbildung nur eine Negativkontrolle gezeigt, die gleichermaßen für alle gilt.

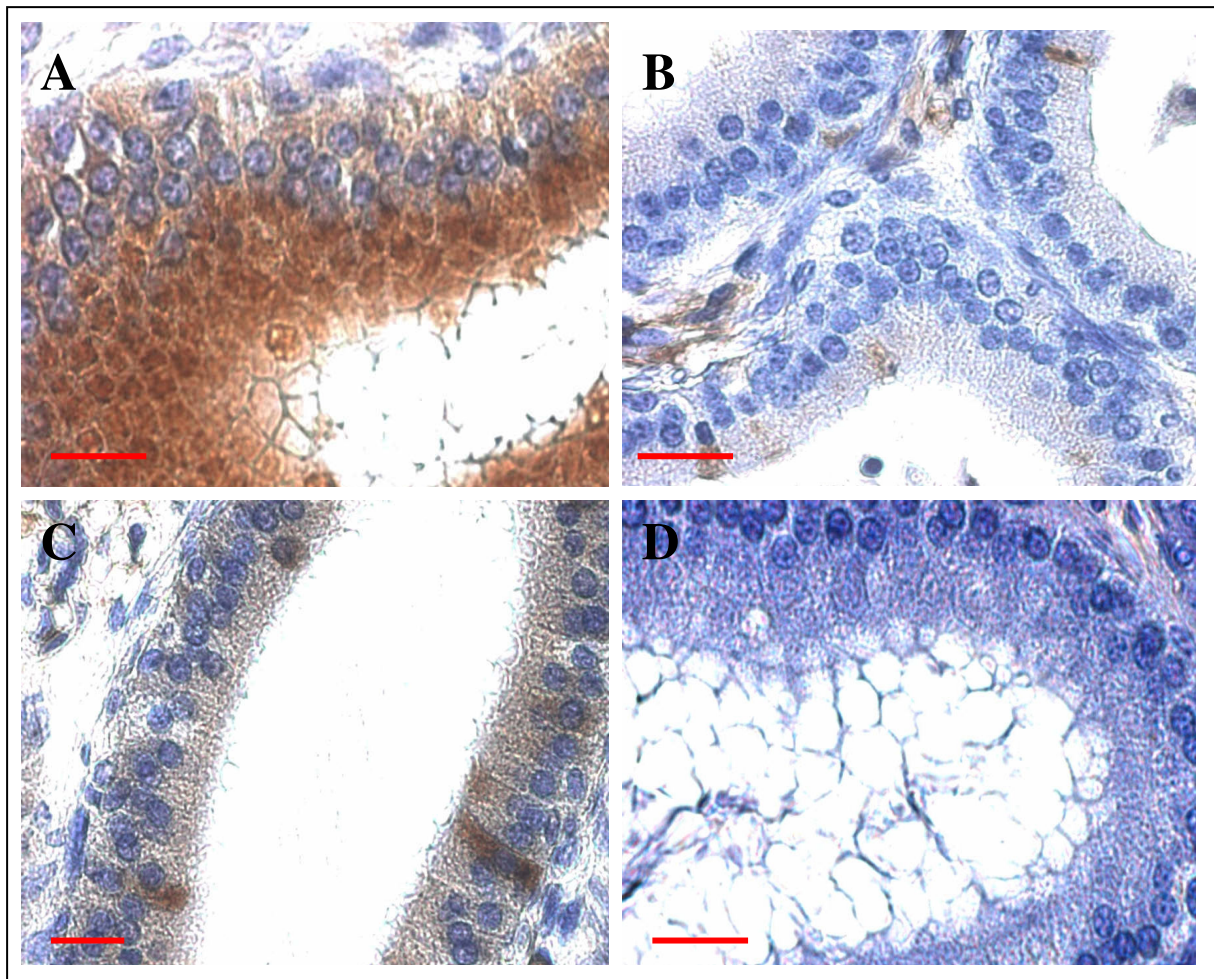


Abb. 5.14: Spezifische Detektion von Rab1B, GM130 und Iporin in Epididymis (Nebenhoden)

3-4 μm dicke Schnitte von murinen Nebenhodenschnitten wurden mit dem monoklonalen Rab1B Antikörper 1E7_{affi}, dem monoklonalem anti-GM130 Antikörper, bzw. dem polyklonalen Iporin Antikörper 1179_{affi} 60 min inkubiert und als Sekundärantikörper ein Gemisch aus anti-Maus und anti-Kaninchen IgG's eingesetzt. Als Substrat für HRP wurde 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) umgesetzt. Der Balken entspricht 10 μm .

A: Rab1B (1E7_{affi} 1:100; DAB-Färbedauer 15 min); **B:** GM130 (anti-GM130 1:50; DAB-Färbedauer 30 min); **C:** Iporin (1179_{affi} 1:10; DAB-Färbedauer 30 min); **D:** Negativkontrolle (DAB-Färbedauer 30 min)

Mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse konnte eindeutig gezeigt werden, dass Rab1B, GM130 und Iporin neben einer Lokalisation in den Samenkanälchen auch eine Lokalisation in den Nebenhoden aufweisen. Das Rab1B Signal ist ubiquitär in den „principal cells“ verteilt (siehe Abbildung 5.14 A), wobei sowohl das GM130 und auch das Iporinsignal (siehe Abbildung 5.14 B und C) auf die „clear cells“ beschränkt sind.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse konnten die „Western Blot“ Analysen zur spezifischen Expression von Rab1B, GM130 und Iporin (siehe Abbildung 5.1, 5.9 und 5.10) in murinem und humanem Hodengewebe, sowie in SK11 Zellen (siehe Abbildung 5.13), bestätigen und ihre Lokalisation in Gewebeschnitten darstellen. Um die exakte Funktion dieser Proteine, insbesondere von Rab1B und Iporin, zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig.

5.6. Neuer Iporin spezifischer Interaktionspartner: Tesmin

Um ein neues Protein besser zu charakterisieren, ist es sinnvoll, seine direkten Interaktionspartner zu ermitteln, um darüber gegebenenfalls eine funktionelle Eingliederung in den zellulären Mechanismus vornehmen zu können. Zahlreiche strukturelle Anordnungen werden durch Protein/Proteininteraktionen vermittelt und transiente Interaktionen kontrollieren und regulieren viele zelluläre Prozesse (Van Crielinge und Beyaert, 1999). So ist es möglich, über die bekannte Funktion des einen Interaktionspartners auf die mögliche Funktion des zweiten bindenden Proteins zu schließen (Uetz und Hughes, 2000).

Wie bereits beschrieben und mit Hilfe der „Western Blot“ und immunhistochemischen Analyse gezeigt (siehe 5.1. „Detektion von Iporin in Gewebelysaten“ und 5.5. „Zelluläre Lokalisation von Iporin, Rab1B und GM130 in murinem und humanem Hodengewebe“), wird Iporin im Hodengewebe exprimiert (Bayer et al., 2005). So sollten mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems und der „human testis library“, einkloniert in den pACT Vektor, neue Interaktionspartner aufgespürt werden. Hierfür wurde die Genbank zuerst wie beschrieben amplifiziert und aufgereinigt (siehe 4.3.4. „Amplifikation einer cDNA Genbank“) und für die Interaktionsstudien mit Iporin in den Hefestamm Y190 transfiziert.

Mit Iporin Δ N847 als Köder konnten wir einige interessante Proteine identifizieren, mitunter das humane Tesmin, welches zum Hauptuntersuchungsobjekt dieser Arbeit wurde. Anfangs wurde der isolierte Klon aufgrund der numerischen Abfolge der Isolierung der Klone als „pACT 56“ bezeichnet. Nach Isolierung der DNA aus den Hefezellen (siehe 4.2.2. „Isolierung von Plasmid DNA aus *S.cerevisiae*“) wurde diese in Bakterienzellen transformiert und so vervielfältigt (siehe 4.2.9.1. „Calciumchlorid-Methode“), um ausreichende Mengen für einen Restriktionsverdau mit Hilfe von *HindIII* zu bekommen. Dieser belegte, dass die ungefähre Größe des „inserts“ ca. 0,7 kb beträgt (siehe 4.3.7. „Überprüfung potentieller Interaktionspartner“). Zur Verifizierung der Interaktion von pACT56 und Iporin wurden Kotransformationen mit den unterschiedlichen, uns vorliegenden Iporin-Mutanten (siehe Abbildung 5.4 „Iporin und Verkürzungsmutanten“) durchgeführt (siehe 4.3.1. „Herstellung kompetenter Hefen“ und 4.3.2. „Kotransformation von Hefen“). Für die Analyse der Spezifität der Interaktion, bzw. ob Tesmin, ebenso wie Iporin, an Rab1B binden kann, wurden Analysen mit Rab1B Wildtyp und mit Rab1B-Mutanten (siehe 3.10.3. „Plasmidkonstrukte für die Expression in Säugetierzellen“) gemacht. Als Negativkontrolle wurde ein leerer „bait“-Vektor, pAS 2-1, eingesetzt.

Die Auswertung der Ergebnisse ist in der folgenden Tabelle 5.3 dargestellt.

Tab. 5.3: Kotransformation zur Verifizierung der pACT 56-Iporin Interaktion mittels eines in vivo „yeast two-hybrid assays“

Die Kotransformationen des Hefestammes Y190 wurden mit den pAS Iporin-Mutanten, bzw. mit pAS Rab1B Konstrukten und dem isolierten Klon pACT 56 durchgeführt. Das Wachstum der Hefekolonien wird wie folgt bewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +: mittelmäßiges Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum. Entsprechend wird die Aktivität der β -Galaktosidase eingestuft: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb von 2 Stunden); ++: gute Blaufärbung (innerhalb von 6 Stunden); +: schwache Blaufärbung (innerhalb 12 Stunden); +/-: sehr schwache Blaufärbung (über Nacht); -: keine Blaufärbung

„bait“ Plasmid	„prey“ Plasmid pACT 56	
	-His3	lacZ
pAS 2-1	+/-	-
pAS Iporin Δ N847	+++	+++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1450	+++	+++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1239	+++	++
pAS Iporin Δ N847 Δ C992	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1177	-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1239	+	+/-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1450	+++	++
pAS Iporin Δ N1122	+	+/-
pAS Iporin Δ N1430	+/-	-
pAS Rab1B wt	-	-
pAS Rab1B S22N	-	-
pAS Rab1B Q67R	-	-
pAS Rab1B Q67L	-	-

Die in Tabelle 5.3 aufgelisteten Ergebnisse belegen, dass der isolierte Klon pACT 56 nicht nur mit dem Köderplasmid pAS Iporin Δ N847 gut interagiert, sondern auch mit einigen weiteren Iporin-Mutanten. So interagiert pACT 56 ebenso gut mit pAS Iporin Δ N847 Δ C1450, d.h. der Deletionsmutante ohne SH3-Domäne, und pAS Iporin Δ N847 Δ C1239, der neben der SH3-Domäne auch der poly P und poly E-„stretch“ fehlen. Die Mutante pAS Iporin Δ C1430, die nur die SH3-Domäne umfasst, interagiert nicht mit pACT 56, so dass die SH3-Domäne demnach nicht an einer Interaktion beteiligt, bzw. für die Bindung nicht nötig ist. Ebenso haben der poly P und der poly E-„stretch“ keine Bedeutung für eine Interaktion. Alle oben tabellarisch aufgeführten Mutanten, die interagieren, beinhalten die gesamte RUN-Domäne, bzw. Teile davon. Einzig die Mutante Iporin Δ N991 Δ C1177, die nur aus der RUN-Domäne besteht, interagiert nicht mit pACT 56, da sich die Faltung einzelner Verkürzungsmutanten ungünstig auf die Bindungsfähigkeit auswirken kann (Van Crielinge und Beyaert, 1999). Die Interaktionen mit den Iporin Mutanten Δ C1122 und Δ N991 Δ C1239, wobei Δ N991 Δ C1239 ähnlich zu Iporin Δ N847 Δ C1239 aufgebaut ist und ihr lediglich einige Aminosäuren „upstream“ in der RUN-Domäne fehlen, konnten nicht eindeutig gezeigt werden, da die Hefekolonien sich erst über Nacht blau färbten und so nicht mehr als signifikant angesehen werden können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass weder die Wildtyp-, noch die inaktive oder die daueraktive Rab1B-Mutante mit dem isolierten Klon 56 interagieren, so dass die Interaktion von Iporin und Klon 56 spezifisch ist.

So konnte eine Interaktion des isolierten Klons mit einzelnen Iporin Mutanten mit Hilfe des „yeast two-hybrid assays“ bestätigt werden. Zur Identifikation des Klons wurde eine

Sequenzierung (siehe 4.2.11. „Sequenzierung“) mit dem „prey“ spezifischen „forward primer“ „fish 3F“ (siehe 3.8. „Primer“) durchgeführt. Die Auswertung der gelesenen Basenabfolge des Klon 56 erfolgte mit Hilfe von ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. So ergab die Analyse, dass der Klon 56 die C-terminale Region des Hoden spezifischen Proteins Tesmin enthält, wovon 409 bp der kodierenden Sequenz entsprechen (vgl. hierzu die veröffentlichte Sequenz Acc.: NM_004923, aktuell ersetzt durch BC064579). Der Datenbankeintrag beschrieb für das humane Tesmin einen „open reading frame“ von 900 bp, resultierend in einer 300 Aminosäure-langen Proteinsequenz. Erstmals wurde Tesmin in murinem Hodengewebe beschrieben, wobei sich die Bezeichnung „Metallothionein-like 5, testis-specific“ von der strukturellen Ähnlichkeit zu Metallothioneinen durch zwei aufeinanderfolgende Cystein-reiche Bereiche und der Gewebeexpression des Proteins ableitet (Sugihara et al., 1999).

Im Laufe der experimentellen Phase stellte sich heraus, dass die 900 bp der humanen Tesmin Sequenz nur einen Teil der tatsächlichen „full length“ Sequenz repräsentieren. Bereits Matsuura et al. konnten zeigen, dass für das murine Tesmin aufgrund eines sehr hohen GC-Gehaltes in der 5'-Region ein kürzerer „open reading frame“ angenommen wurde, so dass der Datenbankeintrag aktualisiert wurde (Matsuura et al., 2002). Ein Antikörper gegen das murine Tesmin detektierte im Hodengewebe ein Protein der Größe 60 kDa. Das berechnete Molekulargewicht beträgt ca. 50 kDa, allerdings kommt es durch posttranslationale Modifikationen zu einer Erhöhung des detektierten Molekulargewichtes (Sutou et al., 2003). Im Folgenden wird die 900 bp lange humane Sequenz, bzw. das daraus resultierende Protein Tesmin A und die aktuelle, 1527 bp lange Sequenz, bzw. das „full length“ Protein als Tesmin „full length“ bezeichnet. Zum besseren Verständnis ist in der folgenden Abbildung ein Schema der beiden Tesmin-Verkürzungsmutanten sowie das „full length“ Protein dargestellt.

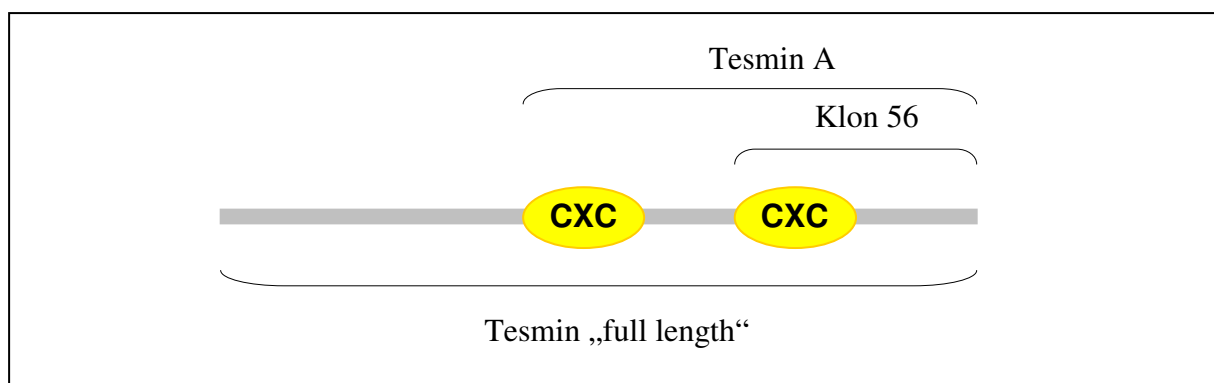


Abb. 5.15: Schematische Darstellung des Klon 56, Tesmin A und Tesmin „full length“.

In der Abbildung ist das humane Tesmin „full length“, welches sich durch zwei Cystein-reiche Motive auszeichnet, schematisch dargestellt. Es besteht aus 508 Aminosäuren, resultierend in einem Protein der Größe von ca. 55 kDa. Tesmin A besteht aus 300 Aminosäuren und ist ca. 33 kDa groß.

Für eine Bestätigung der Interaktion zwischen Tesmin A und Iporin, wurde die 900 bp lange Sequenz mit Tesmin spezifischen „primern“ „tes1for“ und „tes1rev“ (siehe 3.8. „Primer“) aus der „human testis library“ amplifiziert (siehe 4.2.3. „Amplifikation von DNA mittels PCR“). Um eine Klonierung in zahlreiche Vektoren zu erleichtern, wurden die „primer“ mit überhängenden *Eco* RI, bzw. *Nde* I und *Bam* HI Schnittstellen konstruiert. Das gesamte PCR Produkt wurde anschließend auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 4.2.6. „Elektrophoretische Auftrennung von DNA“; Daten nicht gezeigt), aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA aufgereinigt (siehe 4.2.7. „Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen“). Mittels *Nde* I und *Bam* HI wurden die aufgereinigte DNA und der Vektor restringiert und miteinander ligiert (siehe 4.2.8. „Ligation von DNA“). Die Überprüfung mehrerer Klone erfolgte mittels einer Kontrollrestriktion des rekombinanten Konstruktes.

Nach Auftrennung auf einem 1%-igen Agarosegel, dargestellt in Abbildung 5.16, konnte neben „inserts“ der Größe von 900 bp ein Klon mit einem „insert“ der Größe ca. 850 bp isoliert werden.

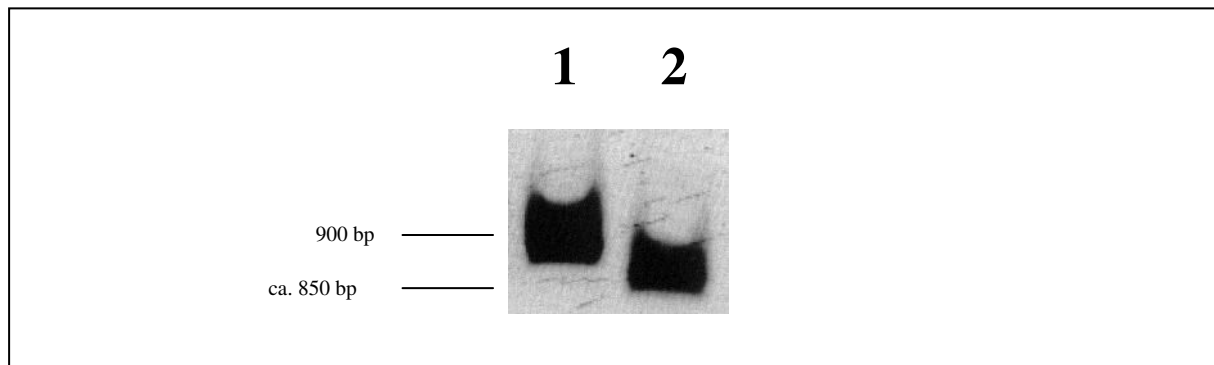


Abb. 5.16: Amplifizierte cDNA-Fragmente mittels Tesmin spezifischer „primer“

Auf einem 1%-igen Agarosegel wurden die cDNA-Fragmente, die Tesmin A entsprechen (Acc.: NM_004923), aufgetrennt.

Spur 1: Insert von Klon 1, 900 bp; **Spur 2:** Insert von Klon 2, 853 bp

Zur Überprüfung des vervielfältigten Tesmin PCR Produktes wurde das Insert des Klons 1 und des Klons 2, der ein verkürztes „insert“ enthält, mit Tesmin-spezifischen „primern“ sequenziert. Die cDNA des „inserts“ von Klon 1, die eine Größe von 900 bp enthält (siehe Abbildung 5.16, Spur 1) entspricht lückenlos dem „open reading frame“ der Tesmin A cDNA Sequenz von Tesmin, Acc.: NM_004923. Die Basen des „inserts“ von Klon 2 sind ebenfalls homolog zu der Tesmin Sequenz, allerdings fehlen 57 bp, d.h. 19 Aminosäuren, in dem zweiten Cystein-reichen Motiv (siehe Abbildung 5.16, Spur 2). Die Basenabfolge ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

```

1→atggtgatatccaattgaaagggggcacacaaatgctatgtatagacaattctagaacaagagaac
taaaagcactccatttggctcctcagatcaagatcaaaataattctacagtcagatgtccctaaaccaatg
actgctttagtagggagatTTTTGCCGATCAACAAAATAATCTCATTACACAACAACCTGAGGGAGCCT
taccatcggtagtaaacgggtctgctttcccctcggtatcaactcttcaggaccacaaaaataacttgg
ctgggactgtgactgctttgccagtggggactttgcaacaactgcaattgtaataattgtgcaacaactg
catcatgatattgaacggtttaaagccattaaggcatgtcttgtagaaatccagaagctttccagccaaaa
attgggaagggccaattgggcaatgtaagccccagcacacaagaagggtgcaactgcaggaggtcagg
ctgcctgaagaactactgcgagtgctatgaggcccaattatgtgtcttctatttgcaaatgcattggtgc
aaaattatgaagaaagcccagaacgaaagacactaatgagcatgccaactacatgcagactggag
gtttgaaggcagccattacctgccaccaacgaaatttcaggactccaagattcagtcacgataggcgg
ccttctcatcatctcctgggaggtggtggaggccacatgcgcctgcctgcttgcaggagaagagg
ccgagaaagaactgctccaagtgcctggcagagcagatgatcctggaggaatttgaaggtgcttacc
acagattctccactgagtttaaatctaagggtgaaatggagtag → 900

```

Abb. 5.17: Ehemaliger „open reading frame“ der humanen Tesmin A cDNA Sequenz (900 bp; Acc.: NM_004923)

Dargestellt ist der ehemals bekannte „open reading frame“ der cDNA der humanen Tesmin A Sequenz von insgesamt 900 bp. Das Codon „atg“ kodiert für das Start-Methionin und ist ebenso wie das Basentriplett „tag“, das die Termination der Transkription bedeutet, **hervorgehoben**. In **blau** dargestellt ist der im „yeast two-hybrid screen“ isolierte Klon 56. Die beiden Cystein-reichen Motive sind unterstrichen, wobei das zweite Motiv, welches größtenteils ebenfalls zum Klon 56 gehört, zwischen Tesmin Homologen unterschiedlicher Spezies konservierter ist. Die Deletion von 57 bp ist in *kursiven* Buchstaben dargestellt. Der Basenaustausch (a → t) in der Sequenz dieser Deletionsmutante ist **rot** markiert.

Entsprechend erhielten die Klone 1 und 2 die Bezeichnungen Tesmin A, bzw. Tesmin B, wobei durch die Amplifikation mittels PCR Tesmin B an Position 105 (siehe Abbildung 5.17, rot dargestellt) einen Basenaustausch von a nach t trägt, so dass das Basentriplett nun für ein Histidin anstatt für Glutamin steht.

Die Interaktion zwischen Iporin, bzw. den einzelnen vorliegenden Mutanten und Tesmin A wurde in einem „yeast two-hybrid assay“ getestet, die Ergebnisse sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Entsprechend dem Ansatz mit pACT 56 und Iporin wurden hier ebenso die unterschiedlichen Rab1B Konstrukte eingesetzt.

Tab. 5.4: Kotransformation zur Verifizierung der pGADT7 Tesmin A-Iporin Interaktion mittels eines in vivo „yeast two-hybrid assays“

Die Kotransformationen des Hefestammes Y190 wurden mit den pAS Iporin-Mutanten, bzw. mit pAS Rab1B Konstrukten und dem amplifizierten Klon Tesmin A, einkloniert in den „prey“ Vektor pGADT7, durchgeführt. Das Wachstum der Hefekolonien wird wie folgt bewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +: mittelmäßiges Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum. Entsprechend wird die Aktivität der β -Galaktosidase eingestuft: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb von 2 Stunden); ++: gute Blaufärbung (innerhalb von 6 Stunden); +: schwache Blaufärbung (innerhalb 12 Stunden); +/-: sehr schwache Blaufärbung (über Nacht); -: keine Blaufärbung

„bait“ Plasmid	„prey“ Plasmid pGADT7 Tesmin A	
	-His3	lacZ
pAS 2-1	+/-	-
pAS Iporin Δ N847	+++	+++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1450	+++	+++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1239	+++	++
pAS Iporin Δ N847 Δ C992	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1177	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1239	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1450	++	++
pAS Iporin Δ N1122	+	+/-
pAS Iporin Δ N1430	+/-	-
pAS Rab1B wt	-	-
pAS Rab1B S22N	-	-
pAS Rab1B Q67R	-	-
pAS Rab1B Q67L	-	-

Die Ergebnisse der „yeast two-hybrid“ Kotransformationen im Hefestamm Y190 für Tesmin A und die einzelnen Iporin-Mutanten entsprechen den Ergebnissen für den isolierten Klon 56 und Iporin. Tesmin A zeigt ebenfalls keine Interaktion mit Rab1B Wildtyp, bzw. den einzelnen Mutanten, so dass auch dieser Ansatz bestätigt, dass die Interaktion zwischen Tesmin A und Iporin spezifisch ist.

Zur Bestätigung der Interaktion zwischen Tesmin A und Iporin sollte ein „GST-pull down“ durchgeführt werden (siehe 4.7. „Protein-Interaktionsstudien *GST-pull down assay*“). Hierfür wurden, entsprechend wie im Kapitel 5.3. „Iporin Homodimerisierung“ beschrieben, die GST-Fusionsproteine Iporin Δ N847 Δ C1239 und Iporin Δ N1430 hergestellt und an „Glutathion-Sepharose beads“ für 1,5 Stunden gekoppelt. Tesmin A wurde in den Vektor pEGFP-IJ einkloniert (siehe 3.9.3. „Eukaryotische Klonierungsvektoren“). Teil dieses

Vektors ist eine aminoterminal inserierte Sequenz, welche für das HA-Epitop kodiert, so dass eine anschließende Detektion des Proteins in der „Western Blot“ Analyse mit dem HA-spezifischen Antikörper 16B12 möglich war. Zur Bestimmung der optimalen Expressionsrate, in Abhängigkeit von der Zeitdauer nach Transfektion, wurde vierfach die gleiche Anzahl HeLa SS6 Zellen ausgesät, die mit pEGFP-IJ-Tesmin A mittels Polyfect transient transfiziert (siehe 4.4.1. „Transfektion eukaryotischer Zellen mit Polyfect[®]“) und jeweils nach 24, 30, 35 und 48 Stunden in PD-Puffer lysiert worden sind (siehe 4.4.2.1. „Herstellung von Gesamtzellextrakten“). Jeweils 1/10-tel des Zelllysats wurde für eine Analyse der Proteinexpression eingesetzt. Die Ergebnisse sind der folgenden Abbildung 5.18, A zu entnehmen.

Die höchste Proteinmenge konnte 35 Stunden nach Transfektion detektiert werden. Entsprechend wurde die Transfektion in einem größeren Ansatz in Cos7 Zellen, die eine höhere Proteinexpressionsrate aufwiesen, wiederholt, um genügend Zellmaterial für den „GST-pull down“ Test zu bekommen. Die Zellen wurden im PD-Puffer aufgenommen, dem der Proteasehemmer Complete[™] zugesetzt war.

Tesmin A weist eine Größe von ca. 33 kDa auf, das GFP-Protein ca. 27 kDa und das zusätzliche HA-„tag“ ca. 2 kDa, so dass sich eine Gesamtgröße von ca. 62 kDa ergibt.

Die Iporin-Mutanten, gebunden an die „Glutathion-Sepharose beads“, wurden über Nacht bei 4°C mit 200 µl des HeLa SS6 EGFP-IJ-Tesmin A Zelllysats inkubiert. Nach mehreren gründlichen Waschschritten wurde das Pellet in 15 µl 2-fach Probenpuffer aufgenommen und die gebundenen Proteine 5 min bei 95°C von den „beads“ gelöst. Der Überstand wurde komplett auf einem 12 %-igem SDS-Gel aufgetrennt (siehe 4.5.1. „SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese“) und einer „Western Blot“ Analyse unterzogen (siehe 4.5.3. „Western Blot“).

Als Positivkontrolle dienten 10 µl des Cos7 EGFP-IJ-Tesmin A Zellextraktes, d.h. 1/20-stel der Menge, die im „pull down assay“ eingesetzt worden ist. Die Detektion erfolgte mit dem HA-spezifischen Antikörper 16B12 (siehe 3.7. „Antikörper“). Die Ergebnisse der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zeitdauer nach der Transfektion (A) und des „GST pull downs“ (B) sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

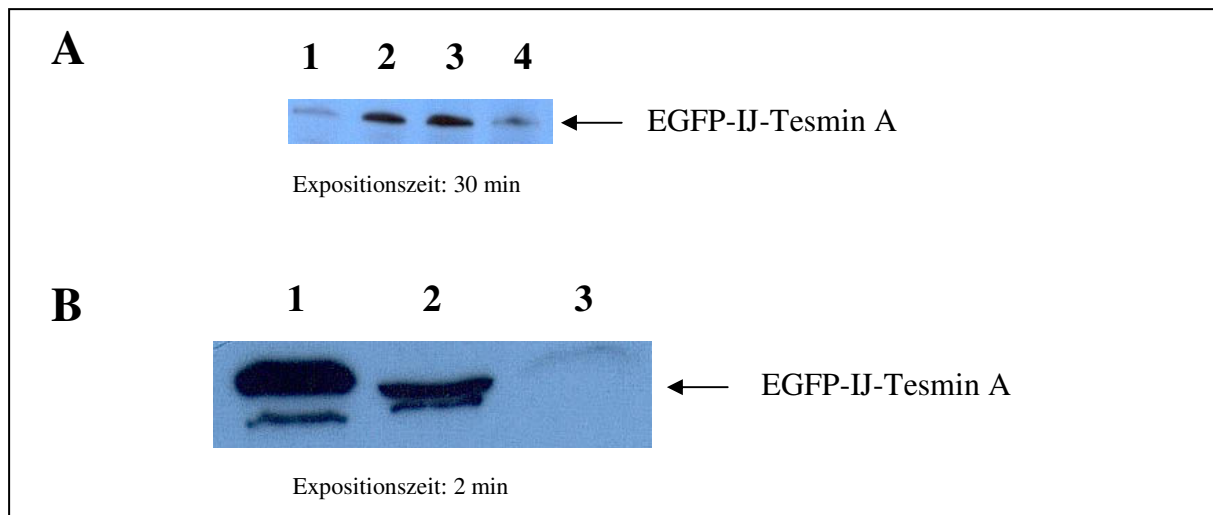


Abb. 5.18: Expression von EGFP-IJ-Tesmin A und der „GST-pull down“ Test zur Bestätigung der Interaktion zwischen Tesmin A und Iporin

A: Auf einem 12 %-igem SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 10 μ l (1/10-tel) des HeLa SS6 EGFP-IJ-Tesmin A Zellysats aufgetragen und die Proteinexpression mit Hilfe der „Western Blot“ Methode und dem HA-spezifischen Antikörper 16B12 (1:1000), sowie dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Maus IgG (1:1000) analysiert.

Die Aufarbeitung der transfizierten Zellen erfolgte nach 24 h (A1), 30 h (A2), 35 h (A3) und 48 h (A4).

B: Auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 15 μ l der „GST-pull down“ Ansätze aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Positivkontrolle wurden 10 μ l Cos7 EGFP-IJ-Tesmin A Zellysates eingesetzt. Zur Detektion wurde der monoklonale anti-HA-Antikörper 16B12 (1:1000) und als Sekundärantikörper HRP-gekoppeltes anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Spur 1: Positivkontrolle Cos7 EGFP-IJ-Tesmin A; **Spur 2:** GST-Iporin Δ N847 Δ C1239/Cos7 EGFP-IJ-Tesmin A; **Spur 3:** GST-Iporin Δ N1430/Cos7 EGFP-IJ-Tesmin A

Wie in der Abbildung 5.18 A dargestellt, konnte das rekombinante EGFP-IJ-Tesmin A Protein in HeLa SS6 Zellen exprimiert werden, wobei die höchste Expressionsrate 35 Stunden nach der Transfektion detektiert werden konnte (siehe Abbildung 5.18, A3).

In der „Western Blot“ Analyse des „GST-pull downs“, der insgesamt drei mal mit gleichem Ergebnis wiederholt worden ist, konnte eine Bindung von Tesmin A und Iporin, bzw. der Verkürzungsmutante Iporin Δ N847 Δ C1239 nachgewiesen werden und somit die Ergebnisse der Kotransformation (siehe Tabelle 5.4) bestätigt werden.

Hierbei fällt jedoch auf, dass das EGFP-IJ-Tesmin A Signal in der Spur B2 etwas tiefer läuft, als das der Positivkontrolle. Da das rekombinante GST-Protein Iporin Δ N847 Δ C1239 die Größe von ca. 60 kDa aufweist, werden die Proteine auf Höhe des Molekulargewichts ca. 60 kDa von der großen Menge des Fusionsproteins zusammengedrängt. Ebenso konnte neben der Hauptbande ein schwächeres Signal, welches etwas tiefer läuft, detektiert werden. Es kann sich um eine unspezifische Bande handeln, die bei Expressionen von GFP-Konstrukten auftaucht, um Proteinabbau, oder um eine mögliche Spleißvariante, die bis heute nicht beschrieben werden konnte. In Spur B3 konnte kein EGFP-IJ-Tesmin A Signal detektiert werden, so dass gezeigt werden konnte, dass die Iporin Mutante Δ N1430, die größtenteils aus der SH3 Domäne besteht, nicht an Tesmin A bindet.

Wie bereits beschrieben, repräsentiert die humane Tesmin A Sequenz nicht den vollständigen „open reading frame“. Versuche, die fehlenden aminoterminal gelegenen Basen mit Hilfe der PCR-Technik mit spezifischen „primern“, „tes f.l.“ und „tes xba“ (siehe 3.8. „Primer“) aus der „human testis library“ zu amplifizieren, schlugen fehl. Es konnte ein Klon mit der ID: IMAGp998E1812764Q, der die „full length“ Tesmin Sequenz enthält, vom RZPD bezogen werden (siehe 3.10.3. „Plasmidkonstrukte für die Expression in Säugetierzellen“).

Restriktionsanalysen unter Nutzung interner Schnittstellen konnten belegen, dass die in den pCMV SPORT6 einklonierte Sequenz von der Größe her der veröffentlichten Sequenz unter der „Accession-Nr.“: BC064579 entspricht. Die „full length“ cDNA konnte mit Hilfe der internen Restriktionsschnittstellen *Nco* I an der Startsequenz und *Eco* RI in der nicht-translatierten mRNA 3'-Region aus dem Konstrukt herausgeschnitten werden und in den pAS Vektor, der ebenfalls *Nco* I/*Eco* RI aufgeschnitten worden ist, einkloniert werden. So besteht die aktuelle „full length“ Sequenz, mit welcher die folgenden Versuche durchgeführt wurden, insgesamt aus 2326 bp, wovon 1527 bp der kodierenden Sequenz entsprechen.

Die Interaktion zwischen Tesmin „full length“ und Iporin sollte, wie bereits für den Klon 56 und Tesmin A erfolgt, in einem „yeast two-hybrid assay“ untersucht werden. Die Ergebnisse sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 5.5: Kotransformation zur Verifizierung der pGADT7 Tesmin „full length“-Iporin Interaktion mittels eines „yeast two-hybrid assays“

Die Kotransformationen des Hefestammes Y190 wurden mit den pAS Iporin-Mutanten, und dem Tesmin „full length“ Konstrukt, einkloniert in den „prey“ Vektor pGADT7 durchgeführt. Das Wachstum der Hefekolonien wird wie folgt bewertet: +++: sehr gutes Wachstum; ++: gutes Wachstum; +: mittelmäßiges Wachstum; +/-: Hintergrundwachstum. Entsprechend wird die Aktivität der β -Galaktosidase eingestuft: +++: schnelle und starke Blaufärbung (innerhalb von 2 Stunden); ++: gute Blaufärbung (innerhalb von 6 Stunden); +: schwache Blaufärbung (innerhalb 12 Stunden); +/-: sehr schwache Blaufärbung (über Nacht); -: keine Blaufärbung

„bait“ Plasmid	„prey“ Plasmid pGADT7 Tesmin „full length“	
	-His3	lacZ
pAS 2-1	+/-	-
pAS Iporin Δ N847	+++	++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1450	+++	++
pAS Iporin Δ N847 Δ C1239	++	+
pAS Iporin Δ N847 Δ C992	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1177	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1239	+/-	-
pAS Iporin Δ N991 Δ C1450	++	++
pAS Iporin Δ N1122	+/-	-
pAS Iporin Δ N1430	+/-	-

Die Interaktion zwischen Iporin und Tesmin „full length“ konnte in dem Ko-Transformationsansatz des Hefestammes Y190 eindeutig gezeigt werden. Ähnlich wie die verkürzten Tesmin Proteine interagiert das „full length“ Protein sehr gut mit den Iporin Mutanten Δ N847, Δ N847 Δ C1450, Δ N847 Δ C1239 und Δ N991 Δ C1450. Eine Interaktion zwischen Tesmin „full length“ und den Iporin-Mutanten, die größtenteils nur aus der RUN-Domäne bzw. Teilen davon bestehen, konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die RUN Domäne als zentrales Motiv für eine Vermittlung der Interaktion entscheidend ist.

Matsuura et al. konnten bereits die zytoplasmatische Lokalisation für das murine Tesmin in Cos1 Zellen zeigen (Matsuura et al., 2002). Entsprechend wurden HeLa SS6 Zellen, da sie sich besonders gut für die Bestimmung der zellulären Lokalisation eignen, mittels Polyfect mit pEGFP-IJ-Tesmin A bzw. Tesmin „full length“ transfiziert und 30 Stunden, bzw. 24 Stunden danach aufgearbeitet. Die optimale Tesmin „full length“ Proteinexpression wurde in

Abhängigkeit von der Zeit mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse bestimmt (Daten nicht gezeigt), und der Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion gewählt.

In der folgenden Abbildung **5.19** ist die Lokalisation der N-terminalen Verkürzungsmutante und des Tesmin „full length“ Proteins dargestellt. Um eine Kolokalisation von Tesmin „full length“ und Iporin im zellulären System zu bestätigen, wurde entsprechend das endogene Iporin mittels des polyklonalen 1179_{affi} Antikörpers detektiert. Das Iporinsignal ist in der folgenden Abbildung rot dargestellt, der Zellkern blau und die GFP-Fusionsproteine grün. Die Lokalisationsstudien wurden ebenfalls in Cos7 Zellen mit gleichem Ergebnis wiederholt (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte mit dem Leitz Diaplan Fluoreszenzmikroskop.

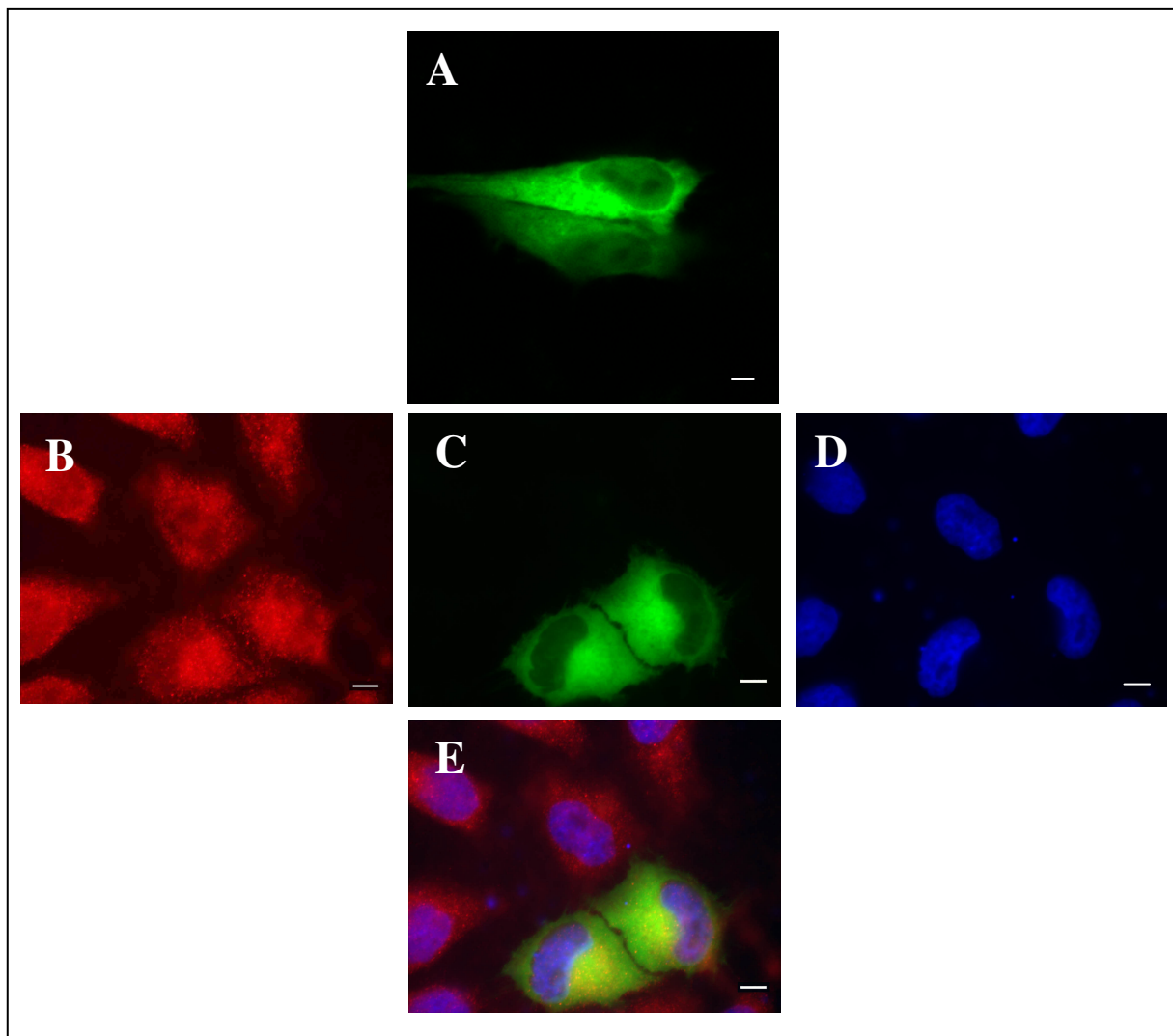


Abb. 5.19: Intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins EGFP-IJ-Tesmin A bzw. EGFP-IJ-Tesmin „full length“ in HeLa SS6 Zellen

HeLa SS6 Zellen wurden mittels Polyfect mit pEGFP-IJ-Tesmin A bzw. pEGFP-IJ-Tesmin „full length“ transient mit Polyfect transfiziert und 30 h, bzw. 24 h danach fixiert. Das endogene Iporin wurden mit dem polyklonalen 1179_{affi} (1:1000) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper das Cy3 gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Die Zellkerne wurde mittels DAPI (1:10000) sichtbar gemacht. Der Balken entspricht 10 μm .

A: EGFP-IJ-Tesmin A; **B:** endogenes Iporin; **C:** EGFP-IJ-Tesmin „full length“; **D:** Zellkerne; **E:** „overlay“ von B, C und D

Sowohl die Verkürzungsmutante Tesmin A und das „full length“ Protein weisen eine zytoplasmatische Verteilung auf, wobei eine Konzentrierung in Zellkernnähe beobachtet werden kann. Im Zellkern wird kaum Signal detektiert (siehe Abbildung 5.19, A und C). Zellen, die Tesmin „full length“ überexprimieren und 36 bzw. 48 Stunden nach Transfektion fixiert worden sind, zeigen eine unveränderte zytoplasmatische Lokalisation des rekombinanten Proteins auf (Daten nicht gezeigt).

HeLa SS6 Zellen, die Tesmin „full length“ überexprimieren, weisen eine unveränderte Lokalisation des endogenen Iporins auf. Eine Übereinanderlagerung der einzelnen Aufnahmen des endogenen Iporins, des überexprimierten Tesmin „full length“ Proteins und der Zellkernfärbung (siehe Abbildung 5.19 B-E) verdeutlicht, dass eine Kolokalisation beider Proteine, insbesondere im perinukleären Bereich, sichtbar wird und der Zellkern größtenteils frei vom Tesminsignal ist. So weisen beide Proteine größtenteils eine ubiquitäre zytoplasmatische Verteilung auf, wobei vermehrt Protein am Zellkern akkumuliert wird.

5.7. Tesmin-Translokation nach Behandlung mit Cadmiumchlorid

Das Tesmin Protein besitzt kaum charakterisierte Bereiche, bis auf zwei Cystein-reiche Motive, die in allen Homologen der unterschiedlichen Spezies vorkommen und ebenfalls in Metallothioneinen vorkommen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.9. „Tesmin“), können diese als Detoxifikanten Schwermetalle binden (Ren et al., 2003).

So konnte bereits für das Maus EGFP-Tesmin Konstrukt, überexprimiert in Cos1 Zellen, beschrieben werden, dass es nach Induktion mit Cadmiumchlorid (100 μ M) in den Zellkern wandert und diese Translokation mittels der Cystein-reichen Motive, die als Sensor dienen könnten, vermittelt wird (Matsuura et al., 2002). Um eine mögliche Translokation des humanen Tesmins zu zeigen, sollten Säugetierzellen, die pEGFP-IJ-Tesmin A, bzw. „full length“ überexprimieren mit 100 μ M Cadmiumchlorid behandelt und anschließend analysiert werden. In diesem Zusammenhang war es interessant, ob einerseits das humane Tesmin ebenfalls nach Schwermetall-Induktion in den Zellkern wandert und ob sich andererseits die Iporin Lokalisation verändert. Da die Verkürzungsmutante Tesmin A den C-terminalen Bereich des „full length“ Proteins repräsentiert, der beide Cystein-reichen Motive enthält, sollte überprüft werden, in wieweit der N-terminale Bereich eine mögliche Translokation beeinflusst bzw. für diese notwendig ist.

Der erste Ansatz sollte klären, in wieweit die zytoplasmatische Lokalisation des endogenen Iporins nach Behandlung mit Cadmiumchlorid beeinflusst wird. Hierfür wurden HeLa SS6 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und 20 Stunden später mit 100 μ M Cadmiumchlorid behandelt. Sie wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der Induktion (2, 5, 10 und 24 Stunden) aufgearbeitet. In der folgenden Abbildung 5.20 ist der Zeitwert 5 Stunden dargestellt, da die Aufarbeitung der Cadmiumchlorid-behandelten Cos1 Zellen, die das transfizierte Maus Tesmin überexprimieren, ebenfalls 5 Stunden nach Induktion erfolgte (Matsuura et al., 2002). Parallel wurde der Zustand der Zellen mikroskopisch begutachtet, um zu überprüfen, wann sie apoptotisch werden und wann sie durch den zytotoxischen Effekt von Cadmiumchlorid zerstört werden. Bereits nach 5-7 Stunden zeigten sich erste apoptotische Merkmale, z.B. ein leichtes Abrunden der Zellen, und zu späteren Zeitpunkten konnte für die Apoptose typisches „blebbing“ sowie eine Zerstörung der Zellen beobachtet werden, die als sekundäre Nekrose gedeutet wurde (Daten nicht gezeigt; Maag et al., 2003). So sollte gewährleistet sein, dass eine mögliche Veränderung der Iporin Lokalisation auf apoptotische und nicht nekrotische Veränderungen in den Zellen zurückzuführen ist. Das endogene Iporin wurde mittels des polyklonalen 1179_{affi} Antikörpers detektiert und ist in der folgenden Abbildung rot dargestellt. Die Analyse der Immunfluoreszenzpräparate erfolgte mit Hilfe des Konfokalen Leica DM RXE „Laser-Scanning“ Mikroskops.

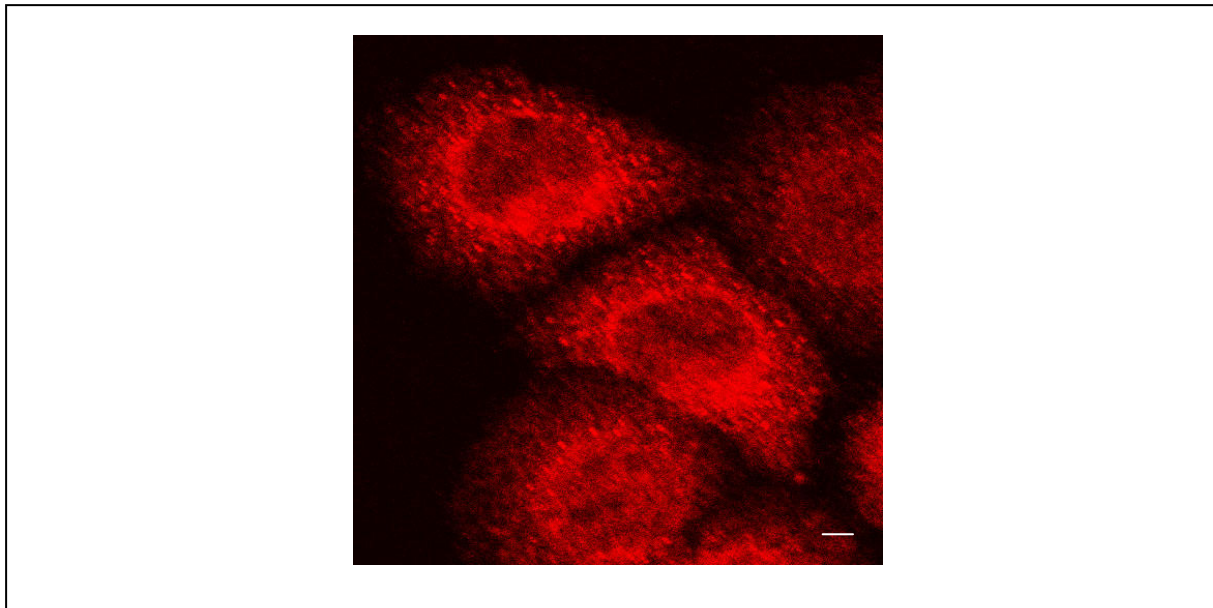


Abb. 5.20: Lokalisation des endogenen Iporins in HeLa SS6 Zellen nach Induktion mit Cadmiumchlorid
HeLa SS6 Zellen wurden 20 Stunden nach Aussaat mit 100 μM Cadmiumchlorid für 5 Stunden behandelt, anschließend fixiert und aufgearbeitet. Das endogene Iporin wurde mit dem polyklonalen 1179_{affi} (1:1000) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper das Cy3 gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Der Balken entspricht 10 μm .

Wie der Abbildung 5.20 zu entnehmen ist, hat sich die Morphologie der HeLa SS6 Zellen leicht verändert. Die Zellen begannen sich vom Untergrund zu lösen und rundeten sich in Folge dessen leicht ab. Das Iporinsignal ist ubiquitär in der Zelle und schwach im Zellkern verteilt und ist im perinukleären Bereich verstärkt. So konnte keine signifikante Veränderung der Lokalisation zu der bereits von Bayer et al. publizierten subzellulären Lokalisation beobachtet werden (Bayer et al., 2005). Zellen, die 10, bzw. 24 Stunden mit Cadmiumchlorid behandelt worden sind, rundeten sich völlig ab und intrazelluläre Organellen waren vakuolisiert, so dass die Apoptose höchstwahrscheinlich weit fortgeschritten war und die Zellen abstarben. Das Iporinsignal war zu diesem Zeitpunkt ubiquitär verteilt, wobei eine Bildung von Artefakten nicht ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits eingangs erläutert, sollte die Translokation der Deletionsmutante Tesmin A nach Induktion mit Cadmiumchlorid gezeigt werden. Hierfür wurden HeLa SS6 Zellen transient mit pEGFP-IJ-Tesmin A transfiziert, 30 Stunden später mit 100 μM Cadmiumchlorid behandelt und nach 4 Stunden der Induktion fixiert und aufgearbeitet. Zur Überprüfung der Iporin Lokalisation wurde das endogene Iporin mittels des polyklonalen 1179_{affi} Antikörpers detektiert und ist in der folgenden Abbildung rot dargestellt. Tesmin A ist grün dargestellt und die Zellkerne blau. Die Lokalisationsstudien wurden ebenfalls in Cos7 Zellen mit gleichem Ergebnis wiederholt (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte mit dem Leitz Diaplan Fluoreszenzmikroskop.

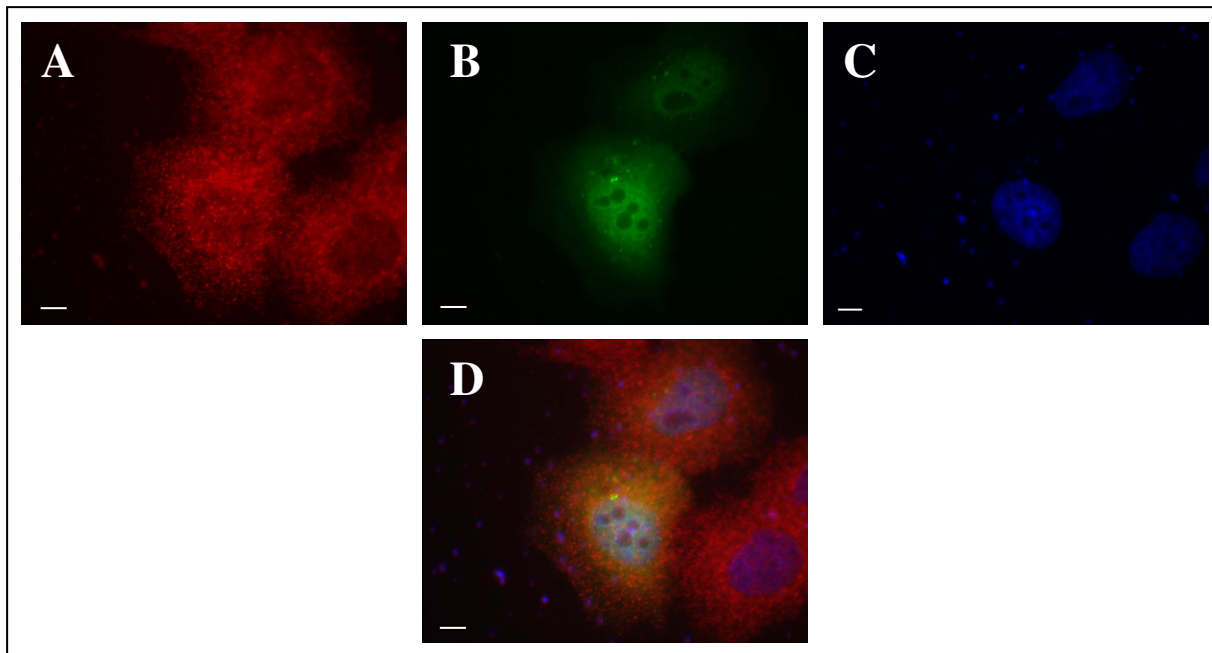


Abb. 5.21: Translokation von EGFP-IJ-Tesmin A in den Zellkern nach Induktion mit Cadmiumchlorid

HeLa SS6 Zellen wurden mittels Polyfect mit pEGFP-IJ-Tesmin A transient transfiziert, 30 h danach 100 μ M Cadmiumchlorid dazugegeben und 4 Stunden später fixiert. Das endogene Iporin wurden mit dem polyklonalen 1179_{affi} (1:1000) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper das Cy3 gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Die Zellkerne wurde mittels DAPI (1:10000) sichtbar gemacht. Der Balken entspricht 10 μ m.

A: endogenes Iporin; **B:** EGFP-IJ-Tesmin A; **C:** Zellkerne; **D:** „overlay“ von A, B und C

Wie der Abbildung 5.21 B und D zu entnehmen ist, verlagert sich das EGFP-IJ-Tesmin A Signal aus dem Zytoplasma (siehe Abbildung 5.19 A) größtenteils in den Zellkern, so dass ausgeschlossen werden kann, dass der fehlende N-terminale Bereich eine entscheidende Rolle für die Translokation spielt. Das Iporinsignal ist, wie bereits gezeigt, ubiquitär im Zytoplasma verteilt (siehe Abbildung 5.20 und 5.21 A), wobei ebenso ein schwaches Signal im Zellkern detektiert wird. Das „overlay“ (siehe Abbildung 5.21, D) verdeutlicht, dass Iporin und Tesmin A im Bereich um den Zellkern kolokalisieren, wie es bereits für das zytoplasmatische Tesmin „full length“ und Iporin beschrieben werden konnte (siehe Abbildung 5.19). Entsprechend wurde der Ansatz mit dem pEGFP-IJ-Tesmin „full length“ Konstrukt wiederholt. 20 Stunden nach der Transfektion mittels Polyfect wurden die HeLa SS6 Zellen mit 100 μ M Cadmiumchlorid behandelt und 5 bzw. 7 Stunden später fixiert. Zellen, die 5, bzw. 7 Stunden nach Cadmiumchlorid-Zugabe fixiert worden sind, zeigten die gleiche Lokalisation von Tesmin „full length“ und Iporin. Zur Überprüfung der Iporin Lokalisation wurde das endogene Iporin mittels des polyklonalen 1179_{affi} Antikörpers detektiert und ist in der folgenden Abbildung rot dargestellt. Tesmin „full length“ ist grün dargestellt und die Zellkerne blau. Die Lokalisationsstudien wurden ebenfalls in Cos 7 Zellen mit gleichem Ergebnis wiederholt (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Immunfluoreszenz-Analyse erfolgte mit dem Leitz Diaplan Fluoreszenzmikroskop.

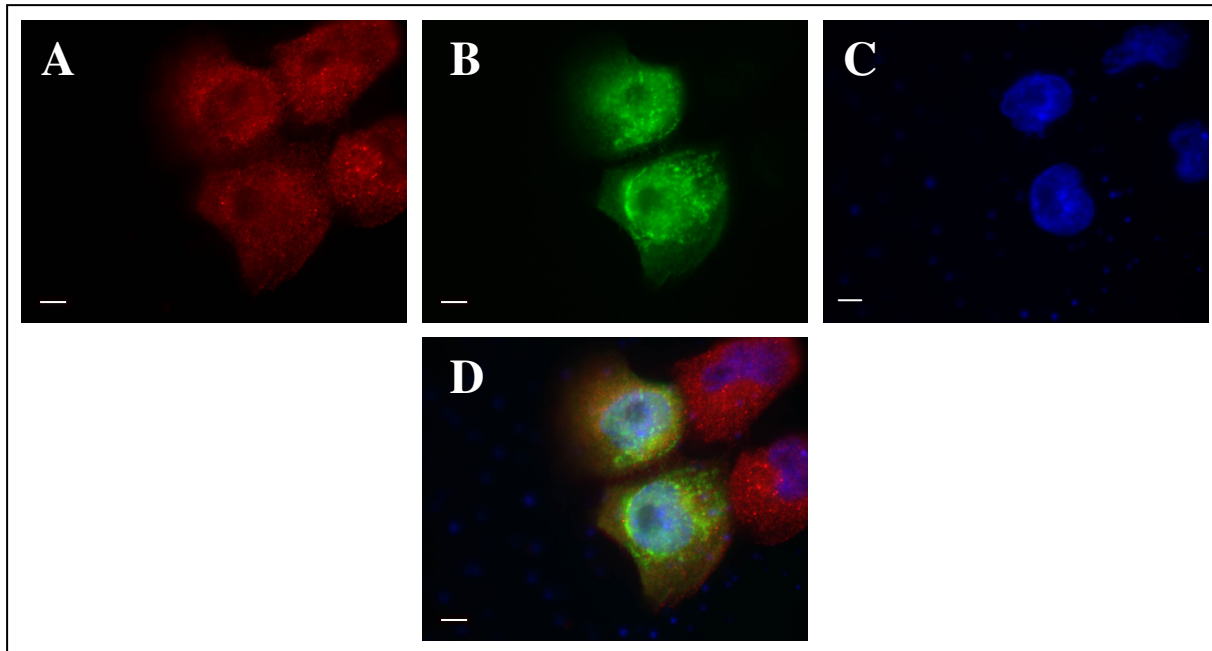


Abb. 5.22: Translokation von EGFP-IJ-Tesmin „full length“ in den Zellkern nach Induktion mit Cadmiumchlorid

HeLa SS6 Zellen wurden mittels Polyfect mit pEGFP-IJ-Tesmin „full length“ transient transfiziert, 20 h danach 100 μ M Cadmiumchlorid dazugegeben und 7 Stunden später fixiert. Das endogene Iporin wurde mit dem polyklonalen 1179_{affi} (1:1000) nachgewiesen und als sekundärer Antikörper der Cy3 gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1:1000) eingesetzt. Die Zellkerne wurde mittels DAPI (1:10000) sichtbar gemacht. Der Balken entspricht 10 μ m.

A: endogenes Iporin; **B:** EGFP-IJ-Tesmin „full length“; **C:** Zellkerne **D:** „overlay“ von A, B und C

Entsprechend der Verkürzungsmutante Tesmin A verlagert sich auch das Tesmin „full length“ Signal zum bzw. in den Zellkern (siehe Abbildung 5.22, B) und kolokalisiert mit dem Iporinsignal im Zellkern nahen Bereich (siehe Abbildung 5.22 D). Das Iporinsignal ist ubiquitär in der Zelle verteilt, akkumuliert stärker am Zellkern und ein schwaches Signal konnte im Zellkern detektiert werden (siehe Abbildung 5.22, A).

Es kann so zusammengefasst werden, dass sowohl die Verkürzungsmutante Tesmin A sowie das „full length“ Protein gleich dem Maus-Homolog zytosolisch ubiquitär verteilt sind und nach einer Induktion mit Cadmiumchlorid, wie postuliert, in den Zellkern wandern (Matsuura et al., 2002). Iporin zeigt eine zytosolische Verteilung, mit einer stärkeren Akkumulation um den Zellkern und einem schwachen Signal im Kern, wobei weder die Zugabe von Cadmiumchlorid, d.h. eine Induktion von Apoptose, noch eine dadurch bedingte Translokation von Tesmin eine signifikante Veränderung des Signals bewirken.

5.8. Subzelluläre Verteilung von Iporin und Tesmin

Mit Hilfe des „yeast two-hybrid assays“ konnte eine Interaktion zwischen Iporin und Tesmin nachgewiesen werden und mittels des „GST-pull downs“ und Lokalisationsstudien mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik bestätigt werden (siehe 5.6. „Neuer Iporin spezifischer Interaktionspartner: Tesmin“). Zur Bestimmung der subzellulären Verteilung beider Proteine in einzelnen Kompartimenten wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe des Percoll-Gradienten, wie von Czekay et al. beschrieben und Press et al. modifiziert, durchgeführt (Czekay et al., 1997; Press et al., 1998). Hierfür wurden Cos7 Zellen mittels Polyfect mit dem Konstrukt pEGFP-IJ-Tesmin „full length“ transient transfiziert und 24 Stunden danach aufgearbeitet. Für die Darstellung der subzellulären Lokalisationsänderung von Tesmin, bedingt durch die Schwermetall-Induktion, wurden die Zellen 20 Stunden nach

Transfektion für 5 Stunden mit Cadmiumchlorid behandelt und folgend aufgearbeitet. Jeweils zwei konfluent bewachsene Zellkulturschalen, Durchmesser 10 cm, wurden für eine Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie unter 4.4.4. „Percoll-Gradient“ beschrieben. Ebenso wurde überprüft, ob Iporin und Tesmin in gleichen Fraktionen vorkommen. Da das endogene GM130 und das Iporinsignal in den aufgearbeiteten transfizierten Cos7 Zellen aufgrund einer zu geringen Proteinkonzentration sehr schwach war, wurde eine konfluent mit HeLa SS6 Zellen bewachsene Schale (\varnothing 25 cm) aufgearbeitet. Neben der Detektion von Iporin mit dem polyklonalen 1179_{affi} Antikörper wurde ebenfalls GM130 detektiert, um so mit Hilfe eines bereits charakterisierten Proteins Aussagen über die Lokalisation treffen zu können. Weiterhin wurde PDI, d.h. „protein disulfide isomerase“, als Markerprotein für das Endoplasmatische Retikulum eingesetzt (Freedman et al., 1994; Pfeffer, 2003).

Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Protein- bzw. „Tag“-spezifischen Antikörper und der „Western Blot“ Methode (siehe 4.5.3. „Western Blot“). Die Ergebnisse sind der folgenden Abbildung zu entnehmen.

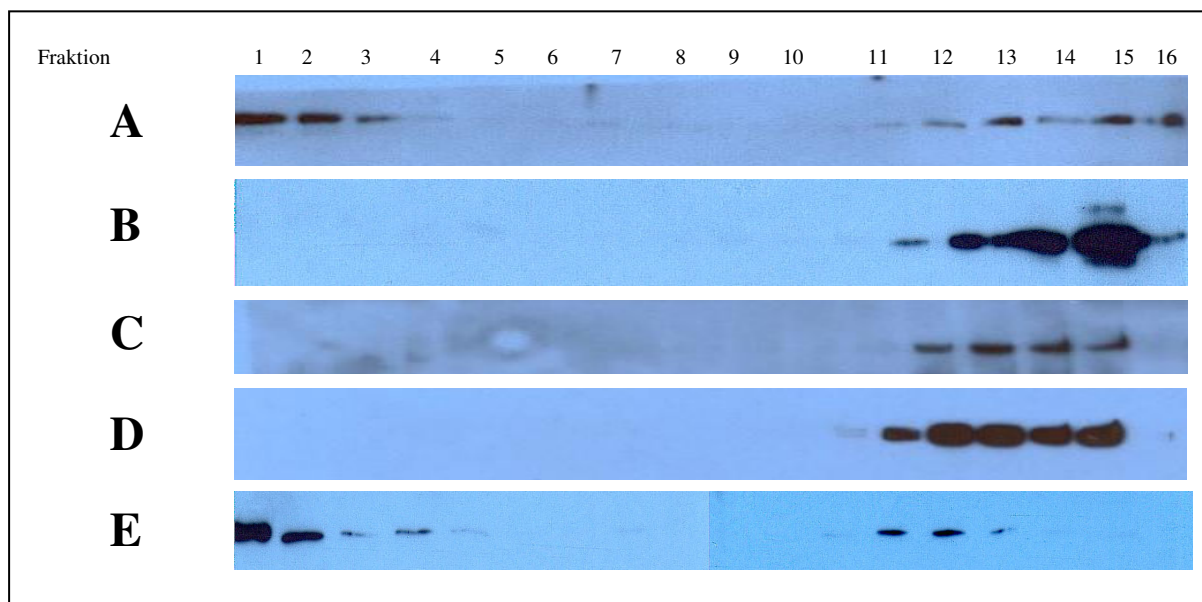


Abb. 5.23: Dichtegradienten-Zentrifugation

EGFP-IJ-Tesmin „full length“ überexprimierende Cos7 Zellen (ohne und mit Zugabe von Cadmiumchlorid) und HeLa SS6 Zellen wurden aufgearbeitet und der PNS in einem 20 %-igen Percoll-Gradienten aufgetrennt. Nach einer Zentrifugation von 2 Stunden bei 20 000 x g wurden jeweils 10 μ l der Fraktionen 1-16 auf 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen. Zur Detektion wurden folgende Antikörper eingesetzt: HA-spezifischer 16B12 Antikörper, eingesetzt zur Detektion des EGFP-IJ-Tesmin „full length“ Proteins (1:1000); der polyklonale Iporin Antikörper 1179_{affi} (1:4000); anti-GM130 (1:250) und anti-PDI_{Hybridomaüberstand} (1:10). Als Sekundäntikörper wurden das HRP-gekoppelte anti-Kaninchen IgG (1:1000) und das anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

A: Cos7 EGFP-IJ-Tesmin „full length“ (MG = 83 kDa; Expositionszeit: 15 min); **B:** Cos7 EGFP-IJ-Tesmin „full length“, 20 h nach Transfektion Zugabe von 100 μ M Cadmiumchlorid für 5 h (MG = 83 kDa; Expositionszeit: 5 min); **C:** HeLa SS6 Iporin_{endogen} (MG = 220 kDa; Expositionszeit: 15 min); **D:** HeLa SS6 GM130_{endogen} (MG = 130 kDa; Expositionszeit: 5 min); **E:** Cos7 EGFP-IJ-Tesmin „full length“ PDI_{endogen} (MG = 57 kDa; Expositionszeit: 10 min)

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse konnte die subzelluläre Lokalisation von Tesmin „full length“ in unbehandelten Zellen und Cadmiumchlorid behandelten Zellen bestimmt werden (siehe Abbildung 5.19 und 5.22). Die Dichtegradienten-Zentrifugation bestätigte, dass Tesmin in den nicht behandelten Zellen in den vorderen Fraktionen 1-4, aber auch in den Fraktionen 11-16 exprimiert wird (siehe Abbildung 5.23 A). Charakterisiert durch PDI (siehe

Abbildung 5.23 E) können die ersten Fraktionen als lösliches Protein charakterisiert werden und die hinteren Fraktionen mittels GM130 (siehe Abbildung 5.23 D) als membrangebundene Kompartimente. In Cadmiumchlorid behandelten Zellen konnte ein Tesminsignal nur in den Fraktionen 12-16 detektiert werden, wobei eine besonders hohe Proteinansammlung in der Fraktion 15 detektiert werden konnte (siehe Abbildung 5.23 B). Die zellulären Bestandteile werden bei der Homogenisierung mit einer 27G Nadel (siehe 4.4.4. „Percoll Gradient“) größtenteils zerstört, jedoch verbleiben z.T. noch einige intakte Nuclei an Membranbestandteile gebunden, die das starke Signal in der Fraktion 15 erklären könnten. Diese Ergebnisse stützen die Immunfluoreszenzanalysen, da das Tesminsignal nach Induktion nur noch in den Fraktionen, die als membrangebundene Kompartimente charakterisiert werden konnten, detektiert werden kann. Überraschenderweise konnte das Iporinsignal nur in den Fraktionen 12-15 detektiert werden. Die Verteilung korreliert zwar mit der Verteilung seines Interaktionspartners GM130 (siehe 5.4. „Neuer Interaktionspartner von Iporin: GM130“), steht aber im Widerspruch mit der hauptsächlich zyttoplasmatischen Lokalisation von Iporin (Bayer et al., 2005).

5.9. Analyse der Membranassoziation von Tesmin „full length“

Die Immunfluoreszenzanalysen verdeutlichten, dass Tesmin in unbehandelten Zellen größtenteils im Zytoplasma verteilt ist, jedoch am Zellkern bzw. in Bereichen des Golgi Apparates stärker akkumuliert ist (siehe Abbildung 5.19). Mit Hilfe der Zytosol-Membran-Fraktionierung sollte, unterstützend zu der Analyse der Dichtegradienten-Zentrifugation, geklärt werden, in wieweit Tesmin membranassoziiert ist bzw. zytosolisch verteilt ist und ob sich das Signal nach Behandlung der Zellen mit Cadmiumchlorid verlagert.

Hierfür wurden jeweils 2 konfluent bewachsene Cos7 Zellkulturschalen (Ø 10 cm) mittels Polyfect mit pEGFP-IJ-Tesmin „full length“ transfiziert, 24 Stunden danach aufgearbeitet, bzw. mit 100 µM Cadmiumchlorid versetzt und weiter 5 Stunden inkubiert. Der hergestellte PNS wurde durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte in eine Zytosolfraktion (S100) und zwei Membranfraktionen, P14 (große Membranen; hier nicht gezeigt) und P100 (kleine Membranen) getrennt (siehe 4.4.3. „Zytosol-Membran-Fraktionierung“). Das rekombinante Protein EGFP-IJ-Tesmin „full length“ der Größe ca. 83 kDa konnte in der folgenden „Western Blot“ Analyse nachgewiesen werden.

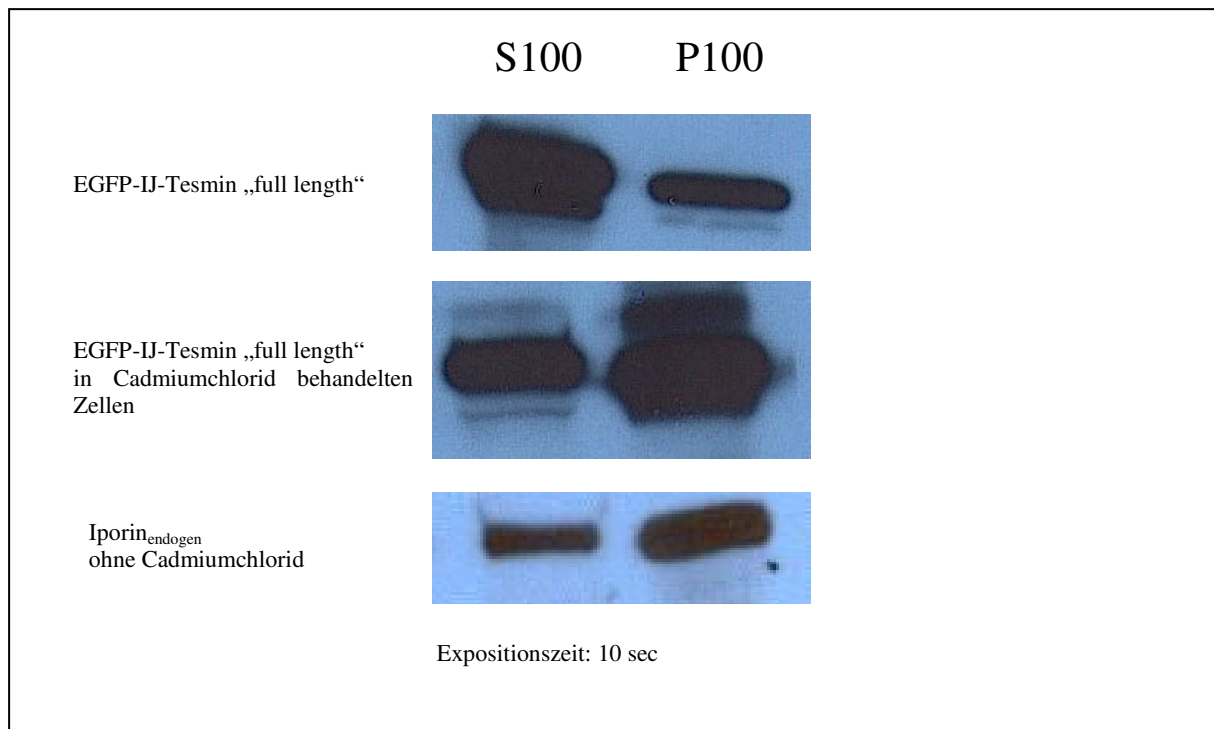


Abb. 5.24: Zytosol-Membran-Fraktionierung des rekombinanten Tesmin „full length“ Proteins ohne bzw. nach Cadmiumchloridbehandlung und des endogenen Iporins

EGFP-IJ-Tesmin „full length“ überexprimierende Cos7 Zellen (ohne und mit Zugabe von Cadmiumchlorid) und unbehandelte Cos7 Zellen wurden aufgearbeitet und mit dem PNS eine Zytosol-Membran-Fraktionierung durchgeführt. Die Fraktionen wurden auf einem 7,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und zur Detektion des EGFP-IJ-Tesmin „full length“ Proteins der 16B12-Antikörper (1:1000) und des endogenen Iporins der Antikörper 1179_{aff.} (1:4000) eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden das HRP-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG (1:1000) und das anti-Maus IgG (1:1000) eingesetzt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem „Uptilight HRP Blot Substrat“.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse (siehe Abbildung 5.19 C) und der Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe Abbildung 5.23 A) konnten bereits zeigen, dass Tesmin „full length“ in Zellen, die nicht mit Cadmiumchlorid behandelt worden sind, im Zytosol ubiquitär verteilt ist und z.T. in Zellkernnähe angereichert ist. Entsprechend verdeutlichen die Ergebnisse der Zytosol-Membran-Fraktionierung, dass Tesmin in der löslichen Fraktion (S100) stärker vertreten ist als in der Pelletfraktion (P100) und sich dieses Verhältnis in Zellen, die mit Cadmiumchlorid behandelt worden sind, ändert (siehe Abbildung 5.24). Zum Vergleich ist die Verteilung des endogenen Iporins in nicht transfizierten Cos7 Zellen gezeigt. Wie bereits publiziert wurde, ist Iporin in beiden Fraktionen vertreten, jedoch verstärkt in der Pelletfraktion (P100) (siehe Abbildung 5.24; Bayer et al., 2005).

Alle in dieser Arbeit durchgeführten „Western Blot“; Immunfluoreszenz und immunhistochemischen Analysen sowie Kotransformationen des Hefestammes Y190 wurden mindestens zweimal wiederholt, um die hier aufgeführten Ergebnisse zu bestätigen.

6. Diskussion

Das Verständnis der molekularen Basis für die Organisation der exo- und endozytotischen Membrantransportvorgänge in eukaryotischen Zellen birgt trotz hervorragender Fortschritte noch zahlreiche ungeklärte Fragen. So trennen Membranen subzelluläre Kompartimente voneinander, welche ihre Charakteristika erst durch die Phospholipid Zusammensetzung und integrale sowie periphere Proteine erhalten. Diese Kompartimente sind keine starren Gebilde sondern dynamische Strukturen, die miteinander mittels kontinuierlicher und spezifischer Kommunikation in Form von Vesikeln in Verbindung stehen. Um diesen steten Austausch zu gewährleisten, müssen zahlreiche Protein/Proteininteraktionen stattfinden. Zwei große Proteinfamilien tragen entscheidend zu der Signifikanz des vesikulären Transportes bei: das sind zum einen die Rab GTPasen und zum andern SNARE Proteine (Deneka et al., 2003; Hong, 2005).

Rab Proteine fungieren in Zellen als molekulare Schalter, indem sie in der aktiven, GTP gebundenen oder der inaktiven, GDP gebundenen Form vorliegen, und können so einzelne Prozesse sowohl zeitlich und auch räumlich trennen, indem sie mit unterschiedlichen Effektoren Komplexe eingehen (Miaczynska und Zerial, 2002). Gurkan et al. haben im Gegensatz zu den herkömmlichen molekularbiologischen Methoden das Membrane-Projekt vorgestellt, wobei eine Klassifizierung einzelner Transportkomponenten durch Untersuchungen ihrer mRNA Expression in unterschiedlichen Geweben vorgenommen wurde. Erste Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass in fast allen Prozessen Rab Proteine den Mittelpunkt bildeten (Gurkan et al., 2005). Im Zentrum meiner Arbeit stand die molekulare und biochemische Charakterisierung von Iporin, einem neu beschriebenen Interaktionspartner der kleine GTPase Rab1.

6.1. Detektion von Iporin in Gewebelysaten

Die Expression des neuen Interaktionspartners von Rab1, Iporin, konnte mit Hilfe der „Northern Blot“ Technik und RT-PCR (Daten hierüber können für den Klon KIAA0375 vom Kazusa DNA Research Institute, Japan bezogen werden) größtenteils auf Gehirn, Niere, Hoden und Ovarien eingeschränkt werden (Bayer et al., 2005). Wie bereits in der Einleitung (siehe 1.7. „Neuer Rab1 Interaktionspartner: Iporin“) und von Katoh und Katoh beschrieben, zeigt das Maus Iporin eine hohe sequenzielle sowie strukturelle Homologie zu dem humanen Protein (Katoh und Katoh, 2004). So war es möglich, zur Bestätigung der Gewebeexpression von Iporin mittels der „Western Blot“ Analyse und des polyklonalen Iporin Antikörpers 1179 die Verteilung des Iporin Proteins sowohl in humanem und murinem Gehirn- und Hodengewebe, sowie in murinem Ovariengewebe zu untersuchen. Bereits in der Veröffentlichung von Bayer et al. wurde die Diskrepanz des berechneten Molekulargewichts von Iporin von ca. 160 kDa und des beobachteten Molekulargewichts von ca. 220 kDa diskutiert, dass posttranslationale Modifikationen, ggf. im N-terminalen Bereich zu der Erhöhung des Molekulargewichts führen könnten (Bayer et al., 2005). So detektieren der affinitätsgereinigte Iporin Antikörper 1179 in lysierten HeLa SS6 Zellen (Daten nicht gezeigt) sowie der 16B12 Antikörper, der gegen das HA-Epitop gerichtet ist, in Zelllysaten, die HA Iporin „full length“ überexprimieren, neben einem 160 kDa Signal auch ein 220 kDa Signal (vgl. Abbildung 5.7 Spur 3).

Wie der Abbildung 5.1 zu entnehmen ist, konnte in lysiertem murinen und humanen Hodengewebe ein stärkeres Signal auf der Höhe von 220 kDa und ein schwächeres auf der Höhe von 160 kDa detektiert werden. Im Gegensatz hierzu konnte in lysiertem murinen und humanen Gehirngewebe (siehe Abbildung 5.2) ein sehr schwaches 120 kDa Signal detektiert werden und ein starkes 220 kDa Signal nur im Mausgehirn. Intensive Recherchen konnten bis heute keine Hinweise auf eine mögliche „splice“ Variante liefern, so dass die Detektion einer 120 kDa Proteins mittels des 1179 Antikörpers noch weiterer Untersuchungen bedarf (Katoh

und Katoh, 2004). Ebenso kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass das Signal der Größe 120 kDa unspezifisch ist.

Ein Ansatz, den Unterschied der Signalstärken zwischen dem murinen und dem humanen Gewebe zu erklären könnte sein, dass das murine Hoden- und Gehirngewebe bereits in Lysis-Puffer E ohne SDS und DOC aufgearbeitet vorlag und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert worden ist, so dass ein Proteinabbau aufgrund der Lagerungszeit und des wiederholten Ein- bzw. Auftauvorgangs möglich ist. Das murine Gewebe wurde frisch aufgearbeitet (siehe 4.6.1. „Herstellung von Gewebeextrakten“) und folgend der „Western Blot“ Analyse unterzogen. So ist ein direkter Vergleich der Expressionstärke nicht möglich, denn hierfür hätten die murinen und humanen Gewebe parallel entnommen, aufgearbeitet und analysiert werden müssen. Eine weitere Überlegung ist, dass der polyklonale affinitätsgereinigte Iporin Antikörper 1179 eine höhere Affinität zu dem Maus Iporin aufweist als zu dem humanen Protein.

Der Vergleich der Expressionsstärke des 220 kDa Iporinsignals in Maushodengewebe zu Mausgehirngewebe zeigt eine etwas stärkere Proteinexpression im adulten Maushoden. Dieses Ergebnis geht einher mit den „Northern Blot“ Ergebnissen zur Analyse der Iporin mRNA, die ebenfalls die höchste Expressionsrate im Hodengewebe vorhersagen (Bayer et al., 2005).

In einem weiteren Ansatz wurde die Iporin Expression in murinem Ovariengewebe untersucht. So konnte nach einer Expositionszeit von 15 min im Gewebe der 3 Tage alten Maus ein Signal bei 160 kDa und ein etwa gleich starkes Signal bei 220 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 5.3 Spur 1), während im Gewebe der 3 Monate alten Maus ein deutlich abgeschwächtes 220 kDa Signal und ein sehr schwaches 160 kDa detektiert wurde (vgl. Spur 2). Erwähnenswert ist, dass die Expression von Iporin mit der Expression von Tesmin, dem von mir beschriebenen neuen Testis-spezifischen Interaktionspartner von Iporin (siehe 1.9. „Tesmin“), während der frühen Stadien der Prophase I in der Oogenese korreliert (Olesen et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Ansätze unternommen, die Iporin Expression im fötalen Hodengewebe zu analysieren, um ggf. eine entwicklungspezifische Iporin Expression während der Spermatogenese zu untersuchen. Im Gegensatz zu der Oogenese vermehren sich die Spermatozyten in Folge mitotischer Teilung und erreichen die Meiose, d.h. das Prophase I Stadium erst während der Pubertät (Bellvé et al., 1977). So konnten erste Ergebnisse zeigen, dass die Iporin Expression in fötalem Hodengewebe sehr niedrig war. Allerdings lag mir nicht genügend Gewebe vor, so dass eine Wiederholung notwendig wäre, um diese Beobachtung zu bestätigen. Für eine genaue Zuordnung der Iporin Expression während der meiotischen Vorgänge der Oogenese, bzw. der Spermatogenese wäre es allerdings notwendig, parallel ein Protein zu detektieren, das spezifisch während dieser Phase exprimiert wird. Ein Beispiel hierfür wäre Nek1, eine Kinase, die sowohl in Oozyten und auch in Spermatozyten während der Prophase exprimiert wird (Letwin et al., 1992).

In einer erst kürzlich erschienenen Dissertation von Bućko-Justyna wurde gezeigt, dass Iporin, auch als RUSC2 bezeichnet, mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems als ein neuer Interaktionspartner der Testis-spezifischen Serin-Threonin Kinase 3 (TSSK3), die spezifisch im Hoden, bzw. den Leydig Zellen exprimiert wird, identifiziert werden konnte (Zuercher et al., 2000; Katoh und Katoh, 2004). Die mRNA Expressionsrate von TSSK3 ist während der Geburt sehr niedrig und steigt während der Pubertät bis ein Maximum im Erwachsenenalter erreicht ist, wobei bisher keine biologische Funktion des Proteins beschrieben werden konnte. Die Interaktion zu TSSK3 wird über den C-terminalen Teil von Iporin vermittelt und ist unabhängig von der Kinase Aktivität von TSSK3, so dass Iporin nicht als Substrat dient. Interessanterweise konnte eine signifikante Erhöhung der Bindungsrate zwischen den beiden Proteinen als Folge von oxidativem Stress, hier ausgelöst durch H_2O_2 , erreicht werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) nach H_2O_2 Exposition durch die MAP Kinase Kinase (MKK4) phosphoryliert und so aktiviert

wird, folgend Iporin/RUSC2 an mehreren, bisher nicht charakterisierten Positionen sowohl im N- und im C-Terminus phosphoryliert und recht schnell wieder aus dem Stress-induzierten Komplex, in den auch TSSK3 involviert ist, dissoziiert (Lawler et al., 1998; Davis, 2000; Karin und Gallagher, 2005). So wurde postuliert, dass TSSK3 eine „downstream“ Komponente der JNK Signalkaskade während einer zellulären Stressantwort darstellt und die TSSK3-Iporin/RUSC2 Interaktion zur Spezifität der TSSK3 Signalweiterleitung beiträgt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Insulininduktion in Zellen, die H-Ras überexprimieren zu einer leichten Erhöhung der Iporin/RUSC2 Proteinexpression führt und mit Hilfe der Immunopräzipitation konnte eine Interaktion zwischen der GTP-gebundenen Form von H-Ras mit der Deletionsmutante, welche die SH3 Domäne von Iporin/RUSC2 enthält, in der SDS „page“, ebenfalls begleitet durch einen leichten Mobilitäts-„shift“ dieser Deletionsmutante, bestätigt werden (Shih et al., 1978; Medema et al., 1993). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass diese Ras-Iporin/RUSC2 Interaktion indirekt ist, denn SH3 Domänen interagieren mit Prolin-reichen Domänen, die im Ras Protein nicht präsent sind (Sudol, 1996). Eine Überexpression der inaktiven H-Ras Mutante führte in H₂O₂ behandelten Zellen zu einer reduzierten Interaktion zwischen JNK und Iporin/RUSC2. Interessanterweise konnte aber eine starke Interaktion zwischen dem H-Ras Wiltyp Protein und Iporin/RUSC2 in H₂O₂ behandelten Zellen beobachtet werden, die durch Überexpression einer dominant negativen MKK4 Mutante unterbunden werden konnte. So wird daraus geschlossen, dass H-Ras „upstream“ von JNK in der Signalkaskade agiert, die zur Aktivierung von JNK führt und „downstream“ von JNK eine Bindung mit RUSC2 eingeht (Bućko-Justyna, 2005). In diesem Zusammenhang wurde allerdings nur ein schwacher Mobilitäts-„shift“ von Iporin/RUSC2 als Folge der JNK abhängigen Phosphorylierung angesprochen, so dass erst weitere Experimente zur Klärung beitragen können, was sich hinter dem 220 kDa Signal verbirgt. So wäre es möglich, dass Iporin als Folge einer Stressinduktion phosphoryliert und dadurch eine Interaktion zu Rab1 inhibiert wird, was Auswirkung auf den vesikulären Transport hätte.

6.2. Lokalisation von transfizierten Iporin Verkürzungsmutanten

Wie von Bayer et al. beschrieben, ist die RUN Domäne von Iporin das zentrale Motiv und vermittelt die Anheftung an Rab1 (Bayer et al., 2005). Es konnten bereits zahlreiche andere Proteine beschrieben werden, die eine Run Domäne enthalten, wie z.B. Rabip4, ein Rab4 Effektor, RPIP8, ein Rap2 Effektor, MAP („merlin-associated protein“) und CIP85 („Cx43-interacting protein of 85-kDa“), die unterschiedliche Funktionen aufweisen (Janoueix-Lerosey et al., 1998; Callebaut et al., 2001; Mari et al., 2001; Lee et al., 2004; Lan et al., 2005). Interessanterweise konnte für Nesca, das ebenfalls neben einer SH3 Domäne eine RUN Domäne enthält, eine zeitlich geregelte Translokation in Nnr5 Zellen, die seinen direkten Interaktionspartner trkA überexprimieren, aus dem Zytosol an die Kernmembran in Abhängigkeit des „nerve growth factors“ beschrieben werden, wobei die RUN Domäne für die Translokation entscheidend ist. Zusätzlich ergab eine Zellfraktionierung, dass geringe Mengen des Nesca Proteins auch in der Kernfraktion detektiert werden konnten. Es konnte jedoch keine Translokation ohne vorherige Induktion oder von überexprimierten Deletionsmutanten beobachtet werden (MacDonald et al., 2004).

In diesem Zusammenhang habe ich Deletionsmutanten, einkloniert in den Expressionsvektor pSV HA bzw. pSV myc, in HeLa SS6 Zellen überexprimiert. Im Vergleich zu der Iporin Mutante, welcher der N-Terminus fehlt und die überwiegend im Zellkern lokalisiert ist (siehe Abbildung 5.5 A), findet sich die Deletionsmutante, welcher der C-Terminus fehlt, im Zytosol (siehe Abbildung 5.5 B). Diese unterschiedliche Lokalisation wurde bereits von Bayer et al. beschrieben. Zellen, welche die Iporin Deletionsmutante HA Δ N847 bzw. HA Δ C853 überexprimierten, wurden einer Zytosol-Membran-Fraktionierung unterzogen. Die Mutante HA Δ N847 war stärker in der Membranfraktion (P100) vertreten und die Mutante HA Δ C853 verstärkt in der zytosolischen Fraktion (S100) (Bayer et al., 2005).

So kann die eingangs gestellte Frage, welcher Bereich von Iporin für die zelluläre Lokalisation des Proteins verantwortlich ist, damit beantwortet werden, dass sowohl der N- sowie der C-Terminus wichtig sind. Überwiegend deckt sich das endogene Iporinsignal mit dem Signal der überexprimierten $\Delta C853$ ($\Delta 10$) Mutante, die allerdings nicht im Kern, wie das der Fall für $\Delta 847$ ($\Delta 1$) war, detektiert werden konnte. Da die $\Delta N847$ ($\Delta 1$) Mutante neben der RUN Domäne einen poly E und einen poly P-„stretch“ sowie eine SH3 Domäne aufweist (siehe Abbildung 5.4), wurde eine weitere Mutante, Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) eingesetzt, welche aus der RUN Domäne (AS 1031-1175) und einigen flankierenden Aminosäureresten besteht. Entsprechend der beobachteten Iporin HA $\Delta N847$ ($\Delta 1$) Verteilung im Nukleus, konnte in HeLa SS6 Zellen, die myc Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) überexprimieren, ebenfalls ein deutliches Signal im Zellkern und ein schwaches Signal im Zytoplasma (siehe Abbildung 5.6 A und B) detektiert werden. So konnte gezeigt werden, dass die RUN Domäne die Kernlokalisierung von Iporin, ähnlich wie es für Nesca beschrieben wird, dirigiert und die weiteren Strukturmodule, wie z.B. die SH3 Domäne, die im C-terminalen Bereich von Iporin liegen, dafür nicht notwendig sind (MacDonald et al., 2004). Bis heute konnten weder „splice“-Varianten noch verkürzte Proteine gefunden und beschrieben werden, die den N- oder C-Terminus des humanen Iporin-Proteins repräsentieren oder Induktoren, ähnlich zu NGF und Nesca, die eine Translokation des Proteins bewirken würden (Katoh und Katoh, 2004; MacDonald et al., 2004). Ein weiteres Beispiel, dass die RUN Domäne für die zelluläre Lokalisation eines Proteins mitverantwortlich ist, konnte für Rabip4, einen direkten Interaktionspartner der kleinen GTPase Rab4 beschrieben werden, wobei die Interaktion zwischen den beiden Proteinen nicht über die RUN Domäne vermittelt wird. Es konnte in CHO Zellen gezeigt werden, dass Rabip4 mit dem „early endosome antigen 1“ (EEA1) kolokalisiert und somit mit frühen Endosomen assoziiert ist (Mills et al., 1998). Die Koexpression von Rab4 und Rabip4 führt zu vergrößerten Endosomen (Cormont et al., 2001). Rabip4 enthält eine N-terminal gelegene RUN Domäne, zwei „coiled-coil“ Bereiche und ein C-terminal lokalisiertes FYVE Fingermotiv. Das FYVE Fingermotiv bindet charakteristischerweise Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PtdIns(3)P) und begründet somit die Funktion des Proteins. Eine Überexpression der Mutante, die aus dem FYVE Fingermotiv besteht, konnte in der zytosolischen Fraktion detektiert werden, während eine Mutante, die aus der RUN Domäne besteht, überwiegend im Pellet detektiert wurde, wie es auch für das Gesamtprotein gezeigt werden konnte (Burd und Emr, 1998; Gaullier et al., 1998; Mari et al., 2001).

Ein wichtiger Aspekt ist, dass viele Proteine, die in den Kern transportiert werden, ein Kernlokalisierungssignal (NLS = „nuclear localization signal“) besitzen (Mattaj und Englmeier, 1998). Strukturelle Analysen mit Hilfe von cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS/ konnten für Iporin kein NLS finden, so dass Iporin entweder unabhängig von einer NLS in den Nukleus translokalisiert oder ein ungewöhnliches NLS besitzt, dessen Sequenz noch entschlüsselt werden muss. Ebenso besitzt Nesca kein NLS, in diesem Fall wurde postuliert, dass die RUN Domäne die nukleäre Lokalisation dirigiert (MacDonald et al., 2004).

Ein weiterer Denkansatz ist, dass Iporin aufgrund eines Signals gespalten werden könnte und dass nur der C-Terminale Bereich in den Kern translokalisiert. Ein Beispiel für solche Regulationen stellt p115 dar. Während apoptotischer Vorgänge wird der Golgi Apparat fragmentiert, um einen unregulierten exozytotischen Proteintransport zu verhindern (Maag et al., 2003). So wird mitunter p115 von Caspase 3 und 8 in zwei Teile gespalten, wobei der C-terminale Bereich in den Zellkern translokalisiert und hier einen pro-apoptotischen Effekt ausübt. Ebenso wie Iporin und Nesca besitzt p115 kein NLS (Chiu et al., 2002). Zellen, welche die Iporinmutante $\Delta N847$ ($\Delta 1$) überexprimierten, zeigten jedoch keine veränderte Morphologie auf, die auf einen pro-apoptotischen Effekt dieser Deletionsmutante schließen lassen würde. Da die Zellen allerdings 24 Stunden nach der Transfektion aufgearbeitet wurden, wäre es sinnvoll, die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten aufzuarbeiten, wie z.B. nach

30, 36 und 48 Stunden und dann die Morphologie zu überprüfen. Parallel sollten Zellen mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert werden, um mögliche Veränderungen der Zellmorphologie auf den Einfluß der Überexpression bzw. Migration der $\Delta N847$ ($\Delta 1$) Mutante zu überprüfen. So wurden im Zusammenhang mit der Schwermetall induzierten Translokation von Tesmin HeLa SS6 Zellen mit Cadmiumchlorid behandelt (siehe Abbildung 5.20), wobei aber 5 Stunden nach der Induktion keine Veränderung des Iporinsignals beobachtet werden konnte. In wieweit eine Spaltung des Iporin Proteins *in vivo* erfolgt, bzw. Caspasen hierbei eine Rolle spielen könnten, müsste in weiteren Ansätzen erforscht werden. Obwohl Cadmium als ein Auslöser der Apoptose bekannt ist, der in C6 Zellen mitunter zur Aktivierung der Caspase 9, einer Initiatorcaspase führt, konnte keine Veränderung des Iporinsignals beobachtet werden (Shi, 2002; Watjen et al., 2002). So könnten einerseits andere Induktoren der Apoptose eingesetzt werden, wie z.B. Staurosporin oder Etoposid oder andererseits Caspasen in Zellen überexprimiert werden, um so ggf. eine Spaltung von Iporin oder eine Translokation in der Zelle zu detektieren.

6.3. Dimerisierung von Iporin

Es konnte bereits für andere Interaktionspartner von Rab1B, wie p115, GM130, Golgin-84 und Giantin, die in den vesikulären Transport involviert sind, beschrieben werden, dass sie Homodimere bilden, um so ihre Funktionen besser ausüben zu können (Sapperstein et al., 1995; Nakamura et al., 1997; Bascom et al., 1999; Lupashin und Sztul, 2005). So konnten Beard et al. experimentell nachweisen, dass eine Rab1-p115 Bindung über die Schwanzdomäne von p115 vermittelt wird, wobei die „coiled-coil“ Domäne 1 zwar notwendig, aber nicht ausreichend für eine Bindung ist. Sie postulierten, dass möglicherweise, neben einer gleichzeitigen Anheftung von GM130 oder Giantin, die homodimere Struktur von p115 entscheidend für eine Bindung mit Rab1 wäre (Beard et al., 2005).

Interessanterweise konnten Matsuda et al. für Nesca/RUSC1 und Katoh und Katoh für Iporin/RUSC2 ein Leucin-„zipper“ Motiv beschreiben (Matsuda et al., 2000; Katoh und Katoh, 2004). Leucin-„zipper“ Motive sind generell als Motive bekannt, die eine „coiled-coil“ oder superhelikale Struktur aufweisen und mitunter Dimerisierungen von Proteinen vermitteln, wodurch den Proteinen spezifische Funktionen verliehen werden. Charakteristischerweise weist die Sequenz an jeder siebten Position die Aminosäure Leucin auf, wobei die Anzahl der Wiederholungen zwischen 3 und 6 variiert (siehe 5.3. „Iporin Homodimerisierung“; Lupas, 1996; Bornberg-Bauer et al., 1998). Das Leucin-„zipper“ Motiv von Iporin umfasst 22 Aminosäurereste mit 4 Leucinresten an der jeweiligen siebten Position und erstreckt sich von AS 1152-1173, d.h. es ist Teil der RUN Domäne (AS 1031-11759). Im Vergleich hierzu umfasst das Leucin-„zipper“ Motiv von Nesca 31 Aminosäurereste (AS 174-204) und ist ebenfalls Teil der RUN Domäne (AS 53-197) (Matsuda et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob es sich bei dem Motiv von Iporin um einen funktionellen Leucin-„zipper“ handelt, bzw. ob Iporin in der Lage ist, Homodimere zu bilden. Mit Hilfe der EMBnet Software (www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) konnte keine eindeutige „coiled-coil“ Region für Iporin gefunden werden, das Programm „PROF predict secondary structure“ sagte aber, wie bereits für Nesca beschrieben, eine α -helikale Struktur vorher (Matsuda et al., 2000; Rost und Liu, 2003; Rost et al., 2004).

Um die Bildung von Homodimeren zu überprüfen, habe ich das „yeast two-hybrid“ System eingesetzt (vgl. Tabelle 5.1). In einem ersten Ansatz wurden Kotransformationen von Iporin „full length“ und einzelnen Iporin Deletionsmutanten (siehe Abbildung 5.4) durchgeführt. Bis auf die Mutanten $\Delta N847\Delta C992$ ($\Delta 4$), $\Delta N1122$ ($\Delta 8$) und $\Delta N1430$ ($\Delta 9$) interagierten alle weiteren Mutanten, welche die vollständige RUN Domäne besaßen stark mit Iporin „full length“. Eine besonders gute Interaktion konnte mit Iporin $\Delta N991\Delta C1177$ ($\Delta 5$) gezeigt werden, d.h. einer Mutante, die hauptsächlich aus der RUN Domäne besteht. So kann postuliert werden, dass Iporin in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren und hierfür die

RUN Domäne benötigt wird. Überraschend interagiert die Mutante $\Delta N1122$ ($\Delta 8$), die zwar nur den C-terminalen Bereich der RUN Domäne enthält, jedoch das α -helikale Sequenzmotiv (AS 1152-1173) beinhaltet, nicht mit Iporin „full length“. Es ist allgemein bekannt, dass ein Nachteil des „yeast two-hybrid“ Systems ist, dass einige Mutanten nicht korrekt gefaltet bzw. nicht in den Kern transportiert werden und es so zu keiner Interaktion kommen kann (Van Crielinge und Beyaert, 1999). Entweder trifft das auf die $\Delta 8$ Mutante zu oder es wird eine vollständige RUN Domäne für die Interaktion benötigt.

Eine Interaktion zwischen zwei „full length“ Proteinen konnte mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems nicht überprüft werden, da pAS Iporin „full length“ autoaktiv ist.

Ein zweiter Ansatz sollte klären, inwieweit zwei gleiche Motive von Iporin für die Homodimerisierung notwendig sind und ob ein oder mehrere Motive an dieser Interaktion beteiligt sind. Die durchgeführten Kotransformationen ergaben, dass alle Iporin Mutanten, d.h. $\Delta N 847$ ($\Delta 1$), $\Delta N847\Delta C1450$ ($\Delta 2$), $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) und $\Delta N991\Delta C1450$ ($\Delta 7$) mit sich selbst interagieren, die sowohl aus der RUN Domäne und einigen flankierenden Aminosäureresten bestehen. So konnte in der Hefe keine Interaktion zwischen Iporin $\Delta N991\Delta C1177$ ($\Delta 5$) bzw. $\Delta N991\Delta C1239$ ($\Delta 6$) detektiert werden, die zwar die vollständige RUN Domäne besitzen, aber kaum flankierende Aminosäurereste. Diese Ergebnisse der „yeast two-hybrid“ Analyse bestätigen, dass die RUN Domäne essentiell für eine Homodimerisierung ist, allerdings, ggf. nur in der Hefe, nicht ausreicht. Ein dritter Ansatz sollte zeigen, ob der N-Terminus eine Rolle für die Homodimerisierung spielt. So interagieren $\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 7$ mit $\Delta C853$ ($\Delta 10$), die neben der RUN Domäne den C-terminal gelegenen poly E und poly P-„stretch“ enthalten. Da die $\Delta 10$ Mutante einen weiteren poly P-„stretch“ enthält, könnte es sein, dass der Poly P-„stretch“ zusätzlich an einer Dimerisierung beteiligt ist und ggf. eine stabilisierende Wirkung übernimmt. Diese Hypothese sollte allerdings noch mit einer weiteren Methode überprüft werden.

Um die Ergebnisse des „yeast two-hybrid“ Systems zu bestätigen wurde eine „GST pull down“ Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 5.7). Hierfür wurde HA Iporin „full length“ in HeLa SS6 Zellen überexprimiert (siehe Abbildung 5.7 Spur 3) und die Deletionsmutanten Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) und $\Delta N1430$ ($\Delta 9$) als GST-Fusionsproteine eingesetzt. Bereits nach einer kurzen Expositionszeit konnte ein Iporin Signal bei 220 kDa und ein schwächeres bei 160 kDa detektiert werden, entsprechend der mitgeführten Positivkontrolle (siehe Abbildung 5.7 Spur 1). In Spur 2 konnte auch nach einer längeren Expositionszeit kein Signal detektiert werden. So bestätigt das „GST pull down“ Experiment, dass HA Iporin „full length“ an die Iporin Mutante $\Delta N847\Delta C1239$, welche die RUN Domäne beinhaltet, binden kann und keine Bindung an die SH3 Domäne von Iporin, repräsentiert durch die Mutante $\Delta N1430$, stattfindet.

Interessanterweise konnten für die meisten Rab1 Effektoren Bereiche als Rab1 Bindedomäne eingegrenzt werden, die „coiled-coil“ Domänen enthalten. So konnte für GM130 die cc3 als interagierendes Motiv beschrieben werden, für MICAL 1-3 ein Bereich, der die beiden „coiled-coil“ Domänen 1 und 2 enthält, p115 bindet über die cc1 an Rab1, für Golgin-84 konnte der gesamte „coiled-coil“ Bereich als interagierender Bereich beschrieben werden und die Rab1-Giantin Bindung beschränkt sich auf einen Bereich zwischen AS 181-301 (Weide et al., 2001; Satoh et al., 2003; Weide et al., 2003; Beard et al., 2005; Fischer et al., 2005). Wie eingangs erwähnt, enthält Iporin keine „coiled-coil“ Bereiche, allerdings weist die RUN Domäne, die als Rab1 Bindedomäne eingegrenzt werden konnte, eine ausgeprägte α -helikale Struktur, die bereits für Nesca und für Rabip4 beschrieben wurde (Matsuda et al., 2000). So wird postuliert, dass dadurch eine konservierte dreidimensionale Struktur eingenommen wird, welche die Funktion der RUN Domäne dirigiert (Mari et al., 2001). Zusammenfassend kann postuliert werden, dass eine gewundene Struktur, ob „coiled-coil“ oder eine α -Helix charakteristisch für ein Bindemotiv mit Rab1 interagierender Partner ist.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass Iporin in der Lage ist, Homodimere zu bilden und dass die RUN Domäne hierbei eine zentrale Rolle einnimmt. Da die RUN Domäne allerdings auch als Rab1 Bindedomäne beschrieben wurde, stellt sich hier die Frage, ob Rab1B und ein weiteres Iporinprotein um die Bindung konkurrieren. Um dies beantworten zu können, wäre es notwendig, den exakten Bereich der Anheftung des Rab1 Proteins und des Iporinproteins im Fall der Homodimerisierung noch stärker einzugrenzen. Da die RUN Domäne aus 6 konservierten Blöcken besteht, könnte es sein, dass Rab1 an einen spezifischen Block bindet und Iporin an einen anderen (Callebaut et al., 2001). Bereits für p115 wurde beschrieben, dass eine Interaktion zwischen p115 und Rab1 über die C-terminale Domäne 1 von p115 vermittelt wird, p115 aber eine Homodimerisierung durch Interaktion der C-terminalen Domäne mit dem Schwanzbereich eingeht (Sapperstein et al., 1995). Um zu überprüfen, ob der Schwanzbereich und Rab1 um die Anheftung an die C-terminale Domäne konkurrieren, wurde die daueraktive Rab1A Form als GST-Fusionsprotein exprimiert und die p115 Mutante, die aus dem C-terminalen Bereich besteht als His-Fusionsprotein. Mit einer steigenden Konzentration des zugegebenen p115 Peptids, das der Schwanzregion entspricht konnte eine zunehmende Inhibierung der Rab1A Q70L-p115 Bindung beobachtet werden und somit eine Konkurrenz der Schwanzregion von p115 und Rab1 um die Bindung an die C-terminale Domäne nachgewiesen werden (Beard et al., 2005). Analog hierzu könnten das daueraktive Rab1 als GST-Fusionsprotein und Iporin als His-Fusionsprotein überexprimiert werden und kontinuierlich höhere Mengen eines Peptids, das größtenteils aus der RUN Domäne von Iporin besteht, wie z.B. die Mutante $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) dazugegeben werden, um so eine Konkurrenz zwischen Rab1 und Iporin um die Bindung an die RUN Domäne zu überprüfen.

In diesem Zusammenhang konnte ich in Zellen, welche die Iporin Mutante $\Delta N847$, d.h. den C-terminalen Bereich überexprimieren beobachten, dass es zu einer Akkumulierung des endogenen Iporinsignals im kernnahen Bereich kommt und dieses Signal mit dem endogenen Rab1B Signal deutlich kolokalisiert (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung würde darauf hindeuten, dass der C-terminale Bereich inklusive der RUN Domäne verstärkt Iporin an den *cis*-Golgi Apparat dirigiert, der bereits als Hauptlokalisationsbereich für Rab1 beschrieben wurde (Saraste et al., 1995).

Aufgrund des Fehlens einer „coiled coil“ Struktur im Bereich des Leucin-„zipper“ Motivs, das zwar im Bereich eines helikalen Abschnittes liegt aber als funktioneller Leucin-„zipper“ mit Hilfe des Internet-Programms „2ZIP“ nicht bestätigt werden konnte, muss die These, dass das Leucin-„zipper“ Motiv für die Homodimerisierung entscheidend ist, noch eindeutig mit experimentellen Ansätzen geklärt werden (Wolf et al., 1997; Bornberg-Bauer et al., 1998).

6.4. Iporin interagiert mit GM130

Da die Iporin/GM130 Interaktion bereits in der Veröffentlichung von Bayer et al. beschrieben und diskutiert wurde (siehe Anhang), wird in diesem Kapitel nur auf die zusätzlich erlangten Daten eingegangen.

Die „coiled-coil“ Domäne 6 von GM130 konnte bereits als Bindedomäne für Iporin beschrieben werden, jedoch wurde noch keine Eingrenzung von Seiten Iporins vorgenommen. Hierfür wurden Kotransformationen mit der GM130 $\Delta N224$ (K18) Mutante, die aus den „coiled-coil“ Domänen 2-6 und der GRASP65 Anheftungsstelle besteht und den Iporin Deletionsmutanten (siehe Abbildung 5.4 „Iporin und Verkürzungsmutanten“) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde die daueraktive Form von Rab1B eingesetzt (Rab1B Q67R), dessen Interaktion mit GM130 bereits publiziert ist (Weide et al., 2001). Interessanterweise konnte eine Interaktion zwischen der GM130 Mutante und den Iporin Mutanten detektiert werden, deren Teil die gesamte RUN Domäne ist (siehe Tabelle 5.2). So interagierten $\Delta N847$ ($\Delta 1$), $\Delta N847\Delta C1450$ ($\Delta 2$), $\Delta N847\Delta C1239$ ($\Delta 3$) und $\Delta N991\Delta C1450$ ($\Delta 7$) sehr gut mit GM130 $\Delta N224$ (K18). Ebenso konnte eine Interaktion zwischen $\Delta N991\Delta C1177$ ($\Delta 5$) und

$\Delta N991\Delta C1239$ ($\Delta 6$), den Iporin Mutanten, die größtenteils aus der RUN Domäne und einigen flankierenden Aminosäuren bestehen und der GM130 Mutante beobachtet werden. Diese Interaktionen waren aber deutlich schwächer, so dass die RUN Domäne zwar als Bindungsmotiv für GM130 eindeutig eingegrenzt werden konnte, in der Hefe jedoch längere Iporin Mutanten besser mit GM130 $\Delta N224$ (K18) interagierten. Da Iporin $\Delta 2$, $\Delta 3$ und $\Delta 7$, denen die SH3 Domäne fehlt, eine starke Interaktion mit GM130 $\Delta N224$ (K18) zeigten und Mutanten wie $\Delta N1122$ ($\Delta 8$) und $\Delta N1430$ ($\Delta 9$) keine, kann so ausgeschlossen werden, dass die SH3 an der Interaktion beteiligt ist. Ebenso kann ein Einfluss des poly E und poly P-„stretches“, die der interagierenden Mutante $\Delta 3$ fehlen, ausgeschlossen werden.

Die Interaktion zwischen Iporin und GM130 konnte mit Hilfe des „GST pull downs“ bestätigt werden, so interagiert die Iporin Mutante $\Delta N847\Delta C1239$, als GST-Fusionsprotein exprimiert mit endogenem GM130 (siehe Anhang Bayer et al., 2005).

Überraschenderweise konnte sowohl für Rab1B sowie für GM130 ein Bereich, der die RUN Domäne enthält, als Bindedomäne eingegrenzt werden. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Interaktion simultan verlaufen kann oder beide Proteine um die Anheftung an die RUN Domäne von Iporin konkurrieren. Ein gut beschriebenes Beispiel stellt die Interaktion zwischen GM130-p115-Giantin dar, die alle mitunter eine Rolle im COPI umhüllten vesikulären Transport einnehmen. Es wurde gezeigt, dass sowohl GM130 und Giantin an die Schwanzregion von p115, die eine kurze saure Sequenz enthält, binden und somit eine Interaktion zwischen p115 und Rab1 stimulieren und folgend selbst eine Bindung mit Rab1B eingehen (Linstedt et al., 2000; Beard et al., 2005). *In vitro* Versuche dokumentierten, dass Giantin an COPI Vesikeln von p115 erkannt wird und anschließend GM130 an der Zielmembran bindet, was aber im Gegensatz zu der Eingrenzung der Bindedomäne steht (Sönnichsen et al., 1998). Es konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass eine gleichzeitige Interaktion aller drei Partner simultan verläuft, denn Giantin ist nicht in der Lage, GM130 komplexiertes p115 zu binden (Linstedt et al., 2000). So ist es möglich, dass Giantin *in vivo* eine weitere, COPI unabhängige Rolle einnimmt (Lupashin und Sztul, 2005). Eine weitere Beobachtung, dass p115, Giantin und GM130 ebenso mit Rab1 interagieren, bzw. Giantin und GM130 die Bindung zwischen p115 und Rab1 positiv beeinflussen, lässt den Schluss zu, dass Giantin und GM130 eher die p115 Rekrutierung steuern, als dass sie nur als Membrananker eine Rolle im vesikulären Transport übernehmen (Beard et al., 2005). Linstedt et al. schlugen vor, dass eine Oligomerisierung von p115 eine gleichzeitige Bindung von Giantin und GM130 ermöglichen könnte (Linstedt et al., 2000). Entsprechend könnte die Rolle von Iporin im vesikulären Transport diskutiert werden. So könnte die Konformation von Rab1, das sich auf COPII bedeckten Vesikeln befindet, die vom ER zum Golgi transportiert werden, durch eine Interaktion mit Iporin positiv für eine weitere Interaktion mit GM130 verändert werden und die Spezifität der Anheftung an den *cis*-Golgi durch eine weitere Interaktion zwischen Iporin und GM130 vermittelt wird. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Iporin Homodimere bilden kann, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass eine Oligomerisierung von Iporin zu einer gleichzeitigen Bindung von GM130 und Rab1 führen könnte.

Suzanne Pfeffer beschrieb einen solchen Zwei-Komponenten „Adressierungsmechanismus“ am Beispiel von TIP47, einem löslichen Protein, welches für die Anlieferung von Mannose 6-Phosphat von den späten Endosomen zum Golgi notwendig ist und ebenfalls mit Rab9 an späten Endosomen interagiert (Diaz und Pfeffer, 1998; Pfeffer, 2003). Die Bindung von TIP47 und Rab9 führt zu einer Konformationsänderung in TIP47, wodurch die Affinität zu Mannose 6-Phosphat und Rab9 erhöht wird (Carroll et al., 2001). In wie weit Iporin und Rab1 sich gegenseitig beeinflussen, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden.

Ein Hinweis darauf, dass Rab1B und GM130 um die Bindung an Iporin konkurrieren, wurde bereits in der Arbeit von Bayer et al. publiziert. HeLa SS6 Zellen, welche das daueraktive Rab1 Protein (Rab1B Q67L) überexprimierten, wurden einer Membran-Zytosol-

Fraktionierung unterzogen und die Verteilung von Iporin, GM130 und p115 überprüft. So sind sowohl Iporin sowie GM130 stärker in der membrangebundenen Fraktion (P100) vertreten und p115 in der löslichen Fraktion (S100). Es konnte für alle drei Proteine keine signifikante Änderung der Lokalisation festgestellt werden. Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, dass das GM130 Signal in der Membranfraktion der Zellen, die Rab1B Q67L überexprimieren etwas schwächer ist und das Iporinsignal leicht verstärkt ist (Bayer et al., 2005). So könnte postuliert werden, dass vermehrt Iporin an aktives Rab1B bindet und die Anlieferung der Vesikel an die Golgi Membran verzögert ist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, den Iporin Antikörper 1179 in Zellen zu mikroinjizieren und zu beobachten, welche Auswirkungen das auf den vesikulären Transport zwischen dem ER und dem Golgi Apparat hat.

Wie bereits erwähnt, konnte in der Publikation von Bayer et al. die gleiche Verteilung von Iporin und GM130 in der membrangebundenen Fraktion nachgewiesen werden und von mir mittels subzellulärer Fraktionierung mit Hilfe des Percoll-Gradienten bestätigt werden (siehe Abbildung 5.23; Bayer et al., 2005). Während Iporin in Immunfluoreszenzanalysen eine überwiegend zytosolische Verteilung, mit Akkumulierung am Kern und leichten Signalen im Kern aufweist, konnte GM130 überwiegend am *cis*-Golgi lokalisiert werden (Nakamura et al., 1995; Weide et al., 2001; Yoshimura et al., 2001). So konnte ich mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse eine Kolo-kalisation beider endogener Proteine in der perinukleären Region nachweisen (siehe Abbildung 5.8).

Die neu beschriebene Interaktion zwischen GM130 und Iporin unterstützt die These, dass Iporin, als ein wichtiger Interaktionspartner von Rab1B, eine entscheidende Rolle im vesikulären, COP II-vermitteltem Transport zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi Apparat einnimmt, wobei die exakte Funktion noch geklärt werden muss (Barlowe et al., 1994; Bayer et al., 2005).

6.5. Zelluläre Lokalisation von Iporin, Rab1B und GM130 in murinem und humanem Hodengewebe

Wie bereits gezeigt, wird Iporin sowohl im Hoden- sowie im Ovariengewebe exprimiert (siehe Abbildung 5.1 und 5.3) und interessanterweise konnte in der Oogenese und in der Spermatogenese eine Rolle für GM130 gezeigt werden (Moreno et al., 2000a; Payne und Schatten, 2003). Erst kürzlich veröffentlichte Daten von Gurkan et al., benannt als das Membrome-Projekt, trugen dazu bei, diverse Rab Proteine sowohl einzelnen Transportprozessen zuzuordnen, sowie eine Gewebespezifität für die einzelnen Proteine zu bestimmen. So konnte eine erhöhte Expressionsrate von Rab1A und Rab1B in der Lunge, Leber, Niere, Darm, Hoden und Zellen des Immunsystems beschrieben werden, entsprechend der Tatsache, dass in diesen Geweben extensive Transportprozesse zwischen dem ER und dem Golgi Apparat stattfinden (Gurkan et al., 2005).

So sollte im nächsten Versuch die Verteilung der drei Proteine Iporin, Rab1B und GM130 in Hodengewebeschnitten analysiert und ihre mögliche Rolle während der Spermienentwicklung und Reifung charakterisiert werden. Entsprechend der Detektion von Iporin im Hodengewebe, sollte die Expression von Rab1B und GM130 im Hodengewebe-lysate nachgewiesen werden. Die Detektion von Rab1B im Hodengewebe-lysate brachte einige Schwierigkeiten mit sich, da der Antikörper 1E7 mit zahlreichen anderen Proteinen, die im Gesamtgewebe-lysate vorhanden waren, kreuzreagierte. Um dieses Problem elegant zu lösen und eine eindeutige Rab1B Expression im Hodengewebe nachweisen zu können, habe ich eine Immunpräzipitation durchgeführt. So konnte ich zeigen, dass der Antikörper zwar auch andere Proteine in der „Western Blot“ Analyse erkennt, jedoch spezifisch Rab1B aus dem Mausgewebe fällen kann (siehe Abbildung 5.9 Spur 1). Parallel dazu wurde als Negativkontrolle ein Ansatz mitgeführt, wo nur Protein G Sepharose mit murinem Hodengewebe-extrakt ohne Antikörper inkubiert worden ist. In diesem aufgetrennten Ansatz (siehe Abbildung 5.9 Spur 2) konnte kein Rab1B

Signal detektiert werden. Da leider nicht genügend humanes Hodengewebe zur Verfügung stand, konnte die Immunpräzipitation nicht mit humanem Gewebe wiederholt werden. Da der 1E7 Antikörper aber in der „Western Blot“ Analyse mit dem humanen Hodengewebe neben unspezifischen Banden eine Rab1B spezifische Bande bei ca. 23 kDa detektieren konnte, sollte angenommen werden, dass eine Fällung des humanen Rab1B Proteins zu einem vergleichbaren Ergebnis, wie für das murine Rab1B Protein, führen würde. Parallel wurde GM130 mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse in murinem und humanem Hodengewebelysat detektiert, wobei das detektierte Signal für das murine GM130 wesentlich stärker war als für das humane GM130 (siehe Abbildung 5.10, Spur 1 und 2). Das führt zu der Annahme, dass entweder viel weniger GM130 Protein im humanen Gewebe exprimiert wird, oder, wie bereits diskutiert (siehe 6.1. „Detektion von Iporin in Gewebelysaten“), die Lagerung des Hodengewebelysats bei -70°C zum Proteinabbau geführt hat.

Im nächsten Schritt sollte die Verteilung von Iporin, Rab1B und GM130 in humanen und murinen Gewebeschnitten der Hodenkanälchen gezeigt werden. In den Hodenkanälchen entstehen unreife Spermien aus Keimzellen, den sogenannten Spermatogonien. Diese differenzieren sich während meiotischer Vorgänge zu Spermatozyten im Präleptotän/Leptotän Stadium und migrieren von der basalen Membran nach Überquerung der Blut-Hoden-Schranke, die anatomisch von den Sertolizellen gebildet wird, in den adluminalen Bereich (Russell, 1977; de Kretser und Kerr, 1988; Santemma et al., 1992; Cheng und Mruk, 2002; Mruk und Cheng, 2004). Die immunhistochemische Analyse erfolgte mit Hilfe der DakoCytomation LSAB 2[®] und des EnVision[™] Systeme (siehe 3.3.6. und 4.6.2. „Immunhistochemie“). Da beide Methoden für Rab1B und auch für GM130 vergleichbare Ergebnisse hervorbrachten, werden nur die DAB Färbungen gezeigt (siehe Abbildung 5.11) und sollen nun diskutiert werden. Mit Hilfe des 1E7 Antikörpers konnte Rab1B in den humanen sowie murinen Schnitten an kernnahen Strukturen in den Spermatozyten und vereinzelt in den Spermatischen markiert werden. Beispielhaft sind einige Zellen mit einem Sternchen markiert (siehe Abbildung 5.11 A und B). Entsprechend hierzu konnte in den murinen Hodenschnitten ein GM130 Signal in Kernnähe in den Spermatozyten detektiert werden (siehe Abbildung 5.11 C). In einem zellulären System konnte bereits mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik eine Kolo-kalisation der beiden Interaktionspartner Rab1B und dem *cis*-Golgi Matrixprotein GM130 am Golgi Apparat gezeigt werden (Weide et al., 2001). Die Negativkontrollen zeigten keine unspezifischen DAB Färbungen auf, so dass davon ausgegangen werden darf, dass die detektierten Rab1B und GM130 Signale spezifisch sind. Wie bereits in der „Western Blot“ Analyse gezeigt (siehe Abbildung 5.10), detektierte der GM130 Antikörper nur ein sehr schwaches Signal im humanen Hodengewebelysat. In den humanen Hodenschnitten konnte kein distinktes GM130 Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Parallel wurde die zelluläre Lokalisation von Iporin in humanen und murinen Hodenschnitten mit Hilfe des affinitätsgereinigten Antikörpers 1179 und der DakoCytomation LSAB 2[®] und EnVision[™] Systeme bestimmt. Mit beiden Methoden konnte ein eindeutiges Iporinsignal in den Sertolizellen detektiert werden und vereinzelt ein schwaches Signal in einigen Spermatozyten (siehe Abbildung 5.12 C und E). In den murinen Hodenschnitten wurde ein schwächeres Iporinsignal detektiert (siehe Abbildung 5.12 A). Bestätigend hierzu konnte mit Hilfe der „Western Blot“ Analyse gezeigt werden, dass Iporin in SK11 Zellen, einer Maus Sertoli Zelllinie, stark exprimiert wird (siehe Abbildung 5.13). Die Negativkontrollen zeigten keine unspezifischen DAB sowie Neufuchsin Färbungen auf, so dass davon ausgegangen werden darf, dass das detektierte Iporinsignal spezifisch ist.

Wie eingangs erklärt, bilden Sertolizellen die Blut-Hoden-Schranke und durch einen intensiven Kontakt mit den sich entwickelnden Keimzellen, über „adherent junctions“, können diese reifen und sich differenzieren (Dym und Fawcett, 1970; Byers et al., 1993; Russell, 1993; Cheng und Mruk, 2002; Mruk und Cheng, 2004). So ist jede Sertolizelle mit etwa 30-50 Keimzellen assoziiert und erst durch diesen Kontakt regulieren die einzelnen

Zelltypen gegenseitig ihre Funktionen (Weber et al., 1983; Aravindan et al., 1996). Damit diese Prozesse geregelt ablaufen können, sind zahlreiche Protein/Proteininteraktionen, ein geregelter Membrantransport und Vesikelfusionen notwendig, so dass ggf. auch die Interaktionen zwischen Iporin, Rab1B und GM130 hierbei eine entscheidende Rolle spielen könnten. Da jedoch beide Iporin-spezifischen Interaktionspartner Rab1B und GM130 überwiegend in Spermatozyten lokalisiert sind, könnte entweder eine Interaktion in Spermatozyten stattfinden oder durch einen intensiven Kontakt der Sertolizellen mit den Spermatozyten. Weitere Experimente sollen klären, ob und wie Iporin, Rab1B und GM130 in den Samenkanälchen miteinander interagieren.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass GM130 während der Spermatogenese eine Rolle spielt und in pachytänen Spermatozyten, runden und elongierten Spermatiden von Rhesus-Affen entlang des akrosomalen Vesikels detektiert wird (Moreno et al., 2000a). So ist der Golgi Apparat an der Vergrößerung und Differenzierung des Akrosoms beteiligt, eines sekretorischen Vesikel, welcher eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme enthält, um eine Penetration der Schutzhülle der Eizelle durch das reife Spermium zu ermöglichen (Susi et al., 1971; Tang et al., 1982). Hierbei spielen neben COPI und Clathrin-bedeckten Vesikeln und Golgi-Proteinen, wie Giantin, β -COP, Golgin-97 und Golgin-95/GM130, in runden Spermatiden auch zahlreiche Komponenten des vesikulären Transportes eine große Rolle (Martinez-Menarguez et al., 1996; Moreno et al., 2000a). Experimente, in welchen Transportwege mit Hilfe von Brefeldin A, das zur Vesikulierung und Dispersion des Golgi Apparates führt, gestört worden sind, erbrachten die Erkenntnis, dass ein aktiver Transport vom ER zum Golgi Apparat stattfindet (Moreno et al., 2000a). So wird deutlich, dass das Akrosom, neben einer distinkten strukturellen und biochemischen Regulation, für sein Wachstum und seine Formung abhängig ist vom Membrantransport, in dem neben SNAREs, COPI und Clathrin-bedeckten Vesikeln auch Rab GTPasen als zentrale Regulatoren des vesikulären Transportes eine entscheidende Rolle spielen (Lippincott-Schwartz et al., 1998; Moreno et al., 2000a).

Es konnte ebenso gezeigt werden, dass kleine GTPasen in die Vorgänge der Spermatogenese involviert sind. Neben Rho GTPasen, die als Regulatoren des Aktinzytoskeletts die Bewegungen der Keimzellen regulieren, konnten auch zahlreiche GAPs wie α 2-chimaerin, β -chimaerin und MgcRacGAP in Hoden nachgewiesen werden und es konnte gezeigt werden, dass Rho GDI -/- Mäuse infertil sind (Hall et al., 1993; Hinsch et al., 1993; Leung et al., 1993; Toure et al., 1998; Tagawa et al., 1999). Bis heute konnten zwar zahlreiche Rab GTPasen, wie z.B. Rab3A, Rab8B, Rab11, Rab27A und B und hRab28L in Hodengewebe detektiert werden, allerdings konnten nur wenige funktionelle Daten gesammelt werden (Lai et al., 1994; Armstrong et al., 1996; Brauers et al., 1996; Iida et al., 1999; Kierszenbaum et al., 2003). Eine beschriebene wichtige Funktion von Rab GTPasen während der Spermatogenese, insbesondere während des Zusammenbaus und der Disassemblierung von „junctions“, ist die Lieferung von Proteinen an Sertoli-Sertoli und Sertoli-Keimzell adherenten „junctions“. Aufgrund der raschen Aktivierung bzw. Inaktivierung durch die GTP-Hydrolyse sind sie in der Lage, als molekulare Schalter den Auf- bzw. Abbau schnell zu regulieren (Mruk und Cheng, 2004). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Rab5 und Rab7 mit dem Akrosom während früher Stadien der Spermatogenese assoziiert sind und somit eine Rolle in der Akrosom-Biogenese spielen (Ramalho-Santos und Moreno, 2001).

Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass sowohl Iporin, Rab1B und GM130 in den Schnitten der Hodenkanälchen detektiert werden können und somit eine, bisher für Iporin und Rab1B noch nicht beschriebene, Rolle in der Spermatogenese spielen können. Die Entwicklung der unreifen Spermien (Spermiogenese) wird erst in den Nebenhoden (Epididymis) abgeschlossen. Hierfür werden die Spermatiden über die Ductuli efferentes testis des Hodens in die Samenleiter (Ductus deferens) weitergeleitet. Die Aufgabe des Nebenhodens ist Ernährung, Schutz, Transport, Reifung und Lagerung der reifenden

Spermien, die jeweils nacheinander im Caput (Kopf), Corpus (Körper) und Cauda (Schwanz) erfolgen. So interessierte es mich, ob Iporin, Rab1B und GM130 ebenfalls in der Reifung der Spermien eine Rolle spielen, weswegen ihre Lokalisation in murinen Schnitten des Nebenhodens untersucht wurde. Die immunhistochemische Analyse erfolgte mit Hilfe der DakoCytomation LSAB 2[®] Systems. Die Ergebnisse sind der Abbildung 5.14 A-C zu entnehmen. Allgemein besteht das Epithel aus drei Zelltypen: „principal cells“, „basal cells“ und „clear cells“, wobei die basalen Zellen ein Netzwerk unter den „principal cells“ bilden und durch die Expression von Makrophagen-Antigenen Phagozytose betreiben können, um so die Spermien zu schützen. Ebenso wird ihnen durch die Synthese von Apolipoprotein E die Aufgabe des Lipid-Recyclings und durch die hohe Expressionsrate an Glutathion S-transferase und Superoxid Dismutase eine Entgiftung zugesprochen. „Clear cells“ zeichnen sich durch große Vakuolen aus und übernehmen die Aufnahme des abgesonderten Materials aus dem Lumen und teilweise von den „principal cells“, deren Aufgabe ebenfalls die Sekretion und Absorption von Ionen, Wasser und organischen Verbindungen ist. Dies wird teilweise ermöglicht durch „tight junctions“ zu den epithelialen Zellen, wodurch große Moleküle aus dem Blut frei beweglich sind. Diese Verbindung wird als die Blut-Nebenhoden-Barriere bezeichnet (Cooper, 1999). Das Rab1B Signal ist größtenteils in den „principal cells“ verteilt, ggf. sind einige „clear cells“ markiert, jedoch erheblich schwächer (siehe Abbildung 5.14 A). Im Gegensatz hierzu beschränken sich sowohl das GM130 Signale sowie das Iporinsignal auf die „clear cells“. So ist es möglich, dass Rab1B in den „principle cells“ synthetisiert wird und in diesen Zellen, als wichtiger Regulator des vesikulären Transportes, Aufgaben übernimmt. GM130 und Iporin werden höchstwahrscheinlich als Komponenten der Spermatischen in die Nebenhoden transportiert, hier als freie Proteine in das epididymale Lumen ausgeschieden und von den „clear cells“ aufgenommen. So wurde für GM130 beschrieben, dass es, ggf. assoziiert an Teilen der Golgimembranen, im letzten Differenzierungsstadium in das „cytoplasmic droplet“ ausgeschieden und dann in den Nebenhoden weitergeleitet wird und in einem Großteil der Zellen wiederzufinden ist (Moreno et al., 2000b; Cooper und Yueng, 2003; Cooper, 2005).

So sollte in weiteren Experimenten geklärt werden, wie z.B. die Aufnahme von GM130 bzw. Iporin aus den Spermatischen von den „clear cells“ erfolgt und ob sie möglicherweise über Rezeptoren, die sich an der Zellmembran befinden, vermittelt wird. Die Frage, ob sie als Komponente der Spermatischen in die Epididymis weitergeleitet werden, könnte beantwortet werden, indem immunhistochemische Analysen der Nebenhoden von Mäusen, die eine gestörte Spermatogenese aufweisen bzw. steril sind, analysiert werden. In diesem Zusammenhang könnten „knock-out“ Mäuse hergestellt werden und der Einfluß des fehlenden Proteins auf die Spermatogenese und die Spermiogenese untersucht werden.

Um allerdings die Funktion von Iporin in der Spermatogenese, bzw. den Sertolizellen beschreiben zu können, ist es notwendig, weitere Interaktionspartner von Iporin zu finden, die eine Rolle in der Spermientstehung und Entwicklung einnehmen.

6.6. Neuer Iporin Interaktionspartner: Tesmin

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das humane Iporin, das als ein neuer Interaktionspartner von Rab1 bereits beschrieben werden konnte, charakterisiert werden und hierfür ein neuer Interaktionspartner mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems detektiert werden. So ist es mir gelungen, mit Hilfe der Iporin Deletionsmutante $\Delta N847$ ($\Delta 1$) (siehe Abbildung 5.4) und einer Hoden cDNA Genbank einen neuen Interaktionspartner, das humane Tesmin, das in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben wurde, zu isolieren (siehe 1.9. „Tesmin“).

Der isolierte Klon, als Klon 56 bezeichnet, entsprach 409 bp der kodierenden C-terminalen Sequenz des humanen Tesmins, das bisher nicht weiter charakterisiert werden konnte. In einem ersten Ansatz wurde die Spezifität der Interaktion zwischen dem Klon pACT 56 und den Deletionsmutanten von Iporin (siehe Abbildung 5.4) mit Hilfe des „yeast two-hybrid“

Systems überprüft. Wie der Tabelle 5.3 zu entnehmen ist, interagiert pACT 56 mit allen Iporinmutanten, deren Teil die vollständige RUN Domäne ist, so dass postuliert werden kann, dass dieser Bereich, sowie einige flankierende Aminosäurereste, für diese Interaktion notwendig sind. Da der Klon 56 nur den C-terminalen Bereich von Tesmin darstellt, wurde mit Hilfe der PCR Technik und spezifischen „primern“ die vollständige Tesmin Sequenz aus der humanen cDNA Genbank amplifiziert. Eine Analyse der amplifizierten Sequenz ergab, dass sowohl eine 900 bp lange Sequenz vervielfältigt worden ist, die lückenlos dem „open reading frame“ entspricht (bezeichnet als Tesmin A; siehe Abbildung 5.16 Spur 1) sowie eine 853 bp lange Sequenz, der somit 57 bp, d.h. 19 Aminosäurereste fehlen (siehe Abbildung 5.16 Spur 2). Die Deletion erfolgte in dem zweiten, zwischen den Mitgliedern der CHC Familie stark konservierten Cystein-reichen Motiv (Abbildung 5.17). Bereits Olesen et al. konnten mit Maus Tesmin spezifischen „primern“ unterschiedliche Transkripte, die sich in der Länge sowie in den einzelnen Nukleotiden von der veröffentlichten Tesmin Sequenz unterschieden, isolieren (Sugihara et al., 1999; Matsuura et al., 2002). Die Unterschiede tauchten aber größtenteils in dem 5' untranslatierten Bereich auf, so dass sie postulierten, dass unterschiedliche Tesmin Varianten alternative RNA „splice“ Formen repräsentieren könnten, die spezifisch in einzelnen Geweben vorkommen (Olesen et al., 2004). Ob jedoch ein deletiertes humanes Tesminprotein *in vivo* vorkommt und falls ja, welche Bedeutung eine Deletion für die Funktionalität von tesmin hat, sollte in weiteren Experimenten überprüft werden. Ebenso ist es aber auch möglich, dass die Polymerase während der Amplifikation, z.B. infolge eines „loops“ in der sekundären DNA-Struktur, diesen Bereich von 57 bp übersprungen hat und diese Mutante das Ergebnis einer fehlerhaften PCR ist. Da diese Deletionsmutante allerdings einen Basenaustausch an Position AS 105 trägt, wurde nicht weiter auf sie eingegangen.

Um die Interaktion zwischen Tesmin A und Iporin zu testen, wurden, wie bereits für den Klon 56, Interaktionsstudien mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems und den Iporin Deletionsmutanten durchgeführt. Die Ergebnisse, zusammengefasst in der Tabelle 5.4 zeigen, dass ebenso alle Iporin Deletionsmutanten, die alle die vollständige RUN Domäne enthalten, mit Tesmin A interagieren und bestätigten so die erlangten Ergebnisse für den Klon 56. Um die Interaktion zu bestätigen, wurde ein „GST pull down“, wie bereits für die Iporin Dimerisierung beschrieben (siehe 5.3. „Iporin Homodimerisierung“), durchgeführt. So konnte eine Bindung des GST-Fusionsproteins Iporin Δ N847 Δ C1239 (Δ 3) an das HA-„getaggte“ GFP-Tesmin A (siehe Abbildung 5.18 B Spur 2) nachgewiesen und somit bestätigt werden. Gleichzeitig konnte durch die fehlende Interaktion zwischen der Mutante Δ N1430 (Δ 9) und GFP-Tesmin A (siehe Abbildung 5.18 B Spur 3) ausgeschlossen werden, dass die SH3 Domäne wichtig für eine Interaktion ist.

Wie bereits Matsuura et al. für das murine Tesmin beschreiben konnten, ist die Anfangssequenz von Tesmin sehr GC-reich, so dass eine Amplifikation mittels PCR erschwert wird und zunächst ein kürzerer „open reading frame“ angenommen wurde (Matsuura et al., 2002). Im Laufe meiner experimentellen Phase wurde ein neuer „open reading frame“ beschrieben, der im 3' Bereich um 627 bp länger ist, resultierend in einer 1527 bp langen Sequenz und einem Protein der Größe ca. 55 kDa (vgl. Acc.-No. NM_004923.2; Tesmin „full length“). Es konnte ein Klon vom RZPD bezogen werden, der die neue vollständige Sequenz enthält, die umklont und mit Hilfe von Restriktionsanalysen überprüft wurde. Eine Interaktion zwischen Tesmin „full length“ und Iporin konnte mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems, wie bereits für den Klon 56 und Tesmin A, durchgeführt und mit gleichem Ergebnis bestätigt werden (siehe Tabelle 5.5). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Analysen war die Interaktion zwischen Iporin und Tesmin „full length“ zeitlich etwas verzögert, was ggf. auf die Faltung des Tesmin „full length“ Proteins in der Hefe zurückzuführen ist.

So kann zusammengefasst werden, dass das humane Tesmin als neuer Interaktionspartner von Iporin gefunden und bestätigt werden konnte. Mit Hilfe des „yeast two hybrid“ Systems und der „GST pull down“ Analyse konnte die RUN Domäne bzw. flankierende Aminosäurereste als Bindedomäne eingegrenzt werden, wobei die genaue Bindungsstelle noch ermittelt werden sollte. Da alle drei Tesminkonstrukte, d.h. der Klon 56, Tesmin A und Tesmin „full length“ mit Iporin interagierten, kann daraus geschlossen werden, dass der C-terminale Bereich von Tesmin, der das zweite, konservierte Cystein-reiche Motiv an Position AS 365-406 enthält, für die Bindung mit Iporin mitverantwortlich ist und somit das erste Cystein-reiche Motiv hierfür nicht benötigt wird.

Matsuura et al. haben für das murine Tesmin, überexprimiert in Cos1 Zellen, eine überwiegende zytoplasmatische Lokalisation beschrieben (Matsuura et al., 2002). Mit Hilfe von Lokalisationsstudien in HeLa SS6 Zellen konnte ich zeigen, dass die humanen Proteine Tesmin A und Tesmin „full length“, gleich dem Mausprotein, eine ubiquitäre zytoplasmatische Verteilung aufweisen (siehe Abbildung 5.19 A und C). Eine Kolokalisation von Tesmin „full length“ und Iporin konnte im perinukleären Bereich detektiert werden (siehe Abbildung 5.19 E).

6.7. Translokation von Tesmin nach Behandlung mit Cadmiumchlorid

Hoden reagieren hoch sensitiv auf Stressfaktoren wie Hitze, oxidative Reagenzien und Schwermetalle. So ist schon seit langem bekannt, dass der Hoden der Säugetiere besonders anfällig auf die Exposition gegenüber Cadmium reagiert und bereits minimale Mengen schwere Blutungen im Hoden auslösen, wodurch es zur Degeneration und schließlich zur Nekrose von Zellen der Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) kommt. Für Cadmium ist außerdem ein kanzerogener Effekt in Rattenhoden und Prostata beschrieben (Samarawickrama, 1979; Nolan und Shaikh, 1986; Suzuki et al., 1998). Allgemein ist Cadmium als toxisches Metall in der Lage, die Immunantwort zu ändern, indem die Antikörperproduktion modifiziert und die Aktivierung von B-Zellen inhibiert wird, und so die Zellen in die Apoptose geleitet werden (Koller et al., 1976; Mieusset und Bujan, 1995; Fisher und Aitken, 1997; Fujimaki et al., 2000). In Abhängigkeit von der Menge, dem Gewebe bzw. dem Organ und dem Entwicklungszeitpunkt kann Cadmium Apoptose induzieren oder verhindern, indem es als Inhibitor der Caspase-3 fungiert (Habeebu et al., 1998; Hart et al., 1999; Achanzar et al., 2000; Yuan et al., 2000).

Eine gut charakterisierte Gruppe von Stressproteinen sind Metallothioneine, die ubiquitär in zahlreichen tierischen und pflanzlichen Spezies vorkommen. Es handelt sich hierbei um Proteine, die ein niedriges Molekulargewicht aufweisen und bis zu einem Drittel aus Cysteinresten bestehen, wodurch sich ihre Rolle als Detoxifikanten von Schwermetallen begründet (Kägi und Kojima, 1987). Es konnte beschrieben werden, dass Metallothioneine während der mitotischen G₀/G₁ Phase zytoplasmatisch verteilt sind und während der S-Phase in den Zellkern wandern (Apostolova und Cherian, 2000). Insbesondere die zytoplasmatische Lokalisation ist wichtig für den Schutz gegen die zytotoxische Wirkung von Cadmium, jedoch konnte nie nachgewiesen werden, dass Metallothioneine die Detoxifikation von Cadmium in Hoden übernehmen können, so dass vermutlich andere, bisher nicht charakterisierte Proteine, wie z.B. Tesmin hierfür verantwortlich sein könnten (Woo und Lazo, 1997; Ren et al., 2003; Takahashi et al., 2004). Es konnte mit Hilfe des Tesmin spezifischen Antikörpers gezeigt werden, dass Tesmin im Zytoplasma der Spermatozyten lokalisiert ist und während des Übergangs von der G₂ Phase in die Meiose in den Kern wandert. Die Translokation in den Kern konnte, unabhängig vom Zellzyklus, ebenso durch Cadmiumchloridexposition ausgelöst werden. So konnte Tesmin als eines der wenigen Proteine beschrieben werden, die eine Veränderung der Lokalisation während der Meiose und nicht, wie die meisten Proteine, während der Mitose aufweisen. Cadmiumchlorid führt zu

einem Verlust dieser Regulierung, so dass weiterhin postuliert wird, dass Tesmin in die Zellzyklus-spezifische Regulation, in Folge von stressauslösenden Faktoren, wie Schwermetallen, involviert ist (Matsuura et al., 2002). In diesem Zusammenhang habe ich untersucht, ob einerseits die beschriebene Translokation des murinen Tesmins ebenfalls auf das humane Protein zutrifft und andererseits, ob auch Iporin seine Lokalisation nach Cadmiumchloridexposition ändert. Hierfür wurde der Versuchsaufbau, wie von Matsuura et al. beschrieben, übernommen. Ich konnte zeigen, dass sowohl die Deletionsmutante GFP-Tesmin A sowie GFP-Tesmin „full length“ nach Cadmiumchloridexposition in den Zellkern wandern (siehe Abbildung 5.21 B und 5.22 B), das Iporinsignal jedoch keine Veränderung aufweist (siehe Abbildung 5.21 A und 5.22 A). In beiden Fällen konnte eine Kolo-kalisation zwischen Tesmin A bzw. Tesmin „full length“ und Iporin im kernnahen Bereich beobachtet werden (siehe Abbildung 5.21 D und 5.22 D). Eine Translokation von Iporin nach Behandlung von nicht-transfizierten HeLa SS6 Zellen mit Cadmiumchlorid kann ebenfalls ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 5.20).

So kann postuliert werden, dass das humane Tesmin, wie sein Maus Homolog, durch eine Schwermetallbehandlung in den Zellkern migriert. Es konnte kein Unterschied zwischen dem translokalisierten Signal der Deletionsmutante und Tesmin „full length“ beobachtet werden, so dass daraus geschlossen werden kann, dass der N-terminale Bereich nicht als Sensor für Cadmiumchlorid gilt, und dass er auch nicht für die Verlagerung des Proteins notwendig ist. Da keine Veränderung des Iporinsignals beobachtet werden konnte, kann einerseits ausgeschlossen werden, dass Iporin als Sensor für Cadmiumchlorid fungieren kann und andererseits, dass es Tesmin verhilft, in den Zellkern zu migrieren. Aufgrund der zeitlichen Beschränkung der experimentellen Phase konnte ich keine funktionellen Daten zu der Iporin-Tesmininteraktion sammeln. Weitere Experimente sind notwendig, um zu ergründen, welche Bedeutung diese Interaktion hat und ob sie limitiert auf die Spermatogenese ist. Alle Arbeitsgruppen, die Tesmin untersucht haben, konnten eine Tesminexpression in Sertolizellen, Spermatogonien und Leydig Zellen ausschließen (Sugihara et al., 1999; Olesen et al., 2004). Diese Ergebnisse widersprechen der Tatsache, dass der Interaktionspartner Iporin überwiegend in Sertolizellen detektiert wurde (siehe Abbildung 5.12 C). Da Tesmin allerdings gleichbleibend von den frühen bis zu den späten Stadien der Spermatogenese exprimiert und dieser Mechanismus von den Sertolizellen unterstützt wird, wäre es möglich, dass die Tesmin Funktion durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit den Sertolizellen gewährleistet wird und Iporin hierbei eine Rolle einnimmt (Jegou, 1993; Cheng und Mruk, 2002; Mruk und Cheng, 2004). In diesem Fall könnte eine Unterbrechung der Zell/Zellkontakte während der Meiose und somit eine Unterbrechung der Iporin-Tesmininteraktion zu der Translokation von Tesmin in den Zellkern führen und die Bewegung des Tesminsignals in den elongierten Spermatischen regulieren (Matsuura et al., 2002). In diesem Zusammenhang sollte erforscht werden, ob noch weitere Komponenten eine wichtige Rolle spielen. So konnte z.B. mit Hilfe der „yeast two-hybrid“ Analyse Testin, ein sekretorisches Protein, das in Sertolizellen lokalisiert ist und einen Schlüsselfaktor der Sertoli-Keimzellen Verbindungen darstellt, als einen Interaktionspartner von Tesmin detektiert werden (Grima et al., 1997; Grima et al., 1998). Weitere Experimente sollten die Interaktion von Testin und Tesmin bestätigen und eine mögliche Funktion von Tesmin in der Ausbildung und Aufrechterhaltung dieser Zellverbindung aufdecken und es sollte überprüft werden, ob Iporin ggf. auch mit Testin interagiert und dadurch der Kontakt und Austausch zwischen Sertolizellen und Keimzellen spezifiziert wird.

Bis heute konnten keine funktionellen Daten für Tesmin beschrieben werden. Möglicherweise ist Tesmin ein Teil eines Überwachungsmechanismus, der beschädigte Zellen, wie z.B. die Keimzellen, repariert oder mittels Apoptose eliminiert. Es konnte gezeigt werden, dass p53 stark in Spermatozyten angereichert ist und nach Hitze oder oxidativem Stress in den Kern wandert (Schwartz et al., 1993; Yin et al., 1997). Ein Indiz dafür, dass dieser Mechanismus

aus mehreren Untereinheiten besteht, liefert die Tatsache, dass die Hitze-induzierte Apoptose sowohl über einen p53 abhängigen sowie einen unabhängigen Weg verlaufen kann (Yin et al., 1998). So verläuft eine apoptotische Zerstörung durch Strahlung beschädigter Zellen mittels eines p53 vermittelten Weges und eine Zerstörung von Spermatozyten mit synaptischen Fehlern unabhängig von p53 (Odorisio et al., 1998). Es wäre interessant zu untersuchen, ob Tesmin eine Rolle in der Regulation des p53 unabhängigen Weges einnimmt und ob eine Translokation in den Kern durch Hitze oder weitere Stressfaktoren, wie z.B. UV-Licht, induziert werden kann und in wieweit Iporin in diese Regulierung involviert ist. Da mit Hilfe der immunhistochemischen Analyse gezeigt werden konnte, dass ein geringer Teil von Iporin auch in den Spermatozyten lokalisiert ist (siehe Abbildung 5.12 C), wäre es ebenso möglich, dass Iporin und Tesmin in den Spermatozyten miteinander interagieren. So bestünde die Möglichkeit, dass Iporin die zelluläre Lokalisation von Tesmin dirigiert, da mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden konnte, dass beide Proteine im Zytosol und insbesondere im kernnahen Bereich miteinander kolokalisieren (siehe Abbildung 5.19 E). Da der Teil von Tesmin, der das zweite konservierte Cysteinreiche Motiv enthält, als Bindedomäne für Iporin eingegrenzt werden konnte, aber ebenso als Sensor für Schwermetalle diskutiert wird, wäre es möglich, dass eine Stressinduktion zu einer Unterbrechung der Iporin-Tesmininteraktion führt und folgend Tesmin in den Zellkern wandert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass Iporin in Zellen des Nebenhodens detektiert werden kann (siehe 5.5. „Zelluläre Lokalisation von Iporin, Rab1B und GM130 in murinem und humanem Hodengewebe“), jedoch wurden bis heute keine Untersuchungen durchgeführt, ob Tesmin in den Nebenhoden exprimiert wird. Da Sutou et al. ein Tesminsignal in den reifenden Spermatisiden entlang der Kernmembran detektierten, postulierten sie, dass Tesmin eine Rolle in der Spermienreifung einnehmen könnte. So wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob und in welchen Zellen der Epididymis Tesmin exprimiert wird. Da jedoch noch kein spezifischer Tesmin Antikörper im Handel angeboten wird, wäre es notwendig, einen polyklonalen Antikörper herzustellen, um ihn dann in immunhistochemischen Analysen einsetzen zu können.

Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Iporin-Tesmin Interaktion auch eine Rolle in anderen Gewebe- und Zelltypen spielt. Ebenso gibt es Diskrepanzen in der für Tesmin beschriebenen Gewebespezifität. Sugihara et al. zeigen zusätzlich zur Expression in Testis eine Tesmin mRNA Expression in der Leber, die von Olesen et al. nicht beobachtet werden konnte. Sie postulieren, dass Tesmin im fötalen und adulten Herzen eine Rolle spielen könnte. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind womöglich auf die Sensitivität der durchgeführten Tests zurückzuführen und ähnliche Unstimmigkeiten bezüglich Genexpressionen wurden bereits zuvor beschrieben (Hacker et al., 1995). So könnten der polyklonale Tesmin Antikörper sowie der bereits vorliegende Iporin Antikörper 1179 in „Western Blot“ und immunhistochemischen Analysen unterschiedlicher Gewebelysate bzw. Gewebeschnitte eingesetzt werden, um zu zeigen, ob beide Proteine auch in weiteren Geweben exprimiert werden. Diese Gewebezuordnung der Proteinexpression könnte vielleicht auch Rückschlüsse auf die Funktion von Iporin sowie Tesmin erlauben.

6.8. Subzelluläre Verteilung von Iporin und Tesmin

Die subzelluläre Lokalisation von Tesmin konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse beschrieben und mit Hilfe des Percoll-Gradienten bestätigt werden. Das HA-„getaggte“ GFP-Tesmin „full length“ Signal konnte in den Fraktionen der unbehandelten Zellen 1-4 (löslich) und 12-16 (membrangebunden) (siehe Abbildung 5.23 A) detektiert werden. Nach Behandlung der Zellen mit Cadmiumchlorid konnte das GFP-Tesmin „full length“ Signal nur noch in den hinteren Fraktionen 12-16 detektiert werden (siehe Abbildung 5.23 B).

Wie der Abbildung 5.23 C zu entnehmen ist, wurde ein Iporinsignal in unbehandelten Zellen in den Fraktionen 12-15 detektiert. Diese Beobachtung stimmt nur zum Teil mit der Lokalisation von Iporin in Zellen überein, die mittels Immunfluoreszenzanalysen detektiert werden konnte. In den Säugetierzellen ist Iporin ubiquitär im Zytosol verteilt und akkumuliert am Zellkern bzw. ist schwach im Zellkern verteilt. So wurde mit Hilfe zahlreicher Datenbanken ein Hinweis für mögliche transmembrane Regionen gesucht. Intensive Recherchen mit dem HMMTOP Programm ergaben, dass Iporin zwei mögliche Transmembranregionen besitzt und zwar an Position AS 1107-1125 und an Position AS 1156-1172 (Tusnady und Simon, 1998 und 2001). Ein weiteres Programm PRED-TMR bestätigte eine transmembrane Region an Position AS 1156-1174 (Pasquier et al., 1999). Parallel wurden Daten mit Hilfe des TMpred Programms gesammelt, die zwar den gleichen Bereich eingrenzen konnten, jedoch war die hier angegebene Wahrscheinlichkeit, dass es sich tatsächlich um transmembrane Regionen handelt, sehr gering (Hofman und Stoffel, 1993). Die Ergebnisse des Percoll-Gradienten konnten durch eine Zytosol-Membran-Fraktionierung untermauert werden. In unbehandelten Zellen kann ein starkes Signal in der löslichen Fraktion (S100) und ein schwächeres in der membrangebundenen Fraktion (P100) detektiert werden, deren Verhältnis sich in Cadmiumchlorid behandelten Zellen ändert. Entsprechend hierzu wurde das endogene Iporinsignal in unbehandelten Zellen detektiert. Wie bereits für die Ergebnisse des Percoll-Gradienten diskutiert, konnte ein stärkeres Signal in der membrangebundenen Fraktion detektiert werden und ein schwaches in der zytosolischen Fraktion (siehe Abbildung 5.24). Bereits Bayer et al. konnten diese Verteilung beschreiben (Bayer et al., 2005). Wahrscheinlich ist, dass es sich bei Iporin um kein integrales Membranprotein handelt, sondern um ein Protein, das zum Teil an kleine membranumhüllte Vesikel gebunden und zum Teil löslich im Zytoplasma vorliegt. Sonst hätte ein Signal ebenfalls in den ersten Fraktionen, die mit Hilfe der Zellfraktionierungsmethode getrennt wurden und den löslichen Komponenten entsprechen, detektiert werden müssen. Vielleicht wurde zu wenig Zellmaterial zur Fraktionierung eingesetzt, so dass das Iporinsignal zu schwach war, um es deutlich in den löslichen Fraktionen detektieren zu können. In wieweit Iporin jedoch in der Zelle an membranumhüllten Kompartimenten oder Vesikeln lokalisiert ist, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden.

6.9. Ausblick

In Rahmen dieser Arbeit wurde der neue Interaktionspartner der kleinen GTPase Rab1B, das humane Iporin, analysiert, das ebenfalls mit GM130 interagiert (Bayer et al., 2005). Bisher konnten keine funktionelle Daten für diese Interaktion gesammelt werden, so dass es interessant wäre, zu erforschen, in wieweit Iporin an der Ausbildung bzw. Anheftung und Fusion von Vesikeln im ER-Golgi Transport eine Rolle spielt. Im Folgenden sollen einige experimentelle Ansätze diskutiert werden, die die Rolle von Iporin im vesikulären Transport klären könnten.

Die Bildung von Transportvesikeln wird mitunter von Arf und Sar Proteinen induziert, einer weiteren gut beschriebene Familie der Ras Superfamilie (Pasqualato et al., 2002). Die kleine GTPase Sar1 wird bei der Ausbildung von COPII bedeckten Vesikeln am ER an „ER export sites“ rekrutiert, an welchen das Membranprotein Sec12, ein Sar1 „nucleotide exchange factor“ (GEF), lokalisiert ist (Nakano und Muramatsu, 1989; Weissman et al., 2001). Durch einen Austausch von GDP durch GTP wird Sar1 aktiviert, an die ER Membran gebunden und COPII Proteine zur Bildung von Transportvesikeln rekrutiert (Pfeffer, 2003). Weiterhin heftet sich der heteromere Proteinkomplex Sec23/Sec24, der eine Rekrutierung des Cargomaterials nach sich zieht, und folgend der heterotetramere Sec13/31 Komplex an (Barlowe et al., 1994; Barlowe, 1998; Kuehn et al., 1998; Matsuoka et al., 1998; Lederkremer et al., 2001; Schekman, 2002). Sec23 vermittelt hierbei als GAP („GTPase activating protein“) für Sar1 die GTP-Hydrolyse und somit die Dissoziation des „coats“ (Hicke et al., 1992). Es konnte

gezeigt werden, dass in Säugetierzellen, die mit einem Sar1 Antikörper behandelt wurden, eine Inhibierung von Sar1 in den Zellen dazu führte, dass zwar Vesikel gebildet worden sind, diese aber keine spezifische COPII Hülle trugen und nicht in der Lage waren, mit dem Golgi Apparat zu fusionieren (Siddiqi et al., 2002). So könnte, z.B. in HeLa SS6 Zellen, in denen Sar1 durch Zugabe des Sar1 Antikörpers inhibiert wird, überprüft werden, ob Iporin an der Ausbildung der Transportvesikel in Wechselwirkung mit Rab1 beteiligt ist und durch einen Transport mit den COPII Vesikeln an die Golgimembran gelangt, um folgend mit GM130 eine Interaktion eingehen zu können, oder ob Iporin, unabhängig von Rab1B, mit GM130 interagieren kann.

Eine weitere Möglichkeit, die Funktion von Iporin in vesikulären Transportprozessen zu untersuchen, bietet das virale Glykoprotein ts045 VSVG, „getagged“ mit dem „green fluorescent protein“. So kann sowohl die Bildung sowie der Weg der einzelnen Transportintermediate in lebenden Zellen beobachtet werden (Presley et al., 1997). Früher wurde die temperatursensitive Mutante des Glykoproteins eingesetzt, um Membrantransportprozesse zu untersuchen. Bei 40°C kehrt das inaktive Protein in das ER zurück und gelangt in den Golgi Komplex bei Reduktion der Temperatur auf 32°C (Kreis und Lodish, 1986; Beckers et al., 1987; Bergmann, 1989). So könnte die Lokalisation von Iporin, zeitabhängig nach Reduktion der Temperatur, in den Zellen beobachtet werden, um so daraus schließen zu können, ob Iporin mit COPII umhüllten Vesikeln vom ER zum Golgi transportiert wird, oder ob es ubiquitär in der Zelle verteilt ist und so noch andere Prozesse steuert. Hierbei wäre es ebenfalls interessant, einzelne Iporinmutanten zu überexprimieren, um deren Transport in den Zellen nachvollziehen zu können.

Es konnte mehrfach beschrieben werden, dass die Annäherung eines Vesikels an die Zielmembran mit der spezifischen Erkennung von Proteinen und Komplexen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, einhergeht (Lupashin und Sztul, 2005). So wird der Transport vom ER zum Golgi mitunter vom TRAPPI Komplex vermittelt. Dieser besteht sowohl in der Hefe sowie in Säugetierzellen aus sieben Untereinheiten, welche stabil an die Golgi Membranen verankert werden (Sacher et al., 1998; Sacher et al., 2000). Der TRAPPI Komplex, der in Hefezellen aktiv ist, dient als ein GEF und vermittelt so den GDP/GTP Austausch der kleinen GTPase Ypt1p am *cis*-Golgi (Wang et al., 2000). Ebenso konnte eine GEF Funktion für das Säugetier-Homolog und Rab1 beschrieben werden (Sacher et al., 2001). Mit Hilfe eines Transport-„assays“ mit semi-intakten Zellen konnte gezeigt werden, dass COPII zuerst an Bet3, welches ein Teil des Multikomplexes TRAPPI ist, bindet und folgend eine Interaktion zwischen Bet3 und Rab1 stattfindet (Loh et al., 2005). So wird postuliert, dass der TRAPPI Komplex als Markierung für ankommenden COPII, bzw. COPI umhüllte Vesikel fungieren könnte (Sacher et al., 2001). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, z.B. mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems zu untersuchen, ob eine Interaktion zwischen Iporin und einer TRAPPI Untereinheit stattfindet und so zur weiteren Spezialisierung der COPII umhüllten Vesikel führt.

Da Iporin, ähnlich wie MAP, ein direkter Interaktionspartner des Tumor-Suppressorgens Merlin, eine Multidomänen-Struktur aufweist, wird vermutet, dass es sich bei beiden Proteinen um Adaptorproteine handelt, die in zahlreiche Protein/Proteininteraktionen der Signaltransduktionswege involviert sind, wie es bereits für ein weiteres Protein, das eine RUN und SH3 Domäne enthält, Nesca, beschrieben werden konnte (Lee et al., 2004; MacDonald; 2004). So konnte bereits ein Konsensusmotiv mit Hilfe des „phage displays“ als mögliches Interaktionsmotiv der SH3 Domäne von Iporin beschrieben werden: PP Ψ X₂M, wobei Ψ für eine aliphatische Aminosäure steht (A, I, L, V) und X für eine beliebige Aminosäure (Bayer et al., 2005). Wie bereits von Bućko-Justyna gezeigt, konnte die SH3 Domäne als mögliches Interaktionsmotiv für das GTP-gebundene H-Ras Protein identifiziert werden, wobei die Funktion dieser Interaktion noch nicht weiter charakterisiert werden konnte (Bućko-Justyna, 2005). So wäre es interessant, weitere Interaktionspartner von Iporin zu finden, die eine

direkte Interaktion mit der SH3 Domäne eingehen. Hierzu gäbe es zwei Möglichkeiten, erstens die Suche neuer Bindungspartner mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems und zweitens spezifische Proteine mit Hilfe des BLAST Programms zu identifizieren, die das Konsensusmotiv PPΨX₂M tragen und diese folgend Interaktionsstudien mit Iporin zu unterziehen.

Bereits 20 Jahre zuvor konnte gezeigt werden, dass der Transport durch den Golgi in Abhängigkeit vom Zell-Zyklus steht (Featherstone et al., 1985). So unterliegen eukaryotische Zellen während mitotischer Vorgänge einem Kontrollmechanismus, um eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen (Karyokinese), aber auch der intrazellulären Organellen (Zytokinese) an die Tochterzellen zu gewährleisten (Puthenveedu und Linstedt, 2001; Cleveland et al., 2003; Bucci und Chiariello, 2006). Ist dieser defekt, verharren die Zellen in der Metaphase. So wurde postuliert, dass Checkpoint-Kontrollmechanismen in Organellen vorkommen, die kritisch für die Zellfunktion sind, wie z.B. der Golgi Apparat (Warren, 1993; Warren und Wickner, 1996; Sütterlin et al., 2002). Preisinger et al. konnte nun einen Zusammenhang zwischen der Golgi Morphologie und der Kontrolle des Zell-Zyklus beschreiben (Preisinger et al., 2005). So ist in tierischen Zellen die Fragmentierung und Verteilung des Golgi Apparates aus der pericentriolaren Region zum ER in so genannte MGFs (mitotische Golgi Fragmente) notwendig, damit die Zellen in die Mitose gehen können (Lucocq et al., 1987). Während mitotischer Vorgänge wird neben zahlreichen Proteinen auch GM130 mittels Cdk1 („Cyclin-dependent kinase“; auch p34^{Cdc2} genannt) /Cyclin B am Serin der Position 25 phosphoryliert, so dass eine p115 Anheftung nicht mehr möglich wird (Nakamura et al., 1997; Lowe et al., 1998; Lowe et al., 2000). Die fehlende Bindungsmöglichkeit zwischen GM130 und p115 korreliert mit der *in vivo* und *in vitro* gezeigten Inhibition der Anbindung von p115 an Golgi Membranen (Levine et al., 1996; Shima et al., 1997). Das jedoch die großen Veränderungen des Golgi Apparates während mitotischer Vorgänge nicht allein durch die Phosphorylierung eines Proteins erklärt werden können, konnte gezeigt werden, da GRASP65 als das hauptsächliche Phosphoprotein hierbei eine ebenso entscheidende Rolle einnimmt. So dient GRASP65 ebenfalls als Substrat für die Cdc2-Cyclin B mitotische Kinase und folgend für Plk1 („polo-like kinase“), welche eine Rolle als Checkpoint für den Zusammenbruch des Golgi Apparates einnimmt (Lin et al., 2000; Sütterlin et al., 2001; Lane et al., 2002; Preisinger et al., 2005). Die mitotische Phosphorylierung beeinflusst die Selbst-Oligomerisierung von GRASP65 und führt so zum Zusammenbruch der Golgi Struktur (Wang et al., 2003; Wang et al., 2005). Am Ende der Telophase kommt es zum Wiederaufbau des Golgis und entsprechend wird GM130 durch die Protein Phosphatase 2A dephosphoryliert (Lowe et al., 2000). Interessanterweise konnten auch kleine GTPasen als Substrat für Cdk1 beschrieben werden. So werden sowohl Rab1 und Rab4 phosphoryliert und translokalisieren in das Zytosol (van der Sluijs, 1992a; Bailly et al., 1991). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob Iporin ebenfalls in der Zellzyklus abhängigen Phosphorylierung eine Rolle spielt und z.B. als eine wichtige Komponente den vesikulären Transport zwischen dem ER und Golgi reguliert, insbesondere, da Bućko-Justyna eine Phosphorylierung von Iporin zeigen konnte.

7. Zusammenfassung

Individuelle Transportereignisse benötigen distinkte, aus zahlreichen Untereinheiten bestehende Anheftungsfaktoren, Rab GTPasen und schließlich SNARE Proteine, so dass ersichtlich wird, dass diese Prozesse durch viele verschiedene Moleküle sowie Protein/Proteininteraktionen gesteuert werden. Dadurch wird ermöglicht, dass zeitlich und räumlich regulierte, selektiv eingeteilte Membrananheftungsschritte in eukaryotischen Zellen stattfinden können (Pfeffer, 1999). Einige Rab Effektoren sind miteinander verwandt, die meisten zeigen jedoch keine Sequenzhomologien zueinander und können so distinkte biologische Prozesse kontrollieren (Deneka et al., 2003). Im Zentrum meiner Arbeit stand die molekulare und biochemische Charakterisierung des neuen Rab1 Interaktionspartners, Iporin (Bayer et al., 2005).

Das zentrale Motiv des Iporinproteins ist die RUN Domäne, die von Bayer et al. als Rab1 Bindedomäne eingegrenzt werden konnte. Stützend auf Datenbankvorhersagen konnte ein mögliches Leucin-„zipper“ Motiv beschrieben und eine Homodimerisierung des Proteins, die ggf. über dieses Motiv vermittelt wird, gezeigt werden. Zusätzlich zu den bereits publizierten Daten bezüglich der Iporin-GM130 Interaktion konnte die RUN Domäne ebenfalls als interagierendes Motiv für GM130 analysiert und die Kollokalisierung beider Proteine in Säugetierzellen detektiert werden.

Eine präferentielle mRNA Expression von Iporin konnte im Gehirn- und Hoden gezeigt werden, die durch „Western Blot“ Analysen in murinem und humanem Gehirn- und Hodengewebe sowie in murinem Ovariengewebe bestätigt werden konnten und eine entwicklungspezifische Expression von Iporin vermuten lassen. In diesem Zusammenhang ist es mir gelungen, die Lokalisation von Iporin und seinen beiden Interaktionspartnern Rab1B und GM130 sowohl in den Tubuli seminiferi und in der Epididymis zu zeigen, wobei eine Rolle der drei Proteine in der Spermatogenese und der Spermiogenese noch bestimmt werden muss.

Mit Hilfe des „yeast two-hybrid“ Systems konnte das humane Tesmin als neuer Interaktionspartner von Iporin gefunden und bestätigt werden. Das Testis- und Ovarien-spezifische Protein zeichnet sich durch zwei Cystein-reiche Bereiche aus, wodurch eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu Metallothioneinen begründet ist. So migriert das zytosolische Tesminprotein nach Behandlung der Zellen mit der Schwermetallverbindung Cadmiumchlorid in den Zellkern, wobei diese Translokation keinen Einfluß auf die Lokalisation von Iporin hat. Analysen mit Hilfe des Percoll-Gradienten und der Zytosol-Membran-Fraktionierung konnten die subzelluläre Lokalisation von Iporin und Tesmin, hier in Cadmiumchlorid unbehandelten und behandelten Zellen, bestätigen.

Da bis heute nur sehr wenige funktionelle Daten für Iporin beschrieben werden konnten, sollten weitere Untersuchungen zur Klärung seiner Funktion, insbesondere in vesikulären Transportprozessen, erfolgen.

Literaturverzeichnis

- Abel, J., de Ruiter, N. und Kuhn-Velten, W.N. (1991): Comparative study on metallothionein induction in whole testicular tissue and isolated Leydig cells. *Arch.Toxicol.* **653**: 228-234
- Achanzar, W.E., Achanzar, K.B., Lewis, J.G., Webber, M.M. und Waalkes, M.P. (2000): Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **164**: 291-300
- Acharya, U., McCaffery, J.M., Jacobs, R. und Malhotra, V. (1995): Reconstitution of vesiculated Golgi membranes into stacks of cisternae: requirement of NSF in stack formation. *J.Cell Biol.* **129**: 577-589
- Advani, R.J., Bae, H.R., Bock, J.B., Chao, D.S., Doung, Y.C., Prekeris, R., Yoo, J.S. und Scheller, R.H. (1998): Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. *J.Biol.Chem.* **273**: 10317-10324
- Albert, S., Will, E. und Gallwitz, D. (1999): Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *EMBO J.* **18**: 5216-5225
- Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M.C. und Zerial, M. (1994): Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* **13**: 5262-5273
- Alexandrov, K., Simon, I., Yurchenko, V., Iakovenko, A., Rostkova, E., Scheidig, A.J. und Goody, R.S. (1999): Characterization of the ternary complex between Rab 7, REP-1 and Rab geranylgeranyl transferase. *Eur.J.Biochem.* **265**: 160-170
- Ali, B.R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. und Seabra, M.C. (2004): Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J.Cell Sci.* **117**: 6401-6412
- Ali, B.R. und Seabra, M.C. (2005): Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochem.Soc.Trans.* **33**: 652-656
- Allan, B.B., Moyer, B.D. und Balch, W.E. (2000): Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**: 444-448
- Allan, V.J., Thompson, H.M. und McNiven, M.A. (2002): Motoring around the Golgi. *Nat.Cell.Biol.* **4**: E236-E242
- Alory, C. und Balch, W.E. (2001): Organization of the Rab-GDI/Chm superfamily: the functional basis for choroideremia disease. *Traffic* **2**: 532-543
- Alto, N.M., Sonderling, J. und Scott, J.D. (2002): Rab32 is an A-Kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics. *J.Cell Biol.* **158**: 659-668
- Alvarez, C., Fujita, H., Hubbard, A. und Sztul, E. (1999): ER to Golgi transport: requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J.Cell Biol.* **147**: 1205-1222
- Alvarez, C., Garcia-Mata, R., Hauri, H.P. und Sztul, E. (2001): The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic. *J.Biol.Chem.* **276**: 2693-2700
- Alvarez, C., Garcia-Mata, R., Brandon, E. und Sztul, E. (2003): COPI recruitment is modulated by a Rab 1b-dependent mechanism. *Mol.Biol.Cell.* **14**: 2116-2127
- Anant, J.S., Desnoyers, L., Machius, M., Demeler, B., Hansen, J.C., Westover, K.D., Deisenhofer, J. und Seabra, M.C. (1998): Mechanism of Rab Geranylgeranylation: Formation of the catalytic ternary complex. *Biochem.* **36**: 12559-12568
- Andres, D.A., Seabra, M.C., Brown, M.S., Armstrong, S.A., Smeland, T.E., Cremers, F.P. und Goldstein, J.L. (1993): cDNA cloning of component of a Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab Escort Protein. *Cell* **73**: 1091-1099
- Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Honin, S. und Jahn, R. (2000): The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol.Biol.Cell.* **11**: 3289-3298
- Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. und Schneider, T.R. (2002): Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat.Struct.Biol.* **9**: 107-111
- Antonny, B. und Schekman, R. (2001): ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **13**: 438-443

- Apostolova, M.D. und Cherian, M.G. (2000): Delay of M-phase onset by aphidicolin can retain the nuclear localization of zinc and metallothionein in 3T3-L1 fibroblasts. *J.Cell.Physiol.* **183**: 247-253
- Aravindan, G.R., Oineau, C., Bardin, C.W. und Cheng, C.Y. (1996): Ability of trypsin in mimicking germ cell factors that affect Sertoli cell secretory function. *J.Cell.Physiol.* **168**: 123-133
- Armstrong, J., Thompson, N., Squire, J.H., Smith, J., Hayes, B. und Solari, R. (1996): Identification of a novel member of the Rab 8 family from the rat basophilic leukaemia cell line, RBL.2H3. *J.Cell.Sci.* **109**: 1265-1274
- B**ahadoran, P., Busca, R., Chiaverini, C., Westbroek, W., Lambert, J., Bille, K., Valony, G., Fukuda, M., Naeyaert, J. M. und Ortonne, J. P., Ballotti, R. (2003): Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by RAB27A missense mutations found in patients with Griscelli syndrome. *J.Biol.Chem.* **278**: 11386-11392
- Bailly, E., McCaffrey, M., Touchot, N., Zahraoui, A., Goud, B. und Bornens, M. (1991): Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34^{cdc2}. *Nature* **350**: 715-718
- Bannykh, S.I., Rowe, T. und Balch, W.E. (1996): The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J.Cell Biol.* **135**: 19-35
- Barbacid, M. (1987): Ras genes. *Annu.Rev.Biochem.* **56**: 779-827
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. und Schekman, R. (1994): COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**: 895-907
- Barlowe, C. (1997): Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *J.Cell Biol.* **139**: 1097-1108
- Barlowe, C. (1998): COP II and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim.Biophys.Acta.* **1404**: 67-76
- Barlowe, C. (2002): COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **14**: 417-422
- Barlowe, C. (2003): Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* **13**: 295-300
- Barr, F.A., Puype, M., Vandekerckhove, J. und Warren, G. (1997): GRAPS65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* **91**: 253-262
- Barr, F.A.; Nakamura; N. und Warren, G. (1998): Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J.* **17**: 3258-3268
- Barr, FA, und B. Short. 2003. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr.Opin.Cell Biol.* **15**:405-413
- Bartkiewicz, M., Houghton, A. und Baron, R. (1999): Leucine zipper-mediated homodimerization of the adaptor protein c-Cbl. *J. Biol. Chem.* **274**: 30887-30895
- Bascom, R.A., Srinivasan, S. und Nussbaum, R.L. (1999): Identification of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J.Biol.Chem.* **274**: 2953-2962
- Bayer, M. (1999): Identifizierung und Charakterisierung zellulärer Interaktionspartner exocytotischer kleiner GTPasen. *Diplomarbeit WWU Münster*
- Bayer, M., Fischer, J., Kremerskothen, J., Ossendorf, E., Matanis, T., Konczal, M., Weide, T. und Barnekow, A. (2005): Identification and characterization of Iporin as a novel interaction partner for rab 1. *BMC Cell Biol.* **6**: 15
- Beard, M., Satoh, A., Shorter, J. und Warren, G. (2005): A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J.Biol.Chem.* **280**: 25840-25848
- Beaudoing, E., Freier, S., Wyatt, J., Claverie, J.-M. und Gautheret, D. (2000): Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* **10**: 1001-1010
- Beckers, C.J., Keller, D.S. und Balch, W.E. (1987): Semi-intact cells permeable to macromolecules: Use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Cell* **50**: 523-534
- Bellvé, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M. und Dym, M. (1977): Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. *J.Cell Biol.* **74**: 68-85
- Bennett, M. und Scheller, R.H. (1994): A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Annu.Rev.Biochem.* **63**: 63-100

- Bergmann, J.E. (1989): Using temperature-sensitive mutants of VSV to study membrane protein biogenesis. *Methods.Cell.Biol.* **32**: 85-110
- Bernards A. (2003): GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim.Biophys.Acta.* **1603** :47-82.
- Bilbilis, K. (2002): Studien zur Funktion und Interaktion ER/Golgi lokalisierter Rab GTPasen. *Diplomarbeit WWU Münster*
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acid.Res.* **7**: 1513-1523
- Bode, G. (2000): Überexpression des rabGDI Proteins induziert morphologische Veränderungen des Golgi-Apparates. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Boenisch, T. (2003): Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage 2003, DakoCytomation GmbH, Hamburg
- Bonifacino, J.S. und Lippincott-Schwartz, J. (2003): Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**: 409-414
- Bonifacino, J.S. und Glick, B.S. (2004): The mechanism of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**: 153-166
- Bornberg-Bauer, E., Rivals, E. und Vingron, M. (1998): Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic.Acid.Res.* **26**: 2740-2746
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. und McCormick, F. (1991): The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127
- Brauers, A., Schurmann, A., Massmann, S., Muhl-Zurbes, P., Becker, W., Kainulainen, H., Lie, C. und Joost, H.G. (1996): Alternative mRNA splicing of the novel GTPase Rab28 generates isoforms with different C-termini. *Eur.J.Biochem.* **237**: 833-840
- Brown, T.A. (1999): Gentechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2. Auflage
- Bucci, C. und Chiariello, M. (2006): Signal transduction gRABs attention. *Cell.Sign.* **18**: 1-8
- Bučko-Justyna, M. (2005): Testis specific serine-threonine kinases: regulation and their role in disease. *Dissertation Universität Utrecht*
- Burd, C.G. und Emr, S.D. (1998): Phosphatidylinositol(3)-Phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol.Cell* **2**: 157-162
- Burgos, M. und Fawcett, D. (1955): Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatid in the cat (*Felis domestica*). *J.Biophys.Biochem.* **1**: 287-313
- Burgoyne, R.D. und Morgan, A. (2003): Secretory granule exocytosis. *Physiol.Rev.* **83**: 581-632
- Busch, S.J. und Sassone-Corsi, P. (1990): Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet.* **6**: 36-40
- Byers, S., Jegou, B., MacCalman, C. und Blaschuk, O. (1993): Sertoli cell adhesion molecules and the collective organization of the testis. In: Russell, L.D. und Griswold, M.D., eds. The Sertoli cell. Clearwater, FL: Cache River Press: 461-476
- Byskov, A.G. und Hoyer, P.E. (1994): Embryology of mammalian gonads and ducts. In: Knobil, E., Neill, J.D., editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press: 487-539
- Calero, M., Chen, C.Z., Zhu, W., Winand, N., Havas, K.A., Gilbert, P.M., Burd, C.G. und Collins, R.N. (2003): Dual prenylation is required for Rab protein localization and function. *Mol.Biol.Cell.* **14**: 1852-1867
- Callebaut, I., De Gunzburg, J., Goud, B. und Mornon, J.-P. (2001): RUN-domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. *Trends Biochem.Sci.* **26**: 79-83
- Cao, X., Ballew, N. und 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. und Barlowe, C. (2000): Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COP II vesicles with acceptor membranes. *J.Cell Biol.* **149**: 55-66
- Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. und Pfeffer, S.R. (2001): Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* **292**: 1373-1376
- Casey, P.J. und Seabra, M.C. (1996): Protein prenyltransferases. *J.Biol.Chem.* **271**: 5289-5292

- Castellano, F., Wilson, A.L. und Maltese, W.A. (1995): Intracellular transport and maturation of nascent low density lipoprotein receptor is blocked by mutation in the Ras-related GTP-binding protein, Rab1B. *J.Recept.Signal Transduct.Res.* **15**: 847-862
- Castillo, P.E., Janz, R., Südhof, T.C., Tzounopoulos, T., Malanka, R.C. und Nicoll, R.A. (1997): Rab3A is essential for mossy long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **388**: 590-593
- Chao, D.S., Hay, J.C., Winnick, S., Prekeris, R., Klumperman, J. und Scheller, R.H. (1999): SNARE membrane trafficking dynamics in vivo. *J.Cell Biol.* **144**: 869-881
- Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K. und Zerial, M. (1990): Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol.Cel.Biol.* **10**: 6578-6585
- Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. und Zerial, M. (1991): Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**: 769-772
- Chen, Y.A. und Scheller, R.H. (2001): SNARE-mediated membrane fusion. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**: 98-106
- Cheng, C.Y. und Mruk, D.D. (2002): Cell junction dynamics in the testis; Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol.Rev.* **82**: 825-874
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. und Fields, S. (1991): The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **88**: 9578-9582
- Chiu, R., Novikov, L., Mukherjee, S. und Shields, D. (2002): A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J.Cell Biol.* **159**: 637-648
- Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D. und Zerial, M. (1999): The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**: 621-625
- Cicchetti, P., Mayer, B.J., Thiel, G. und Baltimore, D. (1992): Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* **257**: 803-806
- Clary, D.O., Griff, I.C. und Rothman, J.E. (1990): SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* **61**: 709-721
- Cleveland, D.W., Mao, Y. und Sullivan, K.F. (2003): Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**: 407-421
- Colicelli, J. (2004): Human Ras superfamily proteins and related GTPases. *Science STKE* re13
- Conibear, E. und Stevens, T.H. (2002): Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex require for protein sorting at the yeast late Golgi. *Mol.Biol.Cell* **11**: 305-323
- Constantinescu, A.-T., Rak, A., Alexandrov, K., Esters, H., Goody, R.S. und Scheidig, A.J. (2002): Rab-superfamily-specific regions of Ypt7p are structurally different from others RabGTPases. *Structure* **10**: 569-579
- Cooper, T.G. (1999): Epididymis. *Encyclopedia of Reproduction*, Vol. 2
- Cooper, T.G. und Yeung, C.-H. (2003): Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc.Res.Techn.* **61**: 28-38
- Cooper, T.G. (2005): Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum.Reprod.* **20**: 9-11
- Cormont, M., Mari, M., Galmiche, A., Hofman, P. und Le Marchan-Brustel, Y. (2001): A FYVE-finger-containing protein, Rabip4, is a Rab4 effector involved in early endosomal traffic. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**: 1637-1642
- Cosson, P. und Letourneur, F. (1994): Coatamer: interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**: 1629-1631
- Crouse J.E. (1993): "Plasmid pSV-SPORT1"; *GibcoBRL Catalogue* **93**:7p16-7p17
- Crouse, G.F., Frischauf, A. und Lehrach, H. (1983): An integrated and simplified approach to cloning into plasmids and single stranded phages. *Methods.Enzymol.* **101**: 78-89
- Cuif, M.H., Possmayer, F., Zander, H., Bordes, N., Jollivet, F., Couedel-Courteille, A., Janoueix-Lerosey, I., Langsely, G., Bornens, M. und Goud, B. (1999): Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *EMBO J.* **18**: 1772-1782

- Cvitanich, C., Pallisgaard, N., Nielsen, K.A., Hansen, A.C., Larsen, K., Pihakaski-Maunsbach, K., Marcker, K.A. und Jensen, E.O. (2000): CPP1, a DNA-binding protein involved in the expression of a soybean leghemoglobin c3 gene. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **97**: 8163-8168
- Czekay, R.P., Orlando, R.A., Wooward, L., Lundstrom, M. und Farquhar, M.G. (1997): Endocytic trafficking of megalin/RAP complexes: Dissociation of the complexes in late endosomes. *Mol. Biol. Cell.* **8**: 517-532
- D**Adamo, P., Menegon, A., Lo Nigro, C., Grasso, M., Gulisano, M., Tamanini, F., Bienvenu, T., Gedeon, A.K., Oostra, B., Wu, S.K., Tandon, A., Valhorta, F., Balch, W.E., Chelly, J. und Toniolo, D. (1998): Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat.Genet.* **19**: 134-139
- Dagert, M. und Ehrlich, S.D. (1979): Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* **6**: 23-28
- Davis, R.J. (2000): Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-252
- De, S.K., Enders, G.C. und Andrews, G.K. (1991): High levels of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse. *Mol.Endocrinol.* **5**: 628-636
- De Antoni, A., Schmitzova, J., Trepte, H.H., Gallwitz, D. und Albert, S. (2002): Significance of GTP hydrolysis in Ypt1p-regulated endoplasmic reticulum to Golgi transport revealed by the analysis of two novel Ypt1-GAPs. *J.Biol.Chem.* **277**: 41023-41031
- de Graaf, P., Zwart, W.T., van Dijken, R.A., Deneka, M., Schulz, T.K., Geijsen, N., Coffey, P.J., Gadella, B.M., Verkleij, A.J., van der Sluijs, P. und van Bergen en Henegouwen, P.M. (2004): Phosphatidylinositol 4-kinase beta is critical for functional association of rab11 with the Golgi complex. *Mol.Biol.Cell* **4**: 2038-2047
- de Kretser, D.M. und Kerr, J.B. (1988): The cytology of the testis. In Knobil, E. und Neill, J. (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, USA, pp. 837-932.
- de Renzis, S., Sonnichsen, B. und Zerial, M. (2002): Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat.Cell.Biol.* **4**: 124-133
- De Rooij, D.G. (2001): Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121**: 347-354
- Deneka, M., Neeft, M. und van der Sluijs, P. (2003): Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* **38**: 121-142
- Diao, A., Rahman, D., Pappin, D.J., Lucocq, J. und Lowe, M. (2003): The coiled-coil protein golgin-84 is a novel Rab effector required for Golgi ribbon formation. *J.Cell Biol.* **160**: 201-212
- Diaz, E. und Pfeffer, S.R. (1998): TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* **93**: 433-443
- Dirac-Svejstrup, A.B., Sumizawa, T. und Pfeffer, S.R. (1997): Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* **16**: 465-472
- Dirac-Svejstrup, A.B., Shorter, J., Waters, M.G. und Warren, G. (2000): Phosphorylation of the vesicle-tethering protein p115 by a casein kinase II-like enzyme is required for Golgi reassembly from isolated mitotic fragments. *J.Cell Biol.* **150**: 475-488
- Don, J., Winer, M.A. und Wolgemuth, D.J. (1994): Developmentally regulated expression during gametogenesis of the murine gene meg1 suggests a role in meiosis. *Mol.Reprod.Dev.* **38**: 16-23
- Du, L.L. und Novick, P. (2001): Yeast rab GTPase-activating protein Gyp1p localizes to the Golgi apparatus and is a negative regulator of Ypt1p. *Mol.Biol.Cell* **12**:1215-26
- Duden, R. (2003): ER-to-Golgi Transport: COP I & COP II function. *Mol.Membr.Biol.* **20**: 197-207
- Dugan, J.M., deWit, C., McConlogue, L. und Maltese, W.A. (1995): The Ras-related GTP-binding protein, Rab1B, regulates early steps in exocytic transport and processing of beta-amyloid precursor protein. *J.Biol.Chem.* **270**: 10982-10989
- Duman, J.G. und Forte, J.G. (2003): What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* **285**: C237-C249
- Durnham, D.M. und Palmiter, R.D. (1981): Transcriptional regulation of the mouse metallothionein I gene by heavy metals. *J.Biol.Chem.* **256**: 5712-5716
- Dym, M. und Fawcett, D.W. (1970): The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol.Reprod.* **3**: 308-326

- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. und Goud, B. (1998): Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**: 580-585
- Elazar, Z., Mayer, T. und Rorhman, J.E. (1994): Removal of Rab GTP-binding proteins from Golgi membranes by GDP dissociation inhibitor inter-cisternal transport in the Golgi stacks. *J.Biol.Chem.* **269**: 794-797
- Elledge, S.J., Mulligan, J.T., Ramer, S.W., Spottswood, M. und Davis, R.W. (1991): Lambda YES: a multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and Escherichia coli mutations. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **88**: 1731-1735
- Ernekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. und Sudol, M. (1997): The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila enabled. *J.Biol.Chem.* **272**: 32869-32877
- Evan, G.L., Lewis, G.K., Ramsay, G. und Bishop, J.M. (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol.Cell.Biol.* **5**: 3610-3616
- Evans, E.P. (1977): Male-sterile translocations. *Mouse News Lett.* **57**: 17
- Farquhar, M.G. und Palade, G. (1981): The Golgi apparatus (complex) - (1954-81) - from artifact to center stage. *J.Cell Biol.* **91**: 77s-103s
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. und Jahn, R. (1998): Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**: 15781-15786
- Featherstone, C., Griffiths, G. und Warren, G. (1985): Newly synthesized G protein of vesicular stomatitis virus is not transported to the Golgi complex in mitotic cells. *J.Cell Biol.* **101**: 2036-2046
- Ferri, K.F. und Kroemer, G. (2001): Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat.Cell Biol.* **3**: E255-E263
- Fields, S. und Song, O. (1989): A novel system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 45-246
- Fields, S. und Sternglanz, R. (1994): The two hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends.Genet.* **10**: 286-292
- Fischer von Mollard, G., Mignery, G.A., Baumert, M., Perin, M.S., Hanson, T.J., Burger, P.M., Jahn, R. und Südhof, T.C. (1990): Rab3A is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**: 1988-1992
- Fischer, J., Weide, T. und Barnekow, A. (2005): The MICAL proteins and rab1: A possible link to the cytoskeleton? *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **328**: 415-423
- Fisher, H.M. und Aitken, R.J. (1997): Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J.Exp.Zool.* **277**: 390-400
- Flick, J. S. Johnston, M. (1990): Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in Saccharomyces cerevisiae. *Mol.Cell.Biol.* **10**: 4757-4769
- Fontijn, R.D., Goud, B., Echard, A., Jollivet, F., Van Marle, J., Pannekoek, H. und Horrevoets, A.J.G. (2001): The human kinesin-like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis. *Mol.Cell.Biol.* **21**: 2944-2955
- Freedman, R.B., Hirst, T.R. und Tuite, M.F. (1994): Protein disulfide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem.Sci.* **19**: 331-336
- Fritzler, M.J., Hamel, J.C., Ochs, R.L. und Chan, E.K. (1993): Molecular characterization of two human autoantigens: unique cDNAs encoding 95- and 160 kD proteins of a putative family in the Golgi complex. *J.Exp.Med.* **178**: 49-62
- Fujimaki, H., Ishido, M. und Nohara, K. (2000): Induction of apoptosis in mouse thymocytes by cadmium. *Toxicol.Lett.* **115**: 99-105
- Fukuda, M. (2003): Distinct Rab Binding Specificity of Rim1, Rim2, Rabphilin, and Noc2. *J.Biol.Chem.* **278**: 15373-15380
- Gallwitz, D., Donath, C. und Sander, C. (1983): A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. *Nature* **306**: 704-707
- Garrett, M.D., Zahner, J.E., Cheney, C.M. und Novick, P.J. (1994): GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J.* **13**: 1718-1728

- Gaullier, J., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B. und Stenmark, H. (1998): FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* **394**: 432-433
- Gautheret, D., Poirot, O., Lopez, F., Audic, S. und Claverie, J.M. (1998): Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large scale analysis by EST clustering. *Genome Res.* **8**: 524-530
- Gaynor, E.C., Graham, T.R. und Emr, S.D. (1998): COP I in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COP I mutants point the way? *Biochim.Biophys.Acta.* **1404**: 33-51
- Gengyo-Ando, K., Kitayama, H., Mukaida, M. und Ikawa, Y. (1996): A murine neural-specific homolog corrects cholinergic defects in *Caenorhabditis elegans* unc-18 mutants. *J.Neurosci.* **16**: 6695-6702
- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C.F. und Südhof, T.C. (1997): The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic fusion. *Nature* **387**: 810-814
- Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium *Cancer Res.* **12**: 264
- Gietz, R.D., Triggs-Raine, B., Robbins, A., Graham, K.C. und Woods, R.A. (1997): Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid screen. *Mol.Cell.Biochem.* **172**: 67-79
- Giorno, R. (1984): A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn.Immunol.* **2**: 161-166
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, M., Nilsson, T. und Pepperkok, R. (1999): Evidence for a COPI-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat.Cell Biol.* **1**: 423-430
- Gluzman, Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182
- Goody, R.S., Rak, A. und Alexandrov, K. (2005): The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell.Mol.Life Sci.* **62**: 1657-1670
- Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A. und Saraste, J. (1990): Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* **345**: 553-556
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. und Hanahan, D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**:4645 -4649
- Greenfield, J.P., Leung, L.W., Cai, D., Kaasik, K., Gross, R.S., Rodriguez-Boulant, E., Greengard, P. und Xu, H. (2002): Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis. *J.Biol.Chem.* **277**: 12128-12136
- Griffiths, G. und Simons, K. (1986): The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* **234**: 439-443
- Grima, J., Zhu, L. und Cheng, C.Y. (1997): Testin is tightly associated with testicular cell membrane upon its secretion by sertoli cells whose steady-state mRNA level in the testis correlates with the turnover and integrity of inter-testicular cell junctions. *J.Biol.Chem.* **272**: 6499-6509
- Grima, J., Wong, C.C., Zhu, L.J., Zong, S.D. und Cheng, C.Y. (1998): Testin secreted by Sertoli cells is associated with the cell surface, and its expression correlates with the disruption of Sertoli-germ cell junctions but not the inter-Sertoli tight junction. *J.Biol.Chem.* **273**: 21040-21053
- Guan, K. L., Dixon, J. E. (1991): Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal.Biochem.* **192**: 262-267
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C. und Novick, P. (1999): The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* **18**: 1071-1080
- Gültekin, H. und Heermann (1988): The use of polyvinylidene fluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal.Biochem.* **172**: 320-329
- Gurkan, C., Lapp, H., Alory, C., Su, A.I., Hogenesch, J. und Balch, W.E. (2005): Large scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the Membrane. *Mol.Biol.Cell* **16**: 3847-3864
- Habeebu, S.S., Liu, J. und Klaassen, C.D. (1998): Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **149**: 203-209

- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. und Lovell-Badge, R. (1995): Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* **121**: 1603-1614
- Hall, C., Sin, W.C., Teo, M., Michael, G.J., Smith, P., Dong, J.M., Lim, H.H., Manser, E., Spurr, N.K. und Jones, T.A. (1993): α 2-Chimerin, an SH2-containing GTPase activating protein for the Ras-related protein p21 Rac derived by alternate splicing of the human n-chimerin gene, is selectively expressed in brain regions and testes. *Mol.Cell.Biol.* **13**: 4986-4998
- Hamer, D.H. (1986): Metallothionein. *Annu.Rev.Biochem.* **55**: 913-951
- Hammer, J.A. und Wu, X.S. (2002): Rab grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **14**: 69-75
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**: 557
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S. J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816
- Hart, B.A., Lee, C.H., Shukla, G.S., Shukla, A., Osier, M., Eneman, J.D. und Chiu, J.F. (1999): Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: Evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology* **133**: 43-58
- Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehingel, S., Tschochner, H. und Wieland, F. (1996): Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**: 1902-1906
- Haubruck, H., Disela, C., Wagner, P. und Gallwitz, D. (1987): The ras-related protein is an ubiquitous eukaryotic protein: isolation and sequence analysis of mouse cDNA clones highly homologous to the yeast YPT1 gene. *EMBO J.* **6**: 4049-4053
- Haubruck, H., Prange, R., Vorgias, C. und Gallwitz, D. (1989): The ras-related mouse ypt protein can functionally replace the YPT1 gene product in yeast. *EMBO J.* **8**: 1427-1472
- Hauser, B.A., He, J.O., Park, S.O. und Gasser, C.S. (2000): TSO1 is a novel protein that modulates cytokinesis and cell expansion in Arabidopsis. *Development* **127**: 2219-2226
- Hicke, L., Yoshihisa, T. und Schekman, R. (1992): Sec23p and a novel 150-kDa protein functions as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol.Biol.Cell* **3**: 667-676
- Hill, E., Clarke, M. und Barr, F.A. (2000): The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J.* **21**: 5711-5719
- Hinsch, K.D., Habermann, B., Just, I., Pfisterer, S., Schill, W.B. und Aktories, K. (1993): ADP-ribosylation of Rho proteins inhibits sperm motility. *FEBS.Lett.* **334**: 32-36
- Hofman, K. und Stoffel, W. (1993): TMbase – A database of membrane spanning proteins segments. *Biol.Chem.* **374**: 166
- Hohl, T.M., Parlati, F., Wimmer, C., Rothman, J.E., Söllner, T.H. und Engelhardt, H. (1998): Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. *Mol. Cell* **2**: 539-548
- Hong, W. (2005): SNAREs and traffic. *Biochim.Biophys.Acta.* **1744**: 120-144
- Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Howell, S.A., Dortland, B.R., De Zeeuw, C.I., Willemsen, R., Visser, P., Grosveld, F. und Galjart, N. (2001): Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J.* **20**: 4041-4054
- Horiuchi, H., Lippé, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M. und Zerial, M. (1997): A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complex to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**: 1149-1159
- Hsu, S.C., TerBush, D., Abraham, M. und Guo, W. (2004): The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int.Rev.Cytol.* **233**: 243-265
- Huang, X. und Miller, W. (1991): A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm. *Adv.App.Math.* **12**: 337-357
- Hunt, J.M., Bommert, K., Charlton, M.P., Kistner, A., Habermann, E., Augustine, G.J. und Betz, H. (1994): A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* **12**: 1269-1279
- Hunziker, P.E. und Kägi, J.H. (1985): Isolation and characterisation of six human hepatic isometallothioneins. *Biochem.J.* **15**: 375-382

- Hutt, D.M., Da Silva, L.F., Chang, L.H., Prosser, D.C. und Ngsee, J.K. (2000): PRA1 inhibits the extraction of membrane-bound rab GTPase by GDI1. *J.Biol.Chem.* **275**: 18511-18519
- Iida, H., Yoshinaga, Y., Tanaka, S. und Mori, T. (1999): Identification of Rab 3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm. *Dev.Biol.* **211**: 144-155
- Jackson, C.L. (2003): Membrane traffic: Arl GTPases get a GRIP on the Golgi. *Curr.Biol.* **13**: R174-R176
- Janoueix-Lerosey, I., Pasheva, E., de Tand, M.F., Tavitian, A. und de Gunzburg, J. (1998): Identification of a specific effector of the small GTP-binding protein Rap2. *Eur.J.Biochem.* **252**: 290-298
- Jegou, B. (1993): The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int.Rev.Cytol.* **147**: 25-96
- Kägi, J.H.R. und Kojima, Y. (1987): Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia* **52**: 25-61
- Kägi, J.H.R. (1993) in "Metallothionein III", eds. Suzuki, K.Y., Imura, N. und Kimura, M., Birkhäuser, Basel, 29-55
- Kahn, R.A., Der, C.J. und Bokoch, G.M. (1992): The Ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *FASEB J.* **6**: 2512-2513
- Kail, M., Hollinshead, M., Kaufmann, M., Boettcher, J., Vaux, D. und Barnekow, A. (2005): Yeast Ypt11 is targeted to recycling endosomes in mammalian cells. *Biol.Cell* **97**: 651-658
- Kang, Y.-L., Li, H., Chen, W.-H., Tzeng, Y.-S., Lai, Y.-L. und Hsieh-Li, H.M. (2004): A novel PEPP homeobox gene, TOX, is highly glutamic acid rich and specifically expressed in murine testis and ovary. *Biol.Reprod.* **70**: 828-836
- Karin, M. und Gallagher, E. (2005): From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* **57**: 283-295
- Katoh, M. und Katoh, M. (2004): Characterization of *RUSC1* and *RUSC2* genes *in silico*. *Oncol.Rep.* **12**: 933-938
- Kee, Y., Yoo, J.S., Hazuka, C.D., Peterson, K.E., Hsu, S.C. und Scheller, R.H. (1997): Subunit structure of the mammalian exocyst complex. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **94**: 14438-14443
- Keegan, L., Gill, G. und Ptashne, M. (1986): Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**: 699-704
- Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E. und Tres, L.L. (2003): The actin-based motor myosin V is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet.Genome.Res.* **103**: 337-344
- Kirchhausen, T. (2000): Three ways to make a vesicle. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **1**: 187-198
- Klumperman, J. (2000a): Transport between ER and Golgi. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **12**: 445-449
- Klumperman, J. (2000b): The growing Golgi: in search of its independence. *Nat.Cell.Biol.* **2**: E217-E219
- Koller, L.D., Exon, J.H. und Roan, J.G. (1976): Humoral antibody response in mice after a single dose exposure to lead or cadmium. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **151**: 339-342
- Konczal, M. (2001): Analyse zur Expression GTPase regulierender Faktoren. *Diplomarbeit WWU Münster*
- Kooy, J., Toh, B.H., Pettitt, J.M., Erlich, R. und Gleeson, P.A. (1992): Human autoantibodies as reagents to conserved Golgi components: Characterization of a peripheral, 230-kDa compartment-specific Golgi protein. *J.Biol.Chem.* **267**: 20255-20263
- Kreis, T.E. und Lodish, H.F. (1986): Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface. *Cell* **46**: 929-937
- Kuehn, M.J., Herrmann, J.M. und Schekman, R. (1998): COP II-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* **391**: 187-190
- Kyshe, L. und Anderson, J. (1984): Electroblothing of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from acrylamid to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods* **10**: 203-209

- Laemmli, U. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lafer, E.M. (2002): Clathrin-protein interactions. *Traffic* **3**: 513-520
- Lafourcade, C., Galan, J.M., Gloor, Y., Haguenaer-Tsapis, R. und Peter, M. (2004): The GTPase-activating enzyme Gyp1p is required for recycling of internalized membrane material by inactivation of the Rab/Ypt GTPase Ypt1p. *Mol.Cell.Biol.* **24**: 3815-3826.
- Lai, F., Stubbs, L. und Artzt, K. (1994): Molecular analysis of mouse Rab 11b: a new type of mammalian YPT/Rab protein. *Genomics* **22**: 610-616
- Lan, Z., Kurata, W.E., Martyn, K.D., Jin, C. Und Lau, A.F. (2005): Novel Rab GAP-like protein, CIP85, interacts with Connexin43 and induces its degradation. *Biochemistry* **44**: 2385-2396
- Lane, J.D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F.A., Woodman, P.G., Allan, V.J. und Lowe, M. (2002): Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J.Cell Biol.* **156**: 495-509
- Lawler, S., Fleming, Y., Goedert, M. und Cohen, P. (1998): Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases *in vitro*. *Curr.Biol.* **8**: 1387-1390
- Lazar, T., Gotte, M. und 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. und Kirchhausen, T. (2001): Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**: 10704-10709
- Lee, I.K., Kim, K.-S., Kim, H., Lee, J.Y., Ryu, C.H., Chun, H.J., Lee, K.-U., Kim, Y.H., Huh, P.-W., Lee, K.-H., Han, S.-I., Jun, T.-Y. und Rha, H.K. (2004): MAP, a protein interacting with a tumor suppressor, merlin, through the run domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**: 774-783
- Letwin, K., Mizzen, L., Motro, B., Ben-David, Y., Bernstein, A. und Pawson, T. (1992): A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J.* **11**: 3521-3531
- Leung, T., How, B.E., Manser, E. und Lim, L. (1993): Germ cell β -chimaerin, a new GTPase-activating protein for p21Rac, is specifically expressed during the acrosomal assembly stage in rat testis. *J.Biol.Chem.* **268**: 3813-3816
- Levine, T.P., Rabouille, C., Kieckbusch, R.H. und Warren, G. (1996): Binding of the vesicle docking protein p115 to Golgi membranes is inhibited under mitotic conditions. *J.Biol.Chem.* **271**: 17304-17311
- Li, B. und Fields, S. (1993): Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**: 957-963
- Liggett, S.B., Tepe, N.M., Lorenz, J.N., Canning, A.M., Jantz, T.D., Mitarai, S., Yatani, A. und Dorn, G.W. 2nd. (2000): Early and delayed consequences of β_2 -adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* **101**: 1707-1714
- Lin, C.Y., Madsen, M.L., Yarm, F.R., Jang, Y.J., Liu, X. und Erikson, R.L. (2000): Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (Plk) and Cdc2. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **97**: 12589-12594
- Linstedt, A.D. und Hauri, H.P. (1993): Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol.Biol.Cell* **4**: 679-693
- Linstedt, A.D., Jesch, S.A., Mehta, A., Lee, T.H., Garcia-Mata, R., Nelson, D.S. und Sztul, E. (2000): Binding relationships of membrane tethering components. The giantin N terminus and the GM130 N terminus compete for binding to the p115 terminus. *J.Biol.Chem.* **275**: 10196-10201
- Lippincott-Schwartz, J., Cole, .B. und Donaldson, J.G. (1998): Building a secretory apparatus: role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance. *Histochem.Cell.Biol.* **109**:449-62
- Loh, E., Peter, F., Subramaniam, V.N. und Hong, W. (2005): Mammalian Bet3 functions as a cytosolic factor participating in transport from the ER to the Golgi apparatus. *J.Cell Sci.* **18**: 1209-1222
- Lowe, M., Rabouille, C., Nakamura, N., Watson, R., Jackman, M., Jamsa, E., Rahman, D., Pappin, D.J. und Warren, G. (1998): Cdc2 kinase directly phosphorylates the *cis*-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* **94**: 783-793

- Lowe, M., Gonatas, N.K. und Warren, G. (2000): The mitotic phosphorylation cycle of the *cis*-Golgi matrix protein GM130. *J.Cell Biol.* **149**: 341-356
- Lu, L., Tai, G. und Hong, W. (2004): Autoanigen golgin-97, an effector of Arl1 GTPase, participates in traffic from the endosome to the *trans*-Golgi network. *Mol.Biol.Cell* **15**: 4426-4443
- Lucocq, J.M., Pryde, J.G., Berger, E.G. und Warren, G. (1987): A mitotic form of the Golgi apparatus in HeLa cells. *J.Cell Biol.* **104**: 865-874
- Lupas, A. (1996): Cooled coils: new structures and new functions. *Trends.Biochem.Sci.* **21**: 375-382
- Lupashin, V. und Sztul, E. (2005): Golgi tethering factors. *Biochim.Biophys.Acta* **1744**: 325-339
- M**Maag, R.S., Hicks, S.W. und Machamer, C.E. (2003): Death from within: apoptosis and the secretory pathway. *Curr.Opin.Cell Biol.* **15**: 456-461
- MacDonald, J.I.S., Kubu, C.J. und Meakin, S.O. (2004): Nesca, a novel adapter, translocates to the nuclear envelope and regulates neurotrophin-induced neurite outgrowth. *J.Cell Biol.* **164**: 851-862
- Maekawa, M., Toyama, Y., Yasuda, M., Yagi, T. und Yuasa, S. (2002): Fyn tyrosine kinase in Sertoli cells is involved in mouse spermatogenesis. *Biol.Reprod.* **66**: 211-221
- Malhotra, V., Orci, L., Glick, B.S., Block, M.R. und Rothman, J.E. (1988): Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport compartment in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* **54**: 221-227
- Margoshes, M. und Vallee, B.L. (1957): A cadmium protein from equine imaging hyperintensity in Alzheimer's disease: correlation with kidney cortex. *J.Am.Chem.Soc.* **79**: 4813-4814
- Mari, M., Macia, E., Le Marchand-Brustel, Y. und Cormont, M. (2001): Role of the FYVE finger and the RUN domain for the subcellular localization of Rabop4. *J.Biol.Chem.* **276**: 42501-42508
- Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnaudet, G., Berger, E.G., Salamero, J. und Goud, B. (1997): GTP-bound forms of Rab6 induce redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**: 1828-1833
- Martinez, O. und Goud, B. (1998): Rab proteins. *Biochim.Biophys.Acta.* **1404**: 101-112
- Martinez-Menarguez, J.A., Geuze, H.J. und Ballesta, J. (1996): Evidence for a nonlysosomal origin of the acrosome. *J.Histochem.Cytochem.* **44**: 313-320.
- Martinez-Menarguez, J.A., Geuze, H.J., Slot, J.W. und Klumperman, J. (1999): Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* **98**: 81-90
- Matanis, T., Akhmanova, A., Wulf, P., Del Nery, E., Weide, T., Stepanova, T., Galjart, N., Grosvelt, F., Goud, B., De Zeeuw, C.I., Barnekow, A. und Hoogenraad, C.C. (2002): Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat.Cell Biol.* **4**: 986-992
- Matsuda, S., Miyazaki, K., Ichigotani, Y., Kurata, H., Takenouchi, Y., Yamamoto, T., Nimura, Y., Irimura, T., Nakatsugawa, S. und Hamaguchi, M. (2000): Molecular cloning and characterization of a novel human gene (NESCA) which encodes a putative adapter protein containing SH3. *Biochim.Biophys.Acta* **1494**: 321-326
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R. und Yeung, T. (1998): COP II-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and cheMICALLY defined liposomes. *Cell* **93**: 263-275
- Matsuura, T., Kawasaki, Y., Miwa, S., Sutou, S., Ohinata, Y., Yoshida, F. und Mitsui, Y. (2002): Germ cell-specific nucleoplasmic shuttling protein, tesmin, responsive to heavy metal stress in mouse testes. *J.Inorg.Biochem.* **88**: 183-191
- Mattaj, I.W. und Engelmeier, L. (1998): Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu.Rev.Biochem.* **67**: 265-306
- Mayer, T., Touchot, N., Elazar, Z. (1996): Transport between cis and medial Golgi cisternae requires the function of the Ras-related protein Rab6. *J.Biol.Chem.* **271**: 16097-16103
- McClellan, K.A., Gosden, R. und Taketo, T. (2003): Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev.Biol.* **258**: 334-348
- McConlogue, L., Castellano, F., deWit, C., Schenk, D. und Maltese, W.A. (1996): Differential effects of a Rab6 mutant on secretory versus amyloidogenic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J.Biol.Chem.* **271**: 1343-1348

- McKenna, I.M., Bare, R.M. und Waalkes, M.P. (1996): Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated. *Toxicology* **107**: 121-130
- Medema, R.H., de Vries-Smits, A.M.M., van der Zon, G.C.M., Maassen, J.A. und Bos, J.L. (1993): Ras activation by insulin and epidermal growth factor through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21^{ras}. *Mol.Cell Biol.* **13**: 155-162
- Mellman, I. und Warren, G. (2000): The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**: 99-112
- Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F. und de Saint, B. G. (2000): Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat.Genet.* **25**: 173-176
- Ménasché, G., Feldmann, J., Houdusse, A., Desaymard, C., Fischer, A., Goud, B. und de Saint, B. G. (2003): Biochemical and functional characterization of Rab27a mutations occurring in Griscelli syndrome patients. *Blood* **101**: 2736-2742
- Merithew, E., Stone, C., Eathiraj, S. und Lambright, D.G. (2003): Determinants of Rab5 Interaction with the N Terminus of Early Endosome Antigen 1. *J.Biol.Chem.* **278**: 8494-8500
- Miaczynska, M. und Zerial, M. (2002): Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp.Cell.Res.* **272**: 8-14
- Mieusset, R. und Bujan, L. (1995): Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int.J.Androl.* **18**: 169-184
- Mills, I., Jones, A. und Clague, M. (1998): Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr.Biol.* **8**: 881-884
- Misumi, Y., Sohda, M., Tashiro, A., Sato, H. und Ikehara, Y. (2001): An essential cytoplasmic domain for the Golgi localization of coiled-coil proteins with a COOH-terminal membrane anchor. *J.Biol.Chem.* **276**: 6867-6873
- Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Chan, E.K.L. und Schatten, G. (2000a): Vesicular traffic and Golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: Implications for acrosome architecture. *Biol.Reprod.* **63**: 89-98
- Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Chan, E.K.L., Wessel, G. und Schatten, G. (2000b): The Golgi apparatus segregates from the lysosomal/acrosomal vesicle during rhesus spermiogenesis: structural alterations. *Dev.Biol.* **219**: 334-349
- Moyer, B.D., Allan, B.B. und Balch, W.E. (2001): Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic* **2**: 268-276
- Mruk, D.D. und Cheng, C.Y. (2004): Sertoli-sertoli and sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr.Rev.* **25**: 747-806
- Munro, S. (2004): Organelle identity and the organization of membrane traffic. *Nat.Cell.Biol.* **6**: 469-472
- Muslin, A.J. (2001): Road rage. Cardiac Rab1 and ER-to-Golgi traffic. *Circ.Res.* **89**: 1087-1088
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slurarewicz, P., Kreis, T.E. und Warren, R. (1995): Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J.Cell Biol.* **131**: 1715-1726
- Nakamura, N., Lowe, M., Levine, T.P., Rabouille, C. und Warren, G. (1997): The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* **89**: 445-455
- Nakano, A. und Muramatsu, A. (1989): A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in vivo and in vitro. *EMBO J.* **8**: 1677-1684
- Nelson, D.S., Alvarez, C., Gao, Y.S., Garcia-Mata, R., Fialkowski, E. und Sztul, E. (1998): The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function. *J.Cell Biol.* **143**: 319-331
- Neu, M., Brachvogel, V., Oschkinat, H., Zerial, M. und Metcalf, P. (1997): Rab7: NMR and kinetics analysis of intact and C-terminal truncated constructs. *Proteins* **27**: 204-209
- Newton, C.R. und Graham, A. (1994): PCR, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

- Nichols, B.J. und Pelham, H.R. (1998): SNAREs and membrane fusion in the Golgi apparatus. *Biochim.Biophys.Acta* **1404**: 9-31
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A. und Zerial, M. (1999): Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat.Cell.Biol.* **1**: 376-382
- Nolan, C.-V. und Shaikh, Z.A. (1986): The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. *Life Sci.* **39**: 1403-1409
- Novick, P., Ferro, S. und Scheckman, R. (1981): Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* **25**: 461-469
- Novick, P. und Zerial, M. (1997): The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**: 496-504
- Nuoffer, C., Davidson, H.W., Matteson, J., Meinkoth, J. und Balch, W.E. (1994): A GDP-bound rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J.Cell Biol.* **125**: 225-237
- O**odorisio, T., Rodriguez, T.A., Evans, E.P., Clarke, A.R. und Burgoyne, P.S. (1998): The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat.Genet.* **18**: 257-261
- Ogura, K.-H., Shirakawa, M., Barnes, T.M., Hekimi, S. und Oshima, Y. (1997): The UNC-14 protein required for axonal elongation and guidance in *Caenorhabditis elegans* interacts with the serine-threonine kinase UNC-51. *Genes.Dev.* **11**: 1801-1811
- Oka, T. und Krieger, M. (2005): Multi-complex component protein complexes and Golgi membrane trafficking. *J.Biochem.* **137**: 109-114
- Olesen, Ch., Moller, M. und Byskov, A.G. (2004): Tesmin transcription is regulated differently during male and female meiosis. *Mol.Reprod.Dev.* **67**: 116-126
- Olkkonen, V.M. und Stenmark, H. (1997): Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int.Rev.Cytol.* **176**: 1-85
- Orci, L., Palmer, D.J., Ravazzola, M., Perrelet, A., Amherdt, M. und Rothman, J.E. (1993): Budding from Golgi membranes requires the coatamer complex of non-clathrin coat proteins. *Nature* **364**: 732-734
- Ornstein, L. (1964): Disc Elektrophoresis – I. Background and theory. *Annals N.Y. Academy Sciences* **121**: 321
- Ostermeier, C. und Brunger, A.T. (1999): Structural Basis of Rab Effector Specificity: Crystal Structure of the Small G Protein Rab3A Complexed with the Effector Domain of Rabphilin-3A. *Cell* **96**: 363-374
- P**ahl, H.L. (1999): Signal transduction from the Endoplasmic Reticulum to the nucleus. *Physiol.Rev.* **79**: 683-701
- Palade, G. (1975): Intracellular aspects of the process of the protein secretion. *Science* **189**: 347-358
- Paran, N., Ori, A., Haviv, I. un Shaul, Y. (2000): A composite polyadenylation signal with TATA box function. *Mol.Cell.Biol.* **20**: 834-841
- Paris, S., Longhi, R., Santambrogio, P. und De Curtis, I. (2003): Leucine-zipper-mediated homo- and hetero-dimerization of GIT family p95-ARF GTPase-activating protein, PIX-, paxillin-interacting proteins 1 and 2. *Biochem.J.* **372**: 391-398
- Pasqualato, S., Renault, L. und Cherfils, J. (2002): Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for “front-back” communications. *EMBO Rep.* **3**: 1035-1041
- Pasqualato, S., Senic-Matuglia, F., Renault, L., Goud, B., Salamelo, J. und Cherfils, J. (2004): The structural GDP/GTP cycle of Rab 11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *J.Biol.Chem.* **279**: 11480-11488
- Pasquier, C., Promponas, V.J., Palaio, G.A., Hamodrakas, J.S. und Hamodrakas, S.J. (1999): A novel method for predicting transmembrane segments in proteins based on a statistical analysis of the SwissProt database: the PRED-TMR algorithm. *Protein Engl.* **12**: 381-385
- Payne, C. und Schatten, G. (2003): Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Dev.Biol.* **264**: 50-63
- Pelham, H.R. (1990): The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem.Sci.* **15**: 483-486
- Pelham, H.R. und Rothman, J.E. (2000): The debate about transport in the Golgi – two sides of the same coin? *Cell* **102**: 713-719

- Pereira-Leal, J.B. und Seabra, M.C. (2000): The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family sequences motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J.Mol.Biol.* **301**: 1077-1087
- Pereira-Leal, J.B. und Seabra, M.C. (2001): Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J.Mol.Biol.* **313**: 889-901
- Peters, H. (1970): Migration of gonocytes into mammalian gonad and their differentiation. *Philos.Trans.Roy.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* **259**: 91-101
- Pevsner, J., Hsu, S.C., Braun, J.E., Calakos, N., Ting, A.E., Bennett, M.K. und Scheller, R.H. (1994): Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* **13**: 353-361
- Pfeffer, S., Dirac-Svejstrup, A.B. und Soldati, T. (1995): Rab GDP dissociation inhibitor: putting Rab GTPases in the right place. *J.Biol.Chem.* **270**: 17057-17059
- Pfeffer, S. (1999): Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat.Cell.Biol.* **1**: E17-E22
- Pfeffer, S. (2001): Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* **11**: 487-491
- Pfeffer, S. (2003): Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* **112**: 507-517
- Pfeffer, S. und Aivazian, D. (2004): Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**: 1-12
- Pfeffer, S. (2005a): A model for Rab GTPase localization. *Biochem.Soc.Trans.* **33**: 627-630
- Pfeffer, S. (2005b): Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J.Biol.Chem.* **280**: 15485-15488
- Pfeffer, S. (2005c): Filling the Rab GAP. *Nat.Cell.Biol.* **7**: 856-857
- Plutner, H., Cox, A.D., Pind, S., Khosravi-Far, R., Bourne, J., Schwaninger, R., Der, C.J. und Balch, W.E. (1991): Rab1B regulates vesicular transport between the endoplasmatic reticulum and successive Golgi compartments. *J.Cell Biol.* **115**: 31-43
- Preisinger, C., Körner, R., Wind, M., Lehmann, W.D., Kopajtich, R. und Barr, F.A. (2005): Plk1 docking to GRASP65 phosphorylated by Cdk1 suggests a mechanism for Golgi checkpoint signaling. *EMBO J.* **24**: 753-765
- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J.M. und Lippincott-Schwartz, J. (1997): ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**: 81-85
- Press, B., Feng, Y., Hoflack, B. und Wandinger-Ness, A. (1998): Mutant Rab 7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose-6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J.Cell Biol.* **140**: 1075-1089
- Puthenveedu, M.A. und Linstedt, A.D. (2001): Evidence that Golgi structure depends on a p115 activity that is independent of the vesicle tether components giantin and GM130. *J.Cell Biol.* **155**: 227-238
- Puthenveedu, M.A. und Linstedt, A.D. (2004): Gene replacement reveals that p115/SNARE interactions are essential for Golgi biogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **101**: 1253-1256
- Puthenveedu, M.A. und Linstedt, A.D. (2005): Subcompartmentalizing the Golgi apparatus. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **17**: 1-7
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. und Palmiter, R.D. (1994): Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* **33**: 7250-7259.
- R**ak, A., Fedorov, R., Alexandrov, K., Albert, S., Goody, R.S., Gallwitz, D. und Scheidig, A.J. (2000): Crystal structure of the GAP domain of Gyp1p: first insights into interaction with Ypt/Rab proteins. *EMBO J.* **19**: 5105-5113
- Rak, A., Pylypenko, O., Durek, T., Watzke, A., Kushnir, S., Brunsveld, L., Waldmann, H., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2003): Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science* **302**: 646-650
- Rak, A., Pylypenko, O., Niculae, A., Pyatkov, K., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2004): Structure of the Rab7:REP-1 complex: Insights into the mechanism of Rab prenylation and choroideremia disease. *Cell* **117**: 749-760
- Ramalho-Santos, J. und Moreno, R.D. (2001): Targeting and fusion proteins during mammalian spermiogenesis. *Biol.Res.* **34**: 147-152
- Reed, J.C., Doctor, K.S. und Godzik, A. (2004): The domain of apoptosis: a genomic perspective. *Sci.STKE*: re9

- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. und Williams, D.E. (1962): Disk Elektrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* **195**: 281-283
- Ren, X.-Y., Zhou, Y., Zhang, J.-P., Feng, W.H. und Jiao, B.-H. (2003): Expression of metallothionein gene at different time in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *World J.Gastroenterol.* **9**: 1554-1558
- Rost, B. und Liu, J. (2003): The PredictProtein server. *Nucleic.Acid.Res.***31**: 3300-3304
- Rost, B., Yachdav, G. und Liu, J. (2004): The PredictProtein server. *Nucleic.Acid.Res.* **32**: W321-W326
- Rothman, J.E. (1994): Mechanism of intracellular protein transport. *Nature* **372**: 55-63
- Rothman, J.E. und Wieland, F.T. (1996): Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**: 227-234
- Russell, L. (1977): Observations on rat Sertoli ectoplasmic ("junctional") specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue Cell* **9**: 475-498
- Russell, L., Ettlin, R., Hikim, A. und Clegg, E. (1990): Histological and histopathological evaluation of the testis. 2nd ed. Clearwater, FL: Cache River Press
- Russell, L.D. (1993): Role in spermiation. In: Russell, L.D. und Griswold, M.D., eds. The Sertoli cell. Clearwater, FL: Cache River Press: 269-303
- Sacher, M., Jiang, Y., Barrowman, J., Scarpa, A., Burston, J., Zhang, L., Schieltz, D., Yates III, J.R., Abeliovich, H. und Ferro-Novick, S. (1998): TRAPP, a highly conserved novel complex on the *cis*-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J.* **17**: 2494-2503
- Sacher, M., Barrowman, J., Schieltz, D., Yates III, J.R. und Ferro-Novick, S. (2000): Identification and characterization of five new subunits of TRAPP. *Eur.J.Cell Biol.* **79**: 71-80
- Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M. und Ferro-Novick, S. (2001): TRAPPI implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Mol.Cell* **7**: 433-442
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A. (1998): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Sakamoto, R., Byrd, D.T., Brown, H.M., Hisamoto, N., Matsumoto, K. und Jin, Y. (2005): The *Caenorhabditis elegans* UNC-14 RUN domain protein binds to the kinesin-1 and UNC-16 complex and regulates synaptic vesicle localization. *Mol.Biol.Cell.* **16**: 483-496
- Sakisaka, T., Meerlo, T., Matteson, J., Plutner, H. und Balch, W.E. (2002): Rab-alphaGDI activity is regulated by a hsp90 chaperone complex. *EMBO J.* **21**: 6125-6135
- Salehi-Ashtiani, K., Widrow, R.J., Markert, C.L. und Goldberg, E. (1993): Testis-specific expression of a metallothionein I-driven transgene correlates with undermethylation of the locus in testicular DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**: 8886-8890
- Salminen, A. und Novick, P.J. (1987): A *ras*-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* **49**: 527-538
- Samarawickrama, G.P. (1979): Biological effects of cadmium in mammals. In: Webb, M., edc. *The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical: 357-361
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **74**: 5463-5467
- Santemma, V., Rosati, P. Guerzoni, C., Mariani, S., Beligotti, F., Magnanti, M., Baruffi, G., Galoni, T. und Fabbrini, A. (1992): Human sertoli cells in vitro: morphological features and androgen-binding protein secretion. *J.Steroid.Biochem.Mol.Biol.* **43**: 423-429
- Sapperstein, S.K., Walter, D.M., Grosvenor, A.R., Heuser, J.E. und Waters, M.G. (1995): p115 is a general vesicular transport factor related to the yeast endoplasmic reticulum to Golgi transport factor Usa1p. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **92**: 522-526
- Sapperstein, S.K., Lupashin, V.V., Schmitt, H.D. und Waters, M.G. (1996): Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Usa1p. *J.Cell Biol.* **132**: 755-767
- Saraste, J. und Svensson, K. (1991): Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J.Cell Sci.* **100**: 415-430

- Saraste, J., Lathinen, U. und Goud, B. (1995): Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway. *J.Cell Sci.* **108**: 1541-1552
- Satoh, A., Wang, Y., Malsam, J., Beard, M.B. und Warren, G. (2003): Golgin-84 is a Rab1B binding partner involved in Golgi structure. *Traffic* **4**: 153-161
- Scangos, G. und Ruddle, F.H. (1981): Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells – a review. *Gene* **14**: 1-10
- Scheffzek, K., Ahmadian, N.R. und Wittinghofer, A. (1998): GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem.Sci.* **23**: 257-262
- Schekman, R. (2002): SEC mutants and the secretory apparatus. *Nature Medicine* **8**: 1055-1058
- Schiavo, G., Matteoli, M. und Montecucco, C. (2000): Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol.Rev.* **80**: 717-766
- Schimmoller, F., Simon, I. und Pfeffer, S.R. (1998): Rag GTPases, directors of vesicle docking. *J.Biol.Chem.* **273**: 22161-22164
- Schmitt, H.D., Wagner, P., Pfaff, E. und Gallwitz, D. (1986): The ras-related *YPT1* gene product in yeast: A GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. *Cell* **47**: 401-412
- Schnatwinkel, C., Christoforidis, S., Lindsay, M.R., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Parton, R.G. und Zerial, M. (2004): The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol.* **2**: E261
- Schwartz, D., Goldefinger, N. und Rotter, V. (1993): Expression of p53 protein in spermatogenesis is confined to the tetraploid pachytene primary spermatocytes. *Oncogene* **8**: 1487-1494
- Schweizer, A., Fransen, J.A., Bachi, T., Ginsel, L. und 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.* **107**: 1643-1653
- Seabra, M.C. (1996a): Nucleotide dependence of Rab Geranylgeranylation. *J.Biol.Chem.* **271**: 14398-14404
- Seabra, M.C. (1996b): New insights into the pathogenesis of choroideremia: a tale of two REPs. *Ophthalmic Genet.* **17**: 43-46
- Seabra, M.C., Mules, E.H. und Hume, A.N. (2002): Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol.Med.* **8**: 23-30
- Seabra, M.C. und Coudrier, E. (2004): Rab GTPases and Myosin Motors in Organelle Motility. *Traffic* **5**: 393-399
- Segev, N. (2001): Ypt/Rab GTPases: Regulators of protein trafficking. *Sci.STKE.* **100**: RE11
- Shi, Y. (2002): Mechanism of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol.Cell* **9**: 459-470
- Shih, T.Y., Williams, D.R., Weeks, M.O., Maryak, J.M., Vass, W.C. und Scolnick, E.M. (1978): Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses. *J.Virol.* **27**: 45-55
- Shima, D.T., Haldar, K., Pepperkok, R., Watson, R. und Warren, G. (1997): Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells. *J.Cell Biol.* **137**: 1211-1228
- Shimada, K., Uzawa, K., Kato, M., Endo, Y., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., Seki, N. und Tanzawa, H. (2005): Aberrant expression of RAB1A in human tongue cancer. *Br.J.Cancer* **92**: 1915-1921.
- Shisheva, A., Südhof, T.C. und Czech, M.P. (1994): Cloning, characterization and expression of a novel GDP dissociation inhibitor isoform from skeletal muscle. *Mol.Cell.Biol.* **14**: 3459-3468
- Short, B., Preisinger, C., Körner, R., Kopajtich, R., Byron, O. und Barr, F.A. (2001): A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. *J.Cell Biol.* **155**: 877-883
- Short, B., Preisinger, C., Schaletzky, J., Kopajtich, R. und Barr, F.A. (2002): The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr.Biol.* **12**: 1792-1795
- Short, B. und Barr, F.A. (2003): Membrane traffic: a glitch in the Golgi matrix. *Curr.Biol.* **13**: R311-R313
- Short, B. und Barr, F.A. (2004): Membrane Fusion: Caught in a Trap. *Curr.Biol.* **14**: R187-R189
- Short, B., Haas, A. und Barr, F.A. (2005): Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim.Biophys.Acta* **1744**: 383-395

- Shorter, J. und Warren, G. (1999): A role for the vesicle tethering protein, p115, in the post-mitotic stacking of reassembling Golgi cisternae in a cell-free system. *J.Cell Biol.* **146**: 57-70
- Shorter, J. und Warren, G. (2002): Golgi architecture and inheritance. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **18**: 379-420
- Shorter, J., Beard, M.B., Seemann, J., Dirac-Svejstrup, A.B. und Warren, G. (2002): Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *J.Cell Biol.* **157**: 45-62
- Siddiqi, S.A., Gorelick, F.S., Mahan, J.T. und Mansbach, C.M. (2002): COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J.Cell Sci.* **116**: 415-427
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M. und Stenmark, H. (1998): EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**: 494-498
- Sivars, U., Aivazian, D. und Pfeffer, S.R. (2003): Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**: 856-859
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. und Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 75-85
- Sohda, M., Misumi, Y., Yano, A., Takami, N. und Ikehara, Y. (1998): Phosphorylation of the vesicle docking protein p115 regulates its association with the Golgi membrane. *J.Biol.Chem.* **273**: 5385-5388
- Soldati, T., Shapiro, A.D., Svejstrup, A.B. und Pfeffer, S.R. (1994): Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**: 76-78
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. und Rothman, J.E. (1993): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**: 318-324
- Söllner, T. (2002): Vesicle tethers promoting fusion machinery assembly. *Dev.Cell* **2**: 377-378
- Sönnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jamsa, E., Dirac-Svejstrup, B. und Warren, G. (1998): A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J.Cell Biol.* **140**: 1013-1021
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. und Zerial, M. (2000): Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J.Cell Biol.* **149**: 901-914
- Song, J.Y., Leung, T., Ehler, L.K., Wang, C. und Liu, Z. (2000): Regulation of meristem organization and cell division by TSO1, an Arabidopsis gene with cysteine-rich repeats. *Development* **127**: 2207-2217
- Springer, S., Spang, A. und Schekman, R. (1999): A primer on vesicle budding. *Cell.* **97**:145-148
- Stahl, B., Chou, J.H., Li, C., Südhof, T.C. und Jahn, R. (1996): Rab3 reversibly recruits rabphilin to synaptic vesicles by a mechanism analogous to raf recruitment by ras. *EMBO J.* **15**: 1799-1809
- Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J. und Zerial, M. (1994): Inhibition of Rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* **13**: 1287-1296
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O. und Zerial, M. (1995): Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* **83**: 423-432
- Stephens, D.J. und Pepperkok, R. (2001): Illuminating the secretory pathway: when do we need vesicles? *J.Cell Sci.* **114**: 1053-1059
- Strom, M., Vollmer, P., Tan, T.J. und Gallwitz, D. (1993): A yeast GTPase-activating protein that interacts specifically with a member of the Ypt/Rab family. *Nature* **361**: 736-739
- Stroupe, C. und Brunger, A.T. (2000): Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J.Mol.Biol.* **304**: 585-598
- Stuart, G.W., Searle, P.F. und Palmiter, R.D. (1985): Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* **31**: 828-831
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* **189**: 113-130
- Sudol, M. (1996): The WW module competes with the SH3 domain? *Trends Biochem.Sci.* **21**: 161-163
- Südhof, T.C., De Camilli, P., Niemann, H. und Jahn, R. (1993): Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* **75**: 1-4

- Sugihara, T., Wadhwa, R., Kaul, S.C. und Mitsui, Y. (1999): A novel testis-specific metallothionein-like protein, tesmin, is an early marker of male germ cell differentiation. *Genomics* **57**: 130-136
- Susi, F.R., Leblond, C.P. und Clermont, Y. (1971): Changes in the Golgi apparatus during spermatogenesis in the rat. *Am.J.Anat.* **130**: 251-267
- Sutou, S., Miwa, K., Matsuura, T., Kawasaki, Y., Ohinata, Y. und Mitsui, Y. (2003): Native tesmin is a 60-kilodalton protein that undergoes dynamic changes in its localisation during spermatogenesis in mice. *Biol.Reprod.* **68**: 1861-1869
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. und Brunger, A.T. (1998): Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2,4 Å resolution. *Nature* **395**: 347-353
- Sütterlin, C., Lin, Y.C., Feng, Y., Ferris, D.K., Erikson, R.L. und Malhotra, V. (2001): Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **98**: 9128-9132
- Sütterlin, C., Hsu, P., Mallabiabarrena, A. und Malhotra, V. (2002): Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in mammalian cells. *Cell* **109**: 359-369
- Suzuki, J.S., Kodama, N., Molotkov, A., Aoki, E. und Tohyama, C. (1998): Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis. *Biochem.J.* **334**: 695-701
- Suzuki, T., Nakamoto, T., Ogawa, S., Seo, S., Matsumura, T., Tachibana, K., Morimoto, C. und Hirai, H. (2002): MICAL, a novel CasL interacting molecule, associated with vimentin. *J.Biol.Chem.* **277**: 14933-14941
- Tagawa, A., Miyoshi, J., Ishizaki, H., Tanaka, M., Takakura, A., Nishioka, H., Yoshida, H., Doi, T., Mizoguchi, A., Matsuura, N., Niho, Y., Nishimune, Y., Nishikawa, S. und Takai, Y. (1999): Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDI α . *Oncogene* **18**: 5373-5380
- Takahashi, Y., Ogra, Y., Ibata, K. und Suzuki, K.T. (2004): Role of metallothionein in the cell cycle: Protection against the retardation of cell proliferation by endogenous reactive oxygen species. *J.Health Sci.* **50**: 154-158
- Takai, Y., Sasaki, T. und Matozaki, T. (2001): Small GTP-binding proteins. *Physiol.Rev.* **81**: 153-208
- Tan, Y., Hong, J., Doan, T., McConlogue, L., Maltese, W. A. (1998): Presenilin-1 mutations associated with familial Alzheimer's disease do not disrupt protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Biochim.Biophys.Acta* **1407**: 69-78
- Tang, X.M., Lalli, M.F. und Clermont, Y. (1982): A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *Am.J.Anat.* **163**: 283-294
- Teber, I., Nagano, F., Kremerskothen, J., Bilbilis, K., Goud, B. und Barnekow, A. (2005): Rab6 interacts with the mint3 adaptor protein. *Biol.Chem.* **386**: 671-677
- Terman, J.R., Mao, T. Pasterkamp, R.J., Yu, H.H. und Kolodkin, A.L. (2002): MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell* **109**: 887-900
- Thoma, N.H., Niculae, A., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2001): Double prenylation by RabGGTase can proceed without dissociation of the mono-prenylated intermediate. *J.Biol.Chem.* **276**: 48631-48636
- Tisdale, E.J., Bourne, J.R., Khosravi-Far, R., De, C.J. und Balch, W.E. (1992): GTP-binding mutants of Rab1 and Rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J.Cell Biol.* **119**: 749-761
- Tisdale, E.J. und Balch, W.E. (1996): Rab2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates. *J.Biol.Chem.* **271**: 29372-29379
- Tishgarten, T., Yin, F.F., Faucher, K.M., Dluhy, R.A., Grant, T.R., Fischer von Mollard, R., Stevens, T.H. und Lipscomb, L.A. (1999): Structures of yeast vesicle trafficking proteins. *Protein.Sci.* **8**: 2465-2473
- Toonen, R.F. und Verhage, M. (2003): Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* **13**: 177-186
- Touchot, N., Chardin, P. und Tavitian, A. (1987): Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**: 8210-8214

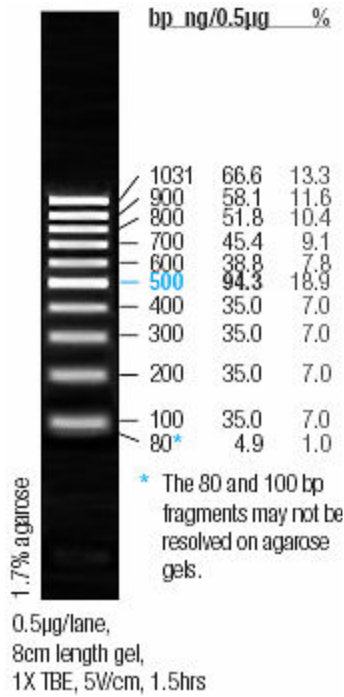
- Touchot, N., Zahraoui, A., Vielh, E. und Tavitian, A. (1989): Biochemical properties of the YPT-related Rab1B protein. Comparison with Rab1A. *FEBS Lett.* **256**: 79-84
- Tourel, A., Dorseuil, O., Morin, L., Timmons, P., Jegou, B., Reibel, L. und Gacon, G. (1998): MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to Drosophila rotundRacGAP gene product, is expressed in male germ cells. *J.Biol.Chem.* **273**: 6019-6023
- Towbin, J., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.Natl Acad.Sci.USA* **76**: 4350-4354
- Tusnady, G.E. und Simon, I. (1998): Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J.Mol.Biol.* **283**: 489-506
- Tusnady, G.E. und Simon, I. (2001): The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**: 849-850
- Tuvim, M. J., Adachi, R., Hoffenberg, S., Dickey, B. F. (2001): Traffic control: Rab GTPases and the regulation of interorganellar transport. *News Physiol Sci.* **16**: 56-61
- Uetz, P. und Hughes, (2000): Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr.Opin.Microbiol.* **3**: 303-308
- Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L.A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y. und Zerial, M. (1993): Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J.Biol.Chem.* **268**: 18143-18150
- Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucchi, C. und Zerial, M. (1994): Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**: 157-160
- Ullrich, O., Reinisch, S., Urbé, S., Zerial, M. und Parton, R.G. (1996): Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J.Cell.Biol.* **135**: 913-924
- Ungar, D., Oka, T., Brittle, E.E., Vasile, E., Lupashin, V.V., Chatterton, J.E., Heuser, J.E., Krieger, M. und Waters, M.G. (2002): Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. *J.Cell Biol.* **157**: 405-415
- Ungar, D. und Hughson, F.M. (2003): SNARE protein structure and function. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **19**: 493-517
- Ungermann, C. und Langosch, D. (2005): Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J.Cell Sci.* **118**: 3819-3828
- Urbé, S., Huber, L.A., Zerial, M., Tooze, S.A. und Parton, R.G. (1993): Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett.* **334**: 175-182
- Van Crielinge, W. und Beyaert, R. (1999): Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol.Proced.Online* **4**:1-38
- Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. und Sander, C. (1991): The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **30**: 4637-4648
- Valsdottir, R., Hashimoto, H., Ashman, K., Koda, T., Storrie, B. und Nilsson, T. (2001): Identification of rabaptin-5, rabex-5, and GM130 as putative effectors of rab33b, a regulator of retrograde traffic between the Golgi apparatus and ER. *FEBS Lett.* **508**: 201-209
- van der Sluijs, P., Hull, M., Huber, L.A., Male, P., Goud, B. und Mellman, I. (1992a): Reversible phosphorylation-dephosphorylation determines the localization of rab4 during the cell cycle. *EMBO J.* **11**: 4379-4389
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B. und Mellman, I. (1992b): The small GTP-binding protein Rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**: 729-740
- Varlamov, O., Volchuk, A., Rahimian, V., Doege, C.A., Paumet, F., Eng, W.S., Arango, N., Parlati, F., Ravazzola, M., Orci, L., Söllner, T.H. und Rothman, J.E. (2004): i-SNAREs: inhibitory snares that fine-tune the specificity of membrane fusion. *J.Cell Biol.* **164**: 79-88
- Vetter, I.R. und Wittinghofer, A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304
- Vielh, E., Touchot, N., Zahraoui, A. und Tavitian, A. (1989): Nucleotide sequence of a rat cDNA: Rab1B, encoding a rab1-YPT related protein. *Nucleic Acids Res.* **17**: 1170

- Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P., McCaffrey, M., Stenmark, H. und Zerial, M. (1998): Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *EMBO J.* **17**: 1941-1951
- Vogl, A.W., Pfeiffer, D.C. und Redenbach, D.M. (1991): Ectoplasmic („junctional“) specializations in mammalian Sertoli cells: influence on spermatogenic cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **637**: 175-202
- Waalkes, M.P. und Perantoni, A. (1986): Isolation of a novel metalbinding protein from rat testes. Characterization and distinction from metallothionein. *J.Biol.Chem.* **261**: 13097-13103
- Walther, N., Jansen, M., Ergün, S., Kascheike, B. und Ivell, R. (1996): Sertoli cell line established from *H-2K^b-tsA58* transgenic mice differentially regulate the expression of cell-specific genes. *Exp.Cell.Res.* **225**: 411-421
- Wang, W., Sacher, M. und Ferro-Novick, S. (2000): TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *J.Cell Biol.* **151**: 289-296
- Wang, Y., Seemann, J., Pypaert, M., Shorter, J. und Warren, G. (2003): A direct role for GRASP65 as a mitotically regulated Golgi stacking factor. *EMBO J.* **22**: 3279-3290
- Wang, Y., Satoh, A. und Warren, G. (2005): Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65. *J.Biol.Chem.* **280**: 4921-4928
- Ward, T.H., Polishchuk, R.S., Caplan, S., Hirschberg, K. und Lippincott-Schwartz, J. (2001): Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J.Cell Biol.* **155**: 557-570
- Warren, G. (1993): Membrane partitioning during cell division. *Annu.Rev.Biochem.* **62**: 323-348
- Warren, G. und Wickner, W. (1996): Organelle inheritance. *Cell* **84**: 395-400
- Waters, M.G., Serafini, T. und Rothman, J.E. (1991): „Coatomer“: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**: 248-251
- Waters, M.G., Clary, D.O. und Rothman, J.E. (1992): A novel 115-kD peripheral membrane protein is required for intercisternal transport in the Golgi stack. *J.Cell Biol.* **118**: 1015-1026
- Watjen, W., Haase, H., Biagioli, M. und Beyersmann, D. (2002): Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environ.Health Perspect.* **110**: 865-867
- Weber, J.E., Russell, L.D., Wong, V. und Peterson, R.N. (1983): Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships. *Am.J.Anat.* **167**: 163-179
- Weber, T., Zemelma, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H. und Rothman, J.E. (1998): SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**: 759-772
- Weide, T., Bayer, M., Köster, M., Siebrasse, J.P., Peters, R. und Barnekow, A. (2001): The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase Rab1B. *EMBO Rep.* **2**: 336-341
- Weide, T., Teuber, J., Bayer, M., Barnekow, A. (2003): MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **306**: 79-86
- Weimbs, T., Low, S.H., Chapin, S.J., Mostiv, K.E., Bucher, P. und Hofmann, K. (1997): A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**: 3046-3051
- Weimer, R.M. und Richmond, J.E. (2005): Synaptic vesicle docking: a putative role for the Munc18/Sec1 protein family. *Curr.Top.Dev.Biol.* **65**: 83-113
- Weissman, J.T., Plutner, H. und Balch, W.E. (2001): The mammalian guanine exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export. *Traffic* **2**: 465-475
- Wennerberg, K., Rossman, K.L. und Der, C.J. (2005): The Ras superfamily at a glance. *J.Cell Sci.* **118**: 843-846
- West, A.K., Stallings, R., Hildebrand, C.E., Chiu, R., Karin, M. und Richards, R.I. (1990): Human metallothionein genes structure of the functional locus at 16q13. *Genomics* **8**: 513-518
- White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B. und Stelzer, E.H. (1999): Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J.Cell Biol.* **147**: 743-759

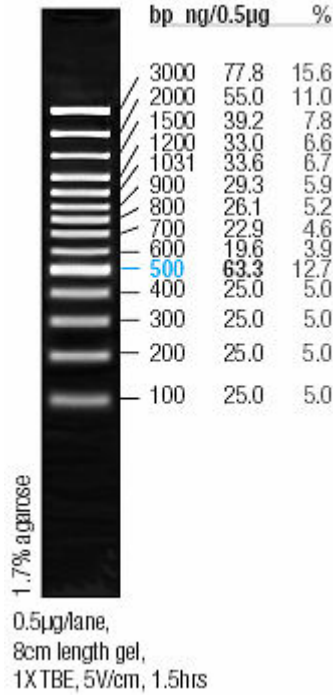
- Wiechelmann, K., Braun, R. und Fitzpatrick, J. (1988): Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal.Biochem.* **175**: 231-237
- Williams, T.M. und Lisanti, M.P. (2004): The caveolin proteins. *Genome.Biol.* **5**: 214
- Wilson, B.S., Nuoffer, C., Meinkoth, J.L., McCaffery, M., Feramisco, J.R., Balch, W.E. und Farquhar, M.G. (1994): A rab1 mutant affecting guanine nucleotide exchange promotes disassembly of the Golgi apparatus. *J.Cell Biol.* **125**: 557-571
- Wolf, E., Kim, P.S. und Berger, B. (1997): MultiCoil: A program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci.* **6**: 1179-1189
- Woo, E.S. und Lazo, J.S. (1997): Nucleocytoplasmic functionality of metallothionein. *Cancer.Res.* **57**: 4236-4214
- Wu, S.K., Zeng, K., Wilson, I.A. und Balch, W.E. (1996): Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends Biochem.Sci.* **21**: 472-476
- Wu, G., Yussman, M.G., Barrett, T.J., Hahn, H.S., Osinska, H., Hilliard, G.M., wang, X., Toyokawa, T., Yatani, A., Lynch, R.A., Robbins, J. und Dorn II, G.W. (2001): Increased myocardial Rab GTPase expression. A consequence and cause of cardiomyopathy. *Circ.Res.* **89**: 1130-1137
- Wu, G., Zhao, G. und He, Y. (2003): Distinct pathways for the trafficking of angiotensin II and adrenergic receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J.Biol.Chem.* **278**: 47062-47069
- Yamakawa, H., Seog, D.H., Yoda, K., Yamasaki, M. und Wakabayashi, T. (1996): Uso1 protein is a dimer with two globular heads and a long coiled-coil tail. *J.Struct.Biol.* **116**: 356-365
- Yin, Y., DeWolf, W.C. und Morgentaler, A. (1997): p53 is associated with the nuclear envelope in mouse testis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **235**: 689-694
- Yin, Y., DeWolf, W.C. und Morgentaler, A. (1998): Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and -independent pathways in mice. *Biol.Reprod.* **58**: 492-496
- Yoo, J.S., Moyer, B.D., Bannykh, S., Yoo, H.M., Riordan, J.R. und Balch, W.E. (2002): Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J.Biol.Chem.* **277**: 11401-11409
- Yoshimura, S.-I., Nakamura, N., Barr, F.A., Misuri, Y., Ikehara, Y., Ohno, H., Sakaguchi, M. und Mihara, K. (2001): Direct targeting of *cis*-Golgi matrix proteins of the Golgi apparatus. *J.Cell Sci.* **114**: 4105-4115
- Young, J., Stauber, T., Vernos, I., Pepperkok, R. und Nilsson, T. (2005): Regulation of Microtubule-dependent recycling at the TGN by Rab6A and Rab6A'. *Mol.Biol.Cell* **16**: 162-177
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. und Schrelber, S.L. (1994): Structural basis for the binding of proline rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**: 933-945
- Yuan, C., Kadiiska, M., Achazar, W.E., Mason, R.P. und Waalkes, M.P. (2000): Possible role of caspase-3 inhibition in camium-induced blockage of apoptosis. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **164**: 321-329
- Zahraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. und Tavitian, A. (1989): The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to the yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *J.Biol.Chem.* **264**: 12394-12401
- Zerial, M. und McBride, H. (2001): Rab proteins as membrane organizers. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* **2**: 107-117
- Zhou, T., Zhou, G., Song, W., Eguchi, N., Lu, W., Lundin, E., Jin, T. und Nordberg, G. (1999): Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and mnd MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicology* **142**: 1-13
- Zuercher, G., Rohrbach, V., Andres, A.-C. und Ziemiecki, A. (2000): A novel member of the testis specific serine kinase family, *tssk-3*, expressed in the Leydig cells of sexually mature mice. *Mech.Dev.* **93**: 175-177

Anhang

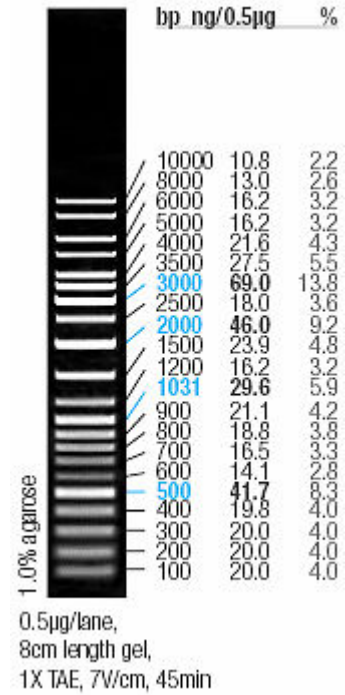
O'GeneRuler™ 100 bp ladder



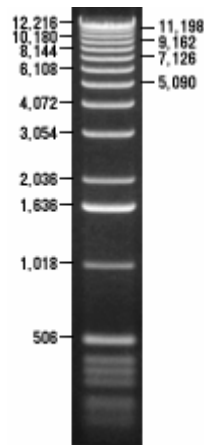
O'GeneRuler™ 100 bp ladder plus



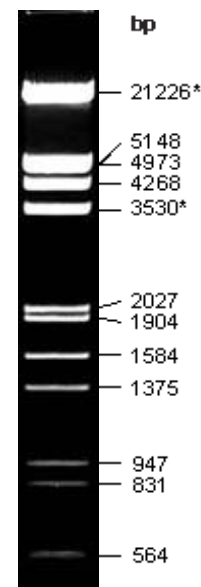
O'GeneRuler™ ladder mix



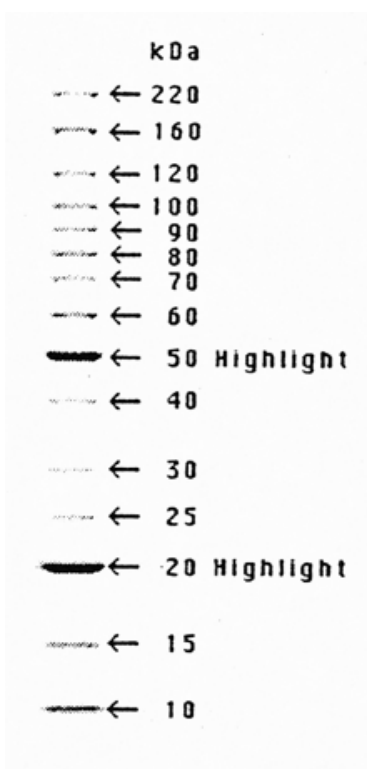
1 kb DNA ladder 0,9 % Agarosegel



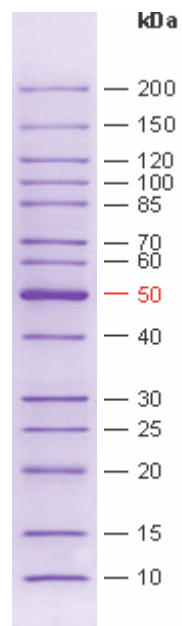
λ-DNA/Eco RI und Hind III-Marker (1 %iges Agarosegel)

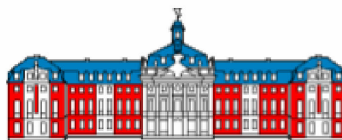


BenchMark



MBI Protein Marker



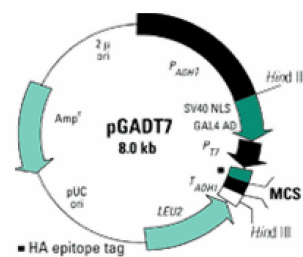


Westfälische-Wilhelms-Universität Münster
 Abt. für exp. Tumorbioogie
 Badestr.9, 48149 Münster
 Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger/Datum	Magdalena Konczal/2004
Plasmid 1:	pGADT7 Tesmin A
Ausgangsvektor:	pGADT7 GM130 ΔN370
Plasmid 2:	pGADT7 Tesmin "full length"
Ausgangsvektor:	pGADT7 (Clontech/Heidelberg)

```

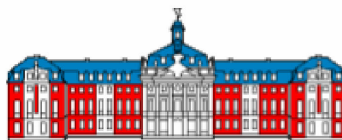
1858                                     GAL4          T7 Promoter
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CCA AAA AAA GAG ATC TTT AAT ACG ACT
                                     3.3
                                     |
1915                                     |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CAC TAT AGG GCG AGC GCC GCC ATG GAG TAC CCA TAC GAC GTA CCA GAT TAC GCT
                                     |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1969                                     |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CAT ATG GCC ATG GAG GCC AGT GAA TTC CAC CCG GGT GGG CAT CGA TAC GGG ATC CAT
      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
      Nde I Nco I Sfi I EcoR I Sma I Xma I Cta I BamH I
2326
CGA GCT CGA GCT GCA GATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCGCAAGTTCACATC
      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
      Sac I Xho I Pst I
2391
AACTGTGCATCGTGACCATCT
  
```



Insert 1:
 Tesmin A; 900 bp groß
 Insertion über *Nde I/Bam HI*

Insert 2:
 Tesmin „full length“; 1526 bp groß
 Insertion über *Nde I/Eco RI*

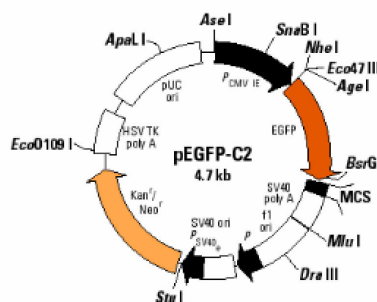
<i>E. coli</i> Stamm:	DH5α
Sicherheitsstufe:	S1
Antibiotika Resistenz:	Amp^R
Referenz:	Magdalena Konczal/ Laborjournal



Westfälische-Wilhelms-Universität Münster
 Abt. für exp. Tumorbioogie
 Badestr.9, 48149 Münster
 Leiterin: Prof. Dr. A. Barnekow

Erzeuger/Datum	Magdalena Konczal/2004
Plasmid 1:	pEGFP-IJ Tesmin A
Ausgangsvektor:	pEGFP-IJ FLJ 14966
Plasmid 2:	pEGFP-IJ Tesmin "full length"
Ausgangsvektor:	pEGFP-IJ Tesmin A

Herstellung: Zunächst wurde durch eine *fill in* Reaktion die interne *Nde I* Schnittstelle im pEGFP-C2 Vektor zerstört. Anschließend wurde der Vektor mit *Bgl II* und *Bam HI* geschnitten, um die ursprüngliche MCS zu entfernen. In den *gecipten* Vektor wurde das *Bgl II* Insert aus pACT-X11L2Δ4 (ca. 1 kb) eingefügt und die richtige Orientierung durch einen *Nde I*- (in der neuen MCS) und *Mlu I*- (im pEGFP-C2 Vektor hinter der alten MCS) Verdau überprüft. Der Vektor hat nun folgende Sequenz hinter der EGFP-kodierenden Region:
Bgl II – **HA-Epitop-kodierende Sequenz-Nde I**-
Nco I-X11L2Δ4-Insert – *Sma I* – *Bam HI* –
Eco RI – *Sac I* – *Xho I* – *Xba I*



Insert 1:
 Tesmin A; 900 bp groß
 Insertion über *Nde I*/*Bam HI*

Insert 2:
 Tesmin „full length“; 1526 bp groß
 Insertion über *Nde I*/*Eco RI*

<i>E. coli</i> Stamm:	DH5α
Sicherheitsstufe:	S1
Antibiotika Resistenz:	Kan^R
Referenz:	Magdalena Konczal/ Laborjournal

Research article

Open Access

Identification and characterization of Iporin as a novel interaction partner for rab1

Michael Bayer¹, Julia Fischer², Joachim Kremerskothen², Edith Ossendorf², Theodoros Matanis², Magdalena Konczal², Thomas Weide³ and Angelika Barnekow*²

Address: ¹UKM Muenster, Albert-Schweitzer-Str. 33, D-48149 Muenster, Germany, ²Department of Experimental Tumorbiology, University of Muenster, Badestr. 9, D-48149 Muenster, Germany and ³Cilian AG, Johann-Krane-Weg 42, D-48149 Muenster, Germany

Email: Michael Bayer - bayerm@uni-muenster.de; Julia Fischer - juliafischer3@web.de; Joachim Kremerskothen - kremers@uni-muenster.de; Edith Ossendorf - ossendorf@uni-muenster.de; Theodoros Matanis - matanis@uni-muenster.de; Magdalena Konczal - konczal@uni-muenster.de; Thomas Weide - weide@cilian.de; Angelika Barnekow* - barneko@uni-muenster.de

* Corresponding author

Published: 29 March 2005

Received: 04 November 2004

BMC Cell Biology 2005, 6:15 doi:10.1186/1471-2121-6-15

Accepted: 29 March 2005

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/6/15>

© 2005 Bayer et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The small GTPase rab1a and its isoform rab1b are essential regulating components in the vesicle transport between the ER and the Golgi apparatus. Rab1 is thought to act as a molecular switch and can change between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound conformation. To elucidate the function of rab1, several approaches have been established to isolate effector proteins, which interact with the activated conformation of rab1. To date p115, GM130, golgin-84 and MICAL have been identified as direct interacting partners. Together with rab1, these molecules are components of a protein complex, which mediates and regulates intracellular vesicle transport.

Results: Here, we report the characterization of Iporin, which is similar to KIAA0375 as a novel rab1-interacting protein. It was initially identified by yeast two-hybrid screening experiments with the active mutant of rab1b (rab1b Q67R) as bait. Iporin contains a SH3 domain and two polyproline stretches, which are known to play a role in protein/protein interactions. In addition, Iporin encloses a RUN domain, which seems to be a major part of the rab1-binding domain (R1BD). Iporin is ubiquitously expressed and immunofluorescence staining displays a cytosolic punctual distribution. Interestingly, we also show that Iporin interacts with another rab1 interacting partner, the GM130 protein.

Conclusion: Our results demonstrate that Iporin is a potential new interacting partner of rab1. Iporin is different from already identified rab1 interacting proteins concerning protein structure and cellular localization. We conclude that Iporin might function as a link between the targeting of ER derived vesicles, triggered by the rab1 GTPase and a signaling pathway regulated by molecules containing SH3 and/or poly-proline regions. The characterization of this novel intermolecular relation could help to elucidate how vesicles find their way from ER to the Golgi apparatus.

Background

The rab/Ypt proteins represent a large family of small GTPases involved in several transport steps of the cellular trafficking pathway. At present 11 members have been identified in yeast and more than 60 human rab proteins are supposed [1,2]. Small GTPases are known to function as molecular switches and can cycle between an active GTP-bound and an inactive GDP-bound conformation [3,4]. In the active conformation, the rab GTPases are localized on membranes, where they recruit specific effector molecules to mediate vesicle attachment [5]. The subsequent fusion step is initiated, when the membranes are forced into close proximity by the interaction of SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) presented on both membranes in concert with SM proteins (Sec1/Munc18-like proteins), thought to act as controlling elements in SNARE interaction [6].

The two isoforms of the small GTPase rab1 (rab1a/b) are localized on ER-Golgi membranes and regulate the exocytotic transport from the ER to the Golgi apparatus [7-9]. Although the function of rab1 is still not fully understood, several lines of evidence describe rab1 and its yeast homolog Ypt1p GTPase as a major component in a protein complex responsible for directing vesicular traffic between the ER and the Golgi apparatus [7-13]. In the past, several approaches have been established to identify effector molecules that bind specifically to the active GTP-bound form of rab1 [14-17]. At present, four specific effector proteins and several additional putative effector molecules are known [14]. The first characterized rab1 interacting protein was p115, which also binds to the Golgi-associated proteins GM130 and Giantin [14,18,19]. p115 is the mammalian homologue of the yeast protein Uso1p, which was found to be an essential component necessary for the tethering of ER-derived COP II vesicles to the Golgi compartment, a process that depends on Ypt1p, but is independent of SNARE proteins [20]. In addition, p115 plays a key role in coordinating sequential tethering and docking of COPI vesicles to Golgi membranes. Thus, it is thought to function as a linker protein between Giantin and GM130 [19,21,22]. Second, the cis-Golgi matrix protein GM130 was identified as a direct rab1 effector, which also binds to a complex containing GRASP65, a lipid-anchored GM130-binding protein, that regulates Golgi stack reformation following mitosis, as well as so far uncharacterized proteins [15,17,23,24]. A third interacting molecule of activated rab1, golgin-84, is supposed to act as a novel mitotic target [16]. Overexpression or depletion of golgin-84 results in fragmentation of the Golgi ribbon and the protein is thought to be required for the incorporation of membranes into the Golgi apparatus [16,25]. Golgin-84 is a type II C-terminally anchored cis-Golgi protein with an extensive cytoplasmic coiled-coil

domain, which shows structural and sequence similarity to Giantin [26]. However, golgin-84 does not appear to physically interact with other cis-Golgi matrix proteins such as GM130, p115 or GRASP65 and therefore it is likely, that additional potential golgin84-binding molecules exist [16]. Recently, we identified MICAL as a fourth rab1 interacting partner and suggested a link between the Golgi apparatus associated rab1 and the intermediate filament cytoskeleton [27].

Here, we describe Iporin as a novel interacting molecule for the active GTP-bound conformation of rab1. Iporin (Interacting protein of rab1) was identified in a yeast two-hybrid screen with rab1b Q67R as bait and sequence analyses revealed, that the encoded protein is similar to the C-terminal half of the KIAA0375 polypeptide. The rab1b-Iporin interaction is nucleotide-dependent and rab1-specific. Interestingly, the rab1 binding motif of Iporin was mapped to a region containing a RUN domain, a protein motif, which is known to be involved in the function of small GTPases. Furthermore we examined the intracellular localization and tissue-specific expression of Iporin and give insight into its domain structure. Interestingly our results also showed an interaction with the rab1 effector GM130 via its coiled-coil region 6 [15].

Results

Identification of a novel rab1 interacting protein

With the rab1b Q67R mutant as bait and a human placenta cDNA library as prey we performed yeast two-hybrid screening assays to identify novel interacting partners for the active GTP-bound conformation of the small GTPase rab1b. One of the isolated clones could be identified as the human Golgi matrix protein GM130 and a second clone encoded for a fragment of MICAL1b [15,27]. Another interesting clone was K17, which displayed a strong and specific interaction with rab1b Q67R in the yeast two-hybrid system (Table 1). Nucleotide sequence analysis revealed that K17 represents the cDNA sequence encoding the C-terminus of KIAA0375 (GenBank Accession number: AB002373.2). We named the identified protein Iporin (for Interacting protein of rab1) and the deleted K17 clone Iporin Δ N847. Since the rab1 effector GM130 has been shown to interact with various rab proteins (rab1, rab2, rab33b), we wanted to investigate the rab1 specificity of the Iporin interaction [16,23,28]. Thus, we used an assortment of rab cDNA molecules as bait constructs in yeast co-transformation assays (Table 1). Iporin Δ N847 (K17) induced strong growth and β -galactosidase activity only, when co-transformed with the permanent active mutants of rab1b (rab1bQ67R/L) and rab1a (rab1a Q70L).

Interestingly, an interaction between Iporin Δ N847 and the wild type as well as the permanently active mutant of

Table 1: Interaction of Iporin ΔN847 with different rab proteins/isoforms

bait	prey Iporin ΔN847		
	control	his3	lacZ
pAS2-1	+++	-	-
rab1a wt	+++	+	+/-
rab1a S25N	+++	-	-
rab1a Q70L	+++	+++	+++
rab1b wt	+++	+/-	-
rab1b S22N	+++	-	-
rab1b Q67R	+++	++	+++
rab1b Q67L	+++	++	+++
rab2 wt	+++	-	-
rab2 S20N	+++	-	-
rab2 Q65L	+++	-	-
rab6 wt	+++	-	-
rab6 T27N	+++	-	-
rab6 Q72R	+++	-	-
Ypt1 wt	+++	++	++
Ypt1 S22N	+++	-	-
Ypt1 Q67L	+++	+++	+++

Results obtained from co-transformation assays in yeast. Clones were cultivated on selection plates lacking tryptophan and leucine (control) or lacking additionally histidine and were supplemented with 50 mM 3-aminotriazol (his3). The β-galactosidase activity was determined using X-gal as substrate on filter lift assays (lacZ). - = no growth on selection plates or no β-galactosidase activity; +/- = background growth or β-galactosidase activity appears overnight; + = slow growth; ++ = strong growth or β-galactosidase activity appears after a few hours; +++ = very fast growth or high β-galactosidase activity.

the yeast counterpart of mammalian rab1, Ypt1p, was observed pointing to a conserved interaction of these two molecules [5]. The empty pAS2-1 vector, the wildtypes of the rab1 isoforms (rab1a/b), permanently inactive mutants of the rab1a/b (rab1a S25N, rab1b S22N) and Ypt1p (Ypt1 S22N) proteins were not able to significantly activate reporter gene expression (Table 1). There were also no interactions of IporinΔN847 with the small GTPases rab6 and rab2 (Table 1). These results indicate, that the interaction with Iporin ΔN847 is rab1-specific and requires the GTP-bound, active conformation of rab1.

Mapping the Iporin binding site of rab1b

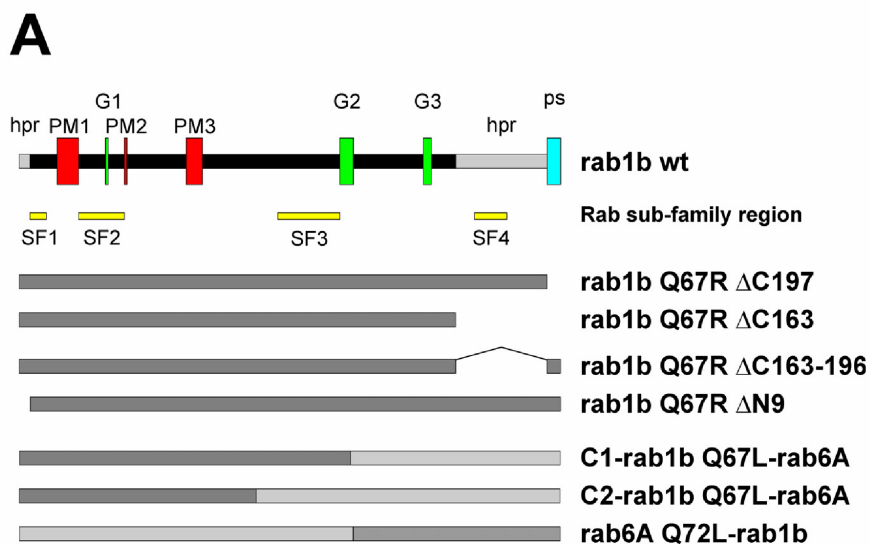
Next, we wanted to analyze, which structural elements of rab1b are necessary or sufficient for the interaction with Iporin. Since we already demonstrated that the hypervariable regions of rab1 are necessary for an interaction with GM130, we created rab1b mutants as well as rab1/rab6 chimeras (Figure 1A) [15,29]. The mutants and the chimeras enabled us to restrict specific regions for the interac-

tion to the C- or N-terminal half of rab1. Co-transformation experiments in yeast revealed that only the rab1b deletion mutant rab1b Q67R ΔC197 lacking the prenylation site of rab1b showed a strong interaction with Iporin ΔN847, suggesting that the prenylation site is not necessary for the interaction with Iporin ΔN847 (Figure 1B). The deletion mutants rab1b Q67R ΔN9, rab1b Q67R ΔC163 and rab1b Q67R ΔC163-196 failed to interact with Iporin ΔN847 (Figure 1B). These mutants were constructed based on the model previously proposed by Bourne *et al.* and Valencia *et al.*. G1-G3 and PM1-PM3 are conserved regions in all members of the ras superfamily of GTPases, that are involved in guanine (G) and phosphate/Mg²⁺ (PM) binding, respectively [3,4,30]. According to the proposed model suggested by Seabra and coworkers, which defined rab conserved sequences as rab family motifs (RabF1-5) and other regions as subfamily motifs (RabSF1-4), the generated mutants lack the RabSF1 or RabSF4 region (Figure 1A) [31]. Co-transformation with the two rab1/rab6 chimeras displayed an interaction between the C1- and C2-rab1b Q67R-rab6a chimera and Iporin/Iporin ΔN847, but not between the rab6a Q72L-rab1b chimera and Iporin ΔN847 (Figure 1B).

Full-length cloning and characterization of Iporin

Sequence analysis of the clone K17 cDNA revealed an open reading frame of 669 amino acids, which was identical to the C-terminal half of the protein encoded by the KIAA0375 cDNA (aa 848-1516). To obtain the full-length Iporin sequence, we used the KIAA0375 cDNA for the amplification of the sequence encoding the missing N-terminal fragment by PCR.

Information about the genomic structure of Iporin protein was obtained from the human genome database. The Iporin gene consists of ~14 kb of genomic sequence and contains eleven exons (Figure 2A). The gene is located on the short arm of chromosome 9 (9p13.1) and comprises 4548 bp of coding DNA. Deduced from the cDNA sequence, Iporin comprises 1516 amino acids with a calculated molecular mass of 161.195 kDa and an acidic pI of 6.17. Further structure analysis revealed functional domains and motifs in the Iporin sequence (Figure 2B). Iporin contains some low complexity regions, which include polyproline (pP) and polyglutamic acid (pE) stretches. The first polyproline stretch is localized between aa 429 and aa 442 with the sequence PPPGPGPDGPSQP and a second region between aa 1311 and aa 1319 with the sequence PPQAPPP. Proline-rich stretches are known to interact with SH3 or WW domains and could mediate further protein/protein interactions [32]. The polyglutamic acid stretch, spanning aa 1236 - 1252 with the sequence EGGEEEEEEETEEVAE is flanked by the two proline-rich regions. This motif is highly negatively



B

bait	prey Iporin ΔN847/Iporin		
	control	his3	lacZ
rab1b Q67R ΔC197	+++	++	+++
rab1b Q67R ΔC163	+++	-	-
rab1b Q67R ΔC163-196	+++	+/-	-
rab1b Q67R ΔN9	+++	-	-
C1-rab1bQ67L-rab6a	+++	+++	+++
C2-rab1bQ67L-rab6a	+++	+++	+++
rab6aQ72L-rab1b	+++	-	-

Figure 1
Determination of the Iporin interacting domain. (A) Schematic overview of the domain structure of rab1b with the conserved G1-G3 boxes, PM1-3 motifs, N-terminal and C-terminal hypervariable regions (hpr) and the C-terminal prenylation site (ps). SF1-4 indicate the rab subfamily regions. The rab1b regions of the chimeras are shaded dark and the rab6 regions are light-shaded. (B) All constructs were co-transformed in yeast and cells were cultivated on selection plates as described above (Table 1). Rab1b deletion mutants were co-transformed with Iporin ΔN847, whereas chimeras were co-transformed with full-length Iporin. - = no growth on selection plates or no β-galactosidase activity; +/- = background growth or β-galactosidase activity appears overnight; ++ = strong growth; +++ = very fast growth or high β-galactosidase activity

charged and may play a role in stabilizing the protein or function as further interaction domain.

Using the Motif Scan Software <http://www.expasy.org> we also detected a RUN (RPIP8, UNNC-14 and NESCA) domain in the Iporin sequence (aa 1031–1175; Figure 2B). This domain was shown to be involved in the function of small GTPases and can also be found in proteins which play a role in proliferation, differentiation and motility [33,34]. The RUN domain is organized in six conserved blocks (Figure 2C; A-F), which are predicted to constitute the "core" of a globular structure. Figure 2C shows an alignment of different RUN domains containing proteins related to small GTPases like RPIP8, Rabip4, Rufy1, NESCA or Iporin [34-36]. RUN domain containing proteins enclose hydrophobic amino acids in conserved positions as shown by shaded or boxed regions (Figure 2C). The secondary structure of the RUN domain core was predicted to consist of predominantly α -helices and the conserved three dimensional structure is probably of importance. However, the exact function of this motif is still unclear [33].

Interestingly, NESCA (new molecule containing SH3 at the carboxy-terminus) and Iporin share 42% of sequence homology and contain both a SH3 domain at the C-terminus. The function of NESCA is not known, but it is thought to be involved in signal transduction pathways and was recently described as a signaling adaptor which shuttles from the cytosol to the nuclear envelope [37,38]. We used NESCA as a prey for yeast two-hybrid assays to investigate, whether NESCA might be a further interacting partner of the small GTPase rab1. However, we were not able to show an interaction between NESCA and rab1 (data not shown).

BLAST searches revealed a mouse homolog of Iporin, EST clone AI840675, which shows 84% similarity to the human protein. This clone encodes 736 amino acids, which are homologous to Iporin aa 723 to 1455. The truncated mouse Iporin protein contains only a RUN domain and we suppose that it might function in a different, but related manner, to human Iporin. The C-terminus of Iporin contains a SH3 domain (aa 1447–1500), which is found in a variety of proteins (Figure 2B) [39]. This domain is known to interact with polyproline domains in target molecules and is involved in transmembrane signaling and cytoskeletal rearrangements [40]. To identify the interacting motif of the SH3 domain of Iporin we performed a phage displayed analysis. For this purpose we screened a fUSE5/15-mer M13 phage displayed random peptide library using purified GST-Iporin SH3 (Iporin Δ N1430) as a target. Sequencing of the cDNA from phages with a high and specific affinity towards GST-Iporin SH3 identified a new consensus motif (Figure 2D). This motif

contains two prolines followed by an aliphatic amino acid (A, I, L, V), two further amino acids and a conserved methionine (PPXX₂M).

Mapping the rab1 binding domain of Iporin

To investigate, which part of the Iporin sequence acts as a rab1 binding domain (R1BD), we generated several deletion mutants of Iporin (Figure 3A) and tested them in yeast two-hybrid assays (Figure 3B). As expected, the N-terminus of the protein (Iporin Δ C853), which is not present in the original prey clone as well as the SH3 domain (Iporin Δ N1430) are not necessary for the interaction with rab1b and failed to activate the reporter genes (Figure 3B). Only the RUN domain-containing mutants (Iporin Δ N847, Δ N847 Δ C1450, Δ N847 Δ C1239, Δ N991 Δ C1177, Δ N991 Δ C1239 and Δ N991 Δ C1450) showed growth and β -galactosidase activity on selection plates (Figure 3B). Interestingly, the interaction of rab1b with the shortest RUN domain containing mutants (Δ N991 Δ C1177, Δ N991 Δ C1239, respectively) was weaker compared to fragments containing longer flanking sequences, which could result from protein misfolding.

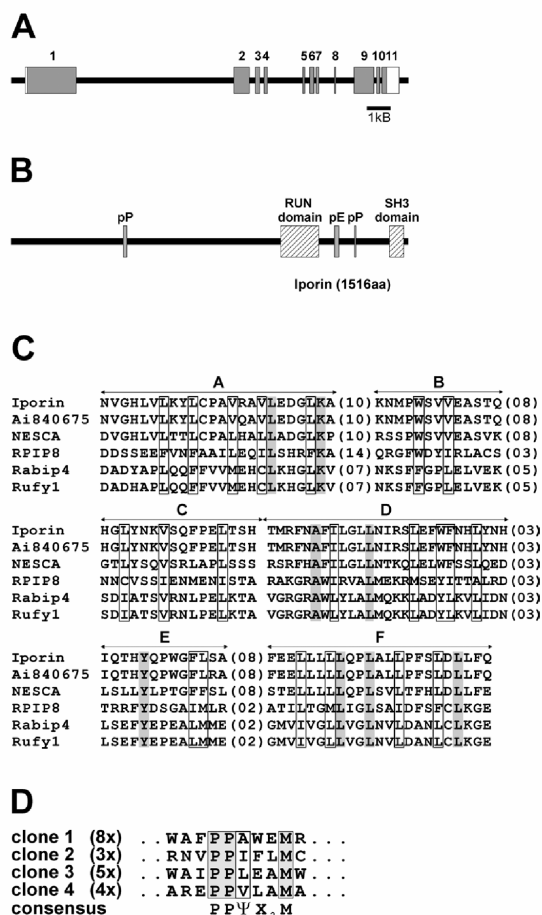
To confirm the yeast two-hybrid mapping results, we performed GST-pulldown assays. Bacterially expressed GST-Iporin Δ N847 Δ C1239, GST-Iporin Δ N847 Δ C992 and GST were coupled to glutathione-Sepharose and incubated with extract from BHK cells overexpressing HA-tagged rab1b Q67R (Figure 3C). In this assay, the GST-Iporin Δ N847 Δ C1239 was able to bind to the active form of rab1b, whereas GST and GST-Iporin Δ N847 Δ C992 failed to interact (Figure 3C). These findings confirmed the yeast data (Figure 3B) and indicate that the rab1 binding domain of Iporin needs the whole RUN motif.

Tissue-specific expression and cellular localization of Iporin

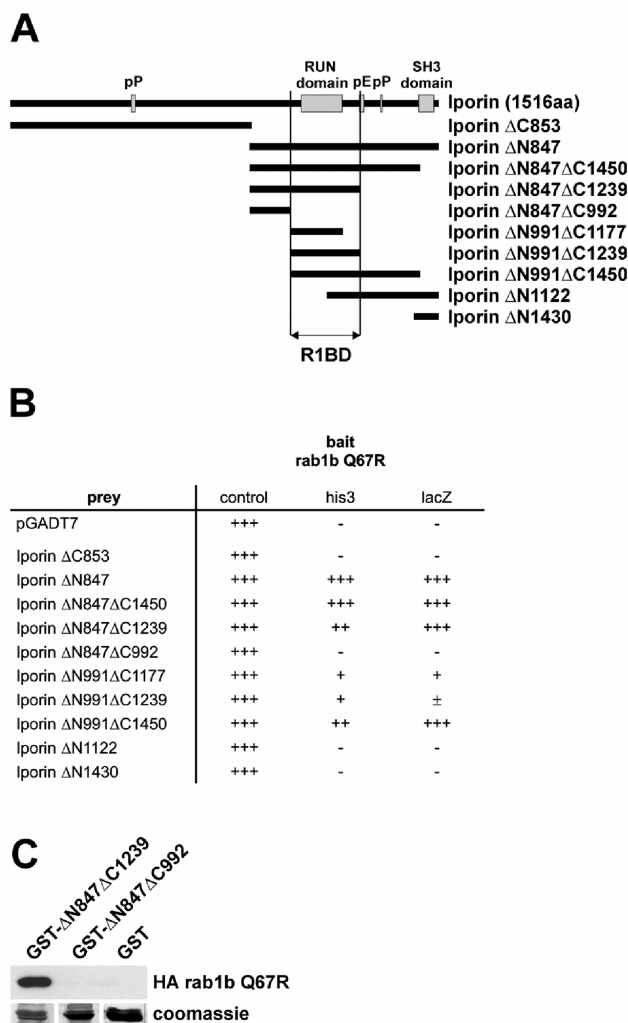
Northern blot analysis of various human tissues indicated, that Iporin is ubiquitously expressed. The Iporin mRNA was identified as a prominent band of approximately 5.5 kb. Highest amounts of Iporin transcripts were observed in brain and testis (Figure 4). These findings are consistent with the RT-PCR results, published by the Kazusa institute, Japan.

The cellular distribution of Iporin was examined by cytosol/membrane fractionation and immunofluorescence.

Although the calculated mass of Iporin (deduced from the cDNA sequence) is 161,195 kDa, the endogenous protein is detected at about 220 kDa in Western blot analyses (Fig. 5Ac first row). We assume that the molecular weight shift observed in the Western blot analyses could result from posttranslational modifications within the

**Figure 2**

2 Genomic structure and functional elements of Iporin. (A) Schematic representation of the human Iporin gene located on chromosome 9. The protein coding exons of Iporin are shown as shaded boxes numbered one to eleven, non-coding sequences are white. The gene (~14 kb) encodes a protein of 1516 amino acids. (B) Domains and structural motifs of Iporin. The most interesting domains within Iporin are the SH3 (aa 1447–1500) and the RUN domain (aa 1031–1175). The proline-rich motifs (pP, aa 429–442; aa 1311–1319) are possible interaction motifs for SH3 or WW domain containing proteins. The glutamic acid-rich region (pE, aa 1236–1252) is negatively charged with possibly stabilizing function. (C) Alignment of RUN domains from related proteins. The sequence corresponding to the RUN domain of Iporin (aa 1031–1175, human) was aligned to the RUN domains present in Ai840675 (aa 309–453, mouse), NESCA (aa 53–197, human), RPIP8 (aa 52–189, human), Rabip4 (aa 31–163, mouse) and Rufy1 (aa 31–163, human) (GenBank accession numbers, XP_131380.2, BAA77507.2, NP_006686.1, CAC17732.1 and AAK50771.1, respectively). RUN domains were detected using the Motif Scan software <http://www.expasy.org>. Hydrophobic residues (V, L, I, F, Y, W, M, C) are shown as boxes, conserved positions are shaded. A-F are the six conserved blocks, and distances between these blocks are indicated by the numbers in parentheses. (D) Alignment of sequenced clones identified by phage display using the Iporin SH3 domain. Four different clones were isolated, whereby the number of independent clones, which contained the same sequence, are in brackets. The conserved consensus motif is shaded. Ψ = aliphatic amino acid; X₂ = two individual amino acids.

**Figure 3**

Mapping the rab1 binding domain (R1BD) of Iporin. (A) Overview of deletion mutants used for yeast co-transformation assays. The deletion mutants ΔN_x or ΔC_x do not contain the N-terminus or the C-terminus, respectively. We were able to map the rab1 binding domain (R1BD) to a RUN domain containing region. (B) Results obtained from yeast co-transformations. The bait construct rab1b Q67R was cloned into the pAS2-I vector and the prey constructs into pGADT7. Clones were cultivated on selection plates as described previously (see Table 1). (C) GST-pulldown with coupled GST-Iporin $\Delta N847\Delta C1239$ indicated an interaction with Iporin, whereas GST-Iporin $\Delta N847\Delta C992$ and GST were negative. The lower panel shows the Coomassie blue stained blot membrane with equal amounts of GST fusion protein. - = no growth on selection plates or no β -galactosidase activity; +/- = β -galactosidase activity appears overnight; + = slow growth or β -galactosidase activity appears after several hours; ++ = strong growth; +++ = very fast growth or high β -galactosidase activity; pP = polyproline; pE = polyglutamic acid.

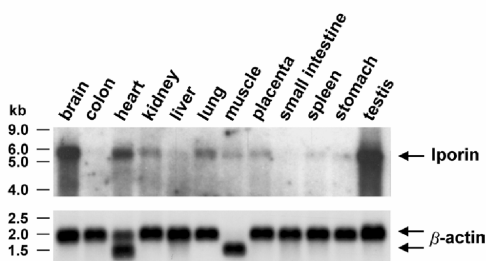


Figure 4
Tissue-specific expression of Iporin mRNA. A 12-lane multiple-tissue Northern blot was hybridized with a specific 32 P-labeled cDNA probe for Iporin. Each lane contains approximately 2 μ g of poly A⁺ from various tissues. The blot was exposed to an X-ray film for 17 h at -80°C with an amplifying screen. To confirm equal loading, the membrane was re-hybridized with a radiolabeled probe specific for β -actin mRNA.

aminoterminal part of the Iporin molecule, because transient transfections in HeLa cells with aminoterminal constructs showed the highest difference between measured and calculated weight (data not shown). However, in lysates from transfected HeLa cells expressing HA-tagged full length Iporin, the affinity-purified antibody Aip519 detected a 220 kDa protein as did the 16B12 antibody, which is directed against the HA epitop (Figure 5Aa).

To obtain information about the membrane association of Iporin, we performed cytosol/membrane fractionation and therefore we transiently transfected HeLa cells with vectors encoding full-length Iporin, an aminoterminal fragment (Iporin Δ C853) or the C-terminal fragment (Iporin Δ N847), respectively (Figure 5Ab). Transfected cells were lysed and extracts were separated by differential centrifugation steps into cytosol (S100) and membrane (P100) fractions. Equal amounts of protein were analyzed by Western blotting. Calnexin distribution was used as a marker for integral membrane proteins to verify the purity of the fractions (not shown). Our data demonstrate that full-length HA-Iporin and HA-Iporin Δ N847 seem to associate with cellular membranes or insoluble parts of cells, because major part of the proteins was detected in the P100 fractions (Figure 5Ab). Interestingly, the HA-Iporin Δ C853 mutant, which lacks the C-terminus was highly enriched in the cytosolic fraction, indicating that parts of the C-terminus play an important role in the cellular localization of Iporin (Figure 5Ab). To address the question, whether the overexpression of permanently active rab1b influences the cellular distribution of Iporin,

we transiently transfected HeLa cells with vectors encoding for HA-tagged rab1b Q67L and performed further fractionations (Figure 5Ac). The comparison between non-transfected and transfected HeLa cells showed, that the overexpression of HA-rab1b Q67L had no remarkable effect on the distribution of Iporin. GM130, p115 and Calnexin were used as control proteins and showed as well no significant changes.

Hence our Aip519 polyclonal antibody was inapplicable for immunohistochemistry we transiently transfected HeLa cells with HA tagged Iporin and used the anti HA-antibody 16b12 for staining. The immunofluorescence shows a cytosolic pattern of HA-Iporin, enriched in small, brighter spots. However, most of the cells showed a faint perinuclear enriched fluorescence where usually the Golgi/ER structures are localized (Figure 5B).

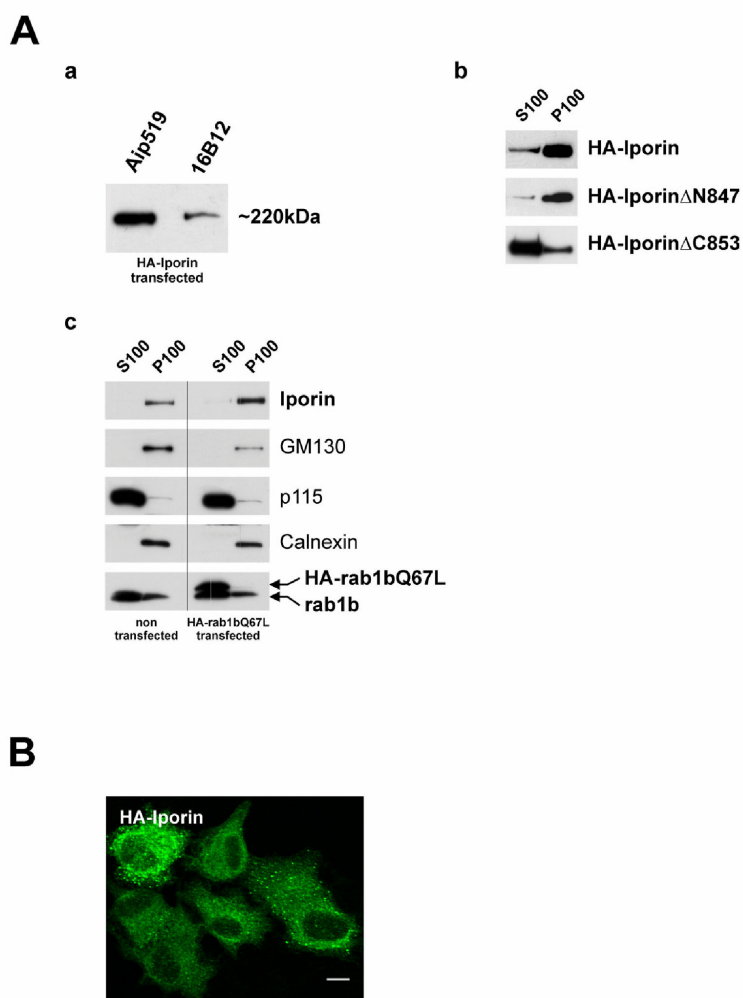
Iporin interacts with the Golgi matrix protein GM130

Surprisingly, yeast two hybrid co-transformation experiments showed an additional interaction between the two rab1 binding proteins Iporin and GM130. Mapping of the binding site of GM130 revealed, that the coiled-coil domain 6 is responsible for the interaction with Iporin, whereas GM130 coiled-coil domain 3 mediates the interaction with rab1b (Figure 6A) [15]. To confirm the yeast data, we performed *in vitro* binding assays. Recombinant GST-Iporin Δ N847 Δ C1239 as well as GST-Iporin Δ N1430 proteins were coupled to glutathione Sepharose beads and then incubated with HeLa SS6 cell extracts, which expressed the GM130 protein in considerable amounts. After washing steps, the bound proteins were separated by SDS-page and analyzed by Western blotting analysis using GM130 antibodies. As shown in figure 6B, only GST-Iporin Δ N847 Δ C1239 is able to bind to endogenous GM130, whereas the GST-Iporin Δ N1430 was unable to interact (Figure 6B).

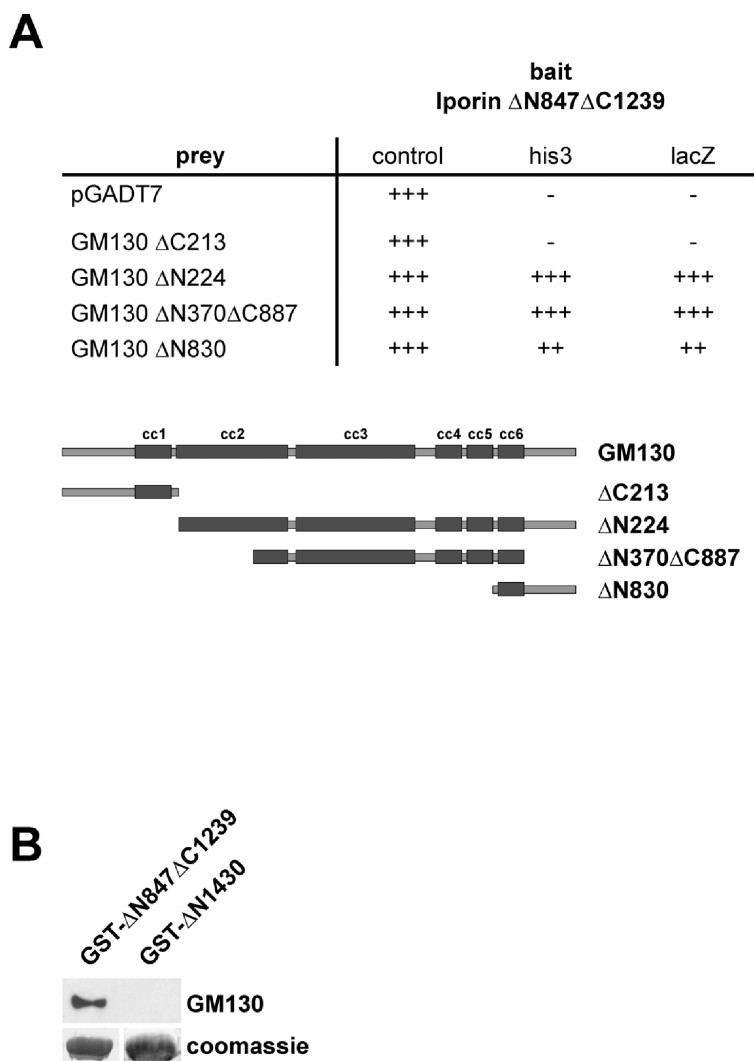
Discussion and conclusions

The cellular function of the small GTPase rab1 is not fully understood, thus the identification of novel rab1 interacting molecules may help to elucidate its role in vesicular transport. Using the yeast two-hybrid system, we were able to isolate Iporin as a new protein, which specifically interacts with the activated, GTP-bound conformation of rab1. Interestingly, Iporin also showed an interaction with the rab1 homolog from yeast Ypt1p, indicating that formation of this protein/protein complex is conserved during evolution.

Northern blot analysis of Iporin mRNA revealed an ubiquitous expression pattern (Figure 4). Highest amounts of Iporin mRNA were observed in brain and testis, suggesting that Iporin might have a distinctive role in these tissues. Neurogenesis as well as spermatogenesis are

**Figure 5**

Cellular distribution of Iporin. **(Aa)** To test specificity of the polyclonal anti Iporin antibody Aip519, HeLa cells were transiently transfected with HA-tagged Iporin. After lysis, cell extracts were blotted and incubated with the Aip519 and the monoclonal 16B12 anti HA antibody, respectively. The Western blot displays a signal of about 220 kDa for both antibodies. **(Ab)** Cytosol/membrane fractionation with extracts from transiently transfected HeLa cells. Recombinant HA-Iporin was detected with anti HA (16B12) antibody. Fractionation of full-length HA-Iporin and HA-Iporin Δ N847 revealed that most of the recombinant proteins were present in the membrane fraction (P100) with small amounts in the cytosolic (S100) fraction. In contrast, the transiently expressed HA-Iporin Δ C853 was present in a high concentration in the cytosolic (S100) fraction. **(Ac)** Comparison between untransfected and HA-rab1bQ67L transfected HeLa cells. Blots were analyzed using the Aip519 (Iporin), anti-GM130 (GM130), anti-p115 (p115), anti-calnexin and IE7 (anti-rab1b) antibodies. **(B)** Immunofluorescence staining of recombinant HA-Iporin expressed in HeLa cells shows a cytosolic distribution with a perinuclear enrichment in spotted structures. Bar 10 μ m.

**Figure 6**

Interaction of Iporin with GM130. (A) Yeast co-transformations revealed an interaction between Iporin and GM130. Using different GM130 deletion mutants, we were able to map the binding site to the coiled-coil region 6 (Figure 6A). The bait construct Iporin Δ N847 Δ C1239 was cloned into the pAS2-I vector and the prey constructs into pGADT7. Clones were cultivated on selection plates as described previously (see Table 1). = no growth on selection plates or no β -galactosidase activity; ++ = strong growth or β -galactosidase activity appears after a few hours; +++ = very fast growth or high β -galactosidase activity **(B)** GST-pulldown of endogenous GM130 with GST-Iporin Δ N847 Δ C1239 or GST-Iporin Δ N1430. After incubation with HeLa cell extracts, GST-Iporin Δ N847 Δ C1239 showed an interaction with GM130, whereas GST-Iporin Δ N1430 did not bind to GM130. The lower panel shows the Coomassie blue stained blot membrane with equal amounts of GST fusion protein.

processes that result in the production of highly polarized cells and we speculate that Iporin might act as a regulator in these cellular systems [41].

Applying a set of deletion mutants and chimeras of rab1, we demonstrated that the Iporin binding domain is localized within the N-terminal half of rab1 and that the rab1 N-terminal hypervariable region is essential for the interaction (Figure 1). In contrast to PRA1, another known rab1 effector protein, our results show that the prenylation site of the rab1 GTPase is not necessary for the binding to Iporin [42]. A well characterized interaction between a rab GTPase and an effector molecule is the rab3a/rabphillin-3a interacting complex [43]. The specific interaction of rab3a with rabphillin-3a is mediated through a rab3a "pocket" contributed by three rab complementary-determining regions (RabCDR), which are localized at the N- and C-terminus. The RabCDRs are proposed to form regions of variable sequences among the rab family within a structural conserved framework and act as a structural element for protein/protein interactions [43]. This model was supported by the work of Seabra and co-workers. They defined a model of conserved regions within the rab family (RabF) and regions only conserved among the rab isoforms (RabSF) [31]. Projected on a three dimensional model of rab3a, the previously described RabCDR regions are represented by the RabSF1, 3 and 4 regions. They form one interaction surface and the RabSF2 region forms another surface, almost on the opposite side [31]. The data presented here about the interaction of the rab1b Q67R deletion mutants and the permanently active rab1b/rab6a chimeras with Iporin and Iporin Δ 847, respectively, revealed that the N-terminal half of rab1b, including RabSF1 and RabSF2, is essential for the interaction with Iporin (Figure 1B). The C-terminal elements, comprising RabSF3 and RabSF4, do not play a role in the formation of the complex and may be necessary for structural reasons only. Surprisingly, this is in contrast to the results received from the rab3a/rabphillin-3a complex. Our data suggest that Iporin is able to interact with parts of both interaction surfaces. Thus, these results support the theory of a multi-protein interaction interface, where molecules can interact with different parts of both surfaces.

To date, four proteins (p115, GM130, golgin-84 and MICAL) have been identified which interact specifically with the activated conformation of rab1 [14-17,25,27,28]. GM130 is a cis-Golgi-localized coiled-coil protein, targeted to membranes via the peripheral membrane protein GRASP65 [44]. Additionally, GM130 interacts with activated rab1, rab2, rab33b, the vesicle tethering-protein p115 and as we recently observed with Iporin [15,45]. p115 has been identified to play a pivotal role in docking of COPI vesicles to the Golgi membranes

by recruiting GM130 and Giantin in a long tethering complex [21,22]. Giantin is a transmembrane protein, located on COPI vesicles and shares similarities with the recently identified golgin-84 and CASP [16,46,47]. It is worth to note, that rab1 was also shown to recruit p115 during budding to the ER-compartment to program COPII vesicles for fusion [14]. Another aspect, which has been discussed to be required for tethering events at the ER-Golgi stage are large multisubunit complexes like TRAPPI (transport protein particle). TRAPPI has been identified in yeast to function as tethering factor with GEF activity (guanosine exchange factor) for Ypt1p [48,49]. The importance of this complex for mammalian transport steps between ER and Golgi remains to be clarified, but the increasing number of rab1 interacting molecules raises the theory of a huge protein complex with rab1 in a central position. Another possibility might be that activated rab1 only mediate interactions between other proteins, e.g. Iporin and GM130, in a time or place dependent manner.

Iporin displays some features that are quite different from the known rab1 interacting molecules. First GM130 as well as golgin-84 contain coiled-coil regions that are essential structural elements for the interaction with rab1 [15-17,28,50]. However, the rab1b binding domain of p115 has not been characterized so far [14,51]. Iporin contains no coiled-coil regions, but interacts via a RUN domain with rab1 (see below). Second the known rab1 effector proteins are membrane-associated proteins, which are involved in tethering processes between donor and acceptor membranes at ER-Golgi compartments [14,17,22,46]. Iporin displays a distribution (Figure 5Ab-c, 5B), which is also different from known proteins belonging to the tethering complex at Golgi membranes. Similar to MICAL, the localization of Iporin is not restricted to the ER-Golgi compartment leading to the conclusion that, in contrast to GM130 or GRASP65, Iporin is not a member of the Golgi matrix protein family [15,24,27]. The cytosol/membrane fractionation of HeLa cell extracts revealed a mainly membranous association (P100) of transiently transfected and endogenous Iporin, which is an evidence for a high and stable membranous association through its function (Figure 5Ab-c). At this step, Iporin might recruit further proteins to form a complex needed for a regulative purpose.

Interestingly, the deletion mutants Iporin Δ N847 and Iporin Δ C853 show a different distribution in the S100 fraction. Iporin Δ C853 exhibits a cytosolic accumulation, which is a hint for a much weaker accessibility to membranes (Figure 5Ab). This accumulation seems to be due to the missing carboxyterminal part of the protein and not the result of overexpression effects (Figure 5Ab). To test the influence of overexpressed permanently active rab1b, we transiently transfected HeLa cells with HA-tagged

rab1bQ67L and compared transfected to non-transfected cells. The obtained data showed no significant effect on Iporin membrane association (Figure 5Ac). One could argue that the membrane association is not necessarily coupled to the interaction with rab1. Like GM130, which is linked via the GRASP65 protein to membranes, another protein, not yet identified, might be responsible for the attachment of Iporin to membranes. In addition, the over-expression of HA-rab1bQ67L had also no effect on the GM130 distribution, which interaction with rab1 is well characterized. Another reason could be, that for the interaction with rab1 only a limited amount of Iporin is sufficient and that the HA-rab1b Q67L compete with the GTP-bound endogenous rab1b.

As mentioned before, Iporin contains a RUN and a SH3 domain as well as proline- and glutamic acid-rich regions. These motifs have been described to function as targets for protein/protein interactions [35,52,53]. The RUN domain was previously shown to be part of the rap2 binding region and is supposed to mediate the interaction between the small GTPase rap2 and the effector protein RPIP8 [35]. In contrast, the RUN domain of Rabip4, an effector protein of the small GTPase rab4, has no influence on the interaction, but was supposed to be responsible for an association with a filamentous network [36]. We were able to map the rab1 interacting domain to a RUN domain-containing region and we suggest a rab1-specific interacting function for the RUN domain of Iporin (Figure 3).

Using the phage display method we identified PP Ψ X₂M as a new SH3 binding motif, which is different from the originally known PXXP motif [52]. The Iporin SH3 domain together with the polyproline regions may act as regulative targets for not yet identified interacting proteins. Such a link was recently described for the small GTPase rab5. RN-tre, a rab5-specific GTPase-activating protein (GAP) interacts with Grb2. This association is mediated via the SH3 domains of Grb2 and the proline-rich regions of RN-tre [54].

Our recent discovery of an additional not yet identified interaction partner of Iporin, the GM130, is a very interesting piece of the "Golgi puzzle" (Figure 6). As has been shown in this and previous manuscripts, both proteins, the Iporin and GM130 interact with rab1 [15,17]. As mentioned above, GM130 is important for vesicle docking processes at the *cis*-Golgi, where it interacts with p115. GM130 itself is recruited to ER-derived vesicles and vesicular-tubular clusters by the rab1 GTPase [50]. One could speculate, that Iporin, while interacting with rab1b, specifies the recruitment of the incoming vesicle to the *cis*-Golgi by displaying a high affinity to GM130 by finally binding to this protein. The presented data showed that

the binding site of Iporin is different from other GM130 interacting proteins. p115 binds to the N-terminus, rab1b to the coiled-coiled region 3 and GRASP65 to the C-terminus of GM130 [15,18,44]. Iporin binds to the coiled-coiled region 6 which means that they could bind in several ways e.g. at the same time, one after another, two at the same time, etc.

The multi-domain structure of Iporin and the cellular distribution suggest that this protein might act as an adapter or scaffold protein, which links GTPases to certain intracellular signal transduction pathways. Noteworthy, Iporin displays several features different from known rab1 effector proteins. Our data about the Iporin-rab1-GM130 association demonstrate once more, that the increasing number of protein/protein interactions at different stages of ER to Golgi transport implies a more complex regulated network as originally thought.

Methods

Yeast two-hybrid assay

For the yeast two-hybrid screen we cloned human rab1b Q67R cDNA into the pAS2-1 bait vector and transformed Y190 as recommended by the Matchmaker II[™] manual (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Germany). The bait yeast strain was then transformed with a human placenta cDNA library (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Germany) as prey. In order to test the specificity of the interaction between rab1b Q67R and putative binding partners, Y190 yeast cells were co-transformed with various bait and prey constructs and incubated on selection plates at 30 °C for 5–7 days as described by manufacturer's instructions (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Germany). A protein/protein interaction was confirmed by β -galactosidase filter lift assays using X-gal as substrate. The cDNAs of selected yeast clones were purified, transformed into *E. coli* strain DH5 α and sequenced.

Cloning of the full-length Iporin sequence and generation of deletion mutants

To clone the full-length Iporin sequence, we amplified the cDNA encoding the N-terminal region of Iporin (which is represented by the Iporin Δ C853 deletion mutant) using the KIAA 0375 cDNA (generous gift from Takahiro Nagase, Kazusa Institute, Japan) as template. We generated a primer with a 5' *Nde*I overhang containing the predicted start codon and a primer with a 3' *Eco*RI overhang beyond a single endogenous *Hind*III restriction site, which was also found in the original prey clone. The PCR product, representing the N-terminal part, was digested with *Nde*I/*Hind*III and was inserted into the eukaryotic expression vector pSV-HA [55]. In a second step, the initially isolated prey cDNA encoding the C-terminal part of Iporin, was digested with *Hind*III and was inserted into the pSV-HA-N-terminal vector. To generate deletion mutants,

fragments of Iporin cDNA were amplified with specific primers containing 5' *Nde*I and 3' *Eco*RI sites and were cloned into the pAS2-1 or pGADT7 vectors. Generation of rab1b/rab6a chimeras was described previously [29]. All resulting constructs were verified by sequencing. Details are available from A. Barnekow.

Northern blot analysis

Multiple tissue Northern Blot (OriGene, Rockville, USA) of poly (A⁺) RNA from various human tissues was hybridized with ³²P-labeled Iporin ΔN847 cDNA using the RediPrime Nick Translation Kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) according to the manufacturer's instructions. The X-ray film was exposed for 17 h at -80°C with an amplifying screen.

Antibodies

The polyclonal antibody Aip519 against Iporin was raised in a rabbit immunized with GST-Iporin aa 848–991 (Eurogentech, Seraing, Belgium). The antibody was affinity purified using the antigen coupled to NHS-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). The mouse monoclonal antibody 1E7 against rab1b has been described earlier [55]. Mouse monoclonal antibodies against Calnexin (anti-Calnexin), GM130 (anti-GM130), p115 (anti-p115) and the HA-tag (16B12) were purchased from BD Biosciences (Heidelberg, Germany) and BABCO (Berkely, USA), respectively. Secondary antibodies coupled to peroxidase were purchased from Amersham Biosciences (Freiburg, Germany).

Expression and purification of recombinant proteins

GST-Iporin ΔN847ΔC992 fusion protein, used for immunization and GST-Iporin ΔN1430 (encoding the SH3 domain) used for the phage display method (see below) were expressed in *E. coli* strain BL21 induced with 1 mM IPTG for 3 h at 30°C. The pelleted bacteria were washed, resuspended in PBS containing protease inhibitors (complete[™], EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and sonicated 10x for 10 sec. Triton X-100 was added to 1% final concentration and the lysate was incubated on ice for 30 min. After centrifugation at 16000 × g the cleared supernatant was incubated with glutathione-Sepharose beads for 30 min at 4°C. The beads were washed twice with chilled PBS and the fusion protein was eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 10 mM reduced glutathione. Samples were dialyzed against PBS overnight. The recombinant proteins used for GST-pull-down experiments were treated as described above without the elution and dialyzation step. Cleared supernatants were stored at -80°C until use.

In vitro binding assay

GST-pull-down assays were performed using bacterially expressed GST fusion proteins containing the deletion

mutants Iporin ΔN847ΔC1239, ΔN847ΔC992 and ΔN1430. Equal amounts of the GST fusion proteins or GST were immobilized on 10 μl packed glutathione-Sepharose beads and incubated overnight at 4°C. After the beads were washed three times with LB buffer (10 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.2% Triton X-100, complete[™] EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), they were incubated with cytosolic extract from BHK cells, transiently transfected with pSV-HA-rab1b Q67R using the Ca-phosphate/DNA precipitation method [56]. To prepare the cytosolic extract, BHK or HeLa cells were washed three times with chilled PBS and scraped in a volume of 300 μl LB buffer. After homogenization by 15 passes through a 25 gauge needle, lysates were centrifuged at 14000 × g, 4°C for 1 h. The beads containing tubes were incubated for 3 h at 4°C on a rocking platform, supplemented with 50 μl goat serum and were adjusted with LB to a total volume of 300 μl. Beads were recovered by centrifugation, washed three times with 500 μl LB. Proteins were eluted by boiling the beads in SDS sample buffer analyzed by SDS/PAGE and Western blotting. The GM130-pull-down was performed as above with untransfected HeLa cell extracts and without the supplementation of goat serum.

Cell lines

BHK and HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% glutamine at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Cytosol/membrane fractionation

HeLa cells were grown on 10 cm tissue culture plates and transiently transfected with different pSV-HA-Iporin constructs or pSV-HA-rab1bQ67L using the Ca-phosphate/DNA precipitation method. After 20 hrs, cells were washed three times with chilled PBS, frozen at -80°C, thawed and scraped into 300 μl CMF buffer (250 mM sucrose, 10 mM Hepes/KOH pH 7.4, 1 mM EDTA, complete[™] EDTA-free, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Cells were homogenized by 15 passes through a 25 gauge needle and centrifuged at 1000 × g, 4°C for 2 min. The resulting PNS (postnuclear supernatant) was underlayered with 10 μl of 50% sucrose and centrifuged at 14000 × g and 4°C for 15 min. The supernatant was centrifuged for a second time at 100000 × g and 4°C for 1 h, which provided the S100 supernatant and the P100 pellet fraction. The P100 pellet was washed with 200 μl of CMF and centrifuged once more. Samples were analyzed by SDS/PAGE and Western blotting.

Immunofluorescence analysis

HeLa cells were grown at 40–60% confluency on coverslips and transiently transfected using the Polyfect transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany) according to

manufacturer's instructions. After 24 hrs, the cells were washed with chilled PBS and fixed for 5 min. in 100% methanol at -20°C. The fixed cells were washed in PBS and blocked for 20 min. in PBS supplemented with 10% (v/v) goat serum. Monoclonal anti-HA tag antibodies (16B12) were diluted in PBS containing 2% (v/v) goat serum and incubated with the cells for 30 min. at RT. After washing with PBS, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgGs were applied for 30 min. The cells were washed again with PBS, rinsed in water and mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem, Bad Soden, Germany).

Phage display

The fUSE5/15-mer M13 phage displayed random peptide library was screened with purified GST-Iporin ΔN1430 fusion protein containing the SH3 domain of Iporin. The used library consists of 2×10^8 primary clones and contains a foreign 15-mer oligopeptide on all 5 copies of pIII. The method was performed as described previously [57]. Briefly, 2 μg of purified GST-Iporin ΔN1430 fusion protein was immobilized on the surface of a 96 well plate and incubated with $\sim 10^{13}$ plaque forming units of the phage displayed random peptide library. The bound phages were washed, eluted, amplified and incubated again with newly immobilized GST-Iporin ΔN1430 fusion protein for a second and third round to purify the bound phages. The isolated phages were tested with GST as negative and GST-Iporin ΔN1430 fusion protein as positive controls by the Detection Module Recombinant Phage Antibody System (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA from positive clones was isolated and sequenced.

Abbreviations

Iporin, interacting protein of rab1; ER, endoplasmic reticulum; Golgi, Golgi apparatus; GST, glutathione S-transferase; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; SH3, Src homology 3; RUN, RPIP8/UNC-14/NESCA; RabF1-5, rab family region 1-5; RabSF1-4, rab subfamily region 1-4; aa, amino acid; NESCA, new molecule containing SH3 at the carboxy-terminus; RPIP8, Rap2-interacting protein 8; Rabip4, Rab4 interacting protein; Rufy1, RUN and FYVE domain containing protein; SNARE, soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; SM, Sec1/Munc18-like proteins, MICAL, a Molecule Interacting with CasL; GM130, Golgi matrix protein with 130 kDa.

Authors' contributions

MB: screening, yeast transformations, cloning of Iporin, construction of mutants, GST- pulldown, figure preparation, manuscript preparation

JF: construction of deletion mutant, co-transformation

JK: northern blot analysis, manuscript preparation

EO: GST-pulldown, cytosol/membrane fractionations

TM: phage display

MK: GM130 experiments

TW: conception

AB: conception, design, manuscript preparation, research funds collection

Acknowledgements

We thank Drs. I. G. Macara, S. R. Pfeffer and D. Gallwitz for control bait plasmids, the Kazusa DNA Research Institute (Japan) for providing the human KIAA0375 cDNA (Accession No. AB002373.2) and Dr. G. P. Smith for the fUSE5/15-mer M13 phage library. Further we thank M. Koester and M. Rosing for the construction of chimeras and Dr. M. Kail for critically reading the manuscript. This work was supported by the DFG and an FCI grant to A.B.

References

- Zerial M, McBride H: **Rab proteins as membrane organizers.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:107-117.
- Lazar T, Gotte M, Gallwitz D: **Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?** *Trends Biochem Sci* 1997, **22**:468-472.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F: **The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions.** *Nature* 1990, **348**:125-132.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F: **The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism.** *Nature* 1991, **349**:117-127.
- Stenmark H, Olkkonen VM: **The Rab GTPase family.** *Genome Biol* 2001, **2**:REVIEWS3007.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC: **Membrane fusion.** *Cell* 2003, **112**:519-533.
- Tisdale EJ, Bourne JR, Khosravi-Far R, Der CJ, Balch WE: **GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex.** *J Cell Biol* 1992, **119**:749-761.
- Saraste J, Lahtinen U, Goud B: **Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway.** *J Cell Sci* 1995, **108** (Pt 4):1541-1552.
- Nuoffer C, Davidson HW, Matteson J, Meinkoth J, Balch WE: **A GDP-bound of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments.** *J Cell Biol* 1994, **125**:225-237.
- Plutner H, Cox AD, Pind S, Khosravi-Far R, Bourne JR, Schwaninger R, Der CJ, Balch WE: **Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments.** *J Cell Biol* 1991, **115**:31-43.
- Morsomme P, Riezman H: **The Rab GTPase Ypt1p and tethering factors couple protein sorting at the ER to vesicle targeting to the Golgi apparatus.** *Dev Cell* 2002, **2**:307-317.
- Martinez O, Goud B: **Rab proteins.** *Biochim Biophys Acta* 1998, **1404**:101-112.
- Brennwald P: **Reversal of fortune. Do Rab GTPases act on the target membrane?** *J Cell Biol* 2000, **149**:1-4.
- Allan BB, Moyer BD, Balch WE: **Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion.** *Science* 2000, **289**:444-448.
- Weide T, Bayer M, Koster M, Siebrasse JP, Peters R, Barnekow A: **The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b.** *EMBO Rep* 2001, **2**:336-341.
- Diao A, Rahman D, Pappin DJ, Lucocq J, Lowe M: **The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation.** *J Cell Biol* 2003, **160**:201-212.

17. Moyer BD, Allan BB, Balch WE: **Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering.** *Traffic* 2001, **2**:268-276.
18. Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C, Warren G: **The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner.** *Cell* 1997, **89**:445-455.
19. Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B, Warren G: **A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes.** *J Cell Biol* 1998, **140**:1013-1021.
20. Cao X, Ballew N, Barlowe C: **Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins.** *EMBO J* 1998, **17**:2156-2165.
21. Shorter J, Beard MB, Seemann J, Dirac-Svejstrup AB, Warren G: **Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115.** *J Cell Biol* 2002, **157**:45-62.
22. Seemann J, Jokitalo EJ, Warren G: **The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:635-645.
23. Short B, Preisinger C, Korner R, Kopajcich R, Byron O, Barr FA: **A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic.** *J Cell Biol* 2001, **155**:877-883.
24. Barr FA, Puype M, Vandekerckhove J, Warren G: **GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae.** *Cell* 1997, **91**:253-262.
25. Satoh A, Wang Y, Malsam J, Beard MB, Warren G: **Golgin-84 is a rab1 Binding Partner Involved in Golgi Structure.** *Traffic* 2003, **4**:153-161.
26. Bascom RA, Srinivasan S, Nussbaum RL: **Identification and characterization of golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain.** *J Biol Chem* 1999, **274**:2953-2962.
27. Weide T, Teuber J, Bayer M, Barnekow A: **MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **306**:79-86.
28. Valsdoctir R, Hashimoto H, Ashman K, Koda T, Storrie B, Nilsson T: **Identification of rabaptin-5, rabex-5, and GM130 as putative effectors of rab33b, a regulator of retrograde traffic between the Golgi apparatus and ER.** *FEBS Lett* 2001, **508**:201-209.
29. Matanis T, Akhmanova A, Wulf P, Del Nery E, Weide T, Stepanova T, Galjart N, Grosveld F, Goud B, De Zeeuw CI, Barnekow A, Hoogenraad CC: **Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**:986-992.
30. Valencia A, Chardin P, Wittginghofer A, Sander C: **The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids.** *Biochemistry* 1991, **30**:4637-4648.
31. Pereira-Leal JB, Seabra MC: **The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily.** *J Mol Biol* 2000, **301**:1077-1087.
32. Sudol M: **The WW module competes with the SH3 domain?** *Trends Biochem Sci* 1996, **21**:161-163.
33. Callebaut I, De Gunzburg J, Goud B, Morion JP: **RUN domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26**:79-83.
34. Yang J, Kim O, Wu J, Qiu Y: **Interaction between tyrosine kinase Etk and a RUN domain- and FYVE domain-containing protein RUFY1. A possible role of ETK in regulation of vesicle trafficking.** *J Biol Chem* 2002, **277**:30219-30226.
35. Janoueix-Lerosey I, Pasheva E, De Tand MF, Tavitian A, De Gunzburg J: **Identification of a specific effector of the small GTP-binding protein Rap2.** *Eur J Biochem* 1998, **252**:290-298.
36. Mari M, Macia E, Marchand-Brustel Y, Cormont M: **Role of the FYVE finger and the RUN domain for the subcellular localization of Rabip4.** *J Biol Chem* 2001, **276**:42501-42508.
37. Matsuda S, Miyazaki K, Ichigotani Y, Kurata H, Takenouchi Y, Yamamoto T, Nimura Y, Irimura T, Nakatsugawa S, Hamaguchi M: **Molecular cloning and characterization of a novel human gene (NESCA) which encodes a putative adapter protein containing SH3.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1491**:321-326.
38. MacDonald JL, Kubu CJ, Meakin SO: **Nesca, a novel adapter, translocates to the nuclear envelope and regulates neurotrophin-induced neurite outgrowth.** *J Cell Biol* 2004, **164**:851-862.
39. Sudol M: **From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'.** *Oncogene* 1998, **17**:1469-1474.
40. Burchett SA: **Regulators of G protein signaling: a bestiary of modular protein binding domains.** *J Neurochem* 2000, **75**:1335-1351.
41. Maier B, Medrano S, Sleight SB, Visconti PE, Scrabble H: **Developmental association of the synaptic activity-regulated protein arc with the mouse acrosomal organelle and the sperm tail.** *Biol Reprod* 2003, **68**:67-76.
42. Martincic I, Peralta ME, Ngsee JK: **Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and VAMP2 receptor.** *J Biol Chem* 1997, **272**:26991-26998.
43. Ostermeier C, Brunger AT: **Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A.** *Cell* 1999, **96**:363-374.
44. Barr FA, Nakamura N, Warren G: **Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae.** *EMBO J* 1998, **17**:3258-3268.
45. Short B, Barr FA: **Membrane traffic: a glitch in the Golgi matrix.** *Curr Biol* 2003, **13**:R311-R313.
46. Alvarez C, Garcia-Mata R, Hauri HP, Sztul E: **The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic.** *J Biol Chem* 2001, **276**:2693-2700.
47. Gillingham AK, Pfeifer AC, Munro S: **CASP, the Alternatively Spliced Product of the Gene Encoding the CCAAT-Displacement Protein Transcription Factor, Is a Golgi Membrane Protein Related to Giantin.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**:3761-3774.
48. Sacher M, Barrowman J, Wang W, Horecka J, Zhang Y, Pypaert M, Ferro-Novick S: **TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport.** *Mol Cell* 2001, **7**:433-442.
49. Whyte JR, Munro S: **Vesicle tethering complexes in membrane traffic.** *J Cell Sci* 2002, **115**:2627-2637.
50. Barr FA, Short B: **Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus.** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**:405-413.
51. Nelson DS, Alvarez C, Gao YS, Garcia-Mata R, Fialkowski E, Sztul E: **The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function.** *J Cell Biol* 1998, **143**:319-331.
52. Kay BK, Williamson MP, Sudol M: **The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains.** *FASEB J* 2000, **14**:231-241.
53. Gao YS, Alvarez C, Nelson DS, Sztul E: **Molecular cloning, characterization, and dynamics of rat formiminotransferase cyclodeaminase, a Golgi-associated 58-kDa protein.** *J Biol Chem* 1998, **273**:33825-33834.
54. Martinu L, Santiago-Walker A, Qi H, Chou MM: **Endocytosis of Epidermal Growth Factor Receptor Regulated by Grb2-mediated Recruitment of the Rab5 GTPase-activating Protein RN-tre.** *J Biol Chem* 2002, **277**:50996-51002.
55. Weide T, Koster M, Barnekow A: **Inactive and active mutants of rab1b are not tightly integrated into target membranes.** *Int J Oncol* 1999, **15**:727-736.
56. Graham FL, van der Eb AJ: **A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.** *Virology* 1973, **52**:456-467.
57. Kay BK, Winter J, McCafferty J: **Phage display of peptides and proteins: A laboratory manual** Edited by: Kay BK, Winter J and McCafferty J. San Diego, CA, Academic Press; 1996.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei ...

... Frau Prof. Dr. A. Barnekow für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas, ihre hervorragende Betreuung sowie die Begutachtung dieser Arbeit und die vielen netten und anregenden Gespräche.

... Herrn Prof. Dr. K.-H. Klempnauer für seine Bereitschaft, als Zweitgutachter tätig zu werden.

... Herrn Prof. Dr. E. Nieschlag, Prof. Dr. J. Gromoll, Frau Dr. V. v. Schönfeldt und Herrn Dipl. Biol. J.-B. Stukenborg sowie zahlreichen Mitarbeitern des Instituts für Reproduktionsmedizin, Universitätsklinikum Münster, für die Bereitstellung des biologischen Materials und für die Möglichkeit, die immunhistochemischen Analysen durchzuführen.

... der Promotionsförderung der WWU Münster für das Promotionsstipendium.

... Herrn Dr. Mark Kail für die angenehme Atmosphäre in der 016, zahlreichen Tipps sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

... Edith Ossendorf und Mecki Rosing für die gute Zusammenarbeit, zahlreichen technischen Tipps, ihrer guten Beratung und ihrer tatkräftigen Unterstützung sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

... allen alten und neuen Kollegen der Abteilung für exp. Tumorbologie für eine schöne und lehrreiche Zeit.

... meinen Eltern und meinen Freunden sowie Nico für ihre Hilfe, die Aufmunterungen und dafür, dass sie da waren.

Lebenslauf

Magdalena Konczal

geboren am 20.12.1975 in Ruda Slaska, Polen

Familienstand: ledig

Name des Vaters: Zdzisław Konczal

Name der Mutter: Johanna Konczal, geb. Kaboth

Schulbildung: Grundschule: 1982-1985: Grundschule Nr. 21 in Hindenburg (Biskupice), Polen
19.02-8.03.1985: Besuch der Gerhard-Hauptmann-Schule; Schule für spätausgesiedelte Kinder und Jugendliche in der Landesstelle Unna-Massen
1985-1986: Besuch der Gemeinschaftsgrundschule im Averbruch in Dinslaken
Gymnasium: 1986-1988: Besuch des Theodor - Heuss – Gymnasiums in Dinslaken
1988-1995: Besuch des Gymnasium Kinderhaus (jetzt: Geschwister - Scholl - Gymnasium) in Münster

Hochschulreife: 13.6.1995 in Münster

Studium: Oktober 1995 – Dezember 2001: **Biologiestudium** an der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster

Prüfungen: Vordiplom im Fach Biologie: 28.5.1998
Diplom im Fach Biologie: 17.12.2001

Beginn der Dissertation: Januar 2002 im Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Abteilung für exp. Tumorbiologie bei Frau Prof. Dr. A. Barnekow

Tätigkeiten: Januar 2002-Dezember 2003: wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung für exp. Tumorbiologie
Januar 2004-Juli 2004: Studentische Hilfskraft im Bereich Data Processing, Covance Laboratories GmbH, Münster

Stipendium: August 2004-Mai 2005: Promotionsförderung der WWU Münster