

# Identifizierung des vertebraten-spezifischen Proteins C7orf43 als neue TRAPPII Komplexuntereinheit

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

Stefanie Nühlen  
aus Lübbecke

Frankfurt am Main 2016

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Volker Dötsch  
Prof. Dr. Stefan Müller

Datum der Disputation:

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>1</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Sekretionswege in Säugerzellen</b>	<b>7</b>
1.1.1 Der pre-Golgi Sekretionsweg	7
1.1.2 ER-Golgi intermediäres Kompartiment (ERGIC) und der Golgi-Apparat	9
1.1.3 Der post-Golgi Sekretionsweg	12
<b>1.2 Makroautophagie</b>	<b>14</b>
<b>1.3 RAB GTPasen und der RAB Zyklus</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Die <i>transport protein particle</i> (TRAPP) Komplexe</b>	<b>19</b>
1.4.1 Die TRAPP Komplexe in Hefe	19
1.4.2 Die TRAPP Komplexe in Säugetieren	21
<b>1.5 Ziel dieser Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>26</b>
2.1.1 Hersteller- und Herkunftsangaben	26
2.1.2 Vektoren, ORF, Primer und Konstrukte	26
2.1.3 Kompetente Bakterienstämme	27
2.1.4 Zelllinien	27
2.1.5 Antikörper	28
2.1.6 siRNS	29
2.1.7 Kits und Standards	29
2.1.8 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.9 Puffer, Lösungen und Gelzusammensetzungen	31
2.1.10 Zellkulturmedien, -zusätze und Transfektionsreagenzien	33
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>34</b>
2.2.1 PCR und Klonierung der Konstrukte	34
2.2.2 Agarosegelelektrophorese	35
2.2.3 Mini- und Maxi-Plasmidpräparation	36
2.2.4 Herstellung des C7orf43 rescue-Plasmids	36
2.2.5 qRealTime-PCR	37
<b>2.3 Zellbiologische Methoden</b>	<b>37</b>
2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
2.3.2 Generierung stabiler Zellen	38
2.3.3 Transient exprimierende Zellen	38
2.3.4 Transient exprimierende Zellen für Kolokalisationsstudien	39

## Inhaltsverzeichnis

2.3.5	Transiente siRNS-Transfektion	39
2.3.6	Immunfluoreszenzfärbung	40
2.3.7	<i>Retention using selective hooks</i> (RUSH)-Assay	40
2.3.8	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> (FRAP)-Assay	41
2.3.9	Elektronenmikroskopie	41
<b>2.4</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>42</b>
2.4.1	Immunpräzipitation	42
2.4.2	Probenvorbereitung SDS-PAGE	42
2.4.3	Native PAGE	43
2.4.4	Immunblot	43
2.4.5	Gelfärbung und -entfärbung	44
<b>2.5</b>	<b>Massenspektrometrische Methoden</b>	<b>44</b>
2.5.1	HA-IP für MS	44
2.5.2	Ingel-Verdau	45
2.5.3	Chromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie-Analysen	46
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
3.1	Identifizierung neuer TRAPP Komplex Interaktionspartner	47
3.2	Konservierung von C7orf43	58
3.3	Validierung von C7orf43 als Kern TRAPP und TRAPP II Interaktor	60
3.4	Zelluläre Lokalisation von C7orf43	63
3.5	Rolle von C7orf43 bei der Stabilität der TRAPP Komplexe	70
3.6	Der Knockdown von C7orf43 fragmentiert ERGIC, Golgi und COPI Vesikel	71
3.7	C7orf43, TRAPPC9 und TRAPPC10 sind im ER zu Golgi Sekretionsweg involviert	79
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>84</b>
4.1	C7orf43 interagiert mit dem Kern TRAPP und TRAPP II Komplex	84
4.2	C7orf43 lokalisiert mit ERGIC, <i>cis</i> -Golgi und COPI Vesikel	85
4.3	C7orf43 ist nicht relevant für die Komplexstabilität	87
4.4	C7orf43 ist ein wichtiger Faktor für den Erhalt des ERGICs, des Golgi-Apparates und der COPI Vesikel	88
4.5	Der TRAPP II Komplex ist in dem Sekretionsweg vom ER zum Golgi involviert	89
4.6	Modell des TRAPP II Komplexes mit C7orf43	92
4.7	Ausblick	94



<b>5. ANHANG</b>	<b>95</b>
5.1 Auflistung der Firmen und Hersteller	95
5.2 Laborgeräte	96
5.3 Primerauflistung	97
5.4 Verwendete Konstrukte	98
5.5 Publikationsliste	99
5.6 Teilnahme an Workshops und Konferenzen	99
<b>6. LITERATUR</b>	<b>100</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>111</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>112</b>
<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>113</b>

## Abkürzungen

### Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Ampere
AA	<i>Acetic Acid</i> , Essigsäure
Abb.	Abbildung
ABC	Ammoniumbicarbonat
Abs	Absorption
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP aktivierende Proteinkinase
ANK	Ankyrin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-ribosylations Faktor
ARAP	<i>Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein</i>
ASAP	<i>Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein</i>
AvePSM	<i>Average peptide spectral match</i> , durchschnittliche Peptid Spektralübereinstimmung
BCA	<i>Bicinchoninacid</i> , Bicinchoninsäure
Bet	<i>blocked early in transport</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub>	Kaliumacetat
Ca	Calcium
CCV	<i>Clathrin-coated vesicles</i>
Ccz	Calcium-Coffein-Zink sensitives Protein
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> , Cyclin abhängige Kinase
cDNS	<i>complementary DNS</i> , komplementäre DNS
cm	Zentimeter
CMV-Promoter	Cytomegalovirus-Promoter
COG	<i>conserved oligomeric Golgi</i> , konserviertes oligomerisches Golgi
COPI	<i>Coat protein complex I</i> , Hüllproteinkomplex I
COPII	<i>Coat protein complex II</i> , Hüllproteinkomplex II
C-terminal	Carboxy-terminal
CV	kondensierende Vakuolen
DENN	<i>differentially expressed in normal and neoplastic cells</i>
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enzymgekoppelte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced GFP</i> , verbessertes GFP
Eppi	Eppendorfreaktionsgefäß
ER	endoplasmatisches Reticulum

## Abkürzungen

ERC	endozytisches recycling Kompartiment
ERES	<i>ER exit site</i>
ERGIC	ER zu Golgi intermediäres Kompartiment
FA	<i>Formic acid</i> , Ameisensäure
FBS	Fötales bovines Serum
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> , Fluoreszenz-wiederherstellung nach Lichtbleichung
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GARP	<i>Golgi-associated retrograde protein</i>
GBF	<i>Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor</i>
GDI	GDP Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLUT	Glukosetransporter
GPI-AP	<i>glycosylphosphatidyl-inositol anchored proteins</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCIP	<i>High confidence candidate interacting proteins</i>
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK-Zelllinie	<i>Human Embryonic Kidney</i> , humane embryonale Nierenzelllinie
HeLa-Zelllinie	Henrietta Lacks Zelllinie
HOPS	<i>Homotypic fusion and vacuole protein sorting</i>
HPS	Hermansky-Pudlak Syndrom
IAA	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
IKBKB	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LC-MS/MS	Chromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCLB	<i>mammalian cell lysis buffer</i> , Säugetierzellen Lysepuffer
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute

## Abkürzungen

mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MnCl	Manganchlorid
Mon	<i>Monensin sensitivity protein</i>
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptoren
mRNS	<i>Messenger RNS</i> , Boten RNS
MS	Massenspektrometrie
MTOC	Mikrotubulie-Organisationszentrum
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTORC	mTOR Komplex
m/v	Masse/Volumen
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
NAG	<i>Neuroblastoma-amplified sequence</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NIBP	<i>NIK- and IKBKB-binding protein</i> = TRAPPC9
NIK	<i>Nck-interacting kinase, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure Agarose
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NP-40	Nonident <sup>TM</sup> P40 substitute
NRZ	Komplex aus NAG, RINT-1 und ZW10
ns	nicht signifikant
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
N-terminal	Amino-terminal
Nyv1p	<i>Vacuolar v-SNARE NYV1</i>
ORF	<i>open reading frame</i> , Offener Leserahmen
p	P value
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAS	pre-autophagosomale Struktur
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGC	<i>post-Golgi carrier</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PM	Plasmamembran
PREB	<i>Prolactin regulatory element-binding protein</i>
PtdIns3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVTC	periphere VTC
Q-SNARE	= t-SNARE, Q = Glutamin
RB1	<i>Retinoblastoma-associated protein</i>
RbCl	Rubidiumchlorid
Rgp	<i>Guanine nucleotide-binding protein</i>

## Abkürzungen

RHO	<i>Ras-like GTP-binding protein Rho</i>
Ric1	<i>RAB6A-GEF complex partner protein 1</i>
RINT	<i>RAD50-interacting protein</i>
RIPA-Puffer	Radio-Immunpräzipitation Assay Puffer
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RUSH	<i>Retention using selective hooks</i> , Loslösung mit Hilfe selektiver Haken
R-SNARE	= v-SNARE, R = Arginin
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SED1/SEDL	Spondyloepiphyseal Dysplasia Tarda
SH3 Domäne	SRC Homologie 3 Domäne
siRNS	<i>small interfering</i> RNS, kleine eingreifende RNS
SMAP	<i>SPARC-related modular calcium-binding protein</i>
SNX	<i>Sorting nexin</i>
SOB-Medium	<i>Super Optimal Broth Medium</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SRC	Sarcoma
StdAb	Standardabweichung
STX5	Syntaxin-5
SQSTM	<i>Sequestosome</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit 1 % Tween20
TCA	Trichloressigsäure
Tca	<i>TRAPP complex-associated</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFB	Transformationspuffer
Tip20	Protein Transport Protein TIP20
TRAPP	<i>transport protein particle</i>
Trs	<i>TRAPP subunit</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton® X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]ether, Polyethylenglycol-tert-octylphenylether
t-SNARE	SNARE der Zielmembran
v-SNARE	SNARE der Vesikelmembran
U	<i>Unit</i> , Einheit
ULK	<i>Unc-51-like kinase</i>
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
USO	<i>General vesicular transport factor p115</i>
V	Volt
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
VPS	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein</i>
VTC	<i>vesicular tubular cluster</i>
v/v	Volumen/Volumen
WD <sup>N</sup>	<i>Normalized Weighted D-score</i>
WIPI4	<i>WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4</i>
w/v	Masse/Volumen Gewicht/Volumen?
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
z. B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Bei den *transport protein particle* (TRAPP) Komplexen handelt es sich um eine Familie von Protein Komplexen, die jeweils aus mehreren Untereinheiten bestehen. Sie sind sowohl in Hefe als auch in Vertebraten an verschiedenen vesikulären Transportwegen beteiligt. In Hefe, wo die TRAPP Komplexe bisher am besten untersucht sind, assoziiert TRAPPI als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) für Ypt1 mit COPII Vesikeln auf dem Weg vom endoplasmatischen Reticulum (ER) zum Golgi-Apparat und besteht aus den Untereinheiten *blocked early in transport 3* (Bet3), Bet5, *TRAPP subunit 20* (Trs20), Trs23, Trs31 und Trs33. Zusätzlich bilden die Komponenten von TRAPPI auch das Grundgerüst von TRAPPII und TRAPPIII. TRAPPII liegt in Hefe als Dimer vor und beinhaltet die zusätzlichen Untereinheiten *TRAPP complex-associated protein 17* (Tca17), Trs65, Trs120 und Trs130. Verbunden ist das Dimer über die Untereinheit Trs65. TRAPPII ist in Hefe mit COPI Vesikeln assoziiert und wird neben dem intra-Golgi Transportweg auch dem *trans*-Golgi und Endosom zu Golgi Transportweg zugeordnet. TRAPPII kann als GEF für Ypt1 oder Ypt31/32 agieren. Zusätzlich zu den für TRAPPI beschriebenen Untereinheiten enthält TRAPPIII das Protein Trs85 und ist als GEF für Ypt1 an der Autophagie und dem Zytosol zu Vakuol Transport beteiligt. Sowohl die Grundstruktur der TRAPP Komplexe als auch die Interaktion von TRAPPII mit den COPI Vesikeln und die Beteiligung von TRAPPIII an der Autophagie sind von der Hefe auf Vertebraten übertragbar. Ebenso wie die TRAPPII-spezifischen Untereinheiten TRAPPC9 (homolog von Trs120) und TRAPPC10 (homolog von Trs130) ist auch das TRAPPIII Mitglied TRAPPC8 (homolog von Trs85) zwischen Hefe und Vertebraten konserviert. Zudem findet sowohl in Hefe als auch in Vertebraten keine Interaktion zwischen TRAPPII und TRAPPIII statt. Allerdings ist das Protein TRAPPC2L (homolog von Tca17) in Hefe spezifisch für TRAPPII, während es in Vertebraten sowohl in TRAPPII und TRAPPIII nachgewiesen wurde. Das in Hefe für die Dimerbildung von TRAPPII essenzielle TRAPPC13 (homolog von Trs65) ist in Vertebraten ein Mitglied von TRAPPIII, der nicht als Dimer vorliegt und zusätzlich noch die Proteine TRAPPC11 und TRAPPC12 enthält, die in Hefe nicht vorkommen. Zudem konnte bislang TRAPPI nicht als eigenständig agierender Komplex in Vertebraten nachgewiesen werden, weshalb dieser in Vertebraten als TRAPP Kern bezeichnet wird. In Säugetierzellen sind noch viele Fragen bezüglich der TRAPP Komplexe unbeantwortet, weshalb eine proteomische Analyse des Interaktoms der TRAPP Untereinheiten zur Identifizierung weiterer, bislang unbekannter Interaktionspartner durchgeführt wurde. Grundlagen dieser Analyse waren die Markierung der TRAPP Proteine mit einem Affinitätstag und deren Expression in Nierensarkoma Zellen. Mit Hilfe des Affinitätstags konnten Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt werden, die

## Zusammenfassung

anschließend massenspektrometrisch analysiert wurden. Im Rahmen dieser Analyse konnte das bisher uncharakterisierte, vertebraten spezifische Protein C7orf43 als neuer TRAPP Interaktor identifiziert werden. Um die spezifische Zuordnung von C7orf43 zum TRAPP Kern und zum TRAPP II Komplex zu verifizieren, wurde mit C7orf43 ebenfalls eine Interaktomanalyse durchgeführt. Die Netzwerkanalyse bestätigte sowohl die Interaktion von C7orf43 mit dem TRAPP Kern als auch mit dem TRAPP II Komplex. Zur weiteren Bestätigung von C7orf43 als Untereinheit des TRAPP Kerns und TRAPP II wurden Immunkomplexe von C7orf43 sowie von Komponenten des TRAPP Kerns und TRAPP II nach ihrer Molekulargröße mittels Native PAGE aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Zusätzlich konnte die Wechselwirkung zwischen C7orf43 und Komponenten vom TRAPP Kern und von TRAPP II auf endogener Ebene nachgewiesen werden. Sowohl TRAPPC9 und TRAPPC10 als auch Mitglieder des Kern TRAPP Komplexes kolokalisieren mit dem ERGIC, dem Golgi-Apparat und COPI Vesikeln. Die Überprüfung der zellulären Lokalisation von C7orf43 zeigte ebenfalls eine Kolokalisation mit dem ERGIC, dem Golgi-Apparat und COPI Vesikeln. Weitere Analysen zeigten, dass C7orf43 keinen Einfluss auf die Stabilität des TRAPP Kerns und TRAPP II hat. Zur Ermittlung der Funktion von C7orf43 wurden die Auswirkungen der Depletion von C7orf43 auf das ERGIC, den Golgi-Apparat und COPI Vesikel überprüft. Sowohl das ERGIC und der Golgi-Apparat als auch COPI Vesikel zeigten ein erheblich fragmentiertes Erscheinungsbild und auch die Regenerationsfähigkeit des Golgi-Apparates über den intra-Golgi Transportweg war beeinträchtigt. Zusätzlich bestätigte eine elektronenmikroskopische Analyse die Fragmentierung des Golgi-Apparates auf ultrastruktureller Ebene. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass C7orf43 - wie die bereits bekannten TRAPP II-Untereinheiten - ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung vom ERGIC und Golgi-Apparat bzw. der Bildung von COPI Vesikel ist. Weiter führte die Depletion von C7orf43, TRAPPC9 und TRAPPC10 zu einer starken Beeinträchtigung des ER zu Golgi Sekretionsweges. Die kleine RAB GTPase RAB1 ist ein wichtiger Bestandteil des ER zu Golgi und auch intra-Golgi Transportweges und interagiert mit einer Vielzahl an Interaktoren und Effektoren. Einer dieser Effektoren ist p115, das sowohl mit COPII und SEC22B als auch COPI Vesikeln und Golgi-relevanten Proteinen wechselwirkt. Die Überprüfung des Einflusses von C7orf43 auf RAB1 und p115 mittels FRAP zeigte ebenfalls, dass es sich bei C7orf43 um einen wichtigen Interaktionspartner handelt. In der vorliegenden Arbeit konnte das Protein C7orf43 als neue potenzielle TRAPP II Untereinheit identifiziert werden, die - wie auch die beiden anderen TRAPP II-spezifischen Komponenten TRAPPC9 und TRAPPC10 - sowohl für die Erhaltung von ERGIC, Golgi-Apparat und COPI Vesikel als für den ER zu Golgi Transportweg benötigt wird.

## 1. Einleitung

### 1.1 Sekretionswege in Säugerzellen

Säugerzellen verfügen über ein komplexes System verschiedener intrazellulärer Kompartimente. An der Etablierung, Aufrechterhaltung und Regulation dieser Kompartimente sind zahlreiche Vesikel, Lipide sowie Proteine und Proteinkomplexe beteiligt (Bonifacino and Glick, 2004; Brocker et al., 2010; Yu and Hughson, 2010). Von entscheidender Bedeutung sind hierbei die Sekretionswege, die sich vom endoplasmatischen Reticulum (ER) zum ER zu Golgi intermediären Kompartiment (ERGIC) über den Golgi-Apparat bis hin zu Endosomen, Autophagosom oder der Plasmamembran erstrecken. An den einzelnen Regulationsschritten sind vor allem Proteine der Klasse der kleinen GTPasen, deren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und GTPase aktivierende Proteine (GAP), Golgine, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor* (SNARE) und die Vesikel COPII, COPI und Clathrin beteiligt (Barrowman et al., 2010; Conibear, 2011; Yu and Hughson, 2010; Yu and Liang, 2012). Diese Sekretionswege können im Wesentlichen in pre-, intra- und post-Golgi Transportwege eingeteilt werden.

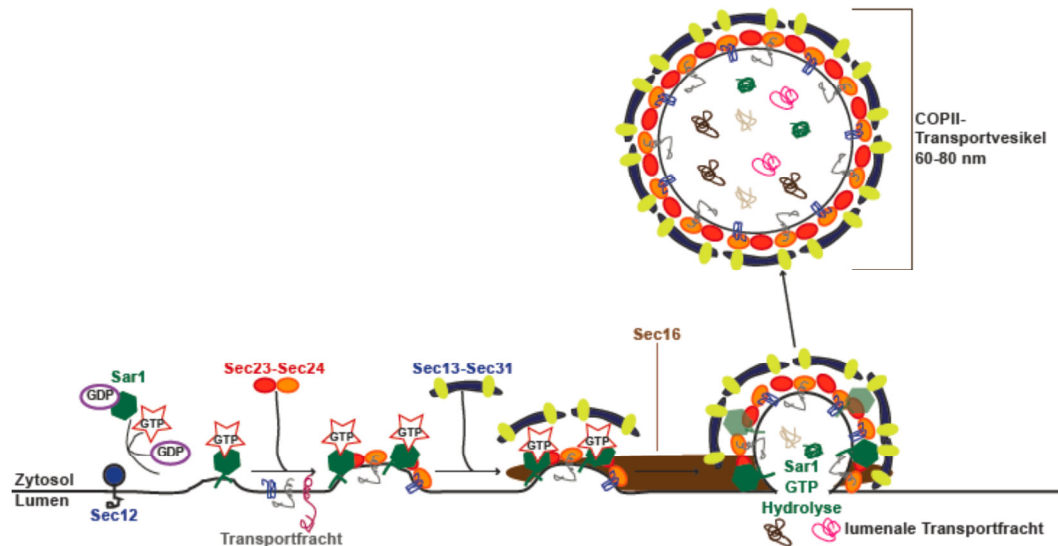
#### 1.1.1 Der pre-Golgi Sekretionsweg

Ungefähr ein Drittel des Proteoms der Säugetiere wird mit Hilfe der Sekretionswege transportiert. Das endoplasmatische Retikulum als Ausgangspunkt des pre-Golgi Transportweges ist der Syntheseort vieler Proteine, beispielsweise mit Organellen oder der Plasmamembran als Ziel. (Cutrona et al., 2013; Scales et al., 1997; Tillmann et al., 2013; Zacharogianni et al., 2014; Zanetti et al., 2012). Nach der Proteinsynthese im rauen endoplasmatischen Reticulum (rER) beginnt der Sekretionsweg dieser Proteine an der ER *exit site* (ERES), an denen COPII Vesikel entstehen, die der Verpackung von Cargo Proteinen dienen (Bharucha et al., 2013; Stinchcombe et al., 1995). Die Entstehung der COPII Vesikel wird durch die kleine GTPase Sar1 initialisiert, die durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Sec12 aktiviert wird. Anschließend rekrutiert Sar1 das Heterodimer Sec24-Sec23 durch die Bindung zu Sec23, wodurch der *pre-budding* Komplex, bestehend aus Sar1-Sec23-Sec24, entsteht. Durch die Interaktion zwischen Sec23 und Sec31 wird anschließend der *pre-budding* Komplex um das Sec13-Sec31 Heterotetramer ergänzt. Die finalen COPII Vesikel sind von einer inneren Proteinhülle, die aus dem Sec23-Sec24 Heterodimer gebildet ist, und aus einer äußeren Proteinhülle, die sich aus dem Sec13-Sec31 Heterotetramer zusammensetzt, umgeben (Bonifacino and Glick, 2004; D'Arcangelo et al., 2013; Tillmann et al., 2013). Ein



## Einleitung

weiterer wichtiger Faktor bei der Entstehung der COPII Vesikel ist das an der ERES lokalisierte Sec16, das mehrere Interaktionen eingehen kann. Es wurde gezeigt, dass Sec16 mit Sec12, Sec23, Sec24, Sec31, Sec13 und Sar1 interagiert und dadurch die GTPase Aktivität von Sar1 reguliert (Barlowe and Miller, 2013; Bharucha et al., 2013; Glick, 2014). Die Entstehung von COPII-Vesikeln ist in Abbildung 1.1 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 1.1: Entstehung von COPII-Vesikeln.** Unterstützt durch Sec12 und dessen GEF Aktivität wird die Bildung der COPII Vesikel durch die Rekrutierung des aktivierten Sar1 eingeleitet. Sar1 interagiert mit Sec23 und rekrutiert so das Heterodimer Sec23-Sec24. Durch Interaktion mit Sec24 wird die zu transportierende Fracht dem *pre-budding* Komplex hinzugefügt. Sec23 wiederum führt durch Interaktion mit Sec13-Sec31 zum Hinzufügen dieses Heterotetramers, wodurch das Vesikel mit der Ausstülpung beginnt. Nachdem das Vesikel mit lumenaler Transportfracht gefüllt wurde, wird durch die Hydrolyse und somit Inaktivierung von Sar1, das COPII Vesikel von der ERES gelöst. Sec16 unterstützt die Bildung des Vesikels. Modifiziert nach (D'Arcangelo et al., 2013).

Die COPII Vesikel können mit Hilfe von weiteren Faktoren miteinander, oder mit dem ERGIC in Säugetieren bzw. dem *cis*-Golgi in Hefe fusionieren (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006; D'Arcangelo et al., 2013; Klumperman, 2011; Szul and Sztul, 2011). Einer der an diesen Prozessen in Hefe beteiligten Faktoren ist der *transport protein particle I* (TRAPPI) Komplex, der durch die Untereinheit Bet3 mit der COPII Untereinheit Sec23 interagiert und sowohl bei der Fusionierung von COPII Vesikeln untereinander als auch bei deren Verschmelzung mit der ERGIC bzw. Golgi Membran beteiligt ist (Cai et al., 2007; Sztul and Lupashin, 2009). In Hefe ist als weiterer Interaktor Grh1 bekannt, ein *Golgi reassembly and stacking protein* (GRASP)-Homolog, das mit Sec24-Sec23 interagiert (Behnia et al., 2007; Glick, 2014; Levi et al., 2010). Darüberhinaus bindet das Golgin Uso1/p115 an COPII und COPI Vesikeln, spielt aber ebenfalls bei der SNARE Komplexbildung eine Rolle (Barlowe and Miller, 2013; Guo and Linstedt, 2013; Wang et al., 2015).

## Einleitung

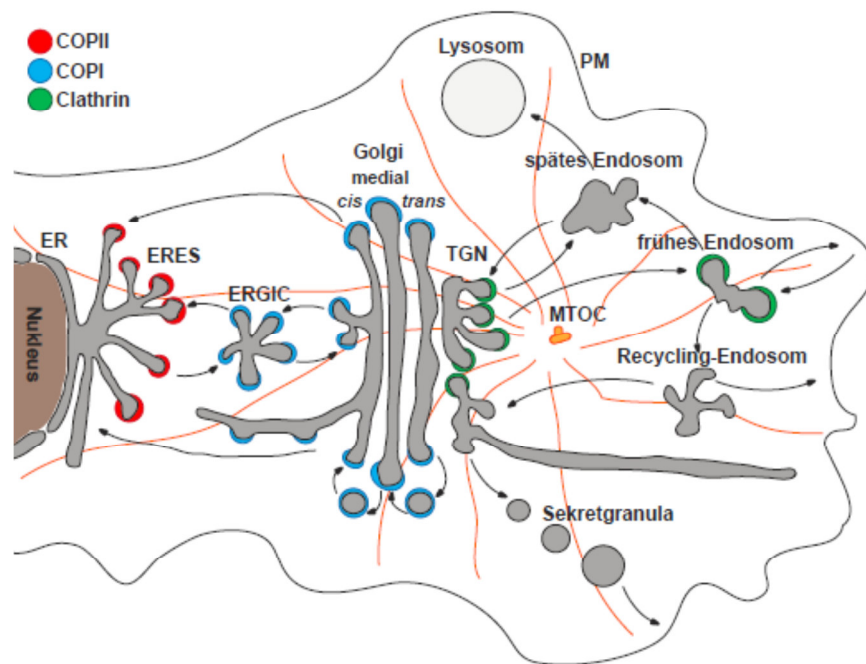
Weitere wichtige Interaktionspartner der COPII Vesikel sind die SNARE Proteine, die auch mit COPI Vesikeln interagieren und im *trans*-Golgi Netzwerk, auf dem post-Golgi Weg und in der Autophagie involviert sind (Chia and Gleeson, 2014; Hong, 2005; Moreau et al., 2015). Zum Beispiel bindet das v-SNARE SEC22B das Heterodimer SEC23-SEC24 und wird dadurch über COPII Vesikel transportiert. Im Komplex mit STX5, BOS1 und BET1 ist SEC22B dagegen am anterograden Transport beteiligt (Jahn et al., 2003; Liu et al., 2004; Mancias and Goldberg, 2007; Mossessova et al., 2003). Innerhalb der SNARE-Proteine wird zwischen den auf der Zielmembran lokalisierten t-SNARE und den v-SNARE auf der Vesikelmembran unterschieden (Enrich et al., 2015; Hay et al., 1997; Hong and Lev, 2014). Bisher sind ungefähr 38 humane SNAREs und in Hefe über 60 SNAREs bekannt (Enrich et al., 2015; Hong and Lev, 2014). Proteine der Gruppe der v-SNARE besitzen in der Regel ein einzelnes SNARE-Motiv am C-Terminus. t-SNARE Proteine bilden Heterodi- bzw. -trimere, die sich aus Mitgliedern der Syntaxin und der SNAP25 Unterfamilie zusammensetzen (Hay et al., 1997; Hong, 2005; Lewis et al., 1997). Neben der Einteilung in t- und v-SNARE werden SNARE-Proteine auch in Q- und R-SNARE eingeordnet. Diese Bezeichnung leitet sich nach der Anordnung einer spezifischen Seitenkette (Glutamin (Q) und Arginin (R)) im Zentrum der SNARE-Domäne ab (Hong, 2005; Zhao et al., 2012). Bei der Fusion von Vesikel- und Zielmembran vermittelt die gezielte Interaktion zwischen t- und v-SNARE die Anreicherung und Fusion des Vesikels mit der Zielmembran. Der hierbei entstehende *trans*-SNARE Komplex, auch SNAREpin genannt, wird nach der Fusion als *cis*-SNARE Komplex in der Zielmembran bezeichnet (Flanagan and Barlowe, 2006; Hong, 2005; Li et al., 2007). Die SNARE Proteine unterliegen einem Zyklus, der aus dem Transport von v- und t-SNARE Proteinen, der Verbindung von Vesikel- und Zielmembran und der Lösung des *cis*-SNARE Komplexes besteht und der durch mehrere weitere Faktoren reguliert wird. Das losgelöste v-SNARE wird mit Hilfe des retrograden Transportwegs zur Donormembran transportiert und dort recycelt, während das t-SNARE in der Zielmembran für weitere Fusionierungen verbleibt (Barszczewski et al., 2008; Hong, 2005; Jahn et al., 2003; Li et al., 2007; Zhao et al., 2012).

### 1.1.2 ER-Golgi intermediäres Kompartiment (ERGIC) und der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat besteht aus scheibenähnlichen, gestapelten Membranen, die Zisternen genannt werden. Sie werden in *cis*-, medial- und *trans*-Golgi unterteilt. Letzterem schließt sich das *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) an. Zusätzlich gehört dem Golgi-Netzwerk in Säugetieren das ERGIC an, das auch *vesicular tubular cluster* (VTC) genannt wird und sich an der *cis*-Golgi Seite befindet (Boncompain and Perez, 2013; Day et al., 2013; Klumperman, 2011). Die Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über das Golgi-Netzwerk. Der Golgi-Apparat ist in räumlicher Nähe

## Einleitung

zum Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), wodurch die Ausrichtung des Golgi-Apparates abhängt. Der Golgi-Apparat stellt einen zentralen Punkt innerhalb des Sekretionsweges dar. Das ERGIC und *cis*-Golgi sind zum einem Ziel des anterograden Transports durch COPII Vesikel und zum anderen Stationen von COPI Vesikel innerhalb des intra-Golgi Sekretionsweges und des retrograden Transports zum ER. Der Golgi-Apparat ist außerdem am post-Golgi Sekretionsweg durch das TGN und Clathrin Vesikel beteiligt (Barlowe and Miller, 2013; Klumperman, 2011; Martinez-Alonso et al., 2013).



**Abb. 1.2: Die intrazellulären Sekretionswege.** Im Mittelpunkt der intrazellulären Sekretionswege steht der Golgi-Apparat. Die Transportwege, gekennzeichnet als Pfeile, werden durch ihre spezifischen Vesikel, COPII in Rot, COPI in Blau und Clathrin Vesikel in Grün durchgeführt. Ausgangspunkt des ER zu Golgi Sekretionsweges sind die ERES, aus denen die COPII Vesikel entstehen und zum ERGIC transportiert werden. Durch anterograden Transport mit Hilfe der COPI Vesikel wird der Sekretionsweg ausgehend vom ERGIC zum Golgi-Apparat fortgesetzt und innerhalb des Golgi-Apparates ebenfalls von den COPI Vesikeln vermittelt. Die COPI Vesikel vermitteln zudem den retrograden Weg vom *cis*-Golgi zum ERGIC bzw. von ERGIC und *cis*-Golgi zum ER. Ausgehend vom TGN werden die Transportwege schließlich mit Hilfe der Clathrin Vesikel fortgesetzt und die transportierte Fracht zur Plasmamembran (PM), den frühen oder späten Endosomen, Recycling-Endosomen oder Sekretgranula gebracht. MTOC: Mikrotubuli-Organisationszentrum. Modifiziert nach (Szul and Sztul, 2011).

Das ERGIC, auch zentrale VTC genannt, besteht aus vesikulären Mikrotubuli Clustern, liegt in der Nähe des *cis*-Golgi und wird als eigenständiges Kompartiment bezeichnet. Darüberhinaus existieren mehrere periphere VTCs (pVTCs), die sowohl mit dem zentralen als auch untereinander verbunden sein können. Neben seiner Fusionierung mit den COPII Vesikeln interagiert das ERGIC auch mit den COPI Vesikeln, die den retrograden Transport vom ERGIC

## Einleitung

und *cis*-Golgi zum ER vermitteln. Teile des ERGICs sind jedoch auch in der Lage sich direkt mit dem *cis*-Golgi zu verbinden (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006; Klumperman, 2011; Tisdale et al., 1997). Die Anzahl der Golgi Zisternen variiert je nach Zelltyp in Säugetieren zwischen vier und elf Stapeln (Klumperman, 2011; Nakamura et al., 2012). Der Golgi-Apparat spielt eine entscheidende Rolle bei der Glykosylierung und weiteren postrationalen Modifikationen (PTM) von Proteinen wie z. B. Sulfatierung und Phosphorylierung.

Die Aufrechterhaltung der Golgi Architektur erfordert die Beteiligung der GRASP Proteine, die zu den Golginen gezählt werden. Zum Beispiel wurde für die beiden Proteine GRASP65, hauptsächlich *cis*-Golgi, und GRASP55, medial- und *trans*-Golgi, eine wichtige Funktion bei der Bildung und Aufrechterhaltung von tubulären Verbindungen innerhalb des Golgi-Apparates gezeigt (Jarvela and Linstedt, 2014; Lee et al., 2014; Tang et al., 2015). Der Begriff Golgin ist nicht genau festgelegt. In der Regel beschreibt dieser ein coiled-coil Protein, das direkt in der Golgi Membran verankert oder durch seine Bindung zu einer kleinen GTPase mit der Membran verbunden ist und wichtige Funktionen bei Membranfusion oder der strukturellen Instandhaltung des Golgi-Apparates übernimmt. Golgine sind am *cis*-Golgi und *trans*-Golgi sowie an den äußeren Enden der Golgi Stapel zu finden (Barr and Short, 2003; Munro, 2011; Wong and Munro, 2014). In der Regel sind Golgine wichtig für die Erhaltung und Bildung der Golgi Struktur, sie binden und verbinden angrenzende Membranen sowohl beim Vesikeltransport als auch bei der Golgi Stapelentstehung. Zu den Golginen gehören unter anderem GM130, GRASP55, GRASP65, Giantin, p115 oder auch Golgin-84 (Barr and Short, 2003). GM130 bildet zusammen mit GRASP65, p115 und Giantin einen Komplex, der an COPI Vesikel bindet (Puthenveedu and Linstedt, 2001). Zudem kann Giantin auf COPI Vesikeln nachgewiesen werden (Beard et al., 2005; Shorter et al., 2002; Sonnichsen et al., 1998). Giantin und GM130 binden beide unter bestimmten Bedingungen an p115. Daher ist die Vermutung, dass p115 durch diese Bindungen COPI Vesikel mit dem *cis*-Golgi zusammenführt (Beard et al., 2005; Linstedt et al., 2000; Puthenveedu and Linstedt, 2001). Darüberhinaus geht GM130 weitere Interaktionen ein, die unter anderem wichtig für die Neuorientierung des Golgi-Apparates sind (Farhan and Rabouille, 2011).

Eine bedeutende Rolle beim antero- und retrograden inneren Golgi Sekretionsweg nehmen die COPI Vesikel ein, die auch für den retrograden Weg von ERGIC und *cis*-Golgi zum ER eingesetzt werden. Die COPI Vesikel bestehen aus dem Trimer  $\alpha$ -,  $\beta'$ - und  $\epsilon$ -COP und dem Tetramer  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ - und  $\beta$ -COP. Das COPI Trimer enthält ähnliche Strukturmodule wie die COPII Untereinheiten Sec13 und Sec31 und bildet die äußere Schicht. Zudem weist die  $\gamma$ -COP Untereinheit Ähnlichkeiten zu Bestandteilen der inneren Schicht der Clathrin Vesikel auf, weshalb das Tetramer ebenfalls zum inneren Teil des COPI Vesikels gezählt wird (Brandizzi and Barlowe,

## Einleitung

2013; Kartberg et al., 2005; Klumperman, 2011; Szul and Sztul, 2011). Obwohl sich COPI Vesikel auch in der zentralen Region der Zisternen bilden können, entstehen die meisten an den Rändern der Zisternen. Die *cis*-Stapel weisen zudem die höchste Anzahl an COPI Vesikeln auf, jedoch können sie im gesamten Golgi-Apparat und auch im TGN nachgewiesen werden (Brandizzi and Barlowe, 2013; Klumperman, 2011). Es existieren verschiedene isoformbedingte Untergruppen innerhalb der COPI Vesikel mit unterschiedlicher Verteilung innerhalb des Golgi-Apparates, weshalb spekuliert wird, dass die unterschiedlichen COPI Vesikel an verschiedenen Transportwegen beteiligt sind (Papanikou and Glick, 2014; Szul and Sztul, 2011). Die Entstehung der Untergruppen beruht möglicherweise auf der Verwendung von spezifischen GTPasen, die die Bildung der COPI Vesikel starten.

Die ARF GTPasen werden in drei Gruppen eingeteilt, wobei Klasse I (ARF1, 2, 3) und Klasse II (ARF4, 5) dem Sekretionsweg und Klasse III (ARF6) der Endozytose und Aktindynamik zugeordnet werden. Die ARF GTPasen unterliegen ebenfalls wie die RAB GTPasen einem Aktivierungszyklus. Speziell bei der Entstehung und Membranrekrutierung der COPI Vesikel ist als ARF GEF GBF1 beteiligt, das wahrscheinlich durch RAB1B zur Membran geleitet wird. GBF1 kann ARF1, 4 und 5 aktivieren. Es können mehrere ARF GAPs (ARFGAP1-3, ASAP2 und 1, SMAP2) innerhalb der Zyklen beteiligt sein, was ebenfalls auf die isoformbedingten Untereinheiten zurückzuführen sein kann (Kawamoto et al., 2002; Szul and Sztul, 2011). Der Transport der COPI Vesikel wird von verschiedenen Proteinen (SNARE und Golgin) und Komplexen unterstützt. Beim retrograden Transport zum ER sind in Hefe der Komplex Dsl1 (Dsl1, 3 und Tip20) und die SNAREs Ufe1, Use1 und Sec20 beteiligt (Hsia and Hoelz, 2010; Szul and Sztul, 2011). In Säugetierzellen ist der Dsl1-ähnliche Komplex NRZ bestehend aus NAG, RINT-1 und ZW10, der mit den SNAREs Syntaxin-18, BNIP1 und p31 interagiert, beteiligt (Hirose et al., 2004; Sztul and Lupashin, 2009; Szul and Sztul, 2011). Der Komplex NRZ hat zudem Anteil an der Autophagie (Tagaya et al., 2014).

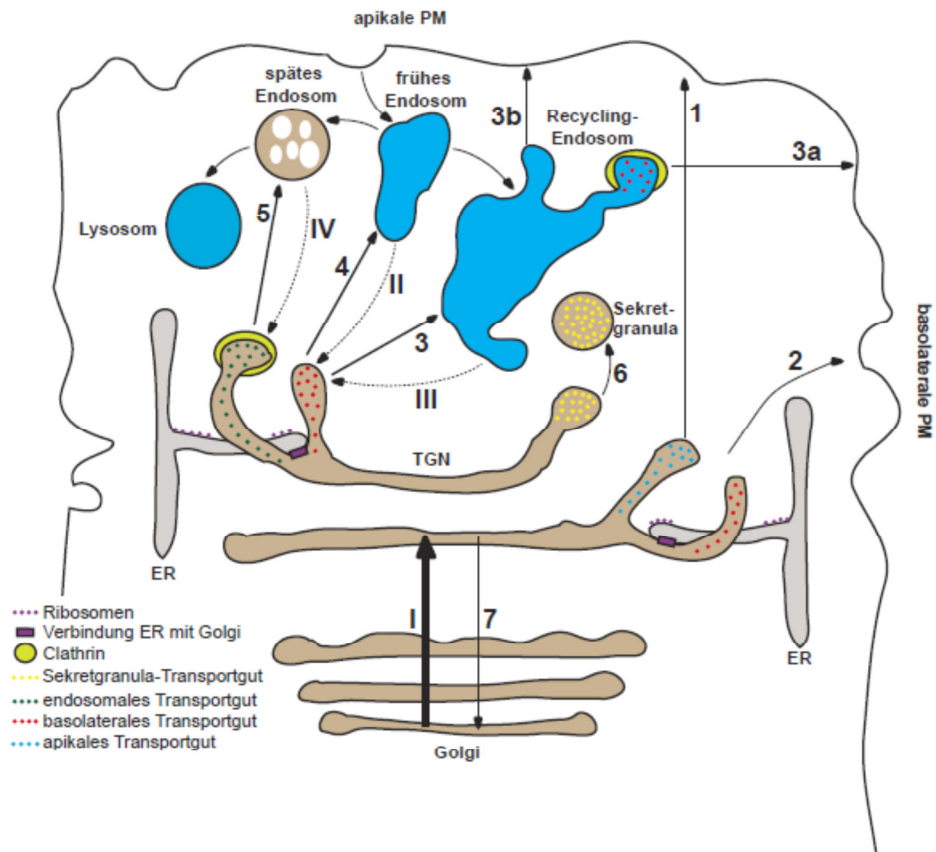
### **1.1.3 Der post-Golgi Sekretionsweg**

Ausgangspunkt der post-Golgi Sekretionswege ist das TGN. Zielorte sind unter anderem sowohl die apikale und basolaterale Plasmamembran als auch das endosomale Kompartiment. Das TGN unterliegt aufgrund der vielen Transportwege und verschiedener Transporter einem raffinierten Sortierungssystem (Guo et al., 2014; Keller and Simons, 1997; Klumperman, 2011; Luini et al., 2008). Obwohl sich auch COPI Vesikel im TGN nachweisen lassen, werden für die meisten post-Golgi Sekretionsprozesse Clathrin Vesikel (Klumperman, 2011) oder in manchen Fällen auch Lipide verwendet (Graham and Burd, 2011; Papanikou and Glick, 2014; Surma et al., 2012). Die Bildung der Clathrin ummantelten Vesikel unterliegt einem stark regulierten und

## Einleitung

komplexen Prozess. Die Clathrin umhüllten Transportvesikel bestehen neben Clathrin aus verschiedenen Adapterproteinen und interagieren mit einer Vielzahl verschiedener Proteine wie beispielsweise zahlreichen SNAREs sowie Untereinheiten des BLOC-1 und des Retromer Komplexes (Blondeau et al., 2004; Borner et al., 2006; Wu, 2012). Mit Hilfe von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren transportieren Clathrin Vesikel zum Beispiel lysosomale, mit Mannose-6-Phosphat markierte Enzyme zu den Endosomen. Anschließend kehren die Clathrin Vesikel zurück zum TGN und können den Kreislauf von Neuen beginnen (Arighi et al., 2004; Guo et al., 2014; Klumperman, 2011; Robinson, 2015). Zusätzlich sind an den post-Golgi Sekretionswegen zahlreiche weitere Clathrin Interaktoren, wie zum Beispiel SNAREs, RAB GTPasen und deren RAB GEFs und RAB GAPs, beteiligt.

Auch verschiedene Komplexe wie der *Golgi-associated retrograde protein* (GARP)-Komplex und das Retromer, aber auch Transporter wie zum Beispiel GLUT4, *sorting nexins* und sogenannte *post-Golgi carrier* (PGC) sind involviert (Gordon et al., 2009; Hirata et al., 2015; Lu and Hong, 2014; Luini et al., 2008; Mallard et al., 2002; Roquemore and Banting, 1998). PGCs entstehen in bestimmten Membranbereichen des Golgi-Apparates, die keine Golgi spezifischen Enzyme aufweisen, sind größer als Clathrin-Vesikel und unterliegen ebenfalls einem Kreislauf (Luini et al., 2008). Der GARP-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten, ist lokalisiert im TGN und involviert im retrograden Transport vom Endosom zum TGN (Day et al., 2013; Hirata et al., 2015; Lu and Hong, 2014). Das Retromer, ein hetero-pentamerischer Komplex, ist hauptsächlich im frühen und späten Endosom lokalisiert, wo es auch essenziell für den Rücktransportweg zum TGN ist. Es hat zwei Unterkomplexe, bestehend aus Vps26, 29 und 35 und dem membranassoziierten Dimer SNX. Eine Interaktion zwischen Clathrin und Retromer wird derzeit kontrovers diskutiert (Chia et al., 2013; Lu and Hong, 2014). Die Abbildung 1.3 zeigt einen Überblick über den post-Golgi Sekretionsweg.



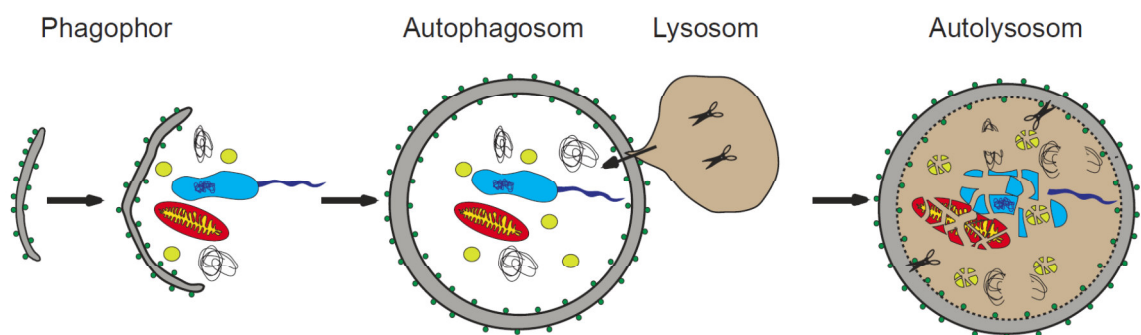
**Abb. 1.3: Das trans-Golgi Netzwerk (TGN).** Das tubuläre Netzwerk entsteht ausgehend von der letzten trans-Golgi Zisterne. I) Es sortiert neu synthetisierte Proteine, die es von früheren Golgi Kompartimenten erreichen, zu verschiedenen Zielpunkten (1–5). II–IV) Zudem ist es Ziel des endozytotischen Transportweges und leitet die Komponenten zu den früheren Golgi Kompartimenten weiter (7). Die Exitrouten des TGN haben als Ziel: 1) die apikale PM, 2) die basolaterale PM, 3) das Recycling-Endosom, 4) das frühe Endosom, 5) das späte Endosom und 6) spezialisierte Kompartimente wie die Sekretgranula. Modifiziert nach (De Matteis and Luini, 2008).

## 1.2 Makroautophagie

Autophagie lässt sich in Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperone vermittelte Autophagie aufteilen. Im weiteren Verlauf wird hier Autophagie als Synonym für Makroautophagie verwendet. Ein wichtiges Merkmal der Autophagie ist das Autophagosom, bei dem es sich um ein Doppelmembranvesikel handelt, das autophagosomale Abbaukomponenten beinhaltet. Ursprünglich als ungerichteter Prozess beschrieben, gilt es mittlerweile als gesichert, dass Autophagie ein selektiver Vorgang ist, durch den unter anderem fehlgefaltete und aggregierte Proteine, überzählige und defekte Organellen so wie zytoplasmatische Bakterien gezielt entfernt werden können (Behrends and Fulda, 2012; Behrends et al., 2010; Boya et al., 2013; Chen and Klionsky, 2011; Stolz et al., 2014). Die Entstehung der Doppelmembran ist derzeit nicht bis ins letzte Detail verstanden. Als mögliche Entstehungsorte werden spezielle Bereiche des ERs, ERES, die Plasmamembran und auch die

## Einleitung

äußere Mitochondrienmembran diskutiert (Abounit et al., 2012; Amaya et al., 2015; Tooze and Yoshimori, 2010). Nach Initiierung der Autophagie bildet sich eine Doppelmembranstruktur, die Phagophor oder auch Isolationsmembran genannt wird. Die Vorstufe des Phagophors wird in Hefe pre-autophagosomale Struktur (PAS) und in Säugerzellen Omegasom genannt. Das sich ausdehnende Phagophor umhüllt anschließend das zu verdauende Objekt und mit dem Schließen der Doppelmembran ist das Autophagosom gebildet. Durch Verbindung mit dem Lysosom entsteht das Autolysosom, in dem das zuvor aufgenommene zytosolische Material abgebaut wird (Abounit et al., 2012; Amaya et al., 2015; Khaminets et al., 2015). Der Ablauf der Autophagie ist in Abbildung 1.4 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 1.4: Autophagie.** Nach der Bildung des Phagophors wird das abzubauen Material durch Expansion umschlossen. Nach der vollständigen Umschließung des Materials und Verschließen der Membran hat sich das Autophagosom gebildet. Durch die Fusionierung mit dem späten Endosom und dem Lysosom entsteht das Autolysosom, in dem das umschlossene Material durch lysosomale Hydrolasen in seine Bestandteile zersetzt wird. Modifiziert nach (Khaminets et al., 2015).

Autophagie wird im Wesentlichen durch die Familie der **Autophagie** (Atg) Proteine reguliert. In Hefe existieren mehr als 30 Atg Proteine und ein Großteil dieser Proteine ist auch in Säugern konserviert (Cho and Kwon, 2010; Khaminets et al., 2015). Für die Autophagosombildung in Hefe ist eine Kernmaschinerie aus hauptsächlich vier Hauptgruppen entscheidend. I) Der Atg1-Atg13-Atg17 Kinasekomplex, II) der Klasse III Phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) Komplex I (bestehend aus Vps34, Vps15, Atg6 und Atg14), III) Atg12 und Atg8 als Mitglieder des Ubiquitin-ähnlichen Proteinkonjugationssystems und IIII) Atg9 mit seinem Zyklussystem (Xie and Klionsky, 2007; Yang and Klionsky, 2010). Da die an der Autophagie beteiligten Proteine eine Vielzahl von Interaktionen eingehen und einer intensiven Regulierung durch PTMs unterliegen, zeigt sich der Gesamtprozess der Autophagie als ein komplexes Netzwerk aus Interaktoren und Regulatoren (Behrends et al., 2010; Cuervo and Macian, 2014). Die Proteinkinase Atg1, in Säugetieren ULK1 und ULK2, als Beispiel ist ein wichtiger Faktor bei der Initiierung der Autophagie. Atg1 unterliegt Phosphorylierungen durch verschiedene Kinasen



## Einleitung

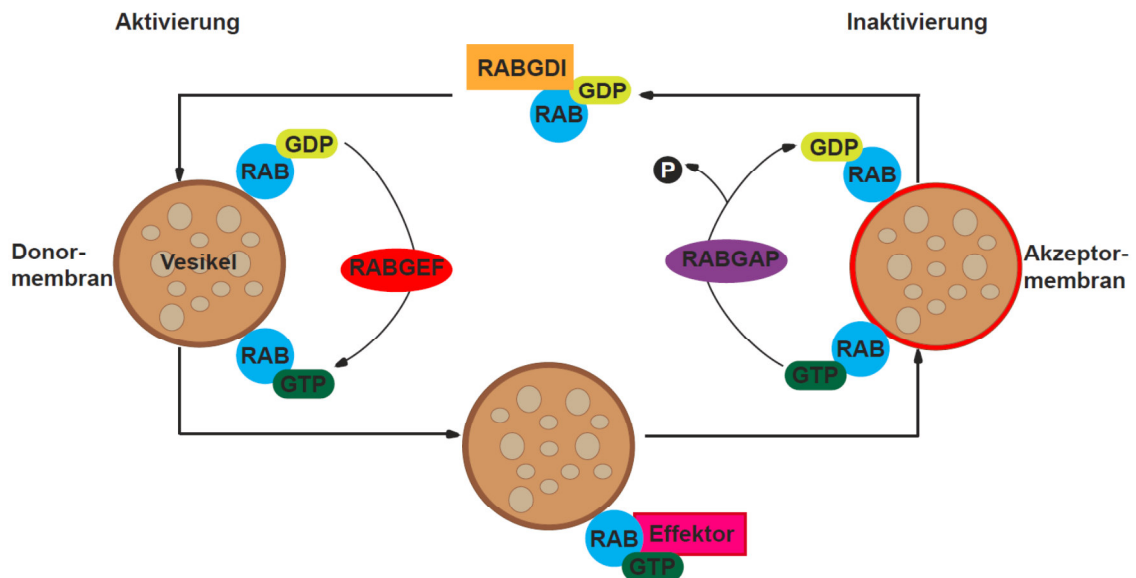
wie AMPK, CDK5 und MAPK14/p38, die wiederum durch weitere Faktoren wie zum Beispiel Nährstoffmangel kontrolliert werden. Der ULK1-AMPK Komplex wird durch MTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) reguliert, wodurch wiederum ATG9 als auch weitere Faktoren zur Initiierung der Autophagie beeinflusst werden (Alers et al., 2012; Boya et al., 2013; Mack et al., 2012; Reggiori et al., 2004). Das Transmembranprotein ATG9 ist durch Interaktion mit ULK1/2 höchstwahrscheinlich ebenfalls an der Entstehung der Autophagie und eventuell auch an der Bildung der PAS und des Phagophors beteiligt (Boya et al., 2013; Mack et al., 2012). ATG9 geht jedoch weitere Interaktionen mit WIPI4 und ATG2 ein, kolokalisiert teilweise mit dem *trans*-Golgi und ist auch im post-Golgi Sekretionsweg involviert (Webber et al., 2007). Ebenfalls an der Autophagie beteiligt sind in Hefe der TRAPP II und TRAPP III Komplex (Meiling-Wesse et al., 2005; Nazarko et al., 2005; Zou et al., 2013; Zou et al., 2015). Für den TRAPP III Komplex konnte in Hefe eine Interaktion zwischen Ypt1, Atg11 und der TRAPP III Untereinheit Trs85 festgestellt werden (Lipatova et al., 2012) und eine Involvierung in der ER vermittelten Autophagie (ER-Phagie) gezeigt werden (Taussig et al., 2014). Zu dem gibt es Hinweise für eine Beteiligung des TRAPP III Komplexes in der Autophagie in Säugetierzellen (Behrends et al., 2010; Wang et al., 2013). Auch für den TRAPP II Komplex konnte eine Beteiligung in der Autophagie in Hefe durch Trs130 nachgewiesen werden (Zou et al., 2013). Untereinheiten des COPII Vesikels konnten ebenfalls als relevant für Autophagie identifiziert werden (Ishihara et al., 2001; Tan et al., 2013).

### 1.3 RAB GTPasen und der RAB Zyklus

RAB (*ras-related GTP-binding*) GTPasen gehören zur Ras Superfamilie monomerer G-Proteine, innerhalb derer sie die größte Proteinfamilie darstellen (Frasa et al., 2012; Hutagalung and Novick, 2011; Kelly et al., 2012), und unverzichtbare Rollen bei der Entstehung von Vesikeln, deren Transport und den finalen Schritten an der Akzeptormembran einnehmen. Alle RABs unterliegen einem regulativen Zyklus, der von *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) und *GTPase activating proteins* (GAPs) kontrolliert wird (Baschieri and Farhan, 2012; Delprato, 2012; Kelly et al., 2012). Dabei werden membrangebundene RAB GTPasen mit Hilfe spezifischer GEFs aktiviert. Hierbei tauscht das GEF das gebundene Guanindiphosphat (GDP) durch intrazelluläres Guanintriphosphat (GTP) aus, wodurch RAB GTPasen eine Konformationsänderung machen. Dieses führt zur Bindung spezifischer Effektoren. Spezifische GAPs stimulieren die GTPase Aktivität der RAB GTPasen, wodurch das GTP zu GDP hydrolysiert und die RAB GTPasen wieder inaktiviert werden. Die GTPasen dissoziieren anschließend mit spezifischen *GDP dissociation inhibitors* (RAB GDIs) von der Membran, um

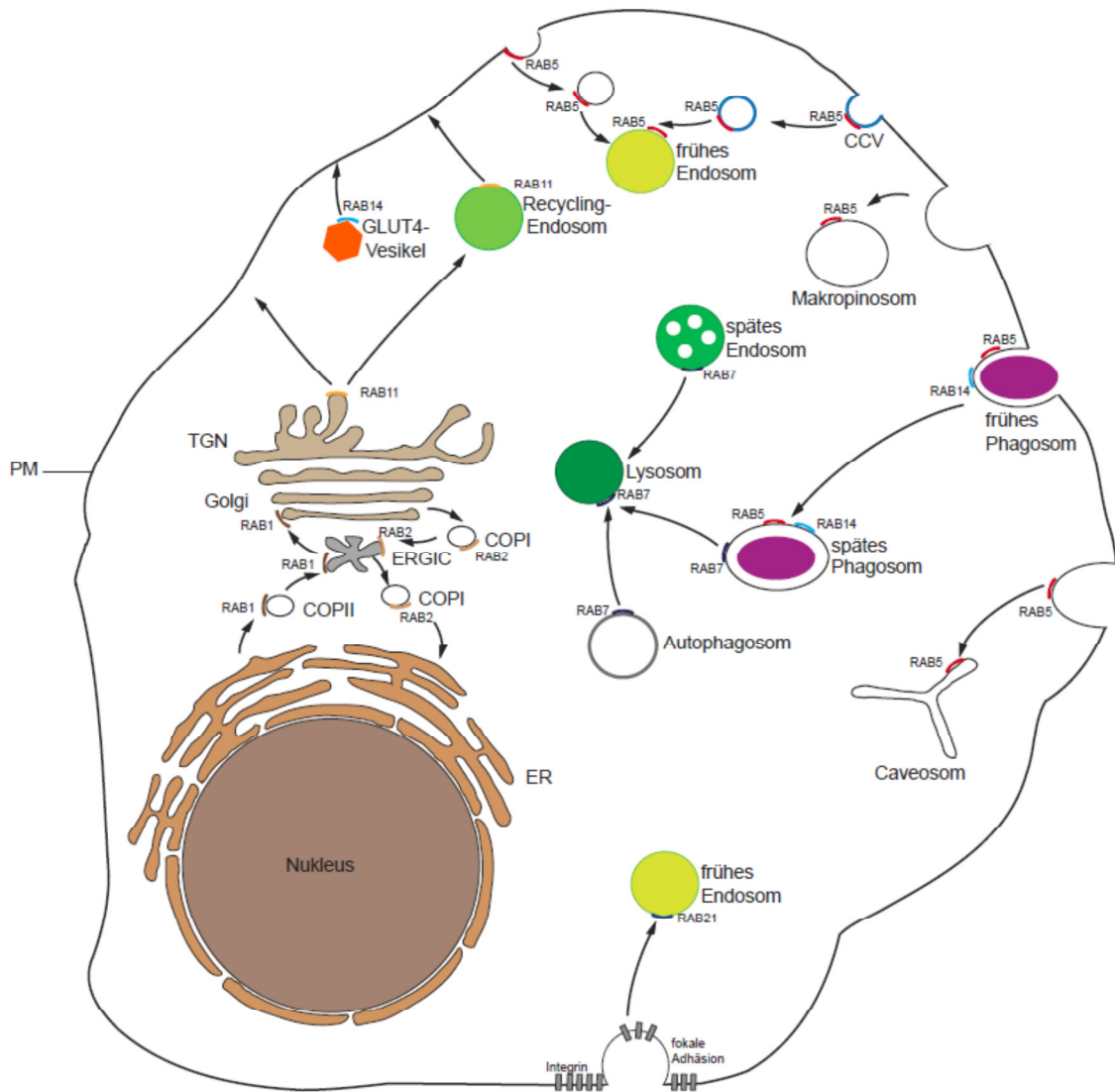
## Einleitung

einen neuen Zyklus starten zu können (Cabrera and Ungermann, 2013; Dumas et al., 1999; Frasa et al., 2012; Hutagalung and Novick, 2011; Kelly et al., 2012) (Abbildung 1.5).



**Abb. 1.5: Der RAB Zyklus.** Das inaktivierte RAB (RAB-GDP) wird mit Hilfe des RAB-spezifischen GDP-Dissoziationsinhibitors (GDI) und weiteren Faktoren zur Donormembran geleitet, mit der es sich verbindet. Ein RAB-spezifischer *guanine nucleotide exchange factor* (GEF) fördert den Austausch des gebundenen GDP zu GTP, wodurch das aktivierte RAB mit Hilfe weiterer Effektoren zur Akzeptormembran geleitet wird, mit der es sich verbindet. RAB-spezifische *GTPase activating proteins* (GAP) stimulieren die GTP Hydrolyse, wodurch das RAB inaktiviert wird. Das inaktivierte RAB (RAB-GDP) wird anschließend wiederum mit Hilfe des GDI und weiteren Faktoren zur Donormembran geleitet, mit der es sich verbindet und der Zyklus von Neuem beginnt. Modifiziert nach (Frasa et al., 2012).

RAB GEFs lassen sich hauptsächlich in vier Klassen einordnen: Proteine mit Vps9- und DENN-Domänen sowie Sec2 und die TRAPP Komplexe (Barr and Lambright, 2010; Cherfils and Zeghouf, 2013). Zudem wurden in Hefe die beiden Dimere Ric1–Rgp1 als RAB GEF für Ypt6 und Mon1–Ccz1 als RAB GEF für Ypt7 identifiziert (Barr and Lambright, 2010; Cabrera et al., 2014; Cherfils and Zeghouf, 2013). RAB GAP Proteine zeichnen sich durch die charakteristische TBC (Tre2/Bub2/Cdc16) Domäne aus. Innerhalb dieser Domäne befinden sich in der Mehrzahl der Fälle jeweils ein Arginin und ein Glutamin, die für die Stimulation der GTP Hydrolyse essenziell sind (Barr and Lambright, 2010; Longatti et al., 2012; Pan et al., 2006). Die Abbildung 1.6 ermöglicht einen Überblick über ausgewählte RAB GTPasen und ihren Einsatzort in Säugerzellen.



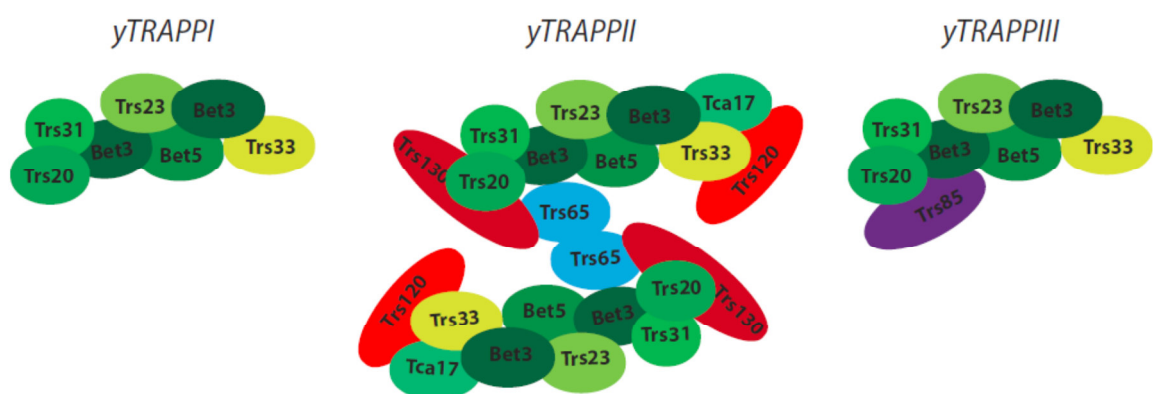
**Abb. 1.6: Funktion und Lokalisation ausgewählter RAB GTPasen.** RAB1: ER und ERGIC, ER zu Golgi Transport; RAB2: ERGIC, evtl. Golgi zu ER-Transport; RAB14: GLUT4 Vesikeltranslokation; RAB5: frühes Endosom, Phagosom, Caveosom, PM, unterstützt Endozytose und Fusionierung des Endosoms mit CCV, Makropinozytose; RAB5 und 14: Entstehung des frühen Phagosoms; RAB21: Integrin-Endozytose; RAB11: unterstützt die langsame endozytotische Wiederverwertung durch das Recycling-Endosom; RAB7: unterstützt die Entstehung des späten Endosoms und Phagosoms sowie deren Verbindung mit dem Lysosom; CCV: Clathrin-coated vesicles. Modifiziert nach (Hutagalung and Novick, 2011; Moyer et al., 2001; Parmar and Duncan, 2016; Stenmark, 2009; Tisdale, 1999; Tisdale and Jackson, 1998).

## 1.4 Die *transport protein particle* (TRAPP) Komplexe

Bei den *transport protein particle* (TRAPP) Komplexen handelt es sich um *multisubunit tethering complexes* (MTCs). Die TRAPP Komplexe spielen eine wichtige Rolle in dem ER zu Golgi Sekretionsweg, bei den Transportschritten innerhalb des Golgi-Apparates und auch bei den post-Golgi Sekretionswegen zum Endosom und zur Plasmamembran so wie innerhalb der Autophagie. Sie sind größtenteils in niederen Organismen wie den Hefe als auch in den unterschiedlichen Klassen der Vertebraten konserviert. Die TRAPP Komplexe konnten als RAB GEF bisher für RAB1 und RAB11 nachgewiesen werden (Barrowman et al., 2010; Brunet and Sacher, 2014; Cox et al., 2007; Jones et al., 2000; Yu and Hughson, 2010).

### 1.4.1 Die TRAPP Komplexe in Hefe

In Hefe wurden bislang drei unterschiedliche TRAPP Komplexe identifiziert, die in der Abbildung 1.7 präsentiert werden. Der TRAPPI Komplex besteht aus den Untereinheiten *blocked early in transport 3* (Bet3), Bet5, *TRAPP subunit 20* (Trs20), Trs23, Trs31 und Trs33 und ist als Kernkomplex auch in den TRAPPII und TRAPPIII Komplexen zu finden. Die Mitglieder des TRAPPI Komplexes werden in die Gruppe der Bet3 Familie mit Bet3, Trs31 und Trs33 und die Gruppe der Sedlin Familie mit Bet5, Trs20 und Trs23 eingeteilt (Sacher et al., 2008; Scrivens et al., 2009). Der TRAPPII Komplex wird in Hefe durch die Untereinheiten *TRAPP complex-associated protein 17* (Tca17), Trs65, Trs120 und Trs130 ergänzt und liegt als Dimer vor. Dem TRAPPIII Komplex ist das Protein Trs85 hinzugefügt (Choi et al., 2011; Lynch-Day et al., 2010; Rossi et al., 1995; Sacher et al., 2000; Sacher et al., 1998; Sacher et al., 2008).



**Abb. 1.7: Zusammensetzung der TRAPP Komplexe in Hefe.** Modifiziert nach (Barrowman et al., 2010; Bassik et al., 2013; Brunet and Sacher, 2014; Yu and Liang, 2012).

## Einleitung

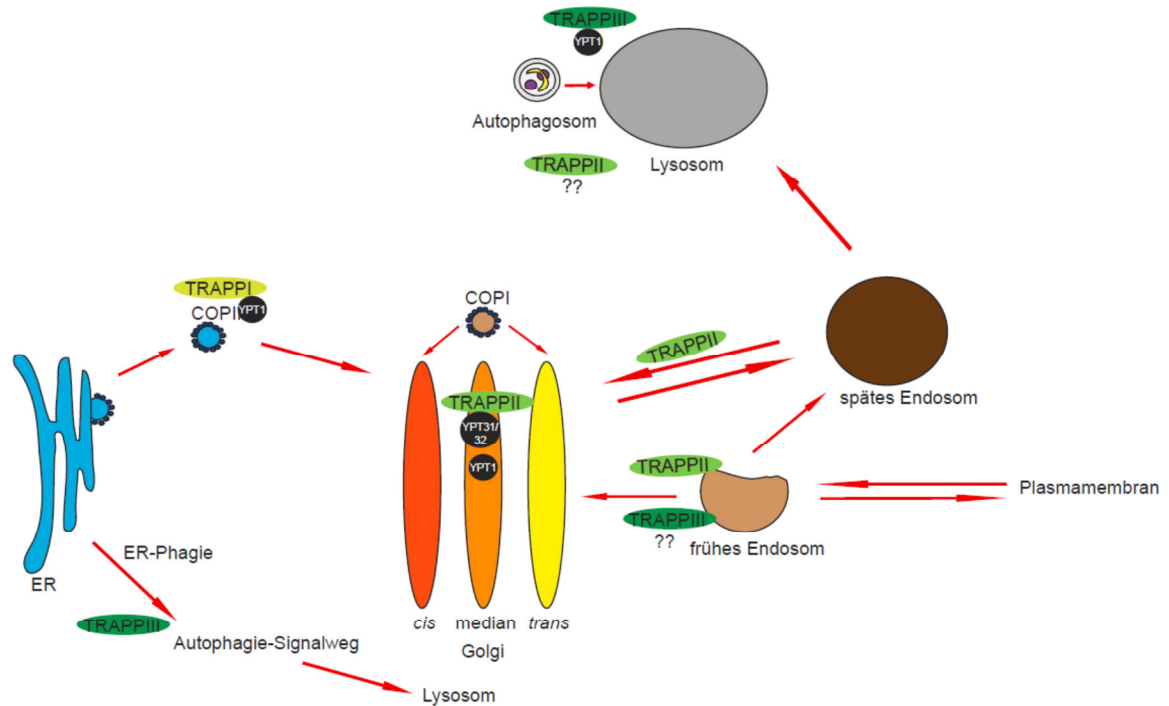
Der TRAPPI Komplex spielt eine wichtige Rolle auf dem Sekretionsweg vom ER zum Golgi und interagiert mit COPII Vesikeln (Lord et al., 2011). Eine Schlüsselrolle nimmt die Untereinheit Bet3 ein, da sie an die Vesikel Untereinheit Sec23 bindet. Es wird vermutet, dass hierdurch die Bindung zu einem weiteren COPII Vesikel oder zur Golgi Membran eingeleitet wird (Cai et al., 2007; Cai et al., 2008). Interessanterweise tragen mehrere Untereinheiten, im besonderen Bet5, Trs23, Trs31 und Bet3, zur katalytische GEF Aktivität des TRAPPI Komplex für Ypt1 bei. Dabei sind zum Beispiel Bet5, Trs23 und Bet3 essenziell für die Bindung von Ypt1, während Bet5 entscheidend für den Aufbau des GEF Kerns ist und Trs31 sowie Bet3 wichtig für die Konformation von Trs23 sind (Barrowman et al., 2010; Brunet and Sacher, 2014; Cai et al., 2008).

Es wurde gezeigt, dass Bet3 in der Autophagie aufgrund dessen Beteiligung an der GEF Aktivität benötigt wird (Zou et al., 2015). Für Trs20 konnte in Hefe gezeigt werden, dass es aufgrund einer Longin-Domäne möglicherweise eine Rolle als Adapterprotein für multiple Protein-Protein-Interaktionen spielt (Mahfouz et al., 2012). Darüberhinaus wurde festgestellt, dass auch der in der Autophagie und ER-Phagie involvierte TRAPPIII Komplex ein GEF für Ypt1 ist (Lipatova and Segev, 2014; Lipatova et al., 2013; Lynch-Day et al., 2010; Meiling-Wesse et al., 2005) und die zusätzliche Untereinheit Trs85 durch Trs20 an den Komplex gebunden wird (Taussig et al., 2014). Demnach spielt neben Bet3 auch Trs85 eine entscheidende Rolle in der Autophagie. Trs85 interagiert mit Atg9, das eine Schlüsselfunktion in der Bildung der Autophagosomen einnimmt. Mit Hilfe von Atg9 Vesikeln werden Trs85 und Ypt1 zu der *pre-autophagosomal structur* (PAS) geleitet, wodurch eventuell der gesamte TRAPPIII Komplex zur PAS geführt wird (Kakuta et al., 2012). Auch könnte der TRAPPIII Komplex die COPII Vesikel zur PAS leiten (Tan et al., 2013) und damit direkt oder indirekt über Trs85 an dem an der PAS-Bildung beteiligtem Atg17 binden (Wang et al., 2013). Eine weitere Studie zeigt jedoch, dass der TRAPPIII Komplex im retrograden Transport vom frühen Endosom zum Golgi involviert ist und innerhalb dieses Transportweges mit Atg9 interagiert (Shirahama-Noda et al., 2013).

Der TRAPPII Komplex liegt in Hefe durch die Untereinheit Trs65 verbunden als Dimer vor. Im Gegensatz zu TRAPPI wird die GEF Aktivität des TRAPPII kontrovers diskutiert, da diese sowohl für Ypt1 (Barrowman et al., 2010; Cai et al., 2008; Chin et al., 2009; Yip et al., 2010) als auch für Ypt31/32 gezeigt werden konnte (Jones et al., 2000; Morozova et al., 2006; Pinar et al., 2015; Sciorra et al., 2005; Zou et al., 2012). Trotz mehrerer Studien konnten weder die für die GEF Aktivität des TRAPPII Komplexes verantwortlichen Untereinheiten als auch das Ziel RAB eindeutig zugeordnet werden. Während die TRAPPII Untereinheit Tca17 der Stabilisierung des TRAPPII Komplexes dient (Montpetit and Conibear, 2009), vermittelt Trs120 die Bindung an COPI Vesikeln (Cai et al., 2005). Damit spielt der TRAPPII Komplex in Hefe sowohl im *trans*- und

## Einleitung

intra-Golgi Sekretionsweg als auch im Endosom zu Golgi Transportweg eine Rolle (Cai et al., 2005; Choi et al., 2011; Liang et al., 2007; Morozova et al., 2006). Die Abbildung 1.8 gibt einen Überblick über die TRAPP vermittelten vesikulären Transportwege in Hefe.



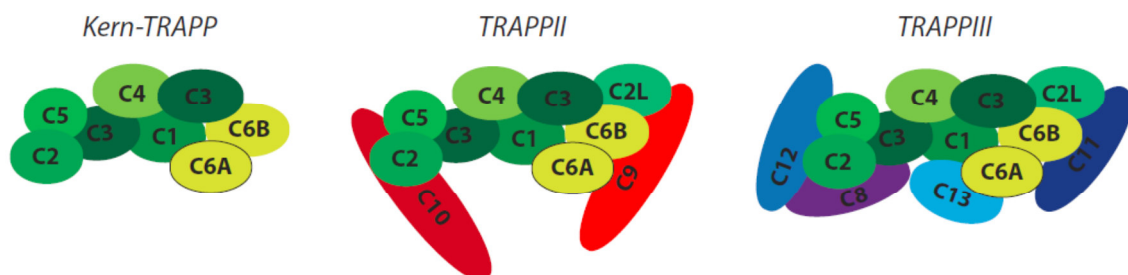
**Abb. 1.8: Die TRAPP Komplexe und ihre Sekretionswege in Hefe.** Der TRAPPI Komplex interagiert mit den COPII Vesikeln als GEF für Ypt1 auf dem Sekretionsweg vom ER zum Golgi-Apparat. Der TRAPPII Komplex ist neben dem intra-Golgi und *trans*-Golgi auch dem Endosom zu Golgi Transportweg zugeordnet. Zudem könnte er auch bei der Autophagie involviert sein. Er wird sowohl als GEF für Ypt1 als auch für Ypt31/32 diskutiert. Der TRAPPIII Komplex wurde der Autophagie und ER-Phagie als GEF für Ypt1 zugeordnet. Zudem könnte er im Sekretionsweg vom frühen Endosom zum *trans*-Golgi involviert sein. Modifiziert nach (Barrowman et al., 2010; Brunet and Sacher, 2014; Cai et al., 2007; Cai et al., 2005; Cai et al., 2008; Kakuta et al., 2012; Lipatova and Segev, 2014; Lipatova et al., 2013; Lynch-Day et al., 2010; Meiling-Wesse et al., 2005; Shirahama-Noda et al., 2013; Yu and Liang, 2012; Zou et al., 2013).

### 1.4.2 Die TRAPP Komplexe in Säugetieren

Ähnlich wie in Hefe enthalten TRAPPII und TRAPPIII in Säugetierzellen einen gemeinsamen Kernkomplex. Allerdings konnte im Gegensatz zur Hefe eine Funktion dieses Kernkomplexes als eigenständig agierender TRAPP Komplex bisher nicht nachgewiesen werden (Barrowman et al., 2010; Bassik et al., 2013; Brunet and Sacher, 2014; Choi et al., 2011; Scrivens et al., 2011; Yu and Liang, 2012). Da TRAPPC3 direkt mit TRAPPC1, TRAPPC2, TRAPPC4 und TRAPPC5 zu interagieren scheint, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Kernkomplex eine ähnliche Zusammensetzung hat wie TRAPPI in Hefe (Loh et al., 2005; Menon et al., 2006). Dagegen finden einige Untereinheiten in den Säugetier TRAPPII und TRAPPIII Komplexen eine andere

## Einleitung

Verwendung als in Hefe. Zum Beispiel ist TRAPPC13 (Trs65) in Säugetierzellen kein Bestandteil des TRAPP<sub>II</sub>, sondern des TRAPP<sub>III</sub> Komplexes. Neben dem Homolog von Trs85 (TRAPPC8) sind zwei weitere, vertebraten spezifische Untereinheiten, TRAPPC11 und TRAPPC12, Mitglieder des TRAPP<sub>III</sub> Komplexes (Barrowman et al., 2010; Bassik et al., 2013; Brunet and Sacher, 2014; Choi et al., 2011; Scrivens et al., 2011; Yu and Liang, 2012). Der TRAPP<sub>II</sub> Komplex besteht wie in Hefe aus den zusätzlichen Untereinheiten TRAPPC9 und TRAPPC10, liegt jedoch in Säugetierzellen nicht als Dimer vor (Barrowman et al., 2010; Bassik et al., 2013; Brunet and Sacher, 2014; Choi et al., 2011; Yu and Liang, 2012). Das Protein TRAPPC2L ist in Hefe ausschließlich Bestandteil des TRAPP<sub>II</sub>, konnte in Säugetieren jedoch beiden Komplexen, TRAPP<sub>II</sub> und TRAPP<sub>III</sub>, zugeordnet werden (Bassik et al., 2013; Bogershausen et al., 2013; Choi et al., 2011; Scrivens et al., 2011; Yu and Liang, 2012). Das Protein TRAPPC3L konnte ebenfalls in Säugerzellen identifiziert werden, bisher allerdings keiner Funktion zugewiesen werden (Scrivens et al., 2011). Eine weitere Besonderheit ist TRAPPC6, zu dem in Säugetieren zwei Proteine, TRAPPC6A und TRAPPC6B, nachgewiesen werden konnten (Gwynn et al., 2006; Kummel et al., 2008; Loh et al., 2005). Die Zusammensetzung der TRAPP Komplexe in Säugetieren gibt die Abbildung 1.9 wieder.



**Abb. 1.9: Zusammensetzung der TRAPP Komplexe in Säugetieren.** Modifiziert nach (Barrowman et al., 2010; Bassik et al., 2013; Brunet and Sacher, 2014; Levine et al., 2013; Yu and Liang, 2012).

Bisher konnte kein Nachweis zur Funktion des vollständigen Kern TRAPP Komplexes im Sekretionsweg erbracht werden, wohl aber für dessen einzelnen Untereinheiten. Zum Beispiel konnte TRAPPC2 mit ERES in Verbindung gebracht werden, wo es eine wichtige Rolle beim Prokollagen-II-Transport aus dem ER spielt (Venditti et al., 2012). Mit diesem Hintergrund wird TRAPPC2 auch mit der Krankheit Spondyloepiphyseal Dysplasia Tarda (SEDT oder auch SEDL) in Zusammenhang gebracht (Brunet and Sacher, 2014; Choi et al., 2009; Gedeon et al., 1999; Shaw et al., 2003). Für TRAPPC3 wurden hefeähnliche Funktionen für den pre-Golgi Sekretionsweg und Interaktion mit COPII Vesikel gezeigt (Cai et al., 2007; Loh et al., 2005; Yu et al., 2006). Zudem konnte eine Verbindung zwischen TRAPPC3 und antibakterieller Autophagie hergestellt werden (Huang et al., 2011). Außerdem wird angenommen, dass TRAPPC3 in der

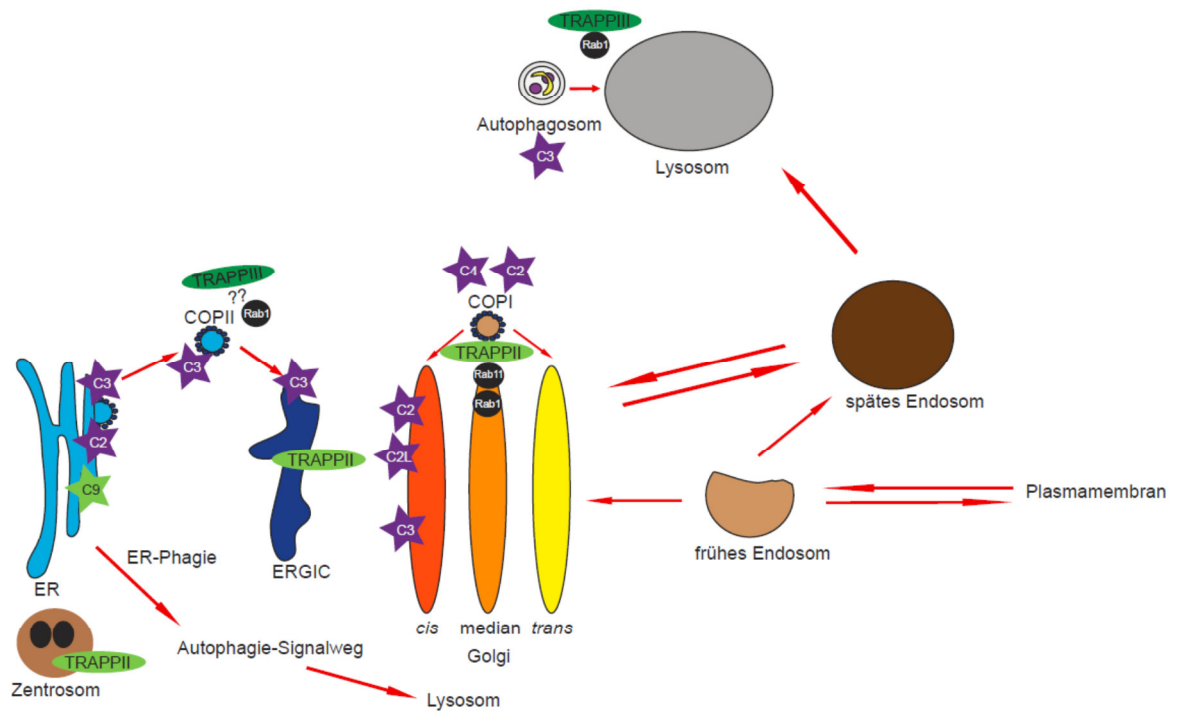
## Einleitung

Formierung des ERGICs eine wichtige Rolle einnimmt, da es unter anderem mit ERES kolokalisiert (Yu et al., 2006). Entsprechend führte eine Depletion von TRAPPC3 zu einer Zerstreuung des ERGICs (Yu et al., 2006) und einer Fragmentierung des Golgi-Apparates (Scrivens et al., 2009; Yu et al., 2006). Letzter Phenotyp wurde auch nach Verlust von TRAPPC2 und TRAPPC2L beobachtet (Scrivens et al., 2009). Zudem konnte eine Lokalisation von TRAPPC2 und TRAPPC4 zum *cis*-Golgi und den COPI Vesikeln festgestellt werden (Yamasaki et al., 2009).

Für die beiden TRAPPIII-spezifischen Proteine TRAPPC11 und TRAPPC12 konnte eine Interaktion mit dem COPII Protein SEC31A nachgewiesen werden (Scrivens et al., 2011). Auch TRAPPC8 wurde als Interaktor von SEC31A identifiziert und somit in Verbindung mit dem pre-Golgi Sekretionsweg gebracht (Bassik et al., 2013). Zudem ließ sich auch in Säugetierzellen eine Verbindung zwischen TRAPPC8 und Autophagie nachweisen (Bassik et al., 2013; Behrends et al., 2010; Choi et al., 2011; Wang et al., 2013). Auch TRAPPC11 und TRAPPC5 zeigten unter Knockdown eine reduzierte Autophagosombildung (Behrends et al., 2010; Choi et al., 2011).

Wie bereits zum TRAPP II Komplex in Hefe beschrieben, wird auch für den TRAPP II Komplex in Säugetierzellen die GEF Aktivität kontrovers diskutiert. Sowohl für RAB1 als auch für RAB11 ist eine Aktivität im Gespräch (Levine et al., 2013; Yamasaki et al., 2009). Jedoch ist die Annahme, dass sich die GEF-RAB Interaktion in Bezug auf RAB1 im vorderen Golgi und in der Interaktion mit COPI Vesikeln zeigt. Wichtig für diese Interaktion ist TRAPPC10, jedoch wurde auch eine Anreicherung von TRAPPC9 und des gesamten TRAPP II Komplexes auf COPI Vesikeln gezeigt (Yamasaki et al., 2009). Dennoch gibt es Hinweise, dass TRAPPC10 zusammen mit TRAPPC2 als GEF für RAB11 dienen könnte (Levine et al., 2013). Eine weitere Studie konnte eine Interaktion von TRAPP II mit RAB11 im Zusammenhang mit Rabin8 zur Aktivierung von RAB8 im Zentrosom feststellen (Westlake et al., 2011). Die Lokalisation von TRAPPC9 ließ sich neben dem Golgi auch für das ERGIC zeigen. Durch Interaktion mit p150<sup>GLUD</sup>, eine Dynaktinuntereinheit, die mit den COPII-Proteinen SEC23 und SEC24 interagiert, vermittelt TRAPPC9 so das Andocken und Fusionieren des COPII Vesikels mit dem ERGIC. Durch die Adapterfunktion zwischen der ERGIC-Membran und Dynaktin ist der TRAPP II Komplex bei dem Transport des ERGICs zum *cis*-Golgi entlang der Mikrotubuli und der Verbindung beider beteiligt. In diesem Zusammenhang wird RAB1 als GTPase angenommen (Zong et al., 2012). Zudem wurde gezeigt, dass TRAPPC9 auch lokalisiert zum ER vorliegt (Zahoor et al., 2010). Die Abbildung 1.10 fasst die Erkenntnisse zu den TRAPP Komplexen in Säugerzellen zusammen.





**Abb. 1.10: Die TRAPP Komplexe und ihre Sekretionswege in Säugetieren.** Dem vollständigen Kern Komplex konnte in Säugetierzellen kein Sekretionsweg zugeordnet werden. Für einzelne Untereinheiten wurden verschiedene Funktionen bestimmt (durch Sterne gekennzeichnet). Der TRAPP II Komplex wurde dem Golgi-Apparat, COPI Vesikeln und ERGIC zugeordnet. Auch mit dem Zentrosom wurde eine Interaktion gezeigt. TRAPPC9 kolokalisiert zusätzlich mit dem ER. Der TRAPP III Komplex wurde in Verbindung mit den COPII Vesikeln und der Autophagie gebracht. Der TRAPP II Komplex wird wie in Hefe sowohl als GEF für RAB1 als auch für RAB11 diskutiert. Der TRAPP III Komplex ist als GEF für RAB1 beschrieben. Modifiziert nach (Barrowman et al., 2010; Bassik et al., 2013; Behrends et al., 2010; Brunet and Sacher, 2014; Cai et al., 2007; Loh et al., 2005; Scrivens et al., 2011; Scrivens et al., 2009; Venditti et al., 2012; Wang et al., 2013; Westlake et al., 2011; Yamasaki et al., 2009; Yu and Liang, 2012; Yu et al., 2006; Zong et al., 2012).

### **1.5 Ziel dieser Arbeit**

Die TRAPP Komplexe sind bei vielen wichtigen Funktionen in Hefe und Vertebraten beteiligt und zu dem sind für die TRAPP Komplexe in Vertebraten- bzw. Säugetierzellen noch viele Fragen ungeklärt. Vor allem die Existenz vertebraten-spezifischer Untereinheiten lässt vermuten, dass weitere bisher unbekannte Proteine von Bedeutung sein könnten. Zur Identifizierung solcher Proteine wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit eine Analyse des Interaktoms der TRAPP Untereinheiten in Säugerzellen durchgeführt. Im Rahmen der Netzwerkstudie konnte das bisher uncharakterisierte Protein C7orf43 als ein neuer Interaktionspartner sowohl des Kern TRAPP Komplexes als auch der spezifischen TRAPP II Untereinheiten identifiziert werden. Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit, die Identifizierung neuer Interaktoren, wurde daraufhin in die Analyse und Charakterisierung von C7orf43 als potenzielle TRAPP II Untereinheit geändert und die Art der Interaktion zum TRAPP II Komplex, die zelluläre Lokalisation sowie Funktion innerhalb des TRAPP II Komplexes überprüft. Die Charakterisierung von C7orf43 führte schließlich zur Bestätigung eines neuen TRAPP II Mitgliedes.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Hersteller- und Herkunftsangaben

Eine ausführliche Liste der Hersteller und Herkunft der verwendeten Materialien ist im Anhang zu finden. Im Kapitel 2.1 Materialien wird daher nur der Firmenname bzw. der Leiter der Forschungsinstitution genannt. Im Anhang werden ebenfalls die eingesetzten Laborgeräte aufgelistet.

#### 2.1.2 Vektoren, ORF, Primer und Konstrukte

Vektor	Beschreibung	Antibiotikaresistenz	Herkunft
pDONR223	Gateway Anfangsvektor	Spectinomycin	Wade Harper
pDEST-MYC-GAW-IP	Transiente Expression in Säugerzellen, CMV-Promoter	Carbenicillin Puromycin	Thermo Fisher Scientific
pHAGE-N-Flag-HA	Transiente oder lentivirale Expression in Säugerzellen, CMV-Promoter	Carbenicillin Puromycin	Wade Harper
pHAGE-N-GFP	Transiente oder lentivirale Expression in Säugerzellen, CMV-Promoter	Carbenicillin Blasticidin	Wade Harper
MSCV-i(N-Flag-HA)-IRES-PURO	Transiente oder retrovirale Expression in Säugerzellen, LTR-Gensteuerung	Carbenicillin Puromycin	Wade Harper

ORF	Quelle	Zugangsnummer
TRAPPC1	ORFeome	NM_001166621
TRAPPC2	ORFeome	NM_014563
TRAPPC2L	ORFeome	NM_016209
TRAPPC3	ORFeome	NM_014408
TRAPPC4	ORFeome	NM_016146
TRAPPC5	ORFeome	NM_174894
TRAPPC6A	ORFeome	NM_024108
TRAPPC8	ORFeome	NM_014939
TRAPPC9	OriGene	NM_031466
TRAPPC10	ORFeome	NM_003274
TRAPPC11	ORFeome	NM_021942
TRAPPC12	ORFeome	NM_016030
TRAPPC13	ORFeome	NM_001093755
C7orf43	ORFeome	NM_018275

Eine vollständige Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Primer befindet sich im Anhang. Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Alle Konstrukte wurden mit Hilfe des Invitrogen™ Gateway™ Klonierungssystems der Firma Thermo Fisher Scientific hergestellt und werden im Anhang aufgelistet.

### 2.1.3 Kompetente Bakterienstämme

Eingesetzt wurden *E. coli* TOP10 oder *E. coli* DB3.1 Bakterienstämme der Firma Thermo Fisher Scientific. Die gewünschten Bakterien wurden auf LB-Agar ohne Antibiotikum ausgestrichen und nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht erfolgte das Beimpfen einer 50 ml Vorkultur mit LB-Medium ohne Antibiotikum. Der erneuten Inkubation bei 37 °C über Nacht folgte die Inokulation von 300 ml SOB-Medium mit 15 ml der Vorkultur. Nach einer Kultivierungsdauer von 120–180 min bei 30 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 wurden die Bakterien mit 3000 × g für 5 min zentrifugiert und in 50 ml TFB1-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 60–90 min auf Eis. Nach der Zentrifugation der Bakterien bei 3000 × g für 20 min bei 4 °C und Aufnahme in 15 ml TFB2-Puffer, wurden sie in vorgekühlte Eppis aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80 °C gelagert.

### 2.1.4 Zelllinien

COS7	Ivan Dikic
HeLa	ATCC
HEK293T	ATCC
T-REx™-293	ATCC
U2OS	ATCC

### 2.1.5 Antikörper

#### Primärantikörper

Name	Nummer	Herkunft
ATG9A	ab108338	Abcam
β-Actin	A1978	Sigma-Aldrich
β-COP	ab6323	Abcam
C7orf43	HPA019359	Sigma-Aldrich
Climp63	-	Hesso Farhan
C-Myc	sc788	Santa Cruz
ERGIC53	-	Hesso Farhan
ERGIC53/p58	E1031	Sigma-Aldrich
Giantin	PRB-114C	BioLegend
GM130	ab52649	Cell signaling
HA	11867423001	Roche
HA.11 Clone 16B12	MMS-101P	Covance
PCNA	sc-7907	Santa Cruz
RAB1A	ab104604	Abcam
Sec16A	A300-648A	Bethyl
Sec22L1/SEC22B	Ab70224	Abcam
Sec31A	612350	BD Transduction
TGN46	T7576	Sigma-Aldrich
TRAPPC11	HPA045427	Sigma-Aldrich
TRAPPC2L	HPA041714-100UL	Sigma-Aldrich
TRAPPC8	HPA041107	Sigma-Aldrich
TRAPPC9	-	Sidney Yu

#### Sekundärantikörper

Name	Nummer	Herkunft
Anti-Mouse-Alexafluor 488	A11001	Thermo Fisher Scientific
Anti-Mouse-Alexafluor 594	A11005	Thermo Fisher Scientific
Anti-mouse-HC-IgG1	W402B	Promega
Anti-Rabbit	W401B	Promega
Anti-Rabbit-Alexafluor 488	A11008	Thermo Fisher Scientific
Anti-Rabbit-Alexafluor 594	A11012	Thermo Fisher Scientific
Anti-Rabbit-Alexafluor 654	A31573	Thermo Fisher Scientific
Anti-rat Cy3 pre-adsorbed against mouse	712-166-153	Jackson ImmunoResearch
Anti-Rat-Alexafluor 488	A21208	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.6 siRNS

Die verwendeten siRNS wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific aus der Reihe der Invitrogen Stealth siRNS bezogen.

Gensymbol	Nummer	Sequenz
C7orf43	HSS124251	AAGUACAUCGAGUAGUCGCACUGGG/CCCAGUGC GACUACUCGAUGUACUU
TRAPPC2L	HSS182190	CGGUGUGCAUCGCGGUGAUUGCCAA/UUGGCAAU CACCGCGCGAUGCACACCG
TRAPPC8	HSS117803	AGGAGAUUCACAGUCUGCAGCUGAA/UUCAGCUG CAGACUGUGAAUCUCCU
TRAPPC9	HSS130309	ACAAUGGAGAAAGUCAGCAACUAAU/AUUAGUUG CUGACUUUCUCCAUUGU
TRAPPC10	HSS144289	CCUGUGCUGGAGAUCAAGAAUUUAUU/AAUAAAUU CUGAUCUCCAGCACAGG
siRNS Negativ Kontrolle Low GC	12935-200	nicht angegeben

### 2.1.7 Kits und Standards

1 kb DNS Leiter	New England Biolabs
Colloidal Blue Staining Kit	Thermo Fisher Scientific
Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma-Aldrich
GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
High Pure RNA Isolations Kit	Roche Diagnostics
KOD Hot Start DNS Polymerase	Merck Millipore
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384	Roche Diagnostics
LightCycler® 480 SYBR Green Master	Roche Diagnostics
NativeMark™ Unstained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific
NativePAGE™ Running Buffer Kit	Thermo Fisher Scientific
NativePAGE™ Sample Prep Kit	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ BCA™ Protein Assay	Thermo Fisher Scientific
Protein Marker VI (10 - 245) prestained	AppliChem
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
SilverQuest™ Silver Staining Kit	Thermo Fisher Scientific
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics
Western Lightning® Plus-ECL	Perkin Elmer

### 2.1.8 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

1,4-Dithiothreitol	Carl Roth
2-Propanol, LC-MS/MS	Carl Roth
Acetic Acid	Sigma Aldrich
Acetic Acid, LC-MS/MS	Sigma-Aldrich
Aceton, LC-MS/MS	Carl Roth
Acetonitril, LC-MS/MS	Carl Roth
Acrylamid 4K - Lösung (30 %) - Mix 29 : 1	AppliChem
Ammoniumbicarbonat, LC-MS/MS	Sigma-Aldrich
Ammonium persulfate	Sigma-Aldrich
Blotting Papier	Whatman Schleicher&Schuell

## Material und Methoden

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Bafilomycin A1 from <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Carbenicillin	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
cOmplete, EDTA-free, Protease Inhibitors	Roche Life Science
DMSO	Sigma-Aldrich
DNS-Ladepuffer (6 x)	New England Biolabs
EDTA	AppliChem
EGTA	AppliChem
Ethanol, 70%	Carl Roth
Ethanol, 90%	Sigma-Aldrich
Formic Acid, LC-MS/MS	Sigma-Aldrich
Gateway® BP Clonase® Enzymmix	Thermo Fisher Scientific
Gateway® LR Clonase® Enzymmix	Thermo Fisher Scientific
Influenza Hemagglutinin (HA) Peptide ≥97%	Sigma-Aldrich
Jodacetamid	Sigma-Aldrich
Kanamycinsulfat	Carl Roth
KCl	Sigma-Aldrich
KOH	Sigma-Aldrich
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth
LiChroSolv H <sub>2</sub> O, LC-MS/MS	Carl Roth
Methanol	Sigma-Aldrich
Methanol, LC-MS/MS	Carl Roth
Midori Green	Nippon Genetics
Milchpulver	Carl Roth
Monoclonal Anti-HA–Agarose Antikörper	Sigma-Aldrich
NaOH	Carl Roth
NativePAGE™ Novex® 4-16% Bis-Tris Gels	Thermo Fisher Scientific
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem
NitroBind, Nitrocellulose Membran, 0.45µm	Thermo Fisher Scientific
Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Protein Gels,	Thermo Fisher Scientific
Nonidet™ P 40 Substitute	Sigma-Aldrich
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik
Paraformaldehyde solution 4% in PBS	Santa Cruz biotechnologies
Pierce™ Biotin	Thermo Fisher Scientific
Poly-L-lysine solution	Sigma-Aldrich
Ponceau S	AppliChem
Präzisionsdeckgläser (0,17mm)	Carl Roth
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific
Protein A/G Plus Agarose, 2ml	Santa Cruz
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Röntgenfilm Fuji Super RX 18 × 24cm	Fuji
Röntgenfilm Fuji Super RX 13 × 18cm	Fuji
HCl	Sigma-Aldrich
SDS	Carl Roth
SeaKem® LE Agarose	Lonza
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega
Spectinomycin	Sigma-Aldrich
TEMED	Carl Roth

## Material und Methoden

TCA	Sigma-Aldrich
TFA, LC-MS/MS	Carl Roth
Tricine	Sigma-Aldrich
TRIS	AppliChem
Triton® X-100	VWR
Tween® 20	Carl Roth
Ultrafree-MC, HV 0,45 µm	Merck Millipore
Ultrafree-MC, VV 0,1 µm	Merck Millipore
Urea	Sigma-Aldrich
Westran CS PVDF Membrane, 0.45 µm	GE Healthcare

### 2.1.9 Puffer, Lösungen und Gelzusammensetzungen

#### Allgemeine Puffer und Lösungen

##### 3 × Lämmli-Probenpuffer

200 mM TRIS-HCl pH 6,8  
6 % (w/v) SDS  
20 % Glycerol  
650 mM DTT  
0,01 % (w/v) Bromphenolblau

##### 10 × SDS-Laufpuffer

0,25 M TRIS  
1,9 M Glycin  
10 % (w/v) SDS

##### 1 × SDS-Laufpuffer

100 ml 10 × SDS-Laufpuffer auf 1 Liter dest. H<sub>2</sub>O

##### 50 × TAE-Puffer

2 M TRIS  
1 M AA  
50 mM EDTA, pH 8,0

##### 1 × TAE-Puffer

20 ml 50 × TAE-Puffer auf 1 Liter dest. H<sub>2</sub>O

##### 10 × TBS

0,2 M TRIS  
1,5 M NaCl  
auf pH 7,7 mit HCl

##### 1 × TBS-T

100 ml 10 × TBS pH 7.7  
0,1 % (v/v) Tween20  
auf 1 Liter dest. H<sub>2</sub>O

##### 10 × Wetblot Puffer

0,25 M TRIS  
1,9 M Glycin  
3,7 % (w/v) SDS

##### 1 × Wetblot Puffer

100 ml 10 × Wetblot Puffer  
200 ml Methanol  
auf 1 Liter dest. H<sub>2</sub>O

##### LB-Agar

1 % (w/v) Trypton  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
1 % (w/v) NaCl  
1,5 % (w/v) Agar  
autoklaviert

##### LB-Medium

1 % (w/v) Trypton  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
1 % (w/v) NaCl  
autoklaviert

##### MCLB

50 mM TRIS pH 7,4  
150 mM NaCl  
1 % (v/v) NP-40  
1 Tablette Proteaseinhibitoren auf 25 ml

##### Ponceau-S-Färbelösung

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



## Material und Methoden

### RIPA-Lysepuffer

50 mM TRIS pH 7,4  
150 mM NaCl  
0,1 % (w/v) SDS  
0,5 % (w/v) Natrium-Desoxycholat  
1 % (v/v) NP-40  
1 Tablette Proteaseinhibitoren auf 25 ml

### TFB1-Puffer

100 mM RbCl  
50 mM MnCl  
30 mM C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>  
10 mM CaCl  
15 % (v/v) Glycerol  
Sterilfiltriert

### SOB-Medium

2 % (m/v) Trypton  
0,5 % (m/v) Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
25 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
pH 6,7–7,0  
autoklaviert

### TFB2-Puffer

10 mM MOPS, pH 8,0  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl  
15 % (v/v) Glycerol  
sterilfiltriert

## **Puffer und Lösungen für Velos**

### Auftragspuffer

2 % (v/v) ACN  
0,2 % (v/v) TFA  
97,8 % (v/v) LiChroSolv H<sub>2</sub>O

### Auftragungspumpenlösung

50 % (v/v) 2-Propanol  
50 % (v/v) LiChroSolv H<sub>2</sub>O

### Lösung A Velos

0,1 % (v/v) FA  
99,9 % (v/v) LiChroSolv H<sub>2</sub>O

### Lösung B Velos

80 % (v/v) ACN  
0,08 % (v/v) FA  
19,92 % (v/v) LiChroSolv H<sub>2</sub>O

### Rückdichtungslösung

10 % (v/v) 2-Propanol  
90 % (v/v) LiChroSolv H<sub>2</sub>O

## **Puffer und Lösungen für Velos Pro**

### Waschpuffer

5 mM ABC  
50 % (v/v) ACN

### Reduktionspuffer

1 M DTT  
50 mM ABC

### Alkylierungspuffer

0,5 M IAA  
50 mM ABC

### Lösung A

0,5 % (v/v) AA

### Lösung A\*

2 % (v/v) ACN  
1 % (v/v) TFA

### Lösung B

80 % (v/v) ACN  
0,5 % (v/v) AA

**Gelzusammensetzungen**

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid 30 %	4 % (v/v)	8 % oder 12 % (v/v)
0,5 M TRIS pH 6,8	0,125 M	-
1,5 M TRIS pH 8,8	-	0,375 M
10 % SDS	1 % (v/v)	1 % (v/v)
10 % APS	1 % (v/v)	1 % (v/v)
TEMED	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
dest. H <sub>2</sub> O	hinzugefügt zum finalen Volumen	

**2.1.10 Zellkulturmedien, -zusätze und Transfektionsreagenzien**

Blasticidin	InvivoGen
Brefeldin A	Tocris Bioscience
DMEM, high glucose, pyruvate	Thermo Fisher Scientific
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg	Thermo Fisher Scientific
Doxycycline hyclate	Sigma-Aldrich
Fötales Rinderserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Promega
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
L-Glutamine (200 mM)	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific
Nocodazol	Acros Organics
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific
PBS	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific
Polybrene Infection / Transfection Reagent	Merck Millipore
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Puromycin dihydrochloride from <i>S. alboniger</i>	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red	Thermo Fisher Scientific

**Medienzusammensetzungen**

Kultivierungsmedium

10 % FBS  
 1 % L-Glutamin  
 1 % Pen/Strep  
 in DMEM

Selektionsmedium

10 % FBS  
 1 % L-Glutamin  
 1 % Pen/Strep  
 2 µg/ml Puromycin  
 in DMEM

Selektionsmedium mit Blast

10 % FBS  
 1 % L-Glutamin  
 1 % Pen/Strep  
 4 µg/ml Blasticidin  
 2 µg/ml Puromycin  
 in DMEM

Transfektionsmedium

15 % FBS  
 1 % L-Glutamin  
 in DMEM

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 PCR und Klonierung der Konstrukte

Für die Klonierung der Konstrukte mit Hilfe des Invitrogen™ Gateway™ Klonierungssystems benötigten die zu klonierenden Fragmente die Gateway-spezifischen Anhänge vor und nach dem Fragment, eingefügt mittels PCR. Für die PCR wurde das KOD Hot Start DNS Polymerase-Kit gemäß Tabelle 2.1 eingesetzt. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 2.2 zusammengefasst und wurde entsprechend der Größe des Zielgens individuell nach den in der Tabelle aufgeführten Angaben angepasst.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der PCR für die Klonierung mit dem Gateway™ Klonierungssystem

	Endkonzentration
DMSO	0,25 %
10 × Puffer	1 ×
MgSO <sub>4</sub>	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer vorwärts	0,3 µM
Primer rückwärts	0,3 µM
DNS	25 ng
KOD Hot Start DNS Polymerase	0,02 U/ml

Tabelle 2.2: PCR-Programm der Klonierung mit dem Gateway™ Klonierungssystem

Schritt	<500 bp	500–1000 bp	1000–3000 bp	>3000 bp
1. Polymeraseaktivierung	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min	95 °C, 2 min
2. Denaturierung	95 °C, 20 s	95 °C, 20 s	95 °C, 20 s	95 °C, 20 s
3. Anlagerung	niedrigste Primertemperatur, mind. 65 °C, 10 s			
4. Verlängerung	70 °C, 10 s/kbp	70 °C, 15 s/kbp	70 °C, 20 s/kbp	70 °C, 25 s/kbp
	30 Wiederholungen der Schritte 2–4			

Anschließend wurde das PCR-Produkt entweder direkt mit Hilfe des Gelextraktionskits gemäß Herstellerangaben aufgereinigt oder durch Agarosegelelektrophorese isoliert und unter anschließender Verwendung des Gelextraktionskits extrahiert. Danach erfolgten die zur Herstellung der Konstrukte benötigten Schritte der BP- und LR-Reaktion (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: BP- und LR-Reaktion für die Klonierung mit dem Gateway™ Klonierungssystem

BP-Reaktion		LR-Reaktion	
Volumen		Volumen	
2,5 µl	PCR-Produkt	1 µl (ca. 150 ng/µl)	pDONR223-Konstrukt
0,5 µl (ca. 150 ng/µl)	pDONR223	1 µl (ca. 150 ng/µl)	Destinationsvektor
1 µl	5 × BP-Puffer	1 µl	5 × LR-Puffer
1 µl	BP-Enzymmix	1 µl	LR-Enzymmix
-	H <sub>2</sub> O	1 µl	H <sub>2</sub> O
5 µl	Gesamtvolumen	5 µl	Gesamtvolumen
Inkubation bei RT über Nacht		Inkubation bei RT für 2-4 h	

Nach Abschluss der Inkubation wurden 30 µl Top10-Zellen auf Eis aufgetaut und der Reaktionsmix hinzupipettiert. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 30 min und einem Hitzeschritt bei 42 °C für 60 s wurden dem Gemisch 100 µl LB-Medium hinzugefügt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Ausplattierung auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum und einer Inkubation bei 37 °C über Nacht. Anschließend konnten bei erfolgtem Kolonienwachstum einzelne Kolonien entnommen und erneut über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit Antibiotikum inkubiert werden. Je nach geplanter Weiterverarbeitung wurden 5 ml LB-Medium für eine Mini- oder 250 ml für eine Maxi-Prep benötigt. Nach der Mini- oder Maxi-Prep (siehe Abschnitt 2.2.3) konnte das Konstrukt je nach Destinationsvektor direkt für die transiente oder stabile Transfektion eingesetzt werden. Die Konzentration an DNS wurde mit dem ND-1000 Spektrophotometer gemessen. Der Klonierungserfolg wurde jeweils nach BP- und LR-Reaktion durch den Sequenzierungsdienst der Firma Eurofins Genomics überprüft.

### 2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 1 % bzw. 3 % Agarose in 1 × TAE-Puffer gelöst und unmittelbar vor dem Einsatz mit 0,5 µg/ml Midori Green zur DNS-Markierung versetzt. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 6 × DNS-Ladepuffer vermischt. Vor dem Starten der Elektrophorese bei 100 V für 30 min wurde die Kammer mit 1 × TAE-Puffer bis zur Markierung aufgefüllt. Die Analyse des Gel-Laufs sowie das Ausschneiden von Banden erfolgte mit Hilfe des GelDoc™XR+. Ausgeschnittene Banden wurden mit dem Gelextraktionskit gemäß der Anleitung aufgereinigt.

### 2.2.3 Mini- und Maxi-Plasmidpräparation

Die Aufreinigung der DNS erfolgte mit Hilfe des GenElute™ HP Plasmid Miniprep und GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kits der Firma Sigma-Aldrich gemäß den Herstelleranweisungen. Die Verwendung der Kits zur Plasmidpräparation orientierte sich am Kultivierungsvolumen der Bakterienkultur.

### 2.2.4 Herstellung des C7orf43 rescue-Plasmids

Mit Hilfe der entwickelten Primer, die unter Anwendung des QuikChange® Primer Design Programms der Firma Agilent konstruiert wurden und im Anhang aufgelistet sind, wurde in einer zweigeteilten PCR unter Zuhilfenahme des KOD Hot Start DNS Polymerase-Kits das siRNS resistente Plasmid hergestellt. Die Tabelle 2.4 gibt die Zusammensetzung wieder.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches der Mutagenese-PCR

Komponente	Endkonzentration
DMSO	0,25 %
10 × Puffer	1 ×
MgSO <sub>4</sub>	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer	0,3 μM
DNS	25 ng
KOD Hot Start DNS Polymerase	0,02 U/ml

Das PCR-Programm ist in Tabelle 2.5 aufgelistet. Im ersten Abschnitt der PCR erfolgte die Durchführung mit voneinander getrennten Primern mit acht Wiederholungen der Schritte 2–4. Anschließend wurden beide Reaktionsgemische im Verhältnis 1:1 gemischt, KOD Hot Start DNS Polymerase erneut hinzugefügt und die zweite PCR mit 18 Wiederholungen der Schritte 2–4 durchgeführt.

Tabelle 2.5: Programme der Mutagenesen-PCR

Schritt	
1. Polymeraseaktivierung	95 °C, 2 min
2. Denaturierung	95 °C, 20 s
3. Anlagerung	60 °C, 10 s
4. Verlängerung	70 °C, 25 s/kbp

Anschließend wurde dem PCR-Gemisch 1 μl des Enzyms DpnI zur Entfernung der Wildtyp-DNS hinzugefügt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Aufreinigung mit Hilfe des Gelextraktions Kits gemäß Herstelleranweisungen wurde das Konstrukt gemäß Abschnitt 2.2.1 weiterverwendet.

### 2.2.5 qRealTime-PCR

Nachdem mit Hilfe des High Pure RNA Isolationskits die RNS von HEK293T-Zellen isoliert und mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit in cDNS reverstranskribiert wurde, erfolgte die qRT-PCR im Light Cycler 480 mit dem LightCycler® 480 SYBR Green Master unter Verwendung der im Anhang aufgelisteten Primer. Das eingesetzte Programm während der qRT-PCR war unterteilt in die Schritte Vorinkubation mit einem Zyklus, Amplifikation mit 45 Zyklen und gleichzeitiger Quantifizierung sowie einem Zyklus Schmelzkurve mit paralleler Analyse der Schmelzkurven und schließlich dem Kühlschritt (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: qRT-PCR Programm

Vorinkubation				
	Akquisitionsmodus	Dauer (h:min:s)	Steigerungsrate (°C/s)	Akquisition pro °C
95 °C	Keiner	00:15:00	4,80	
Amplifikation				
	Akquisitionsmodus	Dauer (h:min:s)	Steigerungsrate (°C/s)	Akquisition pro °C
95 °C	Keiner	00:00:10	4,80	
60 °C	Keiner	00:00:20	2,50	
72 °C	Einfach	00:00:30	4,80	
Schmelzkurve				
	Akquisitionsmodus	Dauer (h:min:s)	Steigerungsrate (°C/s)	Akquisition pro °C
95 °C	Keiner	00:00:30	4,80	
65 °C	Keiner	00:00:30	2,50	
97 °C	Kontinuierlich		0,11	5
Abkühlen				
	Akquisitionsmodus	Dauer (h:min:s)	Steigerungsrate (°C/s)	Akquisition pro °C
40 °C	Keiner	00:00:30	2,50	

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst von der konfluent bewachsenen 10 cm Zellkulturschale gelöst. Hierfür kam für HEK293T- und T-REx™-293-Zellen PBS zur Anwendung, für U2OS-, COS7- und HeLa-Zellen Trypsin-EDTA mit 0,25 %. Nach einer Zentrifugation bei  $194 \times g$  für 5 min bei RT wurde jedem Zellpellet 900 µl FBS und 100 µl DMSO hinzugefügt, anschließend in ein Kryovial pipettiert und bei  $-135 \text{ °C}$  eingefroren. Zum Auftauen wurde das eingefrorene Kryovial der  $-135 \text{ °C}$ -Gefriertruhe entnommen und mit einem Schwimmhelfer in ein  $37 \text{ °C}$  Wasserbad gelegt. Nachdem das Kryovial ungefähr 70 % aufgetaute Zellen enthielt, wurden diese langsam hoch- und herunterpipettiert und in 10 ml auf  $37 \text{ °C}$  erwärmtes

## Material und Methoden

Kultivierungsmedium bzw. entsprechendes Selektionsmedium gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei  $194 \times g$  für 5 min bei RT. Das Zellpellet wurde daraufhin erneut in 10 ml Kultivierungsmedium oder entsprechendes Selektionsmedium aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die konfluenten Zellen konnten am Folgetag für die weiteren Experimente eingesetzt werden, nachdem das Medium gegen frisches getauscht wurde.

### 2.3.2 Generierung stabiler Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  HEK293T-Zellen in einer 6-Well Platte mit 2 ml Transfektionsmedium ausgesät. Pro Transfektion wurden 200 µl Opti-MEM® und 10 µl Lipofectamine® 2000 in einem Eppi gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nachdem 200 µl Opti-MEM® mit 1 µg pro Helferplasmid (pRETRO-VSVG, pRETRO-GAGPOL) und 2 µg Vektor-DNS vermischt wurde, wurde der Opti-MEM®/Lipofectamine® 2000-Mix hinzugefügt und die Reagenzien für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung auf die Zellen getropft und diese über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gegen frisches Transfektionsmedium ausgetauscht. In einer separaten 6-Well Platte wurden erneut  $3 \times 10^5$  HEK293T- bzw. T-REx™-293-Zellen in Transfektionsmedium ausgesät. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Infektion der neu ausgesäten Zellen. Hierfür wurde das Medium der transfizierten Zellen mit Hilfe eines Sterilfilters (0,45 µm) und einer Spritze filtriert, 4 µg/ml Polybrene hinzugefügt, anschließend auf die am Tag zuvor ausgesäten Zellen getropft und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium der Zellen durch frisches Wachstumsmedium ersetzt und erneut über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für mindestens fünf Tage in entsprechendem Selektionsmedium kultiviert und je nach Bedarf passagiert. Die Zellen konnten anschließend für Experimente eingesetzt oder eingefroren werden, als Medium kam nun dauerhaft das für diese Zellen entsprechende Selektionsmedium zur Anwendung. Eingesetzt wurden Konstrukte in dem Vektor MSCV-i(N-Flag-HA)-IRES-PURO.

### 2.3.3 Transient exprimierende Zellen

Die einen Tag zuvor ausgesäten Zellen müssen am Tag der Transfektion zu ungefähr 60 % konfluent vorliegen. Bei rescue-Experimenten wurde sowohl für Immunblotexperimente als auch Immunfluoreszenz-Analysen 48 h nach der siRNS-Zugabe das resistente Plasmid hinzugefügt. Anschließend wurden pro Well einer 6-Well Platte (bei größeren Formaten erfolgte eine entsprechende Umrechnung) 0,9375 ml Opti-MEM®, 18,75 µl Lipofecta-

## Material und Methoden

mine® 2000 und 500 ng DNS für MS-Experimente und 100 ng DNS bei rescue-Experimenten zusammen pipettiert, 20 min bei RT inkubiert und auf die Zellen getropft. Nach einer Inkubation für 24 h bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen für Immunfluoreszenzexperimente dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit 4 % PFA fixiert. Anschließend erfolgten erneut drei Waschschriffe mit PBS und die Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.3.6 aufgelistet mit Antikörpern inkubiert. Zellen für alle weiteren Experimente wurden mit  $194 \times g$  für 3 min geerntet und anschließend direkt weiter verwendet oder eingefroren. Eingesetzt wurden Konstrukte in den Vektoren pDEST-MYC-GAW-IP und MSCV-i(N-Flag-HA)-IRES-PURO.

### **2.3.4 Transient exprimierende Zellen für Kollokalisationsstudien**

Nachdem pro Transfektion 0,9375 ml Opti-MEM®, 18,75 µl Lipofectamine® 2000 und 100 ng DNS zusammen pipettiert und 20 min bei RT inkubiert wurden, wurden mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser in eine 6-Well Platte gelegt. Anschließend wurden  $2 \times 10^5$  COS7-Zellen aufgenommen, in 2 ml Transfektionsmedium in jedes Well pipettiert und für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Zellen entweder mit 40 µl DMSO, 20 µg/ml Nocodazol oder 50 µg/ml Brefeldin A (BFA) für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank. Nachdem die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit 4 % PFA fixiert wurden, erfolgten erneut drei Waschschriffe mit PBS. Anschließend fand die Inkubation der Zellen, wie unter Abschnitt 2.3.6 aufgelistet, mit Antikörpern statt. Eingesetzt wurden Konstrukte in den Vektoren pHAGE-N-Flag-HA und pHAGE-N-GFP. Die weitere Bearbeitung der aufgenommenen Bilder erfolgte mit ImageJ und die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von ImageJ und Microsoft Office Excel unter Verwendung der Pearson-Verteilung und des Pearson-Koeffizienten der unbehandelten Probe (Bolte and Cordelieres, 2006; Manders et al., 1993).

### **2.3.5 Transiente siRNS-Transfektion**

Die Transfektion für spätere Analysen im Immunblot fand in 6-Well Platten statt, für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden 12-Well Platten verwendet und mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern präpariert. Die eingesetzte siRNS wurde direkt der 20 µM-Vorratslösung entnommen. Vermischt wurden nach Herstellerangaben pro Well einer 6-Well Platte 500 µl Opti-MEM®, 5 µl Lipofectamine® RNAiMAX und 4,5 µl siRNS, die Mischung wurde für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jedem Well für Immunblotanalysen 2 ml der Zellsuspension, bestehend aus HEK293T aufgenommen in Transfektionsmedium, mit einer



Menge von ungefähr  $2,4 \times 10^5$  Zellen hinzugefügt. Nach 24 h wurde das Medium mit frischem Transfektionsmedium ersetzt und nach 72 h wurden die transfizierten Zellen geerntet.

Bei der Auslegung für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden  $3 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Nach 72 h wurden die Zellen nach drei sich wiederholenden Waschschritten mit PBS mit 4 % PFA bzw. 293T-Zellen bei späterer Verwendung des  $\beta$ -COP- oder ATG9-Antikörpers mit einem eiskalten Gemisch aus Methanol/Aceton 50:50 fixiert und anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Darauf folgend wurden die Zellen wie im Abschnitt 2.3.6 aufgelistet mit Antikörpern inkubiert. Die weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ. Mit Hilfe der Programme ImageJ, Prism 4 und Microsoft Office Excel wurde nach Abschluss der Experimente zur statischen Auswertung eine one-way-ANOVA von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### **2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung**

Die Zellen wurden wie in den Abschnitten 2.3.3–2.3.5 beschrieben fixiert und mit PBS gewaschen. Anschließend fand jeweils bei RT die Inkubation mit 0,2 % Triton X in PBS für 5 min für Kollokalisationsstudien oder mit 0,5 % Triton X in PBS für 10 min für alle weiteren Methoden statt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgten sowohl die Blockierung und weiteren Waschschrritte als auch die Inkubation mit den primären Antikörpern mit 3 % BSA und 20 mM Glycin in PBS für 1 h bei RT bei Verwendung der  $\alpha$ - $\beta$ -COP oder  $\alpha$ -ATG9 Antikörper. Weitere Waschschrritte wurden ebenfalls mit dieser Lösung durchgeführt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und anschließende Waschschrritte erfolgten für  $\alpha$ - $\beta$ -COP oder  $\alpha$ -ATG9 Antikörper behandelte Proben mit 3 % BSA in PBS für 1 h bei RT.

Für alle übrigen verwendeten Primärantikörper fand die Blockierung mit 1 % BSA in PBS für 1 h bei RT, die Inkubation der Primär- und Sekundärantikörper mit 0,1 % BSA in PBS für 1 h bei RT statt und alle Waschschrritte erfolgten mit PBS. Anschließend wurden die Proben einmal mit dest. Wasser gewaschen und über Nacht mit ProLong® Gold Antifade Mountant auf den Objektträger inkubiert. Die Immunfluoreszenzexperimente wurden mit dem konfokalen Leica TCS SP8 Mikroskop, einem 63  $\times$  Ölimmersionsobjektiv (NA 1.4) und der Software LAS X durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe von ImageJ.

### **2.3.7 Retention using selective hooks (RUSH)-Assay**

Nach Ausstattung einer 12-Well Platte mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern, wurden  $3 \times 10^5$  HEK293T-Zellen in DMEM hinzugefügt. Nachdem 5 nM siRNS zu 12  $\mu$ l HiPerFect pipettiert und auf 100  $\mu$ l mit DMEM aufgefüllt wurden, erfolgte eine Inkubation für 10 min bei

## Material und Methoden

RT. Diese Mischung wurde daraufhin auf die Zellen getropft und 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde pro Well 1 µg des Plasmids RUSH-ManII-SBP-GFP mit 3 µl FuGENE® 6 in 100 µl DMEM aufgenommen, 30 min bei RT inkubiert, auf die Zellen pipettiert und weitere 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum Starten der Reaktion wurde dem erforderlichen Well eine finale Konzentration von 40 µM Biotin hinzugefügt und nach 9 min und 20 min bzw. 30 min nach einem kurzen Waschschrift mit PBS mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert. Zum Zeitpunkt 0 min wurde ohne Biotinzugabe fixiert. Nachdem die Zellen dreimal mit PBS gewaschen wurden, erfolgte eine Inkubation mit Antikörpern wie unter Abschnitt 2.3.6 beschrieben. Die weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ. Mit Hilfe der Programme ImageJ und Microsoft Office Excel wurde zur statischen Auswertung nach Abschluss der Experimente ein *t*-Test von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### **2.3.8 Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)-Assay**

Stabil überexprimierende HeLa-Zellen mit den Konstrukten CFP-markiertes RAB1A oder GFP-markiertes p115 wurden wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben ausgesät und transfiziert, jedoch nicht fixiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte bei 37 °C mit dem konfokalen Leica TCS SP8 Mikroskop, einem 63 × Ölimmersionsobjektiv (NA 1.4) und einer 5 × digitalen Vergrößerung. FRAP erfolgte bei punktartigen Strukturen, die für 0,75 s gebleicht und anschließend für 45 s mit einem Bild pro Sekunde aufgenommen wurden. Das FRAP-Experiment zur Überprüfung der Golgi-Integrität wurde unter gleichen Bedingungen, jedoch mit einem rechteckigen Bereich und einer Bildaufnahmedauer von 30 s durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ. Mit Hilfe der Programme ImageJ und Microsoft Office Excel wurde zur statischen Auswertung nach Abschluss der Experimente ein *t*-Test von drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

### **2.3.9 Elektronenmikroskopie**

Die Zellen wurden mit 1 % Glutaraldehyd in 0,2 M HEPES-Puffer mit pH 7,0 für 1 h bei RT fixiert und nach Waschen mit PBS und dest. Wasser in Uranylacetat und OsO<sub>4</sub> 1 h bei RT post-fixiert. Nach der Dehydrierung für jeweils 10 min durch verschiedene Ethanolgrade (25 %, 50 %, 70 %, 90 % und 100 %), wurden die Zellen in Epoxyharz Epon 812 eingebettet und für 72 h bei 60 °C polymerisiert. Nach der Anfertigung von Dünnschnitten mit dem Leica UC7 Ultramicrotome erfolgte die elektronenmikroskopische Analyse mit dem FEI Tecnai-12 Elektronenmikroskop, ausgestattet mit einer FEI VELETTA CCD Digitalkamera. Die weitere Auswertung der Bilder fand

mit der iTEM Software und mit Hilfe des *t*-Tests unter Verwendung von Microsoft Office Excel statt.

### **2.4 Biochemische Methoden**

#### **2.4.1 Immunpräzipitation**

Die Zellyse der HEK293T-Zellen für die endogene Immunpräzipitation (IP) und der HEK293T-Überexpressionszellen für die Hämagglutinin IP (HA-IP) erfolgte mit MCLB Puffer für 15 min auf Eis. Nach dem Entfernen der unlöslichen Bestandteile wie Zelldebris durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und  $21130 \times g$  wurde die Normalisierung der Proben mit Hilfe des Pierce™ BCA™ Protein Assay durchgeführt und das Lysat der endogenen IP anschließend mit 60 µl Protein A/G Plus Agarose in MCLB Puffer für eine Stunde bei 4 °C zur Vorreinigung inkubiert. Anschließend erfolgte die Antikörperinkubation mit dem α-C7orf43 Antikörper für die endogene IP mit einer Antikörperkonzentration von 2,5 µg über Nacht bei 4 °C. Nach der Zugabe von 60 µl Protein A/G Plus Agarose in MCLB Puffer wurde das Probenmaterial für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit MCLB Puffer gewaschen und nachdem den Beads 35 µl  $3 \times$  Lämmli-Probenpuffer hinzugefügt und 5 min bei 95 °C inkubiert wurde, konnten die Proben für die SDS-PAGE eingesetzt werden.

Nach dem Waschen der HA-Agarosebeads mit MCLB wurde zum Lysat für die HA-IP insgesamt 60 µl Beads pipettiert und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Beads bei  $376 \times g$  für 1 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads jeweils fünfmal mit MCLB und PBS gewaschen. Für den Einsatz der Proben zur SDS-PAGE wurden die Beads in 30 µl  $3 \times$  Lämmli-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C erhitzt und der Überstand direkt eingesetzt. Zum Einsatz in Native PAGE erfolgte die Elution der Proteine dreimal für jeweils 30 min bei RT mit 30 µl einer HA-PBS-Lösung, die 250 µg/ml HA enthielt. Anschließend konnte das Eluat direkt für die Native PAGE eingesetzt werden.

#### **2.4.2 Probenvorbereitung SDS-PAGE**

Nach Zentrifugation der überexprimierenden oder Kontroll-Zellen mit PBS bei  $194 \times g$  für 3 min bei RT wurde dem Pellet eine Menge äquivalent zum Pelletvolumen an RIPA-Puffer hinzugefügt, das Zellpellet gelöst und 15 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation bei  $21130 \times g$  für 10 min bei 4 °C wurden mit Hilfe des Pierce™ BCA™ Protein Assay die Proteinmengen der Proben normalisiert und mit  $3 \times$  Lämmli-Probenpuffer versetzt. Für die SDS-PAGE kam entsprechend der Experimentanforderung ein selbsthergestelltes 8 % oder 12 % Gel mit 4 % Sammelgel oder ein Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Protein Gel der Firma Thermo Fisher Scientific mit  $1 \times$  SDS-Laufpuffer zur Anwendung. Bei Gelen aus eigener Herstellung wurde bis

zum Erreichen des Trenngels eine Volteinstellung von 80 V und anschließend von maximal 120 V benutzt. Die Gele der Firma Thermo Fisher Scientific wurden mit einer konstanten Voltzahl von 125 V betrieben. Anschließend konnten die Gele für Immunblot oder zur Färbung und anschließender massenspektrometrischer Analyse verwendet werden.

### **2.4.3 Native PAGE**

Neben dem in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen HA-IP-Eluat konnte auch direkt Lysat für die Native PAGE verwendet werden. Hierfür wurde das Zellpellet, nach der Ernte mit PBS und einer Zentrifugation von  $194 \times g$  bei RT für 4 min, mit einer dem Pelletvolumen entsprechenden Menge NativePAGE™ Sample Buffer und einer berechneten finalen Konzentration von 1 % Digitonin versetzt und nach dem Lösen des Pellets für 30 min bei 4 °C und  $21130 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend für die Native PAGE eingesetzt werden. Hierfür wurde die innere Kammer mit Kathodenpuffer und die äußere Kammer mit Anodenpuffer gemäß Herstellerangaben befüllt. Anschließend fand die Elektrophorese bei 150 V statt. Das Gel konnte daraufhin für Immunblot oder eine massenspektrometrische Analyse eingesetzt werden.

### **2.4.4 Immunblot**

Für ein SDS-PAGE Gel wurde eine Nitrozellulosemembran eingesetzt und für Native PAGE Gele kamen PVDF-Membranen zum Einsatz. Die PVDF-Membran wurde vor der Verwendung 30 s in reinem Methanol äquilibriert. Der Immunblot erfolgte als Tankblot. Hierfür wurde in die Sandwichhalterung zunächst ein Blotschwamm, dann ein Whatmanpapier, anschließend das Gel, darauf die Membran, wieder ein Whatmanpapier und schließlich erneut ein Blotschwamm in ausreichend  $1 \times$  Wetblotpuffer platziert und in einen mit  $1 \times$  Wetblotpuffer gefüllten Blotbehälter platziert. Der Immunblot-Vorgang erfolgte bei 2 h mit konstanten 300 mA. Anschließend konnte die Membran zur Überprüfung des Bloterfolges mit Ponceau-S-Färbelösung gefärbt und gescannt werden. Nach Entfernung des Ponceau-S mit Hilfe eines TBS-T-Waschschrittes von 30 min wurde die Membran für eine Stunde bei RT in TBS-T mit 4 % Magermilch blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in TBS-T mit 0,4 % Magermilchlösung über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T für 10 min bei RT gewaschen. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper in ebenfalls TBS-T mit 0,4 % Magermilchlösung und jeweils drei Waschschritten für 10 min mit TBS-T wurde die Membran mit 1 ml Western Lightning® Plus-ECL versetzt und unter Verwendung von Röntgenfilmen entwickelt. Bei Bedarf an weiteren

## Material und Methoden

Antikörpern zur Analyse wurde mit Hilfe des Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer der gebundene Antikörper bei einer Inkubation von 15 min bei RT gelöst. Nach drei Waschschritten für 10 min mit TBS-T konnte die Membran erneut blockiert werden.

### **2.4.5 Gelfärbung und -entfärbung**

Für die Silberfärbung wurde das SilverQuest™ Silver Staining Kit und für die kolloidale Coomassie-Färbung das Colloidal Blue Staining Kit nach Herstellerangaben verwendet. Das Gel konnte in ultrapurem Wasser aufbewahrt, anschließend gescannt und Banden für eine massenspektrometrische Analyse ausgeschnitten werden. Bevor diese Banden für die massenspektrometrischen Methoden weiterverarbeitet werden konnten, musste die zuvor durchgeführte Färbung gemäß Herstellerangaben entfernt werden. Nach einer Inkubation für 10 min mit ultrapurem Wasser und dreimaligen Waschen für 20 min in Velos Pro Waschpuffer wurden die Proben mit 100 % ACN für 10 min dehydriert. Daraufhin konnten die Proben wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben weiterverarbeitet werden.

## **2.5 Massenspektrometrische Methoden**

### **2.5.1 HA-IP für MS**

Eingesetzt wurden vier konfluente 15 cm Zellkulturschalen mit HEK293T-Zellen, die das jeweilige Protein überexprimierten. Nach dem Ernten der Zellen mit PBS wurde das Zellpellet in MCLB mit Proteaseinhibitortabletten für 15 min auf Eis lysiert und anschließend bei  $21130 \times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin bei  $12000 \times g$  für 3 min bei  $4^\circ\text{C}$  mit Hilfe der Aufreinigungssäulen (Ultrafree-MC, VV  $0,1 \mu\text{m}$ ) filtriert. Nach dem Waschen der HA-Agarosebeads mit MCLB wurden zum Lysat insgesamt  $60 \mu\text{l}$  Beads pipettiert und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  rotierend inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Beads bei  $376 \times g$  für 1 min bei  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads jeweils fünfmal mit MCLB und PBS gewaschen. Mit Hilfe von drei Inkubationsschritten, jeweils 30 min bei RT mit  $50 \mu\text{l}$  einer HA-PBS-Lösung, die  $250 \mu\text{g/ml}$  HA enthielt, erfolgte die Elution der Proteine von den Beads. Nach Zugabe von  $36 \mu\text{l}$  100 % TCA zu dem Eluat und einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Proben bei  $21130 \times g$  für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Probe daraufhin  $500 \mu\text{l}$  10 % TCA hinzugefügt und anschließend bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 min bei  $21130 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Nachdem die Probe jeweils viermal mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen, bei  $21130 \times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Trocknung der Probe in der Vakuumzentrifuge bei  $30^\circ\text{C}$  für ungefähr 45 min. Das trockene Probenpellet wurde in 50 mM

## Material und Methoden

ABC mit 10 % ACN pH 8 aufgenommen und nachdem 0,5 µl Trypsin (Promega) hinzugefügt wurden, erfolgte der Peptidverdau für vier Stunden bei 37 °C. Daraufhin wurde das Trypsin mit 5 % FA/5 % ACN bei einer Inkubation von 10 min bei RT gestoppt und die Probe erneut für ca. 45 min bei RT in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend fand das Entsalzen durch *stage tipping* statt. Hierfür wurde eine 10–200 µl Pipettenspitze mit drei Plättchen des C18-Materials bestückt und anschließend mit 80 µl 100 % Methanol aktiviert. Nachdem mit 80 µl der 50 % ACN/5 % FA gewaschen wurde, erfolgte die Äquibrierung mit 80 µl 5 % FA/5 % ACN. Die trypsinverdaute Probe wurde daraufhin in die *stage tips* pipettiert und nach einem Waschschrift mit 80 µl 100 % FA erfolgte die Elution mit 40 µl 75 % ACN/5 % FA. Nach dem vollständigen Eindampfen der Probe mit Hilfe der Vakuumzentrifuge wurde die Probe in 10 µl 5 % FA/5 % ACN aufgenommen und in die Probenplatte der mit dem LTQ-Velos verbundenen HPLC pipettiert.

### 2.5.2 Ingel-Verdau

Die zuvor präparierten Gelstücke wurden dreimal für 20 min bei RT mit 200 µl Waschpuffer unter Schütteln bei 750 rpm (Thermomixer Comfort) gewaschen und der Überstand verworfen. Nach der Dehydrierung mit 200 µl 100 % ACN für 10 min bei RT wurde das Gelstück in der Vakuumzentrifuge für ungefähr 45 min bei RT getrocknet. Zur Reduzierung der Disulfidbrücken wurde die Probe bei 56 °C und 750 rpm in 200 µl Reduktionspuffer für 45 min geschüttelt. Anschließend erfolgte die Alkylierung für 30 min bei RT, lichtgeschützt mit 750 rpm durch den Alkylierungspuffer. Nachdem das Gelstück zweimal für 20 min mit 200 µl Waschpuffer bei 750 rpm und RT gewaschen wurde, erfolgte die Dehydrierung mit 200 µl 100 % ACN für 15 min bei RT und 750 rpm. Das Gelstück wurde daraufhin mit der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Zur Vorbereitung des Trypsinverdaus wurde die Probe mit 40 µl 20 mM ABC/12,5 ng/µl Trypsin für 10 min bei 22 °C bei 750 rpm aufgeschwemmt und anschließend mit 80 µl 20 mM ABC bedeckt. Der Trypsinverdau erfolgte über Nacht bei 37 °C und 750 rpm. Vor der Peptidextraktion aus den Gelstücken wurde der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführt und zu den verbleibenden Gelstücken 100 µl 30 % ACN/3 % TFA pipettiert und für 30 min bei RT mit 750 rpm inkubiert. Der Überstand der einzelnen Extraktionsschritte wurde daraufhin ebenfalls in diesem Eppendorfggefäß gesammelt. Nach einer Inkubation mit 100 µl 80 % ACN/0,5 % AA für 30 min bei RT mit 750 rpm folgte ein finaler Extraktionsschritt unter Verwendung von 100 µl 100 % ACN für 30 min bei RT und 750 rpm. Die gesammelten Überstände wurden in der Vakuumzentrifuge bis auf ungefähr 100 µl eingetrocknet und anschließend für das Entsalzen durch *stage tips* eingesetzt. Hierfür wurden zunächst zwei Plättchen aus C18-Material in eine Pipettenspitze gegeben und diese mit 100 µl

## Material und Methoden

100 % Methanol aktiviert. Bevor die Probe nach der Äquilibration des *stage tips* mit 200 µl Lösung A\* hinzupipettiert werden konnte, musste sie mit Lösung A\* auf einen pH-Wert von unter 3 eingestellt werden. Anschließend wurde das *stage tip* mit 200 µl Lösung A gewaschen. Nach der Eluierung der Probe von dem *stage tip* mit 50 µl Lösung B wurde diese mit Hilfe der Vakuumzentrifuge auf unter 9 µl eingetrocknet. Nachdem die Probe auf 9 µl mit LiChroSolv-Wasser aufgefüllt und ihr 1 µl Lösung A\* hinzugefügt worden war, wurde sie in die Probenplatte der mit dem Velos Pro verbundenen Chromatographie zur Messung pipettiert.

### **2.5.3 Chromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie-Analysen**

Die Chromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)-Messungen zur Generierung der Netzwerke mit der linearen Ionenfalle LTQ-Velos, gekoppelt an die UHPLC Dionex UltiMate 3000, erfolgte wie bei (Behrends et al., 2010) beschrieben. Die Spektren wurden mit Hilfe des Programms CompPass analysiert. Hierfür wurden 215 unabhängige Bait-Proteine in der gleichen Art und Weise gemäß (Behrends et al., 2010; Sowa et al., 2009) bearbeitet und der  $WD^N$ -Score mit dem CompPass eigenen Algorithmus unter Berücksichtigung der AvePSM berechnet.

Die LC-MS/MS-Analysen der gelelektrophoretischen Proben wurden mit Hilfe des LTQ-Velos Pro inklusive Orbitap Elite, gekoppelt an die EASY-nLCII, durchgeführt. Die Messungen sowie die Auswertung der Proben mit Hilfe des Programmes MaxQuant Version 1.2.2.5 erfolgten gemäß (Schaeffer et al., 2014).

### 3. Ergebnisse

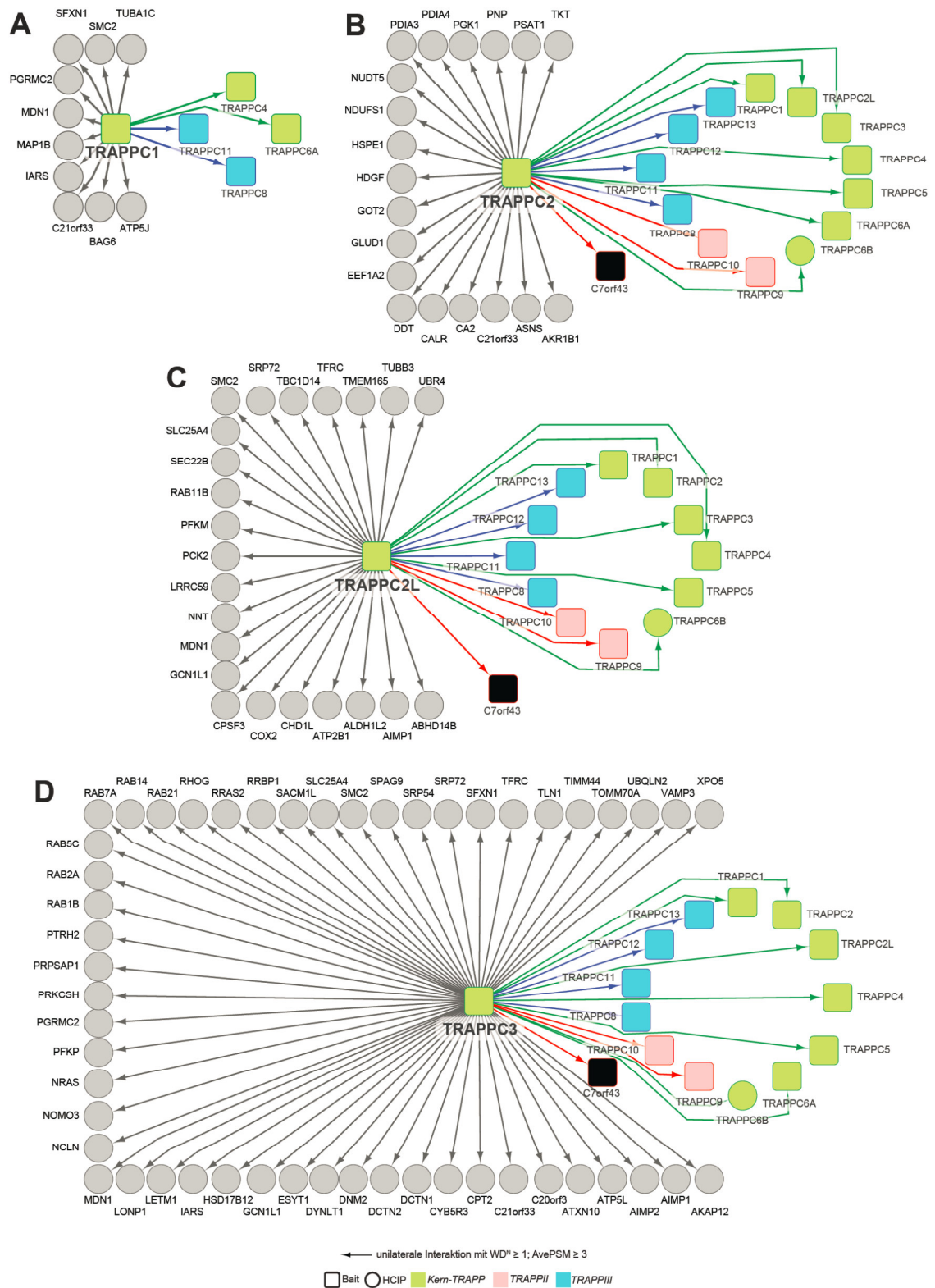
#### 3.1 Identifizierung neuer TRAPP Komplex Interaktionspartner

Zur Identifizierung unbekannter Bindepartner der TRAPP Komplexe wurden Interaktionsnetzwerkstudien der in Säugerzellen bekannten TRAPP Komplexmitglieder mit Ausnahme von TRAPPC6B durchgeführt. Hierfür wurde die *open reading frames* (ORFs) der TRAPP Proteine amino (N)-terminal mit einer Hämagglutinin-Markierung (HA) versehen und stabil oder transient in HEK293T oder T-REx™-293 exprimiert. Mit Hilfe der HA-Markierung wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt und das Interaktom der TRAPP Proteine durch massenspektrometrische Analysen mittels Flüssigchromatographie-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ermittelt. Die Analyse und Auswertung der in der Massenspektrometrie gewonnenen Daten und die Erstellung der Interaktionsnetzwerke durch die Softwareplattform CompPASS erfolgte wie in vorausgehenden Arbeiten beschrieben (Behrends et al., 2010; Sowa et al., 2009).

In der Analyse von TRAPPC1 wurden die Kern TRAPP Mitglieder TRAPPC4 und TRAPPC6A als Interaktoren identifiziert. Weitere Mitglieder des TRAPP II Komplexes wurden unter Verwendung des Grenzwertes von  $WD^N \geq 1$ ;  $AvePSM \geq 3$  nicht nachgewiesen. Interessanterweise wurden mit TRAPPC8 und TRAPPC11 jedoch zwei Proteine des TRAPP III Komplexes als Interaktoren von TRAPPC1 gefunden. Dagegen konnten in den IPs von TRAPPC2, TRAPPC2L, TRAPPC3, TRAPPC4, TRAPPC5 und TRAPPC6A alle bisher bekannten TRAPP Proteine identifiziert werden. Ausnahmen stellten nur TRAPPC6A und TRAPPC6B dar, welche in den Interaktomen von TRAPPC2L und TRAPPC4 bzw. in dem Interaktionsnetzwerk von TRAPPC6A fehlten. Durch die sehr hohe Sequenzähnlichkeit zwischen TRAPPC6A und TRAPPC6B kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Peptide, die in beiden Proteinen vorkommen, in der bioinformatischen Prozessierung nur einem der beiden zugeordnet wurden. Als weitere Interaktoren einzelner Kern TRAPP Proteine wurden sowohl ER, ERGIC und Golgi-Apparat lokalisierte Proteine als auch mitochondriale, zytoplasmatische und nukleäre Proteine nachgewiesen (Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3). Darüberhinaus ließ sich das uncharakterisierte Protein C7orf43 als gemeinsamer Interaktor aller Kern TRAPP Proteine mit Ausnahme von TRAPPC1 nachweisen.

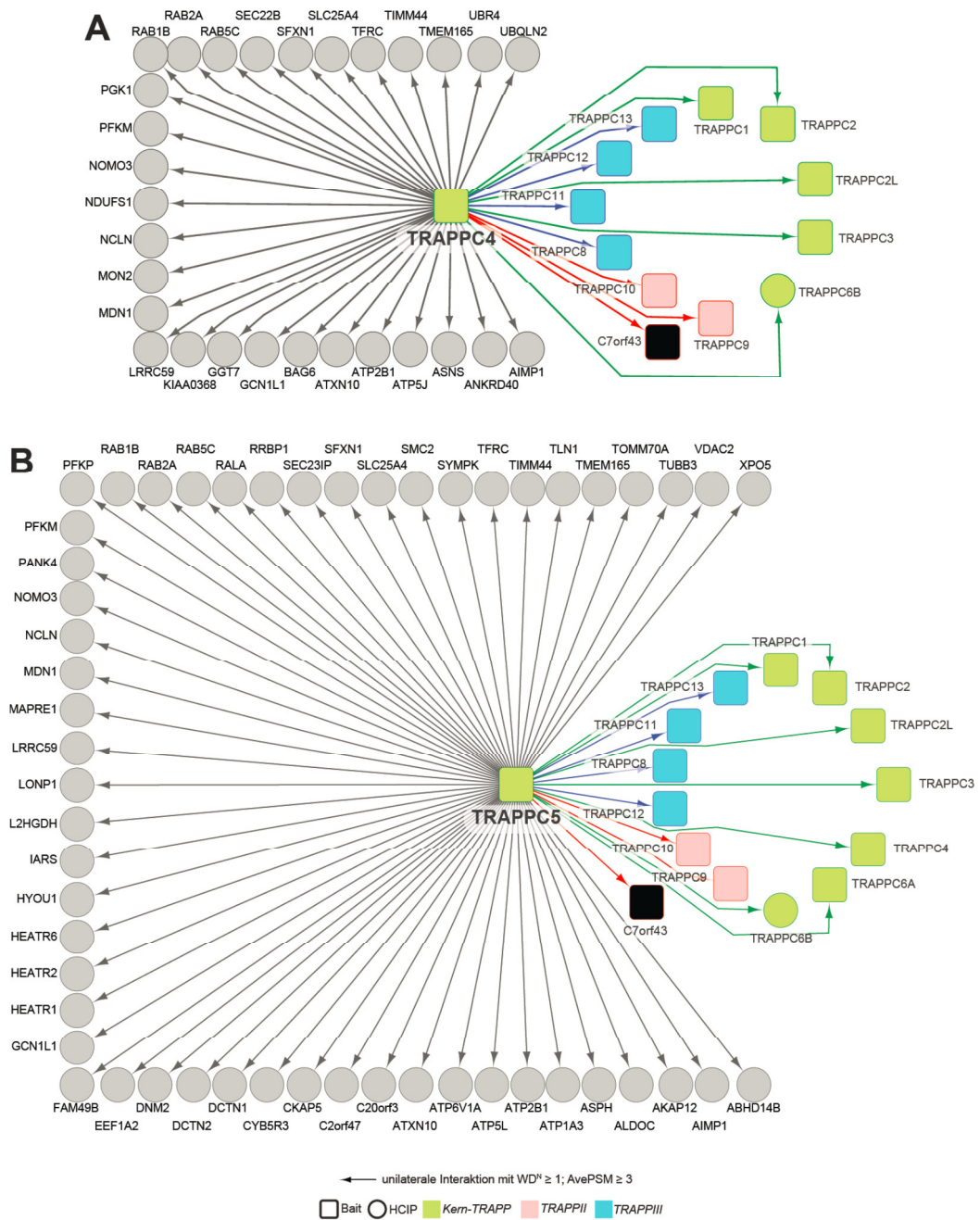


## Ergebnisse



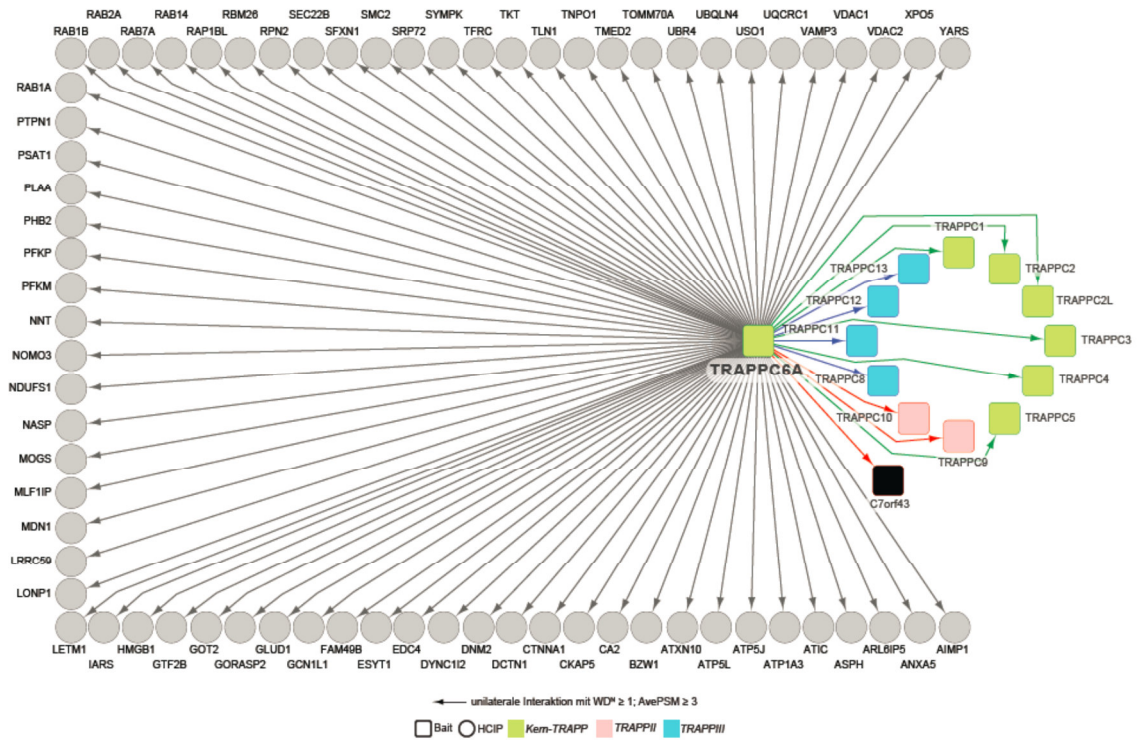
**Abb. 3.1:** Interaktom der Kern TRAPP Untereinheiten TRAPPC1, TRAPPC2, TRAPPC2L und TRAPPC3. CompPass Analyse der in der HA-IP-MS ermittelten Daten. Kern TRAPP Mitglieder sind grün, TRAPPII-Untereinheiten rot und TRAPPIII-Untereinheiten blau dargestellt. Proteine, die als Bait eingesetzt wurden, sind mit einem rechteckigen und HCIPs mit einem runden Symbol dargestellt. Der Grenzwert wurde bei  $WD^N \geq 1$ ; AvePSM  $\geq 3$  festgelegt. HCIP: *High confidence candidate interacting proteins*,  $WD^N$ : *Normalized Weighted D-score*, AvePSM: *Average peptide spectral match*.

# Ergebnisse



**Abb. 3.2: Interaktom der Kern TRAPP Untereinheiten TRAPPC4 und TRAPPC5.** Die Farbcodierung der TRAPP Proteine, die verwendeten Grenzwerte als auch die Darstellung der Baits und HCIPs erfolgt analog zu Abbildung 3.1.

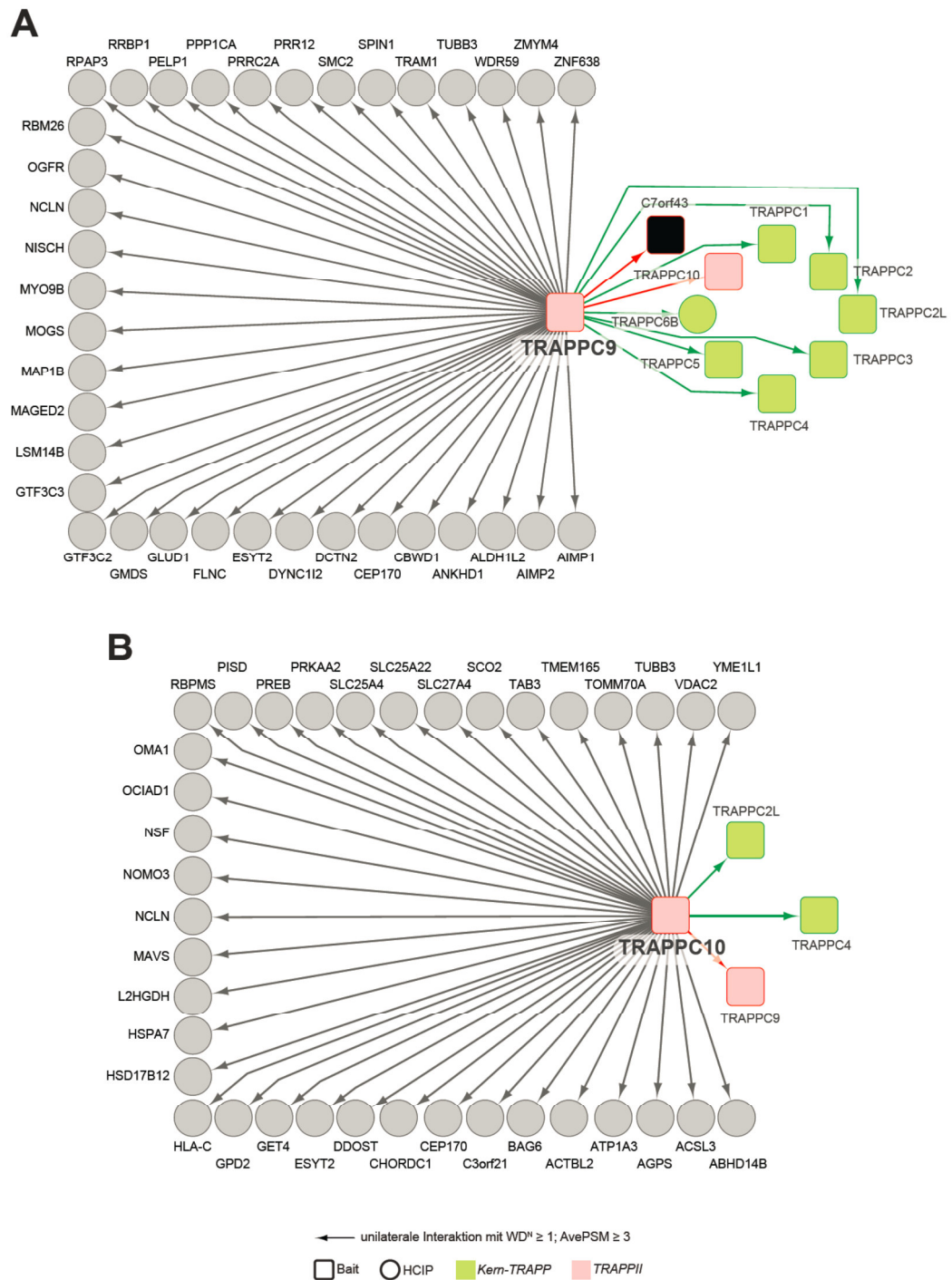
## Ergebnisse



**Abb. 3.3: Interaktom der Kern TRAPP Untereinheit TRAPPC6A.** Die verwendeten Grenzwerte, die Farbcodierung der TRAPP Proteine als auch die Darstellung der Baits und HCIPs erfolgt entsprechend zu Abbildung 3.1.

In der Analyse von TRAPPC9 wurden sowohl die Kern TRAPP Proteine TRAPPC1, TRAPPC2, TRAPPC2L, TRAPPC3, TRAPPC4, TRAPPC5 und TRAPPC6B als auch das TRAPPII spezifische Protein TRAPPC10 als Interaktoren nachgewiesen. Interessanterweise wurde auch in dieser Analyse das uncharakterisierte Protein C7orf43 detektiert. Die Analyse von TRAPPC10 weist als TRAPP-Interaktoren mit dem genannten Grenzwerten lediglich TRAPPC2L, TRAPPC4 und TRAPPC9 auf (Abbildung 3.4).

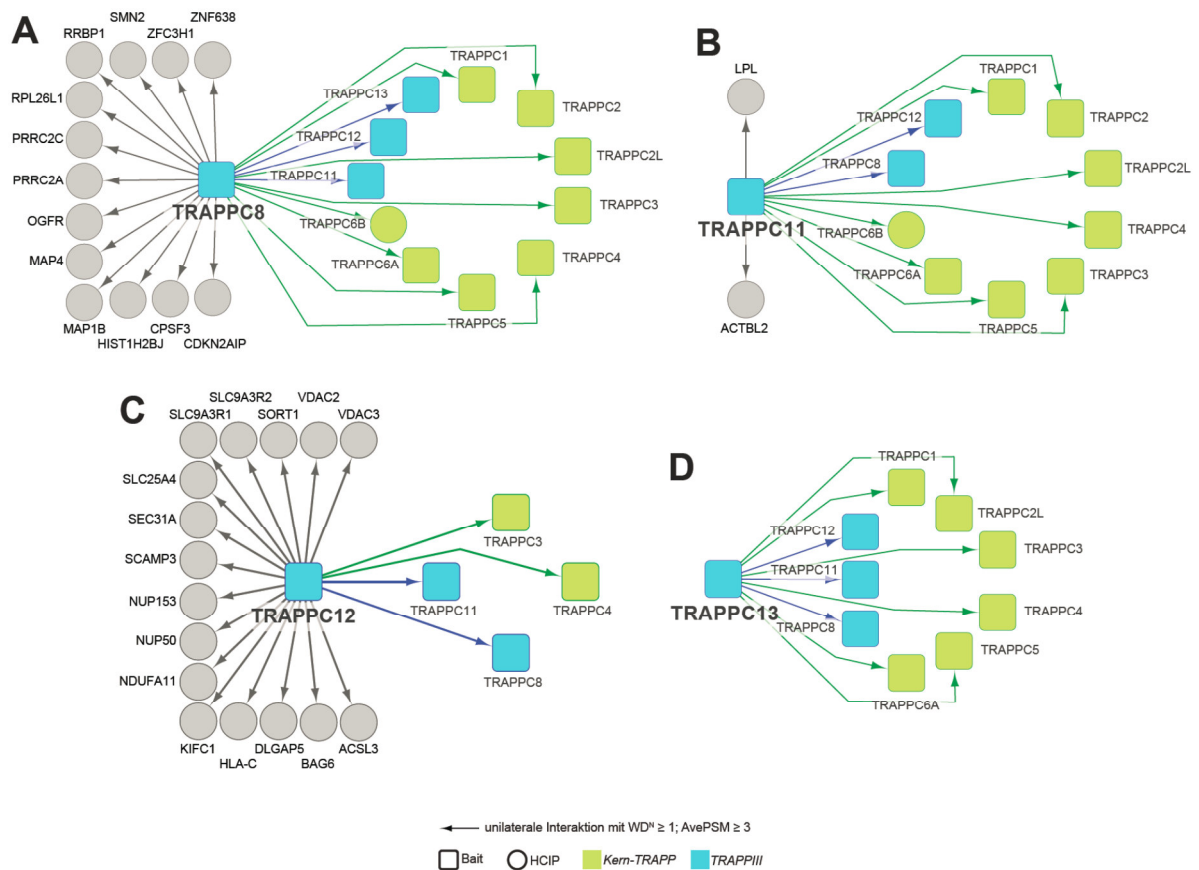




**Abb. 3.4: Interaktom der TRAPPII Untereinheiten TRAPPC9 und TRAPPC10.** Die farbliche Gruppierung der TRAPP Proteine, die verwendeten Grenzwerte als auch die Darstellung der Baits und HCIPs erfolgt gemäß Abbildung 3.1.

In der Interaktionsanalyse von TRAPPC8, TRAPPC11, TRAPPC12 und TRAPPC13 konnten fast alle bisher bekannten TRAPP Proteine des Kern TRAPP und des TRAPPIII Komplexes identifiziert werden. Ausnahmen bilden hier TRAPPC13 bzw. TRAPPC11 und TRAPPC12 in deren Interaktomen Komponenten des Kern TRAPP Komplexes bzw. TRAPPC13 fehlten. Darüberhinaus wurden sowohl Mitglieder des TRAPPII Komplexes als auch C7orf43 nicht als Interaktoren der TRAPPIII Komplexuntereinheiten identifiziert (Abbildung 3.5).

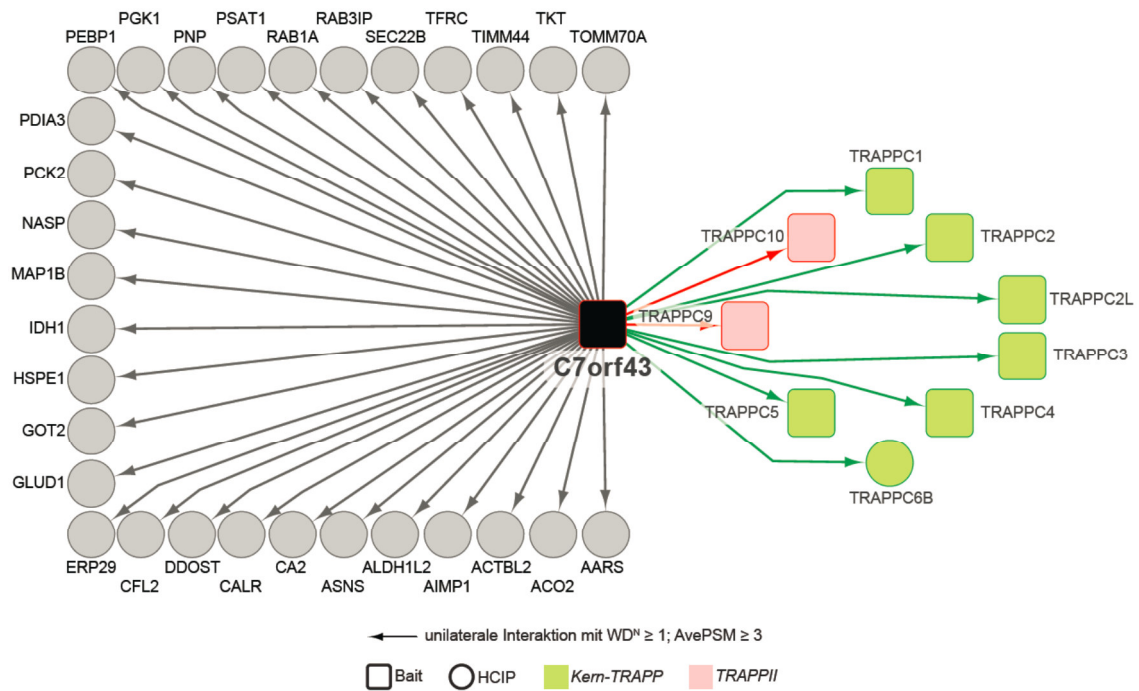
## Ergebnisse



**Abb. 3.5: Interaktom der TRAPPIII Untereinheiten TRAPPC8, TRAPPC11, TRAPPC12 und TRAPPC13.** Die Farbcodierung der TRAPP Proteine, die verwendeten Grenzwerte als auch die Darstellung der Baits und HCIPs erfolgt analog zu Abbildung 3.1.

Die Tatsache, dass das uncharakterisierte Protein C7orf43 sowohl bei den Kern TRAPP Mitgliedern als auch bei der TRAPPII-spezifischen Komponente TRAPPC9 als Interaktor identifiziert werden konnte, deutet darauf hin, dass es sich bei C7orf43 eventuell um eine weitere TRAPP Komplexuntereinheit handeln könnte. Um diese Hypothese initial zu überprüfen, wurde mit C7orf43 ebenfalls eine Interaktionsstudie durchgeführt (Abbildung 3.6). In dieser Analyse wurden sowohl alle Kern TRAPP als auch die TRAPPII Untereinheiten TRAPPC9 und TRAPPC10 als Interaktoren identifiziert.

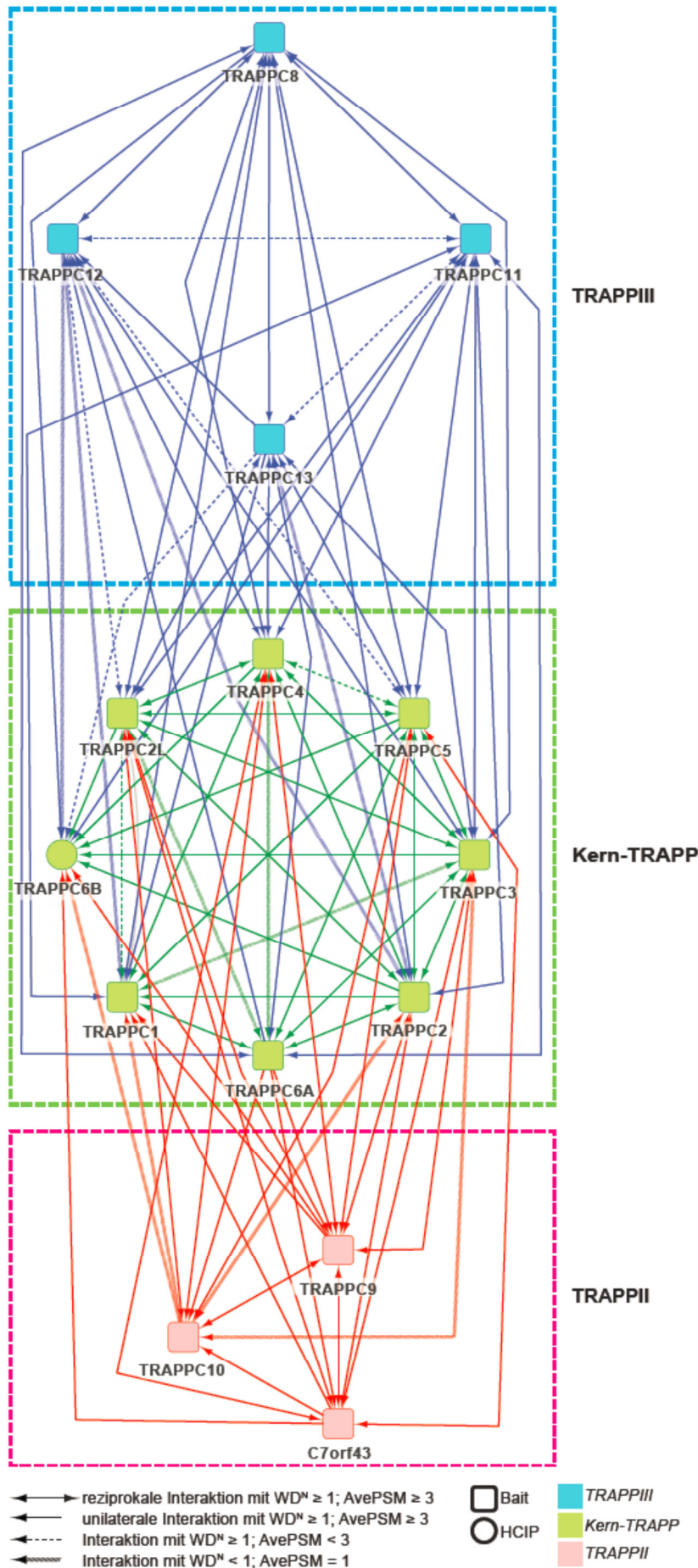
## Ergebnisse



**Abb. 3.6: Interaktom von C7orf43.** Die verwendeten Grenzwerte, die Farbcodierung der TRAPP Proteine als auch die Darstellung der Baits und HCIPs erfolgt entsprechend zu Abbildung 3.1.

Zur Verdeutlichung der Interaktionen zwischen den TRAPP Komplexuntereinheiten und der Verbindung zu C7orf43 wird in Abbildung 3.7 eine Gesamtnetzwerkanalyse präsentiert. Aufgrund der Interaktion von C7orf43 mit den Mitgliedern des Kern TRAPP und TRAPPII Komplexes und der dadurch zu den TRAPPII Untereinheiten vergleichbaren Wechselbeziehung zwischen Kern TRAPP und dem TRAPPII Komplex wurde C7orf43 in den Abbildung 3.7 und 3.8 bei den TRAPPII Komplexmitgliedern eingruppiert.

Das Gesamtnetzwerk zeigt die reziproke Interaktion der Mitglieder des Kern TRAPP Komplexes zu den Untereinheiten von TRAPPII und TRAPPIII. Ebenfalls hervorzuheben ist, dass es keine Komplex übergreifende Interaktionen zwischen den TRAPPII und TRAPPIII Untereinheiten zu geben scheint. Durch die farblichen Markierungen werden zusätzlich die Komplex internen Interaktionen hervorgehoben. Die Interaktionen des uncharakterisierten Proteins C7orf43 sind mit denen der TRAPPII Untereinheiten untereinander vergleichbar. Die Gesamtnetzwerkanalyse wird in Abbildung 3.8 zusätzlich als Heat Map Diagramm präsentiert, um die zuvor beschriebenen Interaktionen zwischen den TRAPP Komplexuntereinheiten und C7orf43 nochmals zu verdeutlichen. Auch zeigt das Heat Map Diagramm, dass erwartete Interaktionen, wie z. B. zwischen den Kern TRAPP Proteinen TRAPPC1 und TRAPPC2, nur einseitig nicht identifiziert wurden. Lediglich Interaktionen zwischen den Untereinheiten der TRAPPII und TRAPPIII Komplexe sind in keinstenweise zu verzeichnen.

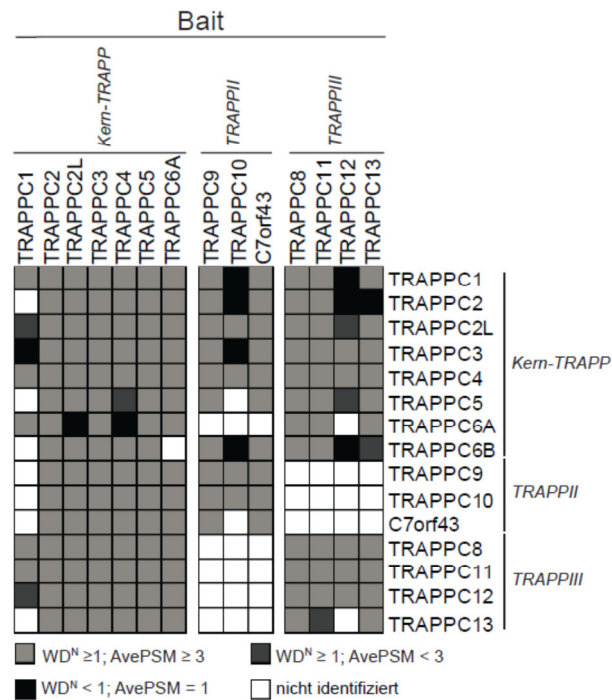


**Abb. 3.7: Gesamtnetzwerk der TRAPP Komplexuntereinheiten.**

Kern TRAPP Mitglieder werden grün, TRAPPII Untereinheiten rot und TRAPPIII Proteine blau gekennzeichnet.

Proteine, die als Bait eingesetzt wurden, werden mit einem rechteckigen und HCIPs mit einem runden Symbol abgebildet. Es wurden drei verschiedene Thresholds verwendet.





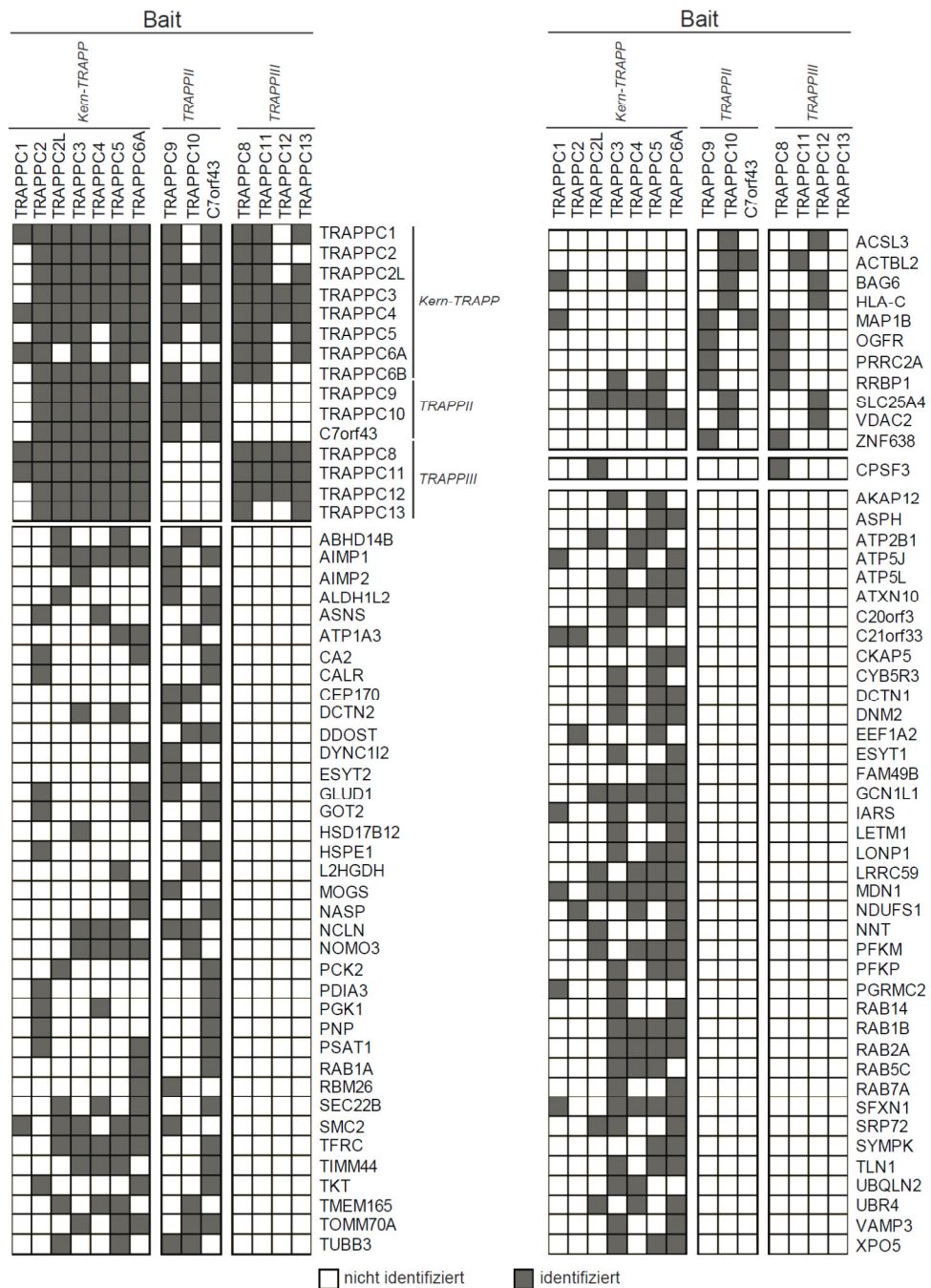
**Abb. 3.8: Gesamtnetzwerk der TRAPP Komplex Untereinheiten als Heat Map.** Es wurden drei verschiedene Thresholds verwendet. 1.) Grau:  $WD^N \geq 1$ ; AvePSM  $\geq 3$ . 2.) Dunkelgrau:  $WD^N \geq 1$ ; AvePSM  $< 3$ . 3.) Schwarz:  $WD^N < 1$ ; AvePSM = 1. Sowie weiße Kästchen, wenn keine Identifizierung vorlag.

Die Einzelinteraktionsnetzwerke der TRAPP Komplexuntereinheiten und von C7orf43 enthielten eine Vielzahl verschiedener intrazellulärer Proteine. Zur Hervorhebung von Proteinen, die sowohl mit mehreren TRAPP Mitgliedern also auch mit C7orf43 assoziiert gefunden wurden, dient die Abbildung 3.9. Zum Beispiel wurden als gemeinsame Interaktoren zwischen den Kern TRAPP Untereinheiten und den TRAPPII-spezifischen Komponenten mitochondriale (ALDH1L2, GLUD1, L2HGDH, TOMM70A), zytoplasmatische (ABHD14B, AIMP2, DCTN2, DYNC112, TUBB3), Membran- (ATP1A3, NOMO3) und nukleäre Proteine (SMC2) identifiziert. Weitere Interaktionsproteine sind im ER und Golgi vertreten als auch in die pre- und post-Golgi Sekretionswege involviert (AIMP1, HSD17B12, MOGS, NCLN, TMEM165). C7orf43 zeigte einige gemeinsame Interaktionspartner mit Kern TRAPP Mitgliedern, die weder bei TRAPPC9 noch bei TRAPPC10 identifiziert wurden. Hierbei handelte es sich um das zytosolische Protein ASNS, das Chaperon HSPE1, mitochondriale Proteine (GOT2, PCK2, TIMM44), zytoplasmatische (NASP, PGK1, PNP, PSAT1), Membranproteine (CA2, TFRC, TKT) und in ER und Golgi-Apparat bzw. in pre- und post-Golgi Sekretionswege lokalisierte Proteine (CALR, PDIA3, RAB1A, SEC22B). Auch für die TRAPPII Mitglieder und C7orf43 wurden gemeinsame Interaktionspartner nachgewiesen, die nicht bei den Kern TRAPP Untereinheiten identifiziert wurden. Zwischen TRAPPC9 und TRAPPC10 handelte es sich hierbei um CEP170,



## Ergebnisse

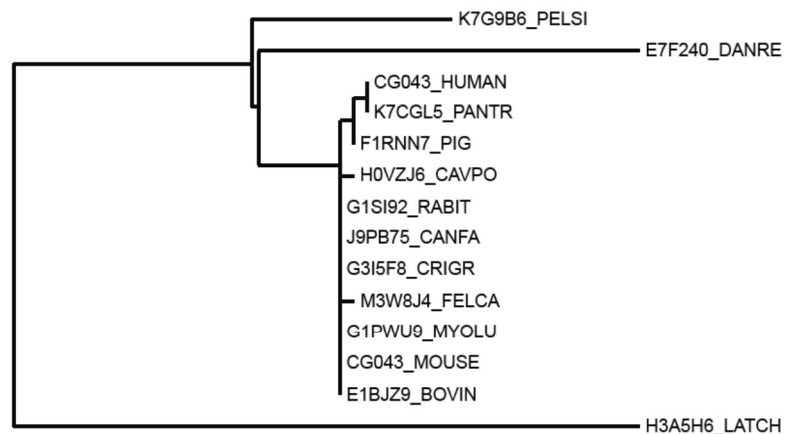
ein zytoplasmatisches Protein, und ESYT2, ein Protein, das sowohl in der Zellmembran als auch in der ER-Membran zu finden ist. Als gemeinsamer Interaktionspartner zwischen TRAPPC10 und C7orf43 ist mit DDOST, ein ER-Membranprotein zu nennen. Innerhalb aller Kern TRAPP als auch aller TRAPP II bzw. TRAPP III Komplexmitglieder wurden ebenfalls gemeinsame Interaktoren identifiziert. Gemeinsame Interaktionspartner zwischen den drei Komplexen sind das Chaperon BAG6, das zytoplasmatische Protein MAP1B, das in der ER-Membran lokalisierte RRBP1 und die mitochondrialen Proteine SLC25A4 und VDAC2. Innerhalb TRAPP II und TRAPP III wurden das ER Protein ACSL3, die zytoplasmatischen Proteine ACTBL2, OGFR und PRRC2A, das Membranprotein HLA-C und das Nukleusprotein ZNF638 als gemeinsame Interaktoren identifiziert. Bei CPSF3, das im Nukleus lokalisiert ist, handelte es sich um den einzigen identifizierten Interaktor zwischen Kern TRAPP und TRAPP III Komplex. Auch innerhalb der Kern TRAPP Mitglieder konnten Interaktoren identifiziert werden, die ausschließlich hier nachgewiesen wurden. Identifiziert wurden sowohl zytoplasmatische (AKAP12, ATXN10, CKAP5, DCTN1, DNM2, IARS, PFKM, PFKP, SRP72), mitochondriale (ATP5J, ATP5L, C21orf33, LETM1, LONP1, NDUFS1, NNT, SFXN1), Membran- (ASPH, ATP2B1, C20orf3, FAM49B, GCN1L1, PGRMC2) und Nukleusproteine (EEF1A2, MDN1) als auch Proteine, die im ER und Golgi lokalisiert bzw. in pre- und post-Golgi Sekretionswege involviert sind (CYB5R3, ESYT1, LRRC59, RAB14, RAB1B, RAB2A, RAB5c, RAB7A, VAMP3). Ebenfalls gemeinsame Interaktoren sind die E3-Ubiquitin-Proteinligase UBR4 und das UPS- bzw. Autophagieprotein UBQLN2.



**Abb. 3.9: Interaktion intrazellulärer Proteine der TRAPP Komplex Untereinheiten und C7orf43 als Heat Map.** Die als Bait eingesetzten Proteine befinden sich jeweils am oberen Teil der Heat Map. Auf der linken Seite werden zunächst die TRAPP-internen Interaktionen und anschließend identifizierte gemeinsame Interaktoren zwischen Kern TRAPP, TRAPP II und C7orf43 aufgelistet. Auf der rechten Seite folgen gemeinsame Interaktoren zwischen den drei Komplexen und C7orf43, gefolgt von Interaktoren zwischen Kern TRAPP und TRAPP II und zuletzt ausschließlich Kern TRAPP-spezifische Interaktoren. Als identifiziert werden Proteine bezeichnet, die sich innerhalb des Grenzwerts von  $WD^N \geq 1$ ; AvePSM  $\geq 3$  befanden und in mindestens zwei TRAPP-IP-MS Analysen als Interaktor identifiziert wurden, sie sind grau gekennzeichnet. Weiße Kästchen zeigen nicht identifizierbare Interaktionen mit dem oben genannten Grenzwert auf.

### 3.2 Konservierung von C7orf43

Über die Funktion des uncharakterisierten Proteins C7orf43 war vor dieser Studie nichts bekannt. Es ist in Hefe und Prokaryoten nicht vertreten, jedoch in Vertebraten konserviert. Die Abbildung 3.10 zeigt die evolutionäre Verbindung von C7orf43 in verschiedener Wirbeltiere wie z. B. Zebrafisch (*Danio rerio*, DANRE), Hausmaus (*Mus musculus*, MOUSE), Schimpanse (*Pan troglodytes*, PANTR) und Mensch (*Homo sapiens*, HUMAN). Die Daten entstammen der Datenbank Uniprot.

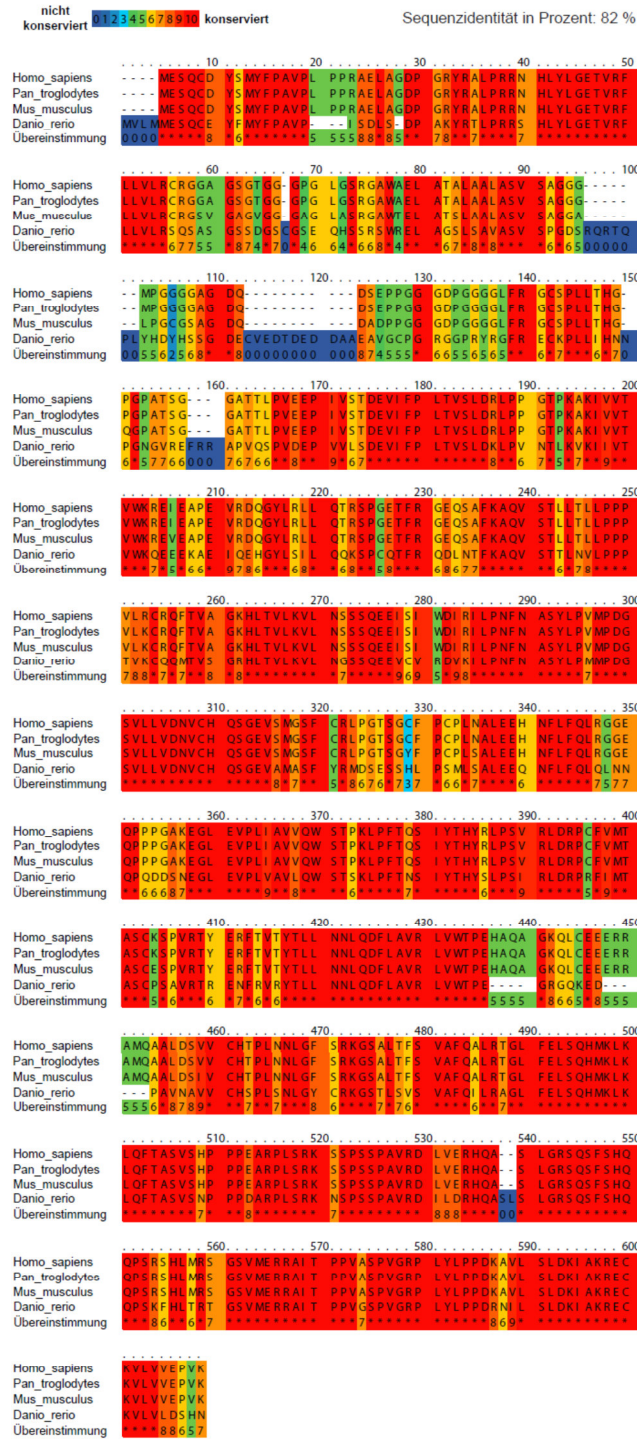


**Abb. 3.10: Phylogenetischer Baum verschiedener Vertebraten.** PELSI: *Pelodiscus sinensis*, chinesische Weichschildkröte; DANRE: *Danio rerio*, Zebrafisch; HUMAN: *Homo sapiens*, Mensch; PANTR: *Pan troglodytes*, Schimpanse; PIG: *Sus scrofa*, Schwein; CAVPO: *Cavia porcellus*, Meerschweinchen; RABIT: *Oryctolagus cuniculus*, Hase; CANFA: *Canis lupus familiaris*, Hund; CRIGR: *Cricetulus griseus*, chinesischer Hamster; FELCA: *Felis catus*, Katze; MYOLU: *Myotis lucifugus*, Mausohrfledermaus; MOUSE: *Mus musculus*, Hausmaus; BOVIN: *Bos taurus*, Hausrind; LATCH: *Latimeria chalumnae*, Komoren-Quastenflosser. Generiert mit Hilfe des Programmes Phylogeny (<http://phylogeny.lirmm.fr/>)

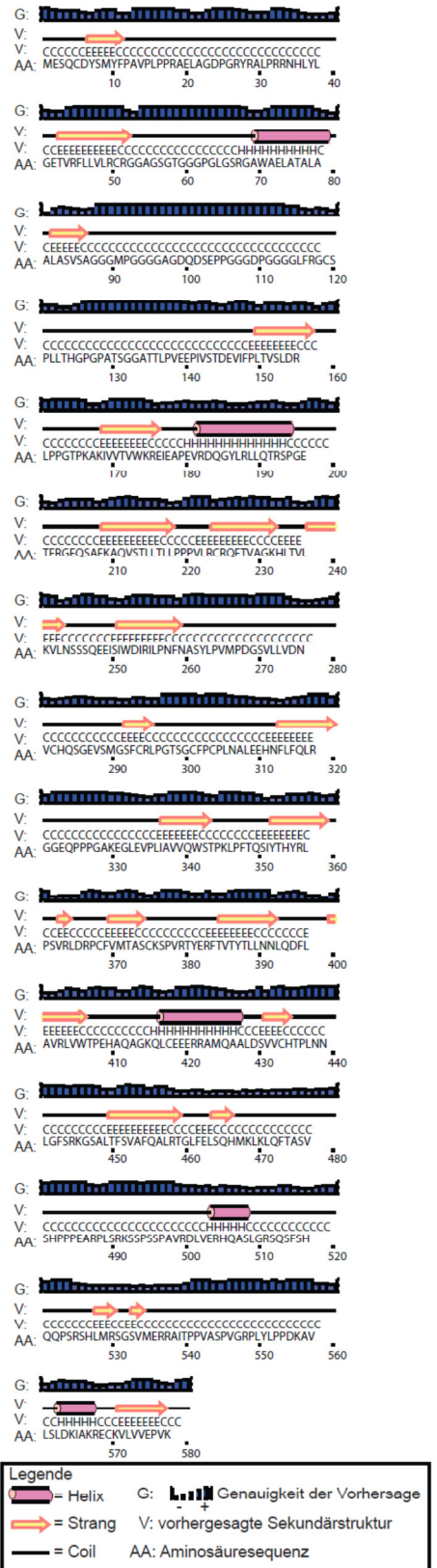
Innerhalb dieser vier unterschiedlichen Vertebratenarten weist die mRNA eine Sequenzübereinstimmung von 82 % auf (Abbildung 3.11 A). Das humane Protein C7orf43 besitzt dabei jedoch keine auffälligen Domänen oder Strukturen (Abbildung 3.11 B), die einen Hinweis auf seine Funktion liefern könnten.

# Ergebnisse

## A



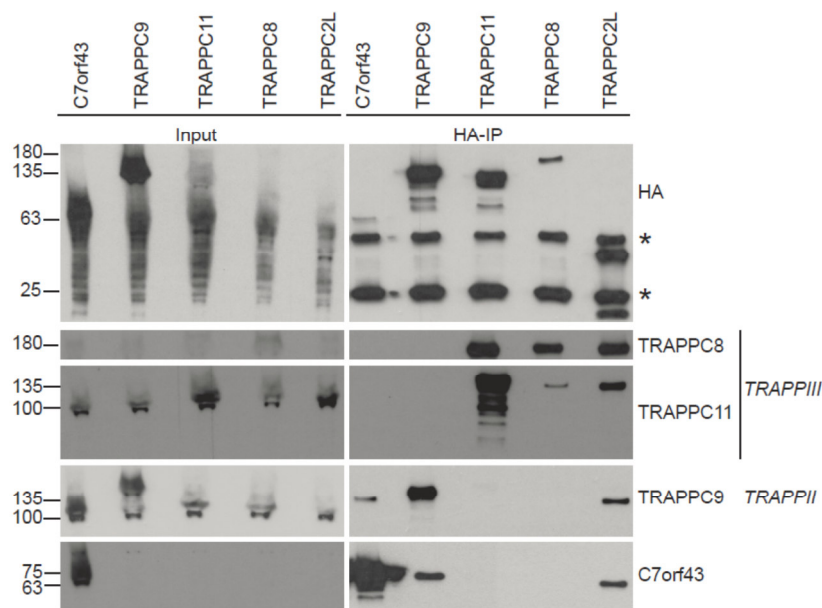
## B



**Abb. 3.11: Sequenzvergleich und Strukturvorhersage.** A) Aminosäurenübereinstimmung von C7orf43 zwischen Mensch, Schimpanse, Maus und Zebrafisch mit Hilfe des Programms PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>)  
 B) Sekundärstrukturvorhersage des humanen C7orf43 mit Hilfe des Programms psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)

### 3.3 Validierung von C7orf43 als Kern TRAPP und TRAPP II Interaktor

Da es sich bei C7orf43 nach den Ergebnissen der Interaktionsnetzwerkstudien um ein potenzielles neues Mitglied der TRAPP Komplexe handelt, sollten im Folgenden die Interaktion von C7orf43 innerhalb der verschiedenen TRAPP Komplexe verifiziert und genauer untersucht werden. Dafür wurden die bereits in der massenspektrometrischen Analyse verwendeten überexprimierenden Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser HA-IP Immunblot-Analyse werden in Abbildung 3.12 präsentiert.



**Abb. 3.12: C7orf43 interagiert mit Untereinheiten des Kern TRAPP und des TRAPP II Komplexes im HA-IP Immunblot.** Es wurden HEK293T Überexpressionszellen mit HA-C7orf43, HA-TRAPPC2L, HA-TRAPPC9 und HA-TRAPPC11 und eine T-REx™-293 überexprimierende Zelle induziert mit Doxycyclin für HA-TRAPPC8 verwendet. Zur Kontrolle der erfolgreichen Überexpression kam der HA-Antikörper zur Anwendung. Sterne markieren die schwere und leichte Kette des zur IP eingesetzten Antikörpers. Die linke Seite der Darstellung zeigt die jeweiligen Inputs, die rechte die Ergebnisse nach der HA-IP.

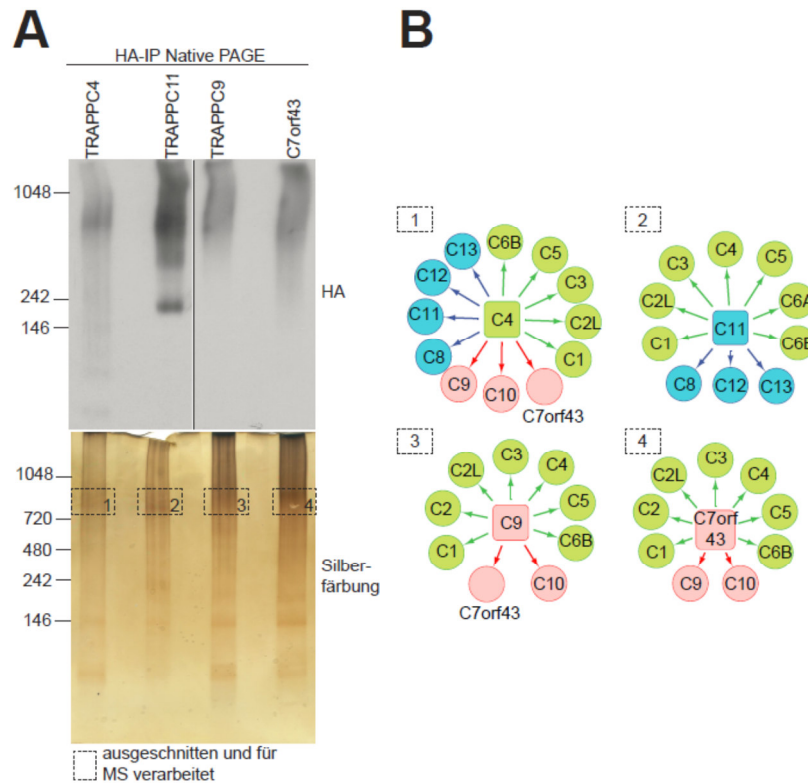
Die Co-IP wurde mit C7orf43, TRAPPC9 als Vertreter des TRAPP II Komplexes, TRAPPC2L als Kern TRAPP Protein und TRAPPC8 und TRAPPC11 als TRAPP III Mitglieder durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der proteomischen Analyse interagierte TRAPPC2L sowohl mit Proteinen des TRAPP II und TRAPP III Komplexes als auch mit C7orf43. Die Interaktion von TRAPPC9 mit C7orf43 konnte ebenfalls bestätigt werden. Die Co-IP in umgekehrter Richtung validiert zusätzlich die Interaktion von C7orf43 mit TRAPPC9 und mit TRAPPC2L. Die Ergebnisse der HA-IP mit anschließender Immunblot-Analyse bestätigten somit die Resultate der massenspektrometrischen Interaktomstudien.

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob C7orf43 mit einzelnen TRAPP Untereinheiten wechselwirkt oder Teil des TRAPP II Komplexes ist. Hierfür wurde mit Hilfe der N-terminal



## Ergebnisse

markierten überexprimierenden Zellen eine HA-IP gekoppelt mit einer Native PAGE Analyse durchgeführt. Die Auswertung erfolgte parallel mittels Immunblot und Massenspektrometrie (MS) (Abb. 3.13).



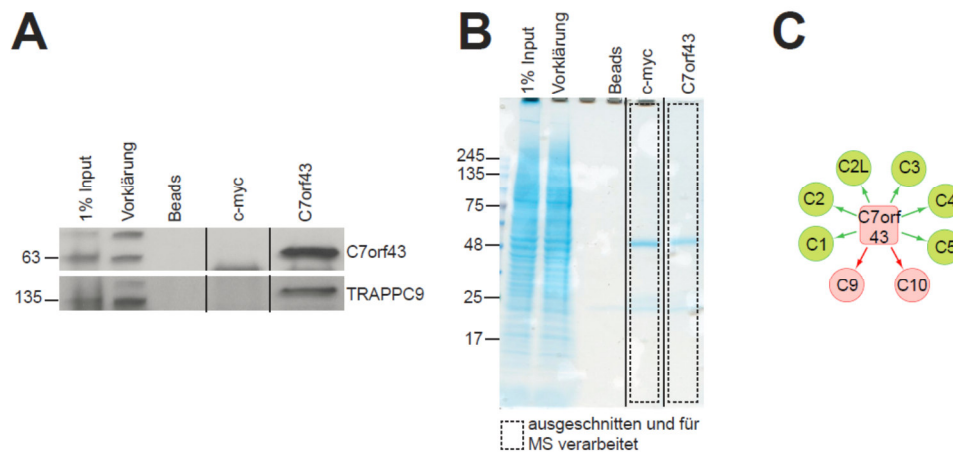
**Abb. 3.13: C7orf43 interagiert mit den Kern TRAPP und TRAPPII Komplexen im HA-IP Immunblot und der MS-Analyse.** Verwendet wurden HEK293T Überexpressionszellen mit HA-TRAPPC4, HA-TRAPPC9, HA-TRAPPC11 und HA-C7orf43. A) Zur Kontrolle der erfolgreichen Überexpression und zur Identifizierung der zu analysierenden Region kam der HA-Antikörper zur Verwendung. Das Gel wurde zur Lokalisation der relevanten Bereiche silber eingefärbt. B) Die identifizierten TRAPP Untereinheiten und C7orf43 sind als Netzwerke dargestellt. Das als Bait verwendete Protein befindet sich jeweils in der Mitte des Netzwerks. Kern TRAPP Mitglieder sind grün, TRAPPII Untereinheiten rot und TRAPPIII Untereinheiten blau markiert.

Als Vergleichsprotein für die Kern TRAPP Proteine kam TRAPPC4, für den TRAPPIII Komplex TRAPPC11 und als TRAPPII Protein TRAPPC9 zum Einsatz. Mit Hilfe des Immunblots wurde sowohl der Erfolg der HA-IP überprüft als auch die zu analysierende Region im Gel identifiziert (Abb. 3.13 A). Die weitere Analyse erfolgte nach Ingel-Verdau und massenspektrometrischer Analyse. Die Ergebnisse der IP-Native PAGE-MS bestätigen die Interaktion des Kern TRAPP Komplexes mit dem TRAPPII Komplex, TRAPPIII Komplex und C7orf43. Auch die Interaktion zwischen C7orf43 und dem gesamten TRAPPII Komplex konnte validiert werden. Die Komplexanalyse des TRAPPIII Proteins TRAPPC11 wies sowohl Mitglieder des TRAPPIII als auch des Kern TRAPP Komplexes auf. Proteine des TRAPPII Komplexes und C7orf43 konnten dagegen hier nicht nachgewiesen werden. C7orf43 lies sich in der Komplexanalyse des Kern

## Ergebnisse

TRAPP und TRAPP<sub>II</sub> bestätigen. Darüberhinaus konnten die Untereinheiten des TRAPP<sub>II</sub> und Kern TRAPP Komplexes in der Analyse von C7orf43 nachgewiesen werden (Abb. 3.13 B).

Da es sich bei der oben gezeigten HA-IP und auch bei der HA-IP-MS um N-terminal markierte Überexpressionskonstrukte handelte, wurde anschließend die Assoziation von C7orf43 zum TRAPP<sub>II</sub> Komplex auf endogener Ebene unter Verwendung eines spezifischen  $\alpha$ -C7orf43 Antikörpers überprüft. Die Analyse der endogenen IP erfolgte sowohl per Immunblot als auch mit Massenspektrometrie (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: C7orf43 interagiert mit dem TRAPP<sub>II</sub> Komplex auf endogenem Level.** Verwendet wurden HEK293T-Zellen für den Antikörper gegen C7orf43 und die Kontrollexperimente mit den Beads allein ohne weitere Antikörper und dem Kontroll-Antikörper c-myc. Die Vorklä rung erfolgte mit dem Zelllysat und den Beads ohne eine Antikörperzugabe. A) Zur Kontrolle der erfolgreichen endogenen IP und zur Identifizierung der zu analysierenden Region mit Hilfe der MS wurde der Immunblot mit den Antikörpern gegen C7orf43 und TRAPPC9 durchgeführt. B) Das Gel wurde zur Visualisierung der Banden mit kolloidalem Coomassie gefä rbt und die gesamte Probenbahn zur Analyse mit MS verarbeitet. C) Die identifizierten TRAPP Untereinheiten und C7orf43 werden in Form eines Netzwerkes abgebildet. Das Bait C7orf43 befindet sich in der Mitte. Kern TRAPP Mitglieder werden grün und TRAPP<sub>II</sub>-Untereinheiten rot gekennzeichnet. Die Analyse der MS-Daten erfolgte mit MaxQuant, Version 1.2.2.5.

Die Ergebnisse der endogenen IP bestätigten die Interaktionen zwischen C7orf43 und TRAPPC9 (Abb. 3.14 A, C) bzw. dem gesamten TRAPP<sub>II</sub> Komplex (Abb. 3.14 C). Somit konnte ebenfalls auf endogener Ebene eine Interaktion zwischen C7orf43 und der TRAPP<sub>II</sub>-spezifischen Komponenten sowie der Kern TRAPP Proteine nachgewiesen werden.

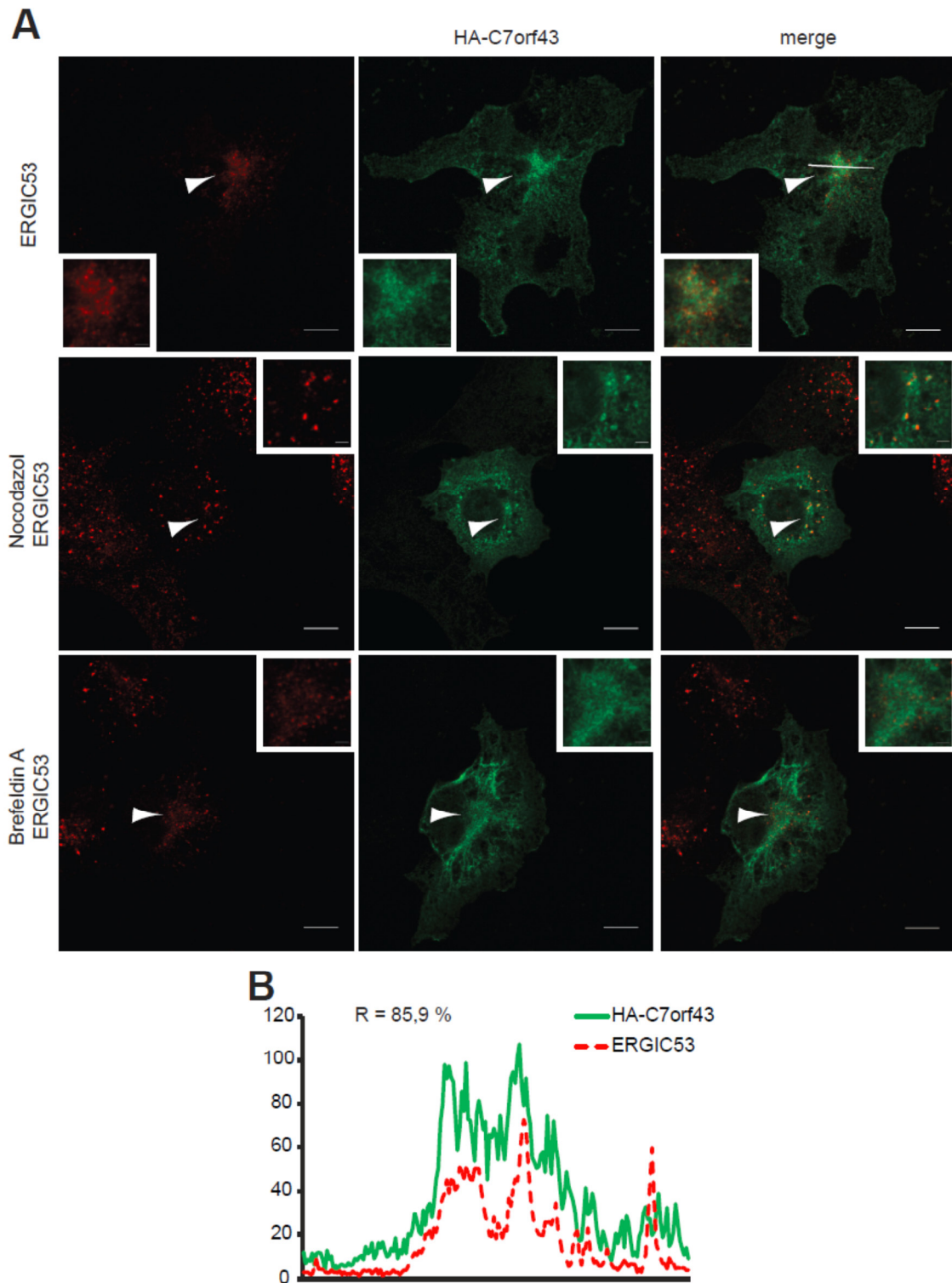
### 3.4 Zelluläre Lokalisation von C7orf43

Obwohl die zellulären Lokalisationen der TRAPP Komplexe in Säugetieren bisher nicht im Detail bekannt sind, wurde für einige Mitglieder des Kern TRAPP Komplexes eine Kollokalisierung mit ERGIC, dem Golgi-Apparat und COPI Vesikeln gezeigt (Scrivens et al., 2009; Yamasaki et al., 2009; Yu et al., 2006). Die TRAPP II Mitglieder TRAPPC9 und TRAPPC10 kollokalisieren ebenfalls mit dem ERGIC, dem Golgi-Apparat und COPI Vesikeln (Yamasaki et al., 2009; Zong et al., 2012; Zong et al., 2011). Für die Untereinheiten des TRAPP III Komplexes wurde eine Kollokalisierung mit COPII-Vesikeln und Autophagie Komponenten gezeigt (Bassik et al., 2013; Scrivens et al., 2011; Wang et al., 2013).

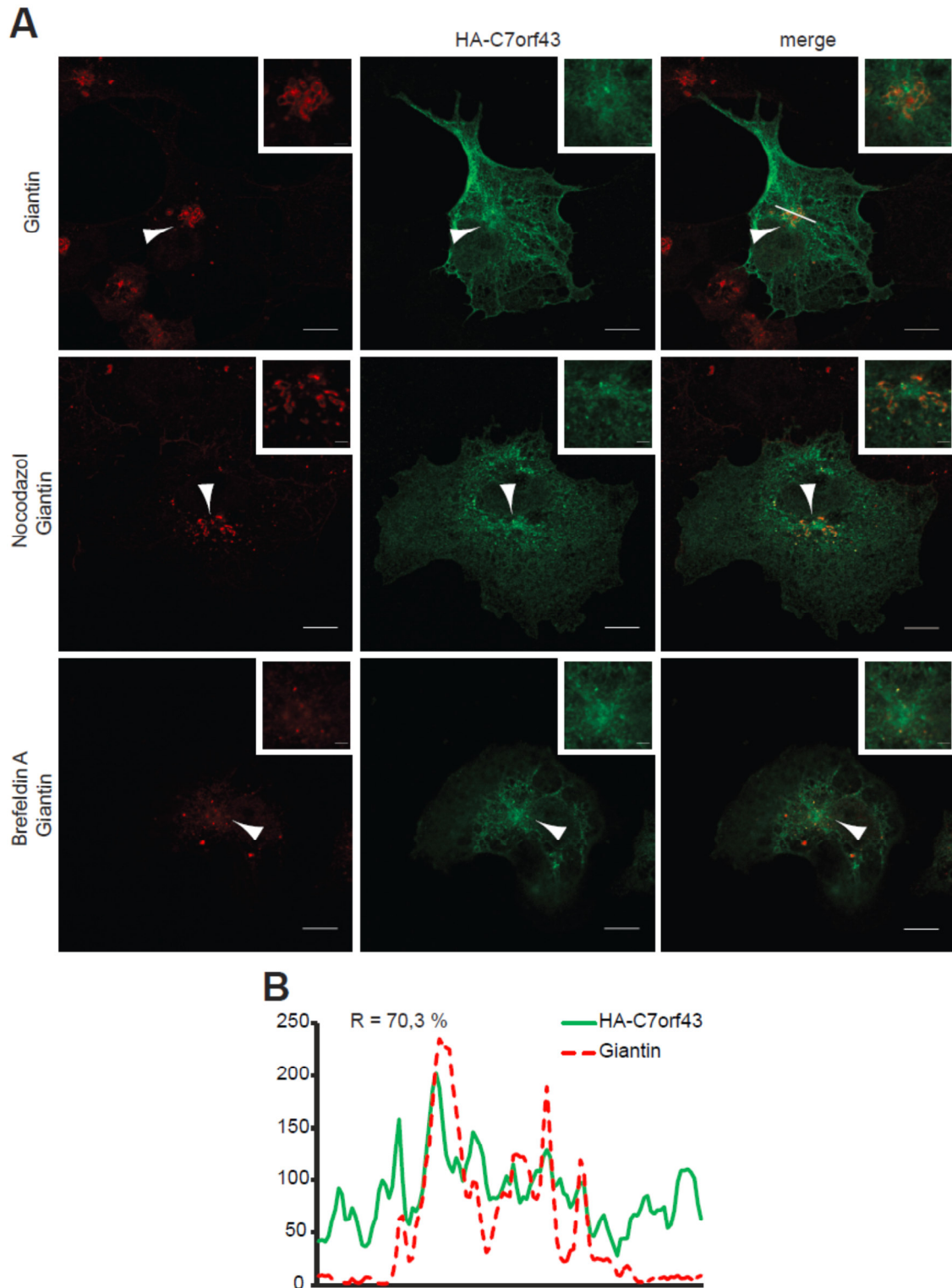
Zur Aufklärung der zellulären Lokalisation von C7orf43 wurden die bisherigen Erkenntnisse über die Untereinheiten des TRAPP II Komplexes genutzt. C7orf43 wurde hierfür mit einer HA-Markierung versehen und transient in COS7 Zellen überexprimiert. Zum Einsatz kamen das ERGIC Markerprotein ERGIC-53/LMAN1 und das *cis*-Golgi und COPI Markerprotein Giantin/GOLGB1. Zusätzlich wurden die Reagenzien Brefeldin A (BFA) und Nocodazol eingesetzt. BFA ist ein Pilzmetabolit, das die ARF1 Aktivierung blockiert. Die Behandlung von Zellen mit BFA führt sowohl zu einer zytoplasmatischen Zerstreuung der COPI Vesikel als auch zu einer Auflösung der Golgi-Struktur (Helms and Rothman, 1992; Lippincott-Schwartz et al., 1989; Ward et al., 2001; Yamasaki et al., 2009; Zong et al., 2012). Der Wirkstoff Nocodazol wirkt depolymerisierend auf Actin und führt zu einer Zersplitterung des Golgi-Apparates in Ministapel (De Brabander et al., 1976; Rogalski and Singer, 1984). Da das ERGIC mit dem *cis*-Golgi kollokalisiert, haben beide Reagenzien auch einen Einfluss auf die ERGIC Struktur (Klumperman et al., 1998; Nelson et al., 1998; Yang and Storrie, 1998).

Die Immunfluoreszenzbilder (Abb. 3.15 A und 3.16 A) und die statistische Auswertung der line scans mit Pearson-Koeffizienten von 85,9 % und 70,3 % (Abb. 3.15 B und 3.16 B) zeigten, dass C7orf43 sowohl mit dem ERGIC als auch mit dem *cis*-Golgi kollokalisiert. Nach Zugabe von Nocodazol ist deutlich die Zersplitterung des ERGICs und des *cis*-Golgi in Abbildung 3.15 A zu erkennen. Auch C7orf43 zeigte dieses fragmentierte Erscheinungsbild nach der Behandlung mit Nocodazol. Die Beobachtung, dass die fragmentierten ERGIC und *cis*-Golgi Strukturen immer noch positiv für C7orf43 sind, spricht zusätzlich für die Lokalisation von C7orf43 an eben diese zellulären Kompartimente. Dagegen löste die Behandlung mit BFA wie erwartet das ERGIC und den *cis*-Golgi-Apparat auf und führte zu einer Umverteilung von C7orf43, die einer Akkumulation im ER ähnelt.





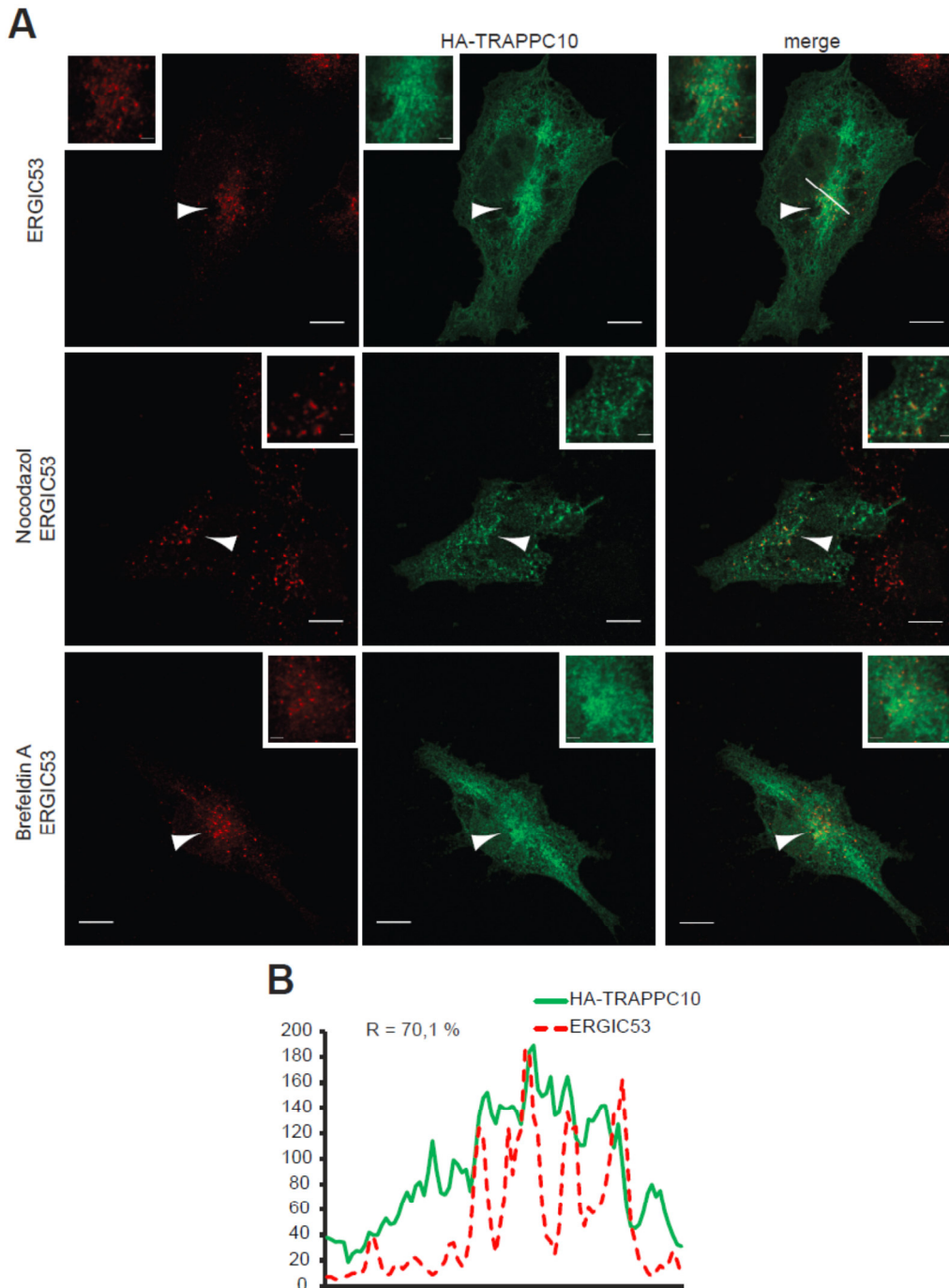
**Abb. 3.15: C7orf43 kolokalisiert mit ERGIC53.** A) Kolokalisationsstudie mit Hilfe eines spezifischen  $\alpha$ -ERGIC53-Antikörpers und COS7-Zellen, die HA-C7orf43 transient überexprimierten. Durchführung der Analysen sowohl unbehandelt als auch unter Einsatz von Nocodazol (20  $\mu$ g/ml, 60 min) und Brefeldin A (50  $\mu$ g/ml, 60 min). B) Graphische Darstellung des line scan und Pearson-Koeffizient des mit Pfeil und Strich markierten Areals der unbehandelten Probe. Die statistische Auswertung der Kolokalisation erfolgte mit ImageJ und Microsoft Office Excel. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m, Zoom-Größenbalken 2  $\mu$ m.



**Abb. 3.16: C7orf43 kolokalisiert mit Giantin.** A) Die Kolokalisationsstudie mit Hilfe eines spezifischen  $\alpha$ -Giantin-Antikörpers wurde analog zu Abbildung 3.15 in COS7-Zellen mit transient überexprimierten HA-C7orf43 und sowohl unbehandelt als auch unter Einsatz von Nocodazol (20  $\mu$ g/ml, 60 min) und Brefeldin A (50  $\mu$ g/ml, 60 min) durchgeführt. B) Die Darstellung des line scan und Berechnung des Pearson-Koeffizient erfolgte ebenfalls wie in Abbildung 3.15 beschrieben. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m, Zoom-Größenbalken 2  $\mu$ m.

## Ergebnisse

Für die TRAPP II Komplexuntereinheit TRAPPC10 konnte eine Kolo­kalisierung mit ERGIC, *cis*-Golgi und den COPI Vesikeln gezeigt werden (Yamasaki et al., 2009). Um das zelluläre Verteilungsmuster von C7orf43 mit dem von TRAPPC10 vergleichen zu können, wurde die Lokalisierung von HA-markierten TRAPPC10 in COS7 Zellen untersucht (Abbildungen 3.17 und 3.18).



**Abb. 3.17: TRAPPC10 kolokalisiert mit ERGIC53.** A) Die Kolo­kalisationsstudie mit überexprimierten HA-TRAPPC10 in COS7-Zellen wurde mit Hilfe eines spezifischen  $\alpha$ -ERGIC53-Antikörpers wie in Abbildung 3.15 beschrieben durchgeführt und B) statistisch ebenfalls wie in Abbildung 3.15 erläutert ausgewertet. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m, Zoom-Größenbalken 2  $\mu$ m.





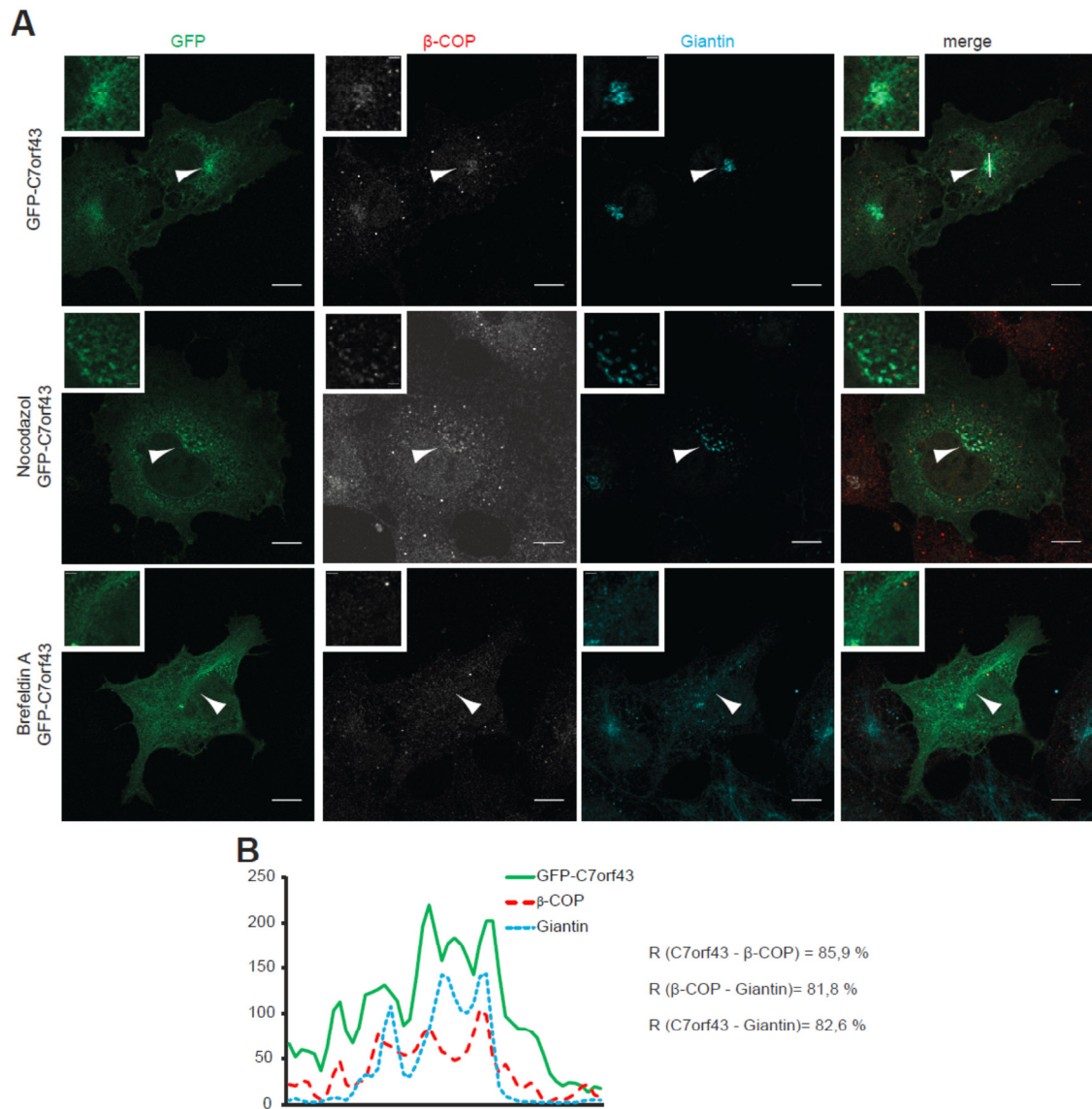
## Ergebnisse

In Übereinstimmung mit der bestehenden Literatur konnte die Lokalisation von TRAPPC10 am ERGIC (Abb. 3.17) und am *cis*-Golgi nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Die Ergebnisse der Behandlung mit Nocodazol und BFA unterstützen wie auch bei C7orf43 zusätzlich die Kolokalisation mit beiden Kompartimenten. TRAPPC10 und C7orf43 konnten somit beide dem ERGIC und dem *cis*-Golgi zugeordnet werden. Zusätzlich war bei C7orf43 und TRAPPC10 eine Hintergrundfärbung erkennbar. Eine Kolokalisation mit dem ER, die bereits für TRAPPC9 nachgewiesen wurde (Zahoor et al., 2010), kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Das Reagenz BFA inaktiviert ARF1 wodurch die COPI Vesikel und andere periphere Proteine von der Golgimembran dissoziieren. Dies hat die Fragmentierung des Golgis und die Rückführung von Golgi-relevanten Enzymen zum ER zur Folge (Helms and Rothman, 1992; Lippincott-Schwartz et al., 1989; Ward et al., 2001). Die in der Literatur beschriebene Interaktion des TRAPP II Komplexes mit COPI Komponenten (Yamasaki et al., 2009; Zong et al., 2012) und die hier beobachteten Effekte von BFA auf C7orf43 und Golgi lassen vermuten, dass C7orf43 ebenfalls mit dem COPI Vesikeln lokalisieren könnte. In Kolokalisationsstudien von C7orf43 mit COPI Vesikeln wurde GFP-markiertes C7orf43 transient in COS7 Zellen überexprimiert und zusätzlich  $\beta$ -COP und Giantin mittels Immunodetektion dargestellt (Abbildung 3.19).

Sowohl die repräsentativ ausgewählten Mikroskopieaufnahmen (Abb. 3.19 A) als auch die Pearson-Koeffizienten von 85,9 % (C7orf43 –  $\beta$ -COP), 81,8 % ( $\beta$ -COP – Giantin) und 82,6 % (C7orf43 – Giantin) (Abb. 3.19 B) zeigen, dass C7orf43 mit den COPI Vesikeln kolokalisiert. Diese Kolokalisation blieb auch nach Nocodazol Behandlung erhalten. Zusammengenommen läßt sich damit feststellen, dass C7orf43 zusätzlich zu *cis*-Golgi und ERGIC auch mit COPI Vesikeln kolokalisiert.

## Ergebnisse



**Abb. 3.19: C7orf43 kolokalisiert mit COPI.** A) Die Kolokalisationsstudie mit Hilfe eines spezifischen  $\alpha$ -Giantin- und  $\alpha$ - $\beta$ -COP-Antikörpers wurde wie in Abbildung 3.15 in COS7-Zellen mit transient überexprimierten HA-C7orf43 und sowohl unbehandelt als auch unter Einsatz von Nocodazol (20  $\mu$ g/ml, 60 min) und Brefeldin A (50  $\mu$ g/ml, 60 min) durchgeführt. B) Die Darstellung der line scans und die Berechnung der Pearson-Koeffizienten erfolgte ebenfalls wie in Abbildung 3.15 beschrieben. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m, Zoom-Größenbalken 2  $\mu$ m.

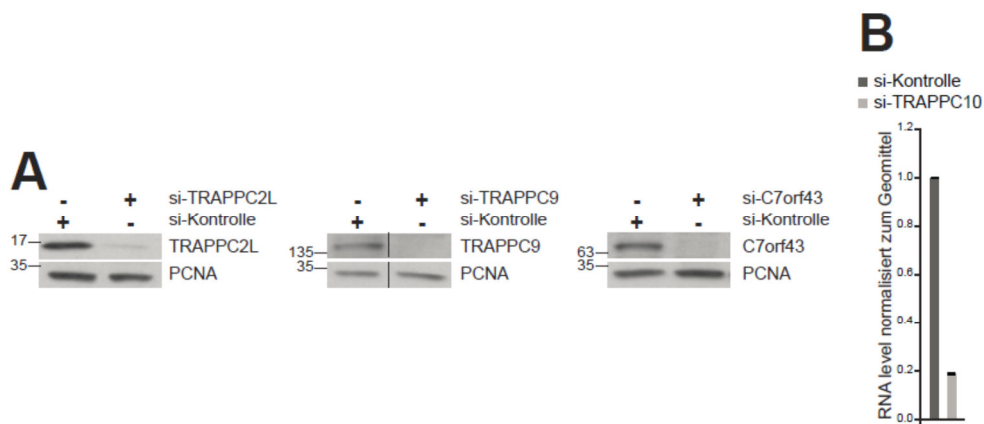


## Ergebnisse

Komplexes hat, jedoch die Assoziation von C7orf43 zum TRAPP II Komplex von TRAPPC9 und TRAPPC10 abhängig ist.

### 3.6 Der Knockdown von C7orf43 fragmentiert ERGIC, Golgi und COPI Vesikel

Die Kollokalisationsversuche zeigten eine Kollokalisation von C7orf43 mit dem ERGIC, *cis*-Golgi und COPI Vesikeln (Abb. 3.15, 3.16 und 3.19). Sowohl für TRAPPC10 als auch für einige Mitglieder des Kern TRAPP Komplexes ist bekannt, dass ein Knockdown zu einer Zerstörung der Golgi-Struktur und einer Zerstreuung des ERGICs führt (Scrivens et al., 2009; Yamasaki et al., 2009; Yu et al., 2006). Daher wurde im Folgenden die Auswirkung einer Herunterregulation von C7orf43 auf die Struktur von ERGIC, *cis*-Golgi und COPI Vesikeln überprüft. Des Weiteren wurden zur Kontrolle die spezifischen siRNS von TRAPPC2L, TRAPPC9 und TRAPPC10 eingesetzt. Die Abbildung 3.21 zeigt die verwendeten transient in HEK293T transfizierten siRNS und den Effekt auf das jeweilige Zielprotein. Da für TRAPPC10 kein Antikörper für den Immunblot kommerziell erhältlich war, wurde für TRAPPC10 zur Überprüfung der Knockdown Effizienz eine qRT-PCR durchgeführt.



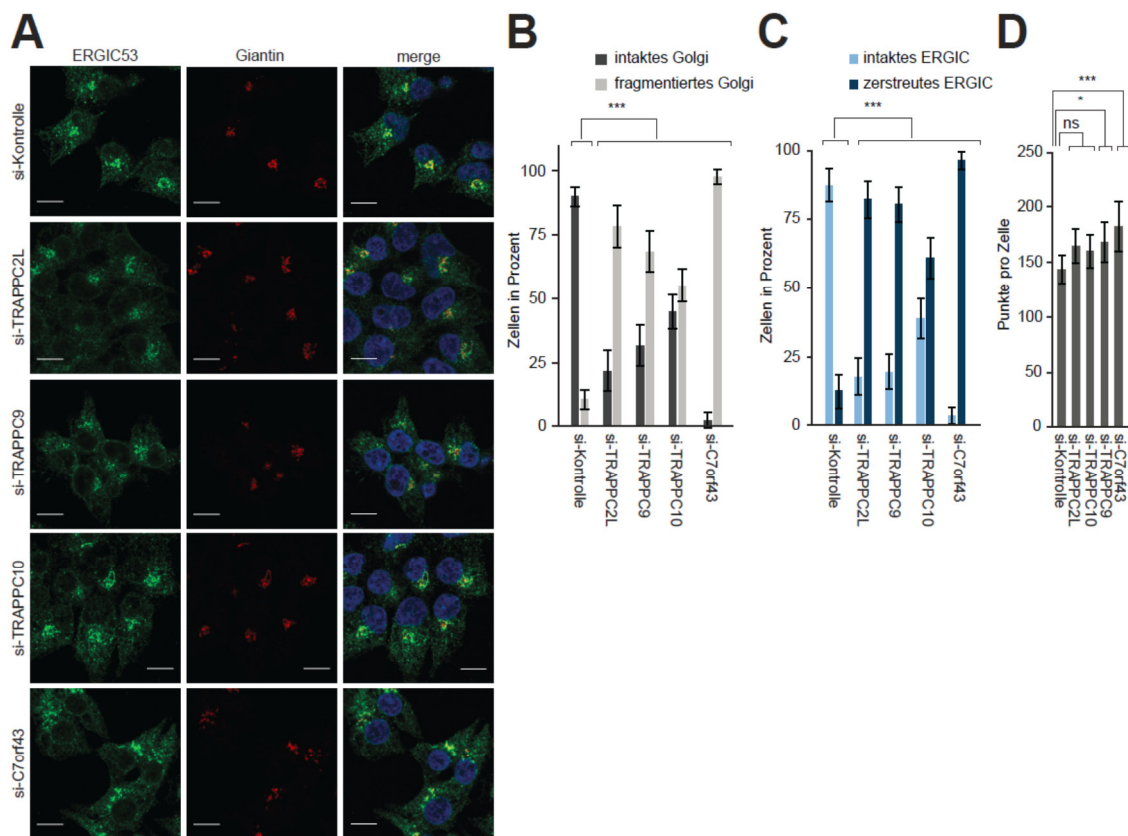
**Abb. 3.21: Überprüfung der Effizienz der verwendeten siRNS für TRAPPC2L, TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43.** A) Die Überprüfung der siRNS gegen TRAPPC2L, TRAPPC9 und C7orf43 erfolgte im Immunblot, PCNA diente als Ladekontrolle. B) Der Knockdown von TRAPPC10 wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen, als Referenzgene wurden ActinB, PBG-D und TBP verwendet.

Für alle vier siRNS konnten eine deutliche Depletion des Zielproteins erreicht werden (Abb. 3.21). Abbildung 3.22 zeigt die Auswirkung der Herunterregulierung von TRAPPC2L, TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43 auf das ERGIC und das *cis*-Golgi. Zur Quantifizierung der Auswirkungen des jeweiligen Knockdowns auf den *cis*-Golgi bzw. das ERGIC wurde die prozentuale Anzahl an Zellen mit intaktem bzw. fragmentierten *cis*-Golgi und ERGIC in drei unabhängig voneinander



## Ergebnisse

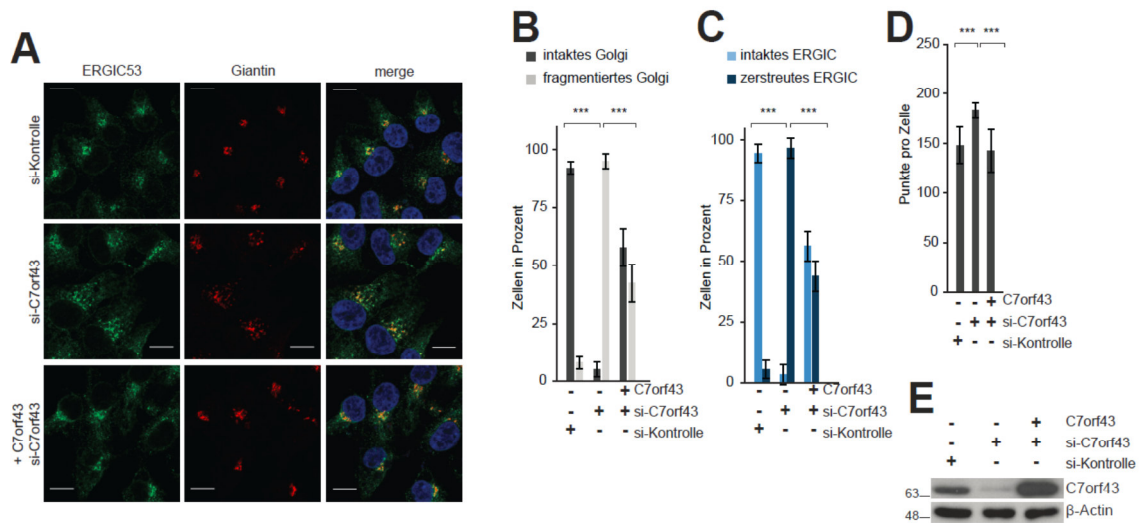
durchgeführten Experimenten gezählt. Zudem wurden die Anzahl der ERGIC Punkte pro Zelle analysiert.



**Abb. 3.22: Einfluss auf ERGIC und Golgi-Apparat durch Knockdown von TRAPPC2L, TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43.** A) Immunfluoreszenz-Analyse der Knockdowns mit Hilfe des Antikörpers gegen ERGIC53 und Giantin. Der Zellkern ist DAPI gefärbt. B) Statistische Auswertung der Golgi-Fragmentierung, C) Statistische Auswertung der ERGIC-Zerstreuung, D) Statistische Auswertung der ERGIC-Punkte. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ, Prism 4 und Microsoft Office Excel. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse: one-way ANOVA, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

Abbildung 3.22 A–C zeigt deutlich die Fragmentierung des *cis*-Golgi und das zerstreut erscheinende Bild des ERGICs bei Knockdown von TRAPPC2L und C7orf43. Auch die Herunterregulation von TRAPPC9 und TRAPPC10 führte in schwächerem Ausmaß zu einer Fragmentierung des *cis*-Golgi und einer Zerstreuung des ERGICs. Zur genaueren Quantifizierung der Wirkung der Knockdowns auf das ERGIC erfolgte in Abbildung 3.22 D die Berücksichtigung der ERGIC Punkte. Im Falle des Knockdowns von TRAPPC2L und TRAPPC10 konnte kein signifikanter Unterschied zur siRNA Kontrolle festgestellt werden. Dagegen führte die Depletion von TRAPPC9 und C7orf43 zu einer leichten bzw. signifikanten Erhöhung der Anzahl der ERGIC Punkte. Zur Überprüfung der Spezifität der Knockdown-Effekte von C7orf43 auf das *cis*-Golgi und das ERGIC wurde in C7orf43 depletierten Zellen eine Knockdown-stabile Variante von C7orf43 exprimiert (Abb. 3.23).

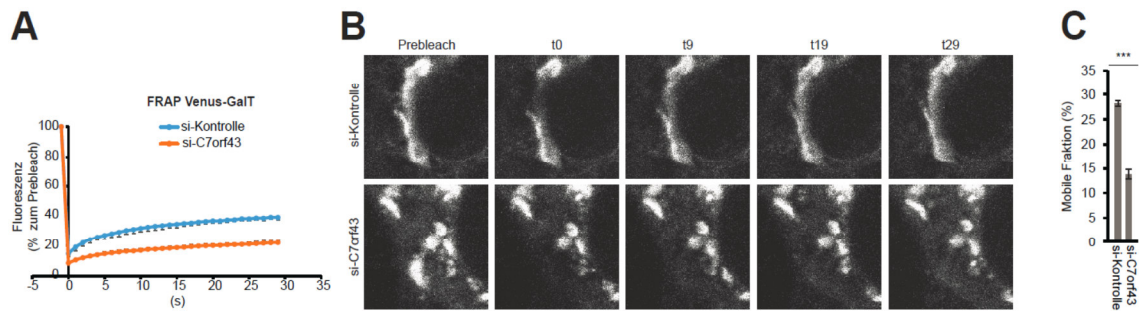
## Ergebnisse



**Abb. 3.23: Einfluss der spezifischen siRNAs von C7orf43 auf das ERGIC und den Golgi-Apparat unter Verwendung eines Knockdown-resistenten Plasmides.** A) Immunfluoreszenz-Analyse des Knockdowns und rescues mit Hilfe des Antikörpers gegen ERGIC53 und Giantin. Der Zellkern ist DAPI-gefärbt. B) Statistische Auswertung der Golgi-Fragmentierung, C) Statistische Auswertung der ERGIC-Zerstreuung, D) Statistische Auswertung der ERGIC-Punkte, E) Immunblot-Nachweis der Knockdown-Resistenz,  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ, Prism 4 und Microsoft Office Excel. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse: one-way ANOVA, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

Die Re-expression von C7orf43 in C7orf43 depletierten Zellen führte zur Wiederherstellung eines kompakten Erscheinungsbildes des Golgi-Apparates und des ERGICs (Abb. 3.23 A-E). Der starke Effekt des Knockdown von C7orf43 auf die Golgi Struktur legte nahe, den Einfluss von C7orf43 auf die Regenerationsfähigkeit des Golgi-Apparates zu untersuchen. In Zusammenarbeit mit Dr. Kerstin Tillmann und Dr. Hesso Farhan (Kreuzlingen/Konstanz) wurde hierzu in Abhängigkeit von C7orf43 ein *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) Experiment mit Fluoreszenzmarker (Venus)-markierter  $\beta$ 1,4-Galaktosyltransferase (GalT) in HeLa Zellen durchgeführt (Abb. 3.24). Das FRAP Experiment zeigte deutlich, dass sich der Golgi-Apparat unter dem Einfluss der spezifischen siRNAs von C7orf43 nicht regenerieren kann und der intra-Golgi Transportweg eingeschränkt ist.

## Ergebnisse

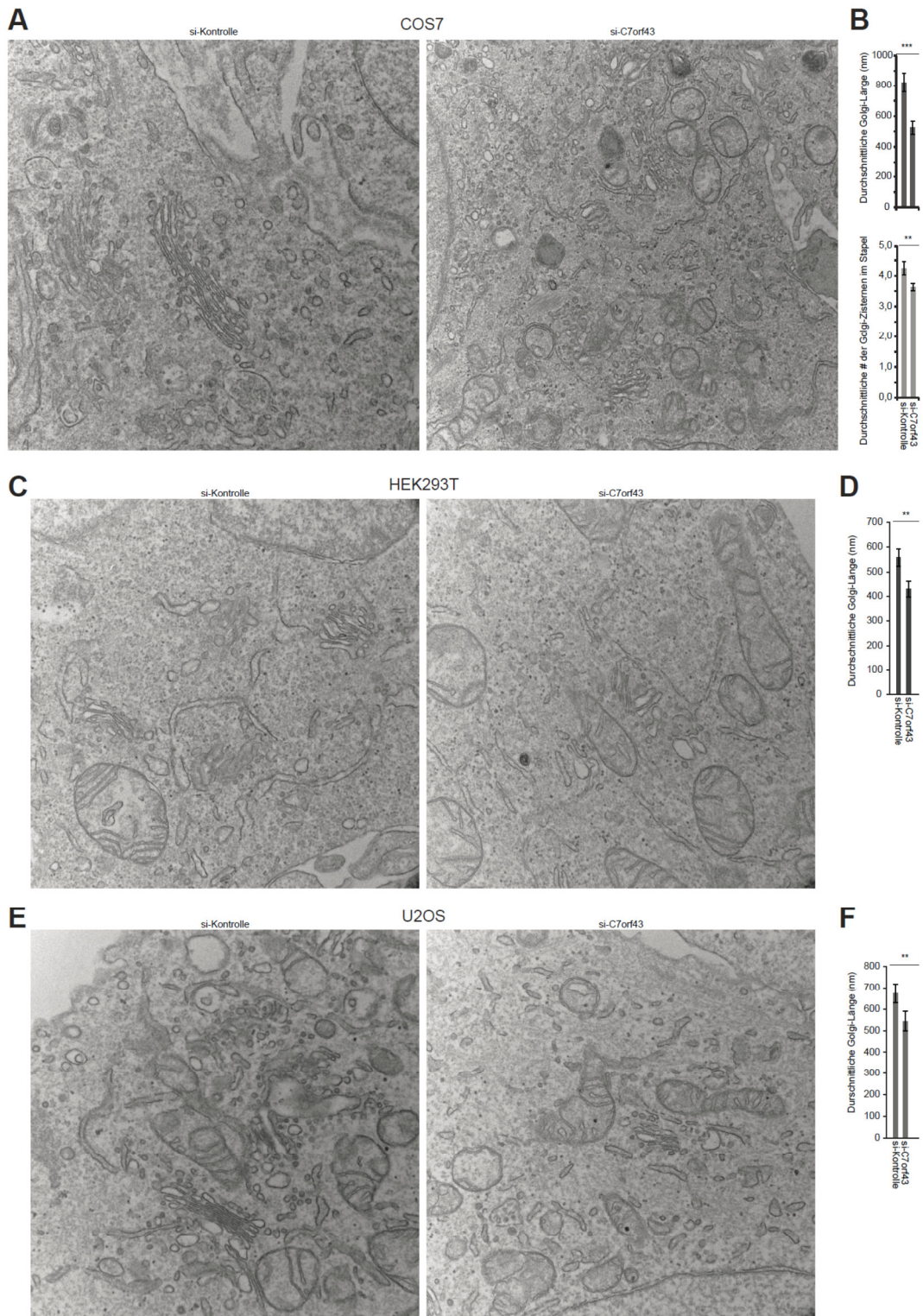


**Abb. 3.24: FRAP Assay mit der  $\beta$ 1,4-Galaktosyltransferase (GalT), gelabelt mit Venus unter dem Einfluss der spezifischen siRNS von C7orf43 in HeLa am Golgi-Apparat.** A) Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität in s. B) Mikroskopische Darstellung des FRAP-Assays. C) Grafische Abbildung der mobilen Fraktion in %. Die zeitlich dargestellte Aufnahme erfolgte von den gleichen Coverslips. Die statistische Auswertung durchgeführt als *t*-Test zeigt das Mittel  $\pm$  StdAb von drei unabhängigen Experimenten mit mindestens fünf aufgenommenen Kurven pro Experiment. Die Fluoreszenz wurde aufgrund der Prebleach-Intensität normalisiert.

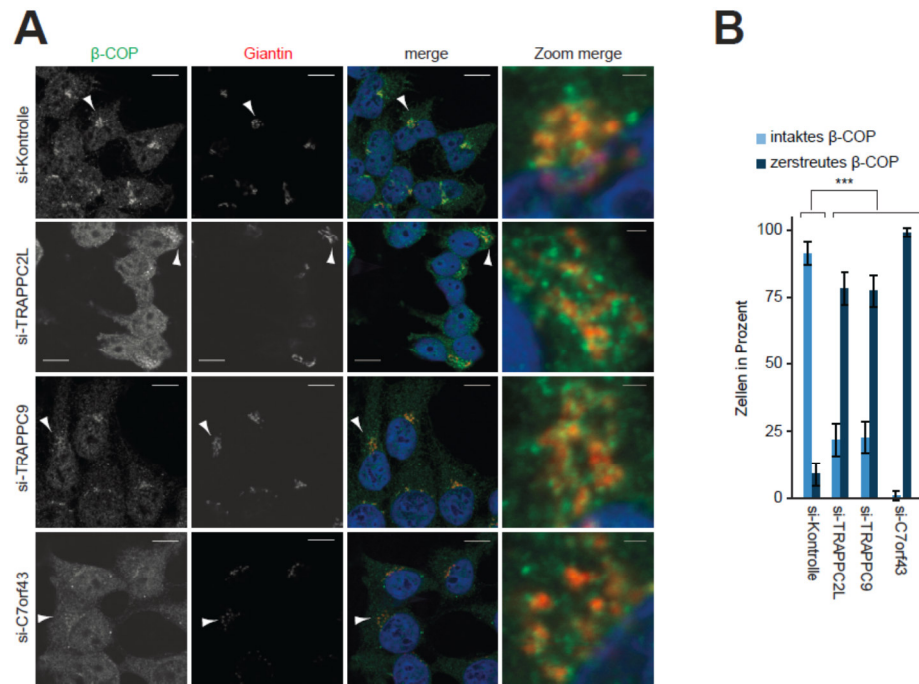
Zur weiteren Überprüfung der Abhängigkeit des Golgi-Apparates von der Gegenwart von C7orf43 wurde die innerzelluläre Struktur des Golgi-Apparates im Elektronenmikroskop analysiert. Hierfür kam die transient transfizierte spezifische siRNS von C7orf43 in drei unterschiedlichen Zelllinien HEK293T, COS7 und U2OS zum Einsatz. Die Abbildung 3.25 gibt die Resultate der elektronenmikroskopischen Analyse und der statistischen Auswertung wieder. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Roberta Crispino und Dr. Roman Polishchuk (Pozzuoli) durchgeführt. In allen drei Zelllinien konnte eine deutliche Abnahme der Golgi Länge beobachtet werden (Abb. 3.25 B, D, F). Zudem war in den COS7 Zellen durch den Knockdown von C7orf43 ebenfalls eine Verringerung der Anzahl der Golgi Zisternen zu verzeichnen (Abb. 3.25 A und B). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Golgi-Apparat Veränderungen bestätigen den deutlichen Effekt der C7orf43 Depletion auf den Golgi-Apparat. Da C7orf43 wie in Abbildung 3.19 gezeigt auch mit COPI kolokalisiert, wurden im Weiteren die Auswirkungen des C7orf43 Knockdowns auf die COPI Vesikel untersucht. Dazu wurden in HEK293T Zellen TRAPPC2L, TRAPPC9 und C7orf43 mit spezifischen siRNS depletiert und einer Immunodetektion von  $\beta$ -COP und Giantin unterzogen. Die Abbildung 3.26 A zeigt deutlich das zerstreut erscheinende Bild der COPI Vesikel nach dem Knockdown von C7orf43. Auch die Depletion von TRAPPC2L und TRAPPC9 führte in schwächerem Ausmaß zu einer Zerstreung der COPI Vesikel (Abb. 3.26 B).



## Ergebnisse



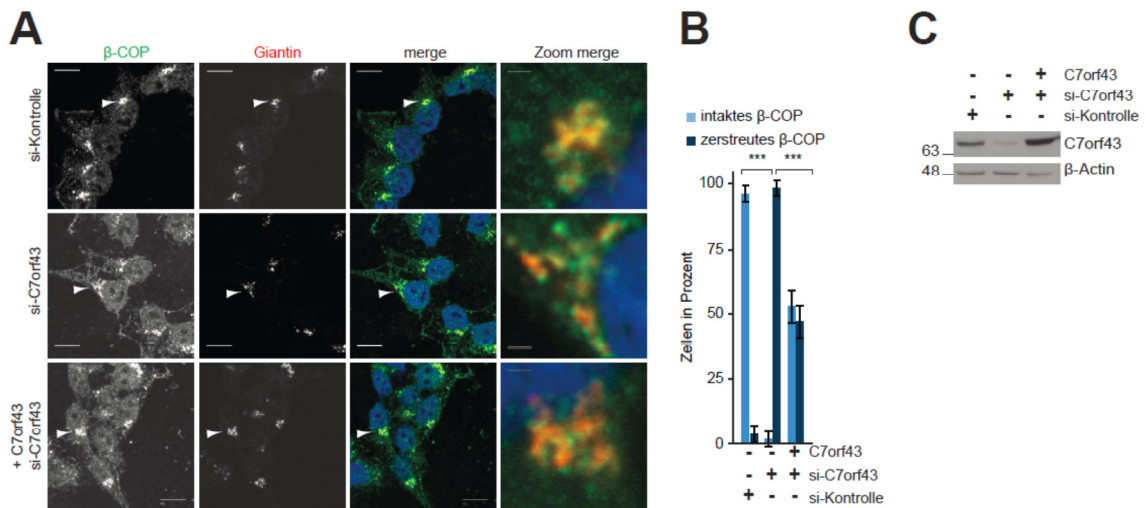
**Abb. 3.25: Einfluss der spezifischen siRNS von C7orf43 auf den Golgi-Apparat in der elektronenmikroskopischen Analyse.** Verwendet wurden A) COS7-, C) HEK293T- und E) U2OS-Zellen. B) Statistische Auswertung der durchschnittlichen Golgi-Länge und der durchschnittlichen Anzahl der Golgi-Zisternen im Stapel der COS7-Zellen. D) Statistische Auswertung der durchschnittlichen Golgi-Länge der HEK293T-Zellen. F) Statistische Auswertung der durchschnittlichen Golgi-Länge der U2OS-Zellen. Die statistische Auswertung durchgeführt als t-Test erfolgte unter Verwendung der ITEM Software und Microsoft Office Excel.



**Abb. 3.26: Einfluss der spezifischen siRNAs von TRAPPC2L, TRAPPC9 und C7orf43 auf Giantin und  $\beta$ -COP.** A) Immunfluoreszenz-Analyse der Knockdowns mit Hilfe des Antikörpers gegen Giantin und  $\beta$ -COP. Der Zellkern ist DAPI-gefärbt. B) Statistische Auswertung der  $\beta$ -COP-Zerstreung. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ, Prism 4 und Microsoft Office Excel. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse: one-way ANOVA, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

Zur Überprüfung der Spezifität der Knockdown-Effekte von C7orf43 auf COPI Vesikel wurde wiederum zusätzlich zur C7orf43 siRNA eine Knockdown-stabile Variante von C7orf43 transient exprimiert (Abb. 3.27). Wie auch schon für *cis*-Golgi und ERGIC gezeigt, führte die Expression von exogenem C7orf43 in C7orf43 depletierten Zellen zur Wiederherstellung des ursprünglichen, kompakten Erscheinungsbildes von COPI Vesikeln (Abb. 3.27 A und B).

## Ergebnisse

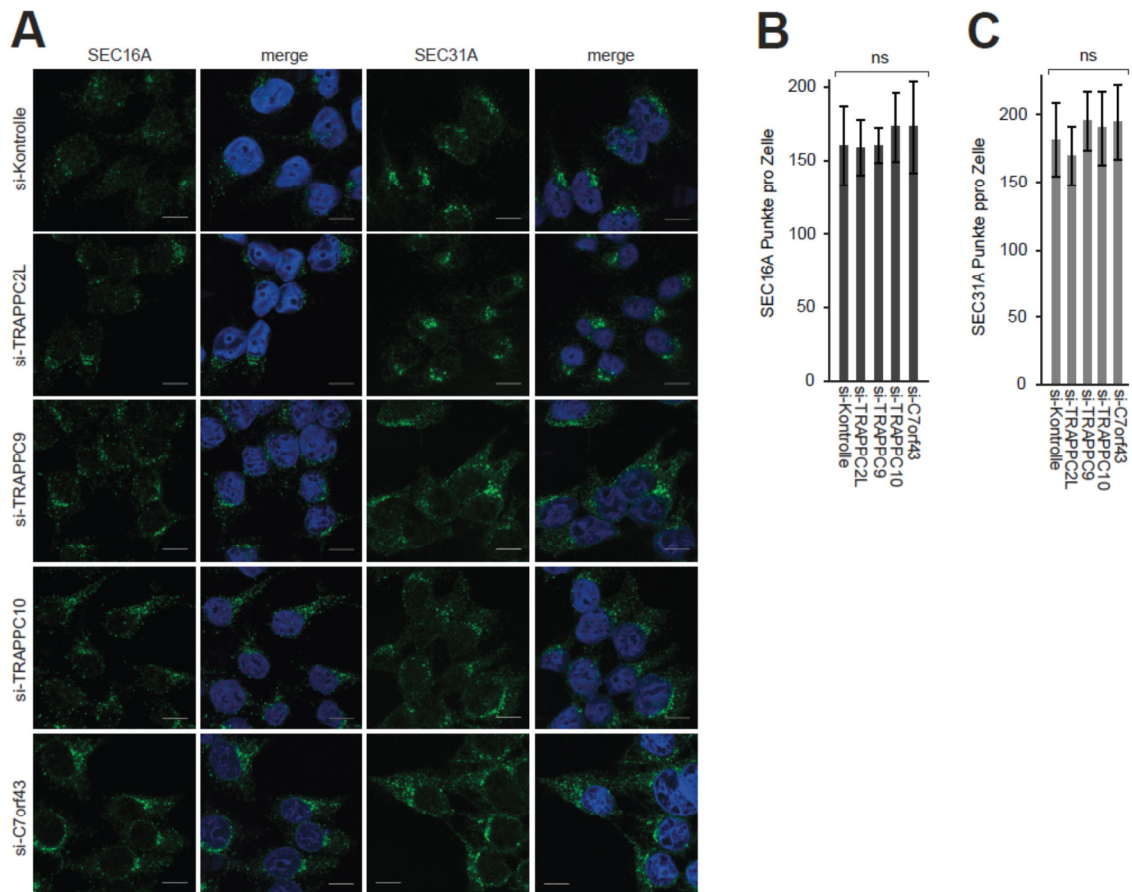


**Abb. 3.27: Einfluss der spezifischen siRNAs von C7orf43 auf Giantin und  $\beta$ -COP unter Verwendung eines Knockdown-resistenten Plasmides.** A) Immunfluoreszenz-Analyse des Knockdowns und rescues mit Hilfe des Antikörpers gegen Giantin und  $\beta$ -COP. Der Zellkern ist DAPI-gefärbt. B) Statistische Auswertung der  $\beta$ -COP-Zerstreuung. C) Immunblot-Nachweis der Knockdown-Resistenz,  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ, Prism 4 und Microsoft Office Excel. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse: one-way ANOVA, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

Da es sich bei C7orf43 um ein bisher uncharakterisiertes Protein handelt, wurden zusätzlich weitere zelluläre Kompartimente hinsichtlich eines Knockdown-Effektes durch C7orf43 überprüft. Zur Überprüfung des pre-Golgi Signalweges wurden erneut die transient transfizierten siRNAs von TRAPPC2L, TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43 in HEK293T-Zellen eingesetzt. SEC16A und SEC31A sind Markerproteine der ERES bzw. COPII Vesikel, die eine wichtige Rolle auf dem Sekretionsweg vom ER zum Golgi spielen (D'Arcangelo et al., 2013; Klumperman, 2011; Szul and Sztul, 2011). Bisher konnte zwar eine indirekte Interaktion von TRAPPC9 mit den COPII-Vesikeln über p150<sup>GLUD</sup> gezeigt werden (Zong et al., 2012). Jedoch wurde für TRAPPC10 unter Verwendung eines *vesicular stomatitis virus Glycoprotein* (vsv-G)-Plasmides, welches unter anderem Anwendung bei dem Monitoring der Sekretionswege findet, gezeigt, dass das Herunterregulieren diesen speziellen Sekretionsweg nicht beeinflusst (Yamasaki et al., 2009). Unter Zuhilfenahme der statistischen Analyse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigte sich keine signifikante Änderung der SEC16A- und SEC31A-positiven Strukturen sowohl bei TRAPPC2L als auch TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43 (Abb. 3.28 A–C).

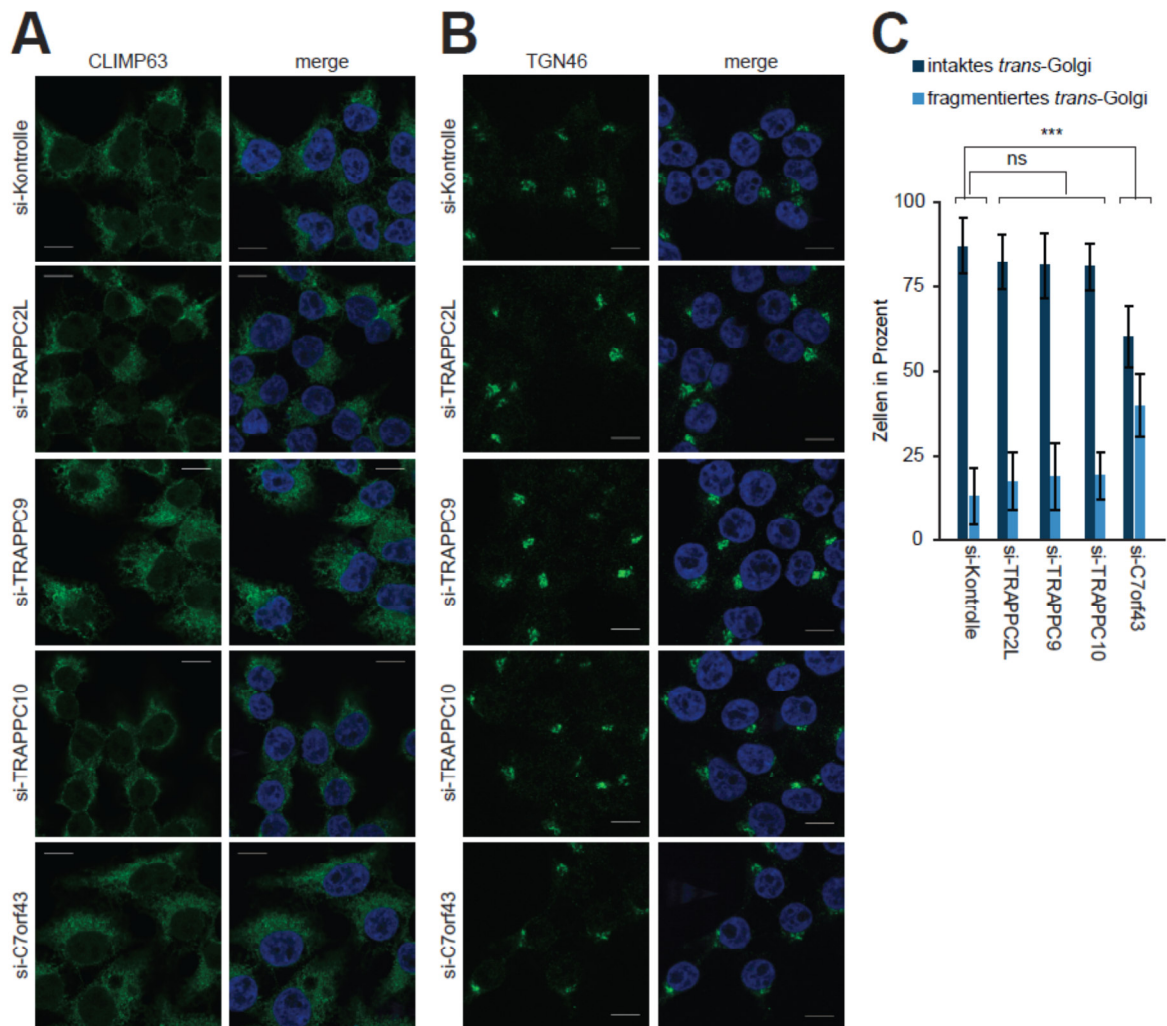


## Ergebnisse



**Abb. 3.28: Einfluss der spezifischen siRNAs von TRAPPC2L, TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43 auf SEC16A und SEC31A.** A) Immunfluoreszenz-Analyse der Knockdowns mit Hilfe des Antikörpers gegen SEC16A und SEC31A. Der Zellkern ist DAPI-gefärbt. Statistische Auswertung der Punkte von B) SEC16A und C) SEC31A. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ, Prism 4 und Microsoft Office Excel. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse: one-way ANOVA, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

Weiterhin wurden das ER und das *trans*-Golgi auf Phentypen nach Depletion von C7orf43 untersucht. Als zelluläre Marker dienten hierbei CLIMP63 zur Markierung des ER und TGN46 für das *trans*-Golgi (Abb. 3.29). Auswirkungen durch den Einfluss der spezifischen siRNAs von TRAPPC2L, TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43 auf die Topologie des ERs waren nicht zu erkennen (Abb. 3.29 A). In Bezug auf TGN46, zeigte sich ein leichter Fragmentierungseffekt der siRNAs von C7orf43 auf das *trans*-Golgi (Abb. 3.29 B–C). Die starke Fragmentierung des *cis*-Golgi und Zerstreuung des ERGICs und der COPI Vesikel durch den Einfluss der siRNAs von C7orf43 (Abb. 3.22 und 3.26) ließen bereits vermuten, dass hierdurch wahrscheinlich der gesamte Golgi-Apparat beeinträchtigt wird. Die Tatsache, dass das FRAP Experiment zur Regenerationsfähigkeit des Golgi-Apparates eine Beeinträchtigung zeigte (Abb. 3.24), unterstützt diese Hypothese zusätzlich. In Anbetracht dieser Ergebnisse war eine Auswirkung auf das *trans*-Golgi nach Depletion von C7orf43 zu erwarten.



**Abb. 3.29: Einfluss der spezifischen siRNS von TRAPPC2L, TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43 auf CLIMP63 und TGN46.** Immunfluoreszenz-Analyse in HEK293T-Zellen der Knockdowns mit Hilfe des Antikörpers gegen A) CLIMP63 und B) TGN46. Der Zellkern ist DAPI-gefärbt. C) Statistische Auswertung der Golgi-Fragmentierung. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ, Prism 4 und Microsoft Office Excel. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten: one-way ANOVA, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

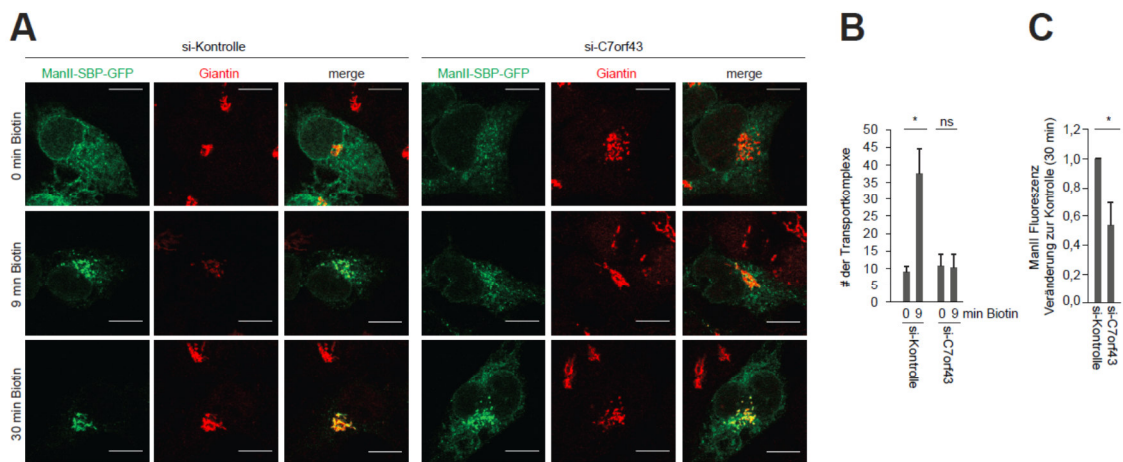
### 3.7 C7orf43, TRAPPC9 und TRAPPC10 sind im ER zu Golgi Sekretionsweg involviert

Da in der vorliegenden Arbeit bisher gezeigt werden konnte, dass der Knockdown von C7orf43 zu einer Fragmentierung des Golgi-Apparates und zur Zerstreuung des ERGICs und der COPI Vesikel führte, wurde als nächstes eine mögliche Funktion von C7orf43 innerhalb des ER zu Golgi Sekretionsweges mit Hilfe des *retention using selective hooks* (RUSH)-Assays unter Verwendung der transient transfizierten spezifischen siRNS von C7orf43 in HEK293T Zellen überprüft. Der RUSH-Assay basiert auf der reversiblen Interaktion eines verankerten Proteins gekoppelt an ein Streptavidin-bindendes Peptid. Durch die Zugabe von Biotin wird dieses



## Ergebnisse

Reporterprotein aus seiner kompetitiven Bindung gelöst und ist nun in der Lage, seinen zellulären Bestimmungsort zu erreichen (Boncompain et al., 2012). Als Reporterprotein wurde in der Abbildung 3.30 Mannosidase II verwendet, welches ins ER translatiert wird und nach der Faltung, der Glykosylierung und dem Transport zum Golgi-Apparat dort eine wichtige Rolle bei der N-Glykosylierung einnimmt (Shah et al., 2008). Durch die Zugabe von Biotin wird es aus seiner kompetitiven Bindung im ER gelöst und erreicht daraufhin das Golgi. Das Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Valentina Millarte und Dr. Hesso Farhan (Kreuzlingen/Konstanz) durchgeführt.



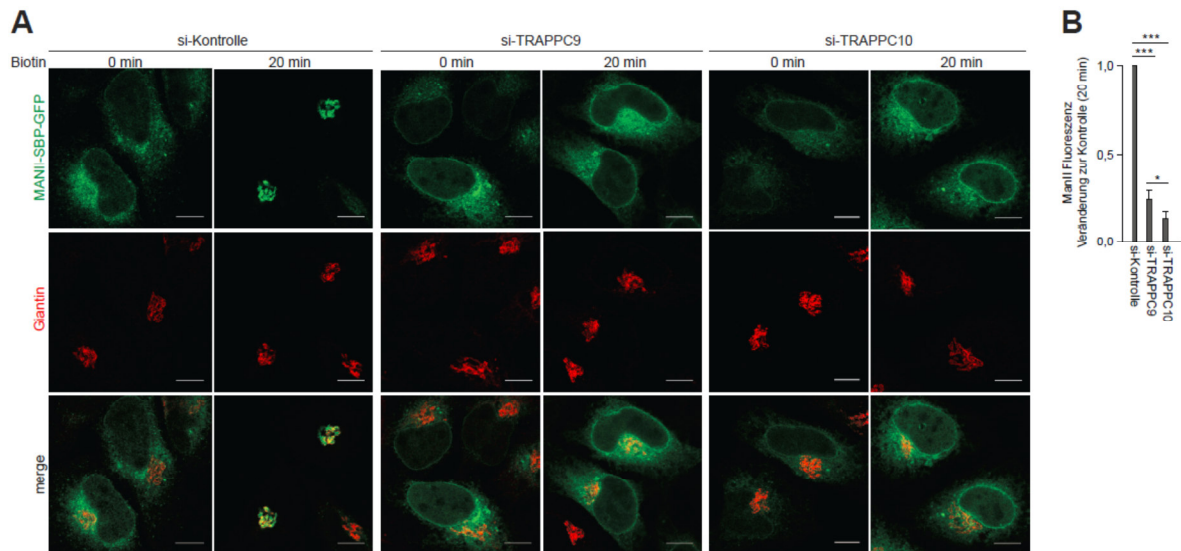
**Abb. 3.30: RUSH-Assay mit Mannosidase II unter Knockdown von C7orf43.** Das ManII-SBP-GFP wurde transient in HEK293T-Zellen exprimiert und mit 40  $\mu$ M Biotin für 0 min, 9 min und 30 min bei 37 °C inkubiert, mit anschließender Fixierung und Analyse mit Hilfe des Antikörpers nach  $\alpha$ -Giantin. A) Mikroskopische Beispielbilder. B) Statistische Auswertung der Transportkomplexe, 9 min nach der Biotinzugabe. C) Statistische Auswertung der Mannosidase II Fluoreszenz, 30 min nach der Biotinzugabe. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ und Microsoft Office Excel von drei unabhängigen Experimenten. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse: *t*-Test, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

Für Mannosidase II zeigte der RUSH-Assay bereits nach 9 min eine deutliche Verzögerung beim Erreichen des Golgi-Apparates nach Depletion von C7orf43. Im gleichen Zeitraum erreichte das Mannosidase II Reporterprotein unter Knockdown Kontroll Bedingungen schon fast vollständig den Golgi-Apparat (Abb. 3.30 A und B). Nach 30 min war bei der siRNS Kontrolle im ER keine Mannosidase II mehr nachzuweisen und die Mannosidase II hatte den Golgi-Apparat vollständig erreicht. Unter dem Einfluss der siRNS von C7orf43 war eine deutliche Verzögerung 30 min nach Biotinzugabe für die Erreichung des Golgi-Apparates durch Mannosidase II zu erkennen (Abb. 3.30 A). Das Herunterregulieren von C7orf43 führte somit zu einer partiellen Blockade im ER zum Golgi Sekretionsweg.

Für TRAPPC10 konnte bisher mit Hilfe des vsv-G-Plasmides gezeigt werden, dass der ER zu Golgi Sekretionsweg nicht durch einen Knockdown von TRAPPC10 beeinflusst wird (Yamasaki

## Ergebnisse

et al., 2009). Um den Einfluss von TRAPPC9 und TRAPPC10 auf diesen Sekretionsweg unter Verwendung des MANII-SBP-GFP-Plasmides zu analysieren, wurde der RUSH-Assay ebenfalls mit der transient transfizierten spezifischen siRNS von TRAPPC9 und TRAPPC10 in HEK293T Zellen durchgeführt (Abb. 3.31 A und B). Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Daniela Stadel (Frankfurt am Main/Kreuzlingen) und Dr. Hesso Farhan (Kreuzlingen/Konstanz) durchgeführt.



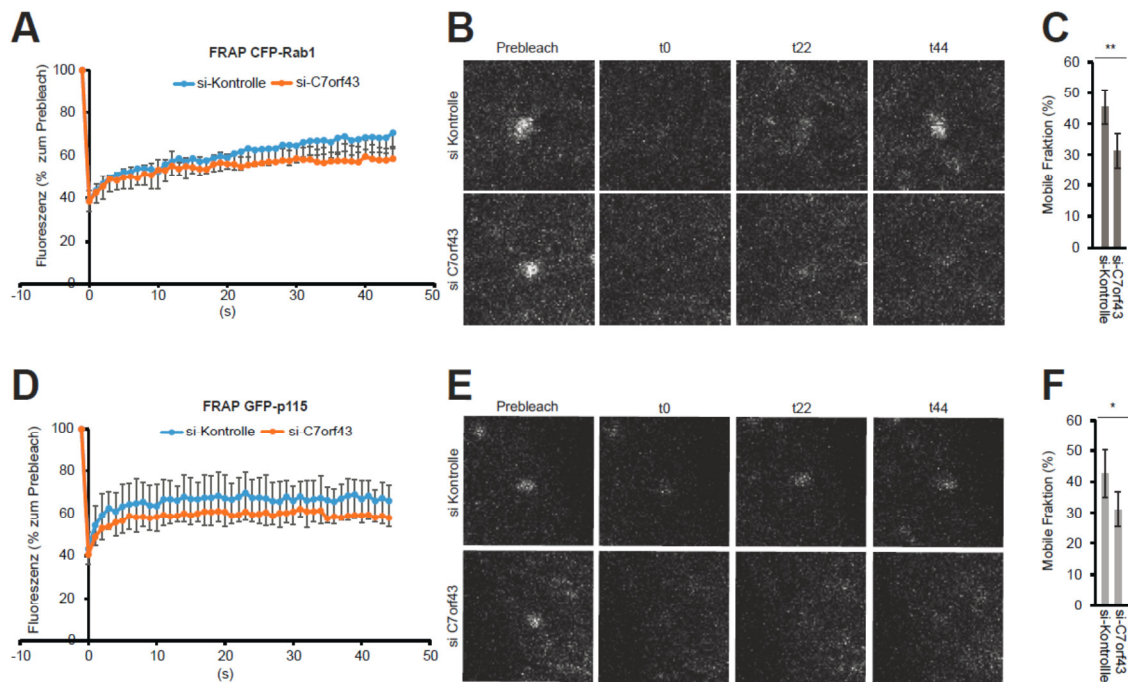
**Abb. 3.31: RUSH-Assay mit Mannosidase II unter Knockdown von TRAPPC9.** Das ManII-SBP-GFP wurde transient in HEK293T-Zellen exprimiert und mit 40  $\mu$ M Biotin für 0 min und 20 min bei 37  $^{\circ}$ C inkubiert, mit anschließender Fixierung und Analyse mit Hilfe des Antikörpers nach  $\alpha$ -Galectin. A) Mikroskopische Beispielbilder. B) Statistische Auswertung der Mannosidase II Fluoreszenz 20 min nach der Biotinzugabe. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ und Microsoft Office Excel von drei unabhängigen Experimenten. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse: *t*-Test, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

Die Abbildung 3.31 A und B zeigen, dass unter Knockdown von TRAPPC9 und TRAPPC10 ebenfalls eine Verzögerung des Sekretionsweges von ER zum Golgi zu beobachten ist. Diese Analyse widerlegt die bereits veröffentlichten Ergebnisse hinsichtlich der Abhängigkeit des ER zum Golgi Sekretionsweges von TRAPPC10 und identifiziert den TRAPPII Komplex als relevant für den ER zum Golgi Sekretionsweg. Die hier beschriebene neue TRAPPII Komplexuntereinheit C7orf43 verhält sich demnach funktionell äquivalent zu den TRAPPII Mitgliedern TRAPPC9 und TRAPPC10.

In der Netzwerkanalyse von C7orf43 konnte RAB1A als Interaktor identifiziert werden (Abb. 3.6). Neben dem ER zum Golgi Transportweg ist RAB1A auch im *cis*-Golgi von Bedeutung. Ein wichtiger Effektor von RAB1A ist das Golgin p115, weshalb in der Abbildung 3.32 mit Hilfe des FRAP Assays die Auswirkung des spezifischen transient transfizierten Knockdowns von C7orf43 auf RAB1A und p115 in HeLa Zellen überprüft wurde. Die Experimente wurden in

## Ergebnisse

Zusammenarbeit mit Dr. Kerstin Tillmann und Dr. Hesso Farhan (Kreuzlingen/Konstanz) durchgeführt.

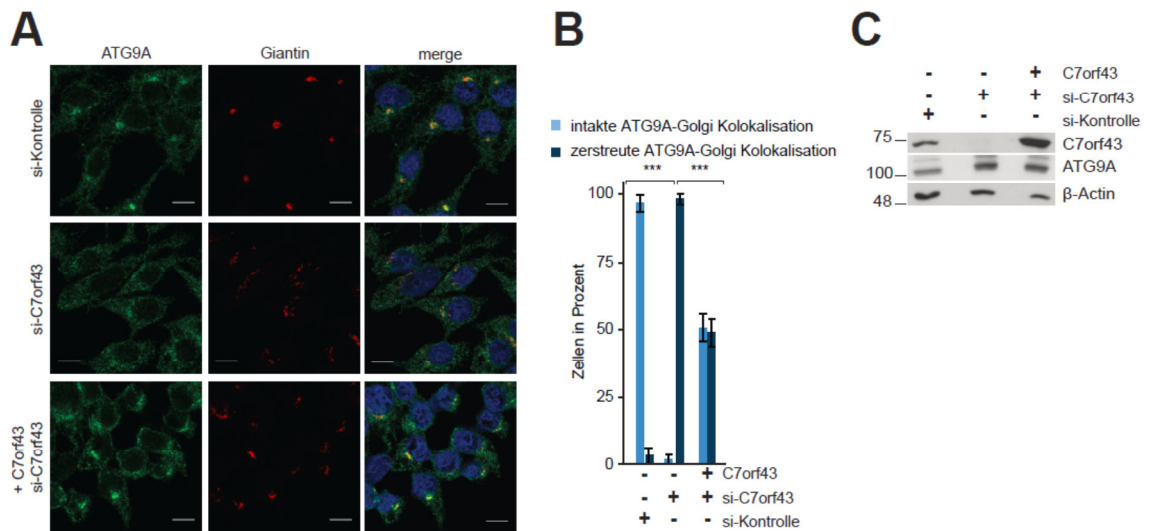


**Abb. 3.32: FRAP-Assay mit CFP-RAB1 und GFP-p115 unter dem Einfluss der spezifischen siRNAs von C7orf43 in HeLa am ERGIC.** Grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität in s von A) CFP-RAB1 und D) GFP-p115. Mikroskopische Darstellung des FRAP-Assays von B) CFP-RAB1 und E) GFP-p115. Grafische Abbildung der mobilen Fraktion in % von C) CFP-RAB1 und E) GFP-p115. Die zeitlich dargestellte Aufnahme erfolgte von den gleichen Coverslips. Die statistische Auswertung durchgeführt als *t*-Test zeigt das Mittel  $\pm$  StdAb von drei unabhängigen Experimenten mit mindestens fünf aufgenommenen Kurven pro Experiment. Die Fluoreszenz wurde aufgrund der Prebleach-Intensität normalisiert.

Die FRAP Experimente zeigten, dass nach Depletion von C7orf43 sowohl von RAB1 als auch von p115 eine verzögerte Regeneration vorliegt (Abb. 3.32). C7orf43 scheint daher, ein wichtiger Partner für RAB1 und p115 am ERGIC zu sein, die wiederum beide wichtige Faktoren für den ER zu Golgi Sekretionsweg und auch für den Transport innerhalb des ERGICs und des Golgi-Apparates sind.

Durch die starken C7orf43-abhängigen Fragmentierungen des ERGICs, des Golgi-Apparates und der COPI Vesikel wurde zuletzt untersucht, inwieweit die Depletion von C7orf43 auch einen Effekt auf post-Golgi Transportwege ausübt. ATG9 liegt teilweise in Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat vor (Lamb et al., 2015; Yamamoto et al., 2012) und wurde deshalb für diese Untersuchung verwendet. Zur Analyse des post-Golgi Sekretionsweges wurde die Kolokalisation von ATG9A mit dem Golgi Marker Giantin in HEK293T Zellen in Abhängigkeit von C7orf43 analysiert (Abb. 3.33).

## Ergebnisse



**Abb. 3.33: Einfluss der spezifischen siRNAs von C7orf43 auf Giantin und ATG9A unter Verwendung eines Knockdown-resistenten Plasmides.** A) Immunfluoreszenz-Analyse des Knockdowns und rescues mit Hilfe des Antikörpers gegen Giantin und ATG9A. Der Zellkern ist DAPI-gefärbt. B) Statistische Auswertung der ATG9A und Golgi-Apparat-Kolokalisation. C) Immunblot-Nachweis der Knockdown-Resistenz und der Proteinlevel von ATG9A,  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Statistische Auswertung mit Hilfe von ImageJ, Prism 4 und Microsoft Office Excel. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 10  $\mu$ m. Statistische Analyse: one-way ANOVA, ns =  $p > 0,05$ ; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  StdAb.

Einhergehend mit der Fragmentierung des Golgi-Apparates nahmen auch die Golgi-assoziierten ATG9A-Strukturen unter dem Einfluss der spezifischen siRNAs von C7orf43 ab (Abb. 3.33 B). Dies lies im Zusammenhang mit dem pre-Golgi Effekt auch einen post-Golgi Transporteffekt vermuten. Während die Proteinmenge von ATG9 weder durch den Knockdown noch durch die Re-expression von C7orf43 beeinflusst wurde (Abb. 3.33 C), führte die Wiederherstellung der C7orf43 Proteinabundanz zu einer erneuten Kompaktierung von ATG9-positiver Strukturen und zu deren partiellen Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat (Abb. 3.33 B).

Abschließend wurde in dieser Studie über C7orf43 eine neue TRAPP II Komplexuntereinheit identifiziert, die sowohl für die Aufrechterhaltung der ERGIC und Golgi-Apparat Struktur als auch für den effizienten Transport vom ER zum Golgi von Bedeutung ist.

## 4. Diskussion

### 4.1 C7orf43 interagiert mit dem Kern TRAPP und TRAPP II Komplex

Die verschiedenen TRAPP Komplexe sind wichtige Faktoren im Sekretionsweg der Zelle. Darüberhinaus konnte für viele ihrer Untereinheiten eine Beteiligung an zahlreichen Erkrankungen nachgewiesen werden. Trotzdem sind zur Funktion bzw. Dysfunktion der einzelnen TRAPP Komplexe unter physiologischen bzw. pathophysiologischen Bedingungen noch viele Fragen offen (Brunet and Sacher, 2014; Choi et al., 2009; Venditti et al., 2012). Die Identifikation von neuen Untereinheiten in Säugerzellen zeigt, dass auch die Komplexzusammensetzungen selbst noch nicht endgültig geklärt sind (Bassik et al., 2013; Scrivens et al., 2011; Scrivens et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen erstmals die Interaktome aller Untereinheiten der TRAPP Komplexe in Säugetierzellen durchgeführt (Abb. 3.1 – 3.5). Diese Analyse zeigte, dass alle Kern TRAPP Proteine mit einzelnen wenigen Ausnahmen mit den jeweiligen Untereinheiten von TRAPP II und TRAPP III interagieren. In gleicher Weise fanden sich die Kern TRAPP Untereinheiten als Interaktionspartner der beiden spezifischen TRAPP Komplexe. Dagegen konnten keine komplex-übergreifende Interaktionen zwischen TRAPP II und TRAPP III identifiziert werden. Neben einigen anderen gemeinsamen Interaktoren wurde das uncharakterisierte Protein C7orf43 als Interaktor des Kern TRAPP Komplexes und TRAPP II identifiziert. Eine Assoziation mit TRAPP III konnte für C7orf43 nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieser ausgeprägten Bindungsassoziationen wurde ebenfalls ein Interaktom von C7orf43 erstellt. Hierbei konnten neben beiden TRAPP II Untereinheiten auch alle Kern TRAPP Mitglieder mit Ausnahme von TRAPPC6A identifiziert werden (Abb. 3.6). Darüberhinaus finden sich auch andere Bindepartner von C7orf43 in den Interaktionsnetzwerken von mehreren TRAPP Proteinen wieder. Dazu zählen unter anderem RAB1A und SEC22B. Die Identifikation von RAB1A als Interaktor von C7orf43 könnte wichtige Hinweise auf die GEF Aktivität des TRAPP II Komplexes liefern, da die Funktionsweise der GEF Aktivität des TRAPP II Komplexes bislang nicht entschlüsselt ist. Wie beim TRAPP II Komplex in Hefe wird auch beim TRAPP II Komplex in Säugetierzellen die GEF Aktivität kontrovers diskutiert. Sowohl RAB1 als auch RAB11 sind als Substrate im Gespräch. TRAPPC10 scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen, da dies sowohl im Zusammenhang mit TRAPPC9 als RABGEF für RAB1 als auch im Zusammenhang mit TRAPPC2 für RAB11 im Gespräch ist (Levine et al., 2013; Yamasaki et al., 2009). Allerdings konnten im Interaktom von TRAPPC9 und TRAPPC10 weder RAB1A noch RAB11 identifiziert werden. Zusätzlich wurde in dem Interaktom von C7orf43 RAB31P

nachgewiesen, auch unter der Bezeichnung Rabin8 bekannt. RAB3IP konnte in den Analysen der TRAPP Proteine nicht identifiziert werden, es wurde jedoch gezeigt, dass der TRAPP II Komplex eine Interaktion mit RAB11 im Zusammenhang mit Rabin8 zur Aktivierung von RAB8 im Zentrosom eingeht (Westlake et al., 2011). Neben C7orf43 konnte SEC22B als Interaktoren von TRAPPC2L, TRAPPC4 und TRAPPC6A identifiziert werden. Das R-SNARE SEC22B interagiert mit dem COPII Protein SEC24 und ist in den antero- und retrograden ER-Golgi Sekretionsweg involviert (Flanagan et al., 2015; Liu and Barlowe, 2002; Liu et al., 2004; Mancias and Goldberg, 2007). SEC22B konnte zudem am ERGIC nachgewiesen werden (Hay et al., 1998). Kontrovers wird zusätzlich eine mögliche Rolle von SEC22B als v-SNARE innerhalb der Autophagie diskutiert (Nair et al., 2011; Zhao et al., 2015). Das uncharakterisierte Protein C7orf43 erweist sich durch die Bindung zum Kern TRAPP Komplex und TRAPP II auf der einen Seite und durch die Interaktion mit SEC22B und RAB1A auf der anderen Seite als idealer Kandidat für eine neue TRAPP II spezifische Untereinheit (Abb. 3.7-3.9).

Zur Bestätigung der Ergebnisse der TRAPP-C7orf43 Interaktionsstudie wurden HA-Immunpräzipitationen (HA-IP) mit anschließender SDS-PAGE- (Abb. 3.12) bzw. Native PAGE-Analyse (Abb. 3.13) sowie endogene IPs mit einem Antikörper gegen C7orf43 (Abb. 3.14) durchgeführt. Sowohl die SDS-PAGE- als auch die Native PAGE-Analyse der TRAPP Untereinheit und C7orf43 Überexpressionszellen bestätigten, die im Netzwerk beobachtete Interaktion von C7orf43 zu TRAPPC2L, TRAPPC4 und TRAPPC9 bzw. zum Kern TRAPP Komplex und TRAPP II. Wie auch schon für die TRAPP II Untereinheiten TRAPPC9 und TRAPPC10 bekannt, findet keine Interaktion zwischen C7orf43 und den TRAPP III Mitgliedern statt. Die massenspektrometrischen Analysen der Native PAGE Auftrennung zeigte, dass C7orf43 Teil des Kern TRAPP Komplexes bzw. von TRAPP II ist (Abb. 3.13). Darüberhinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass C7orf43 auch auf endogener Ebene mit Komponenten des Kern TRAPP Komplexes und TRAPP II interagiert (Abb. 3.14). Aufgrund der beschriebenen Interaktionen wird das uncharakterisierte Protein C7orf43 als potenzielle TRAPP II Untereinheit betrachtet und in der anschließenden Diskussion der Ergebnisse auch so bezeichnet.

### **4.2 C7orf43 lokalisiert mit ERGIC, *cis*-Golgi und COPI Vesikel**

Zur weiteren Analyse von C7orf43 als potenzielle neue TRAPP II Untereinheit wurde in der vorliegenden Arbeit eine Überprüfung der zellulären Lokalisation von C7orf43 durchgeführt und mit den bereits bekannten Lokalisationen der Kern TRAPP und TRAPP II Komplexmitglieder verglichen. Für die TRAPP II Komplexuntereinheiten TRAPPC9 und TRAPPC10 konnte bisher eine zelluläre Lokalisation sowohl am ERGIC und am Golgi-Apparat als auch mit COPI Vesikeln

## Diskussion

gezeigt werden (Yamasaki et al., 2009; Zong et al., 2012). Darüberhinaus konnte TRAPPC2 und TRAPPC4 mit COPI Vesikeln (Yamasaki et al., 2009), TRAPPC3 mit dem ERGIC (Yu et al., 2006) und TRAPPC2, TRAPPC2L und TRAPPC3 mit dem Golgi-Apparat (Barrowman et al., 2000; Sacher et al., 1998; Scrivens et al., 2009; Yu et al., 2006) lokalisiert werden. Der komplexe Aufbau des Golgi-Apparates erschwert die Unterscheidung zwischen den einzelnen Golgi Sub-Kompartimenten, weshalb zur leichteren Differenzierung die Substanz Nocodazol eingesetzt wurde. Der Einsatz von Actin-depolymerisierenden Nocodazol führt zu einer Fragmentierung des Golgi-Apparates in Ministapel (De Brabander et al., 1976; Rogalski and Singer, 1984). Im Falle einer Kolo-kalisation sollte auch unter Verwendung von Nocodazol eine eindeutige Kofärbung der fragmentierten Bereiche sichtbar sein. Diese Methode wurde in anderen Arbeiten bereits erfolgreich für Kolo-kalisationsstudien von TRAPPC9 und TRAPPC10 eingesetzt (Yamasaki et al., 2009; Zong et al., 2012). Zur Überprüfung der Hypothese, dass C7orf43 eine ähnliche zelluläre Lokalisation wie die oben benannten Kern TRAPP und TRAPP II Proteine aufweist, wurden Kolo-kalisationsstudien zu C7orf43 mit Antikörpern für ERGIC53, Giantin (*cis*-Golgi und COPI) und  $\beta$ -COP durchgeführt (Abb. 3.15, Abb. 3.16 und Abb. 3.19). Um die gewonnenen Erkenntnisse mit Hilfe des überexprimierenden Plasmides mit bereits bekannten Kolo-kalisationsstudien vergleichen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit TRAPPC10 als Kontrolle ebenfalls unter Einsatz eines überexprimierenden Plasmides verwendet (Abb. 3.17 und Abb. 3.18), für welches die bereits bekannte Lokalisation mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methoden bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurde für TRAPPC9 und TRAPPC10 bereits gezeigt, dass sie BFA-sensitiv sind (Yamasaki et al., 2009; Zong et al., 2012). Der Pilzmetabolit BFA blockiert die ARF1-Aktivierung, was zu einer Ablösung des COPI-Mantels von den Golgi Membranen führt. Bedingt durch diese Ablösung werden die Glykosyltransferasen des Golgi-Apparates zurück zum ER gebracht und der Golgi-Apparat fragmentiert (Helms and Rothman, 1992; Lippincott-Schwartz et al., 1989; Ward et al., 2001). Somit führt eine Behandlung mit BFA auch zur Auflösung von Strukturen, die mit dem ERGIC und dem *cis*-Golgi assoziiert sind (Zong et al., 2012). Diese Fragmentierung durch BFA-Behandlung konnte in der vorliegenden Arbeit für C7orf43- und TRAPPC10-positive Strukturen gezeigt werden (Abb. 3.15–3.19). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass C7orf43 mit dem ERGIC, dem *cis*-Golgi und auch mit COPI Vesikeln kolo-kalisiert und damit den gleichen subzellulären Kompartimenten zugeordnet werden kann wie die bereits zuvor bekannten TRAPP II spezifischen Untereinheiten TRAPPC9 und TRAPPC10.



### **4.3 C7orf43 ist nicht relevant für die Komplexstabilität**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktions- und Lokalisationsstudien legen nahe, dass C7orf43 ein neues potenzielles TRAPP II Mitglied sein könnte. In der Regel ist die Komplexzusammensetzung stark abhängig von der Bindung der Komplexmitgliedern untereinander und verschiedene TRAPP Untereinheiten konnten hierfür bereits als essenziell identifiziert werden. In Hefe wurde beispielsweise gezeigt, dass Trs33 oder Trs65 wichtig für die Bindung von Trs130 an den TRAPP II Komplex ist (Liang et al., 2007; Morozova et al., 2006; Tokarev et al., 2009; Yu and Liang, 2012). Darüberhinaus wurde Trs65 als Bindeglied für die Komplex Dimerisierung identifiziert und auch für Trs130 wurde ein wesentlicher Einfluss auf die Oligomerisierung demonstriert (Choi et al., 2011). Zudem verhinderte eine Mutation in Trs120 die hefe-typische TRAPP II Struktur (Menon et al., 2006). Schlussendlich wurde auch gezeigt, dass Trs33 und Tca17 essenziell für die Bildung des TRAPP II Komplexes sind (Choi et al., 2011; Montpetit and Conibear, 2009). Trs20 wird sowohl für die TRAPP II als auch für die TRAPP III Komplexbildung benötigt (Taussig et al., 2013; Taussig et al., 2014). Auch in Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass TRAPPC2 und TRAPPC2L wichtig für die Bildung der TRAPP II und der TRAPP III Komplexe sind (Scrivens et al., 2009; Yu and Liang, 2012; Zong et al., 2011). Für TRAPPC3 konnte ebenfalls eine essenzielle Bedeutung für die TRAPP Komplexbildungen nachgewiesen werden (Menon et al., 2006).

Zur Analyse des Einflusses von C7orf43 auf die Komplexstabilität des Kern TRAPP Komplexes und TRAPP II wurde mit Hilfe einer spezifischen siRNA C7orf43 herunterreguliert und anschließend die Komplexuntereinheiten mittels SDS-PAGE und die nativen Komplexe mit Hilfe von Native PAGE analysiert (Abb. 3.20). Der Knockdown von C7orf43 zeigte keinen Effekt auf die Proteinmengen repräsentativer Untereinheiten der drei TRAPP Komplexe und auch die Zusammensetzung der jeweiligen nativen Komplexe wurden durch einen Knockdown von C7orf43 nicht beeinflusst. Am Beispiel der TRAPP III Untereinheit Trs85 wurde in Hefe gezeigt, dass die Depletion von TRAPP Komponenten, die keinen Einfluss auf die Komplexzusammensetzung ausüben, die komplex-typische Funktion dennoch erheblich beeinträchtigen können (Kim et al., 2005; Meiling-Wesse et al., 2005; Sacher et al., 2000; Sacher et al., 2001). Da C7orf43 weder einen Einfluss auf die Proteinmengen einzelner TRAPP Untereinheiten noch auf die Stabilität der assemblierten TRAPP Komplexe hat, läßt sich ausschließen, dass C7orf43 eine regulative Rolle bei der Zusammensetzung des TRAPP II Komplexes spielt. Unterstützt wurde diese Einschätzung durch die Analyse des Einflusses von TRAPPC9 und TRAPPC10 auf C7orf43. Der Knockdown durch die spezifische siRNA sowohl von TRAPPC9 als auch von TRAPPC10 führte zu einer starken Verminderung der Proteinabundanz von C7orf43 (Abb. 3.20 A). Auch eine Assoziation von C7orf43 mit dem TRAPP II Komplex fand



nach Depletion von TRAPPC9 oder TRAPPC10 nicht mehr statt (Abb. 3.20 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass C7orf43 dem TRAPPII Komplex über TRAPPC9 und TRAPPC10 hinzugefügt wird.

#### **4.4 C7orf43 ist ein wichtiger Faktor für den Erhalt des ERGICs, des Golgi-Apparates und der COPI Vesikel**

Da C7orf43 für die Komplexstabilität entbehrlich zu sein scheint, stellte sich die Frage, welche Funktion C7orf43 als TRAPPII Untereinheit innehat. Für den Kern TRAPP Komplex und TRAPPII wurde gezeigt, dass die Herunterregulation einzelner Komponenten zu einem fragmentierten Phänotyp des ERGICs und des Golgi-Apparates führte (Scrivens et al., 2009; Yamasaki et al., 2009; Yu et al., 2006; Zong et al., 2012). Mit Hilfe der bereits zuvor eingesetzten siRNS von C7orf43 und von TRAPPC2L, TRAPPC9 und TRAPPC10 wurden die Auswirkungen eines Knockdowns auf das ERGIC und den Golgi-Apparat analysiert (Abb. 3.22). Wie bereits für andere TRAPP Proteine beobachtet (Scrivens et al., 2009; Yamasaki et al., 2009; Yu et al., 2006; Zong et al., 2012), führte der Knockdown von C7orf43 zu einer Fragmentierung des Golgi-Apparates bzw. zur Zerstreuung des ERGICs (Abb. 3.22 B-D). Mit Hilfe eines siRNS-resistenten Überexpressionsplasmides von C7orf43 konnte anschließend die Wirkung des Knockdowns aufgehoben und dadurch die Spezifität der C7orf43-vermittelten ERGIC und *cis*-Golgi Phänotypen bestätigt werden (Abb. 3.23). Die Depletion von C7orf43 hat somit ähnliche Auswirkungen auf sekretorische Kompartimente wie sie für Mitglieder des TRAPP Kern Komplexes und TRAPPII bereits bekannt waren. Um den Einfluß von C7orf43 auf den Golgi-Apparat weiter zu charakterisieren, wurde die Regenerationsfähigkeit des Golgi-Apparates nach Depletion von C7orf43 analysiert. Hierzu wurde ein FRAP-Assay mit einer Fluoreszenzprotein-markierten  $\beta$ 1,4-Galaktosyltransferase (GalT) durchgeführt (Abb. 3.24). GalT ist eine *trans*-Golgi Glykosyltransferase, die sich in der *trans*-Golgi Membran befindet (Qasba et al., 2008). Nach Knockdown von C7orf43 ist es dem Golgi-Apparat nicht möglich, sich in der gleichen Zeit wie die Kontrolle zu regenerieren. Aufgrund des starken Phänotyps in Bezug auf den Golgi-Apparat wurde mit Hilfe von Elektronenmikroskopie eine genauere Analyse der Knockdown-Auswirkungen vorgenommen (Abb. 3.25). Nach Depletion von C7orf43 zeigte sich in drei untersuchten Zellen eine signifikante Abnahme der Golgi-Länge und in der COS7 Zelle zusätzlich eine Reduktion der Anzahl an Golgi-Zisternen im Golgi-Stapel. Ähnliche Beobachtungen konnten mit dem Elektronenmikroskop bereits bei anderen für die Golgi-Struktur relevanten Proteinen gemacht werden (Bechler and Brown, 2013; Lee et al., 2015; Saitoh et al., 2009). Die bekannte Interaktion von TRAPPII spezifischen Untereinheiten

mit  $\beta$ -COP und die hier gezeigte Kollokalisierung von C7orf43 mit  $\beta$ -COP ließ im Zusammenhang mit den C7orf43-abhängigen Golgi-Apparat und beim ERGIC Phänotypen vermuten, dass sich der Knockdown von C7orf43 auch auf die COPI Vesikel auswirken könnte. Eine Immunfluoreszenz-Analyse mit dem Antikörper  $\beta$ -COP zeigte, dass der Knockdown von TRAPPC2L, TRAPPC9 und C7orf43 ebenfalls einen zerstreuten Phänotypen der COPI Vesikel zur Folge hatte (Abb. 3.26). In Studien, die sich auf COPI Vesikel bezogen, wurde zudem gezeigt, dass der Knockdown von  $\beta$ -COP ebenfalls in einer Fragmentierung des ERGICs, des *cis*- und sogar des *trans*-Golgis resultierte (Saitoh et al., 2009; Styers et al., 2008). Neben den Auswirkungen auf den *cis*-Golgi und die COPI Vesikel führt die Depletion von C7orf43 ebenfalls zu einem fragmentierten *trans*-Golgi (Abb. 3.29 B und D). C7orf43 erweist sich somit ähnlich der TRAPP II Komplexmitgliedern TRAPPC9 und TRAPPC10 und  $\beta$ -COP als wichtiger Faktor für das ERGIC, die COPI Vesikel und den gesamten Golgi-Apparat.

### **4.5 Der TRAPP II Komplex ist in dem Sekretionsweg vom ER zum Golgi involviert**

Die Zersplitterung des ERGICs, der COPI Vesikel und die Fragmentierung des Golgi-Apparates nach Knockdown von C7orf43 wirft die Frage auf, ob nur C7orf43 oder der gesamte TRAPP II Komplex innerhalb des pre-Golgi Sekretionsweges eine Rolle spielt. Bisher wurden nur TRAPPC2, TRAPPC3 und Untereinheiten des TRAPP III Komplexes mit dem Sekretionsweg vom ER zum Golgi in Verbindung gebracht (Bassik et al., 2013; Cai et al., 2007; Loh et al., 2005; Scrivens et al., 2011; Venditti et al., 2012; Yu et al., 2006). Dennoch ist die Beteiligung von letzterem am ER zu Golgi Sekretionsweg noch nicht im Detail geklärt. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass ein Knockdown von  $\beta$ -COP sich negativ auf den anterograden Sekretionsweg vom ER zum Golgi bzw. ERGIC auswirkt und COPI Vesikel für den anterograden Transport zum Golgi benötigt werden (Styers et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse brachten die Injektion eines  $\beta$ -COP Antikörpers oder die Verhinderung der COPI Assoziation mit Membranen. Zudem wurde gezeigt, dass ein COPI-abhängiger Selektionsmechanismus während oder kurz nach dem Verlassen des ERs existiert (Stephens and Pepperkok, 2002). Jedoch wird die direkte Beteiligung von COPI Vesikeln am anterograden Sekretionsweg auch kontrovers diskutiert, da angenommen wird, dass es sich hierbei auch um einen indirekten Effekt aufgrund der starken Verknüpfung von antero- und retrograden Transportwegen handeln könnte (Duden, 2003). Für den Hefe TRAPP II wurde gezeigt, dass Mutationen von Trs120 und Trs130 den intra-Golgi und post-Golgi Transportweg negativ beeinflussen (Barrowman et al., 2010; Cai et al., 2005). In diesem Kontext ist interessant, dass der Knockdown von C7orf43 die Kollokalisierung von ATG9 mit dem Golgi-Apparat beeinflusste (Abb.

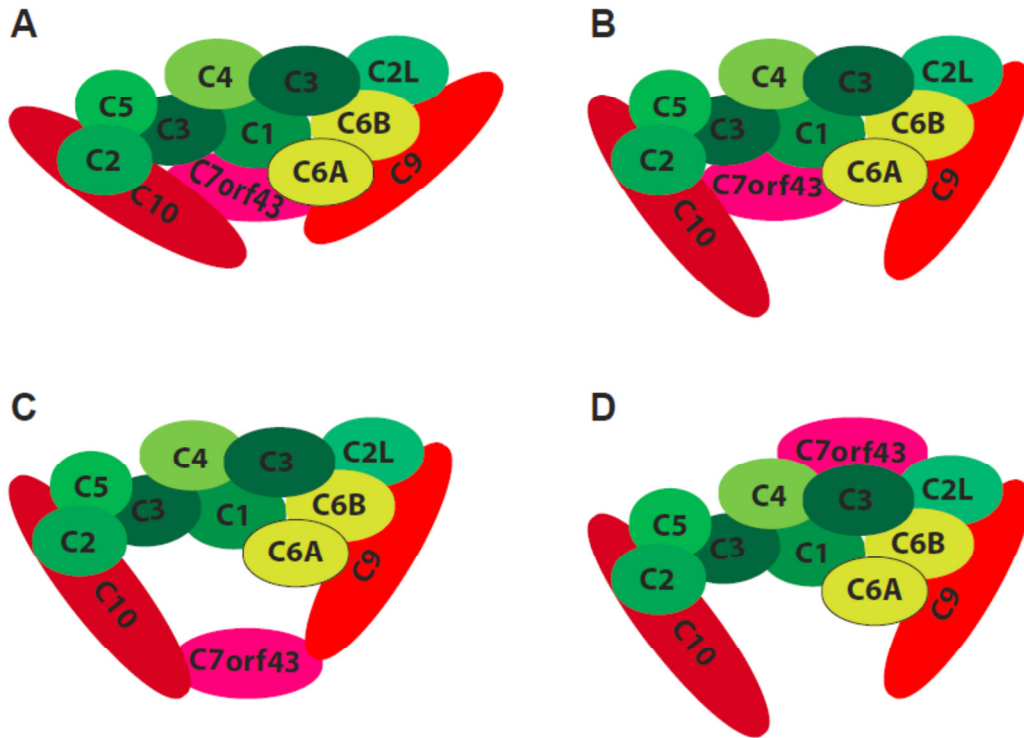
3.33). In Säugetierzellen konnte demonstriert werden, dass bei Knockdown von TRAPPC10 der Golgi-Apparat fragmentiert, eine große Anzahl von Vesikeln akkumuliert und der intra-Golgi Transportweg blockiert ist. Zudem wurde gezeigt, dass sowohl TRAPPC9 als auch TRAPPC10 an COPI Vesikeln am *cis*-Golgi binden (Barrowman et al., 2010; Cai et al., 2005; Kim et al., 2006; Sacher et al., 2001; Yamasaki et al., 2009). Unter Verwendung eines *vesicular stomatitis virus Glycoprotein* (vsv-G)-Plasmides, welches unter anderem Anwendung bei dem Monitoring der Sekretionswege findet, wurde bisher jedoch kein Zusammenhang zwischen TRAPPC10 und dem Sekretionsweg vom ER zum Golgi gefunden (Yamasaki et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des RUSH-Assays gezeigt werden, dass die Depletion von C7orf43 sehr wohl zu einer Beeinträchtigung des Sekretionsweges vom ER zum Golgi-Apparat führte (Abb. 3.30). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang dennoch, dass in dem Interaktom von C7orf43 keine Proteine der COPII Vesikel identifiziert wurden (Abb. 3.6) und dass die Depletion von C7orf43 keinen Einfluss auf das ER, die ERES oder die COPII Vesikel ausgeübt hat (Abb. 3.28 und Abb. 3.29 A). Allerdings führte der Knockdown von TRAPPC9 bzw. TRAPPC10 wie im Falle von C7orf43 im RUSH-Ansatz, zu einer Beeinträchtigung des Sekretionsweges vom ER zum Golgi (Abb. 3.31). Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte RUSH-Assay unterscheidet sich in der Durchführung in einigen Punkten von dem durch (Yamasaki et al., 2009) veröffentlichten Ansatz unter Einsatz des vsv-G-Plasmides. Neben unterschiedlichen Vektoren zwischen dem RUSH-Assay und dem vsv-G-Ansatz und verschiedenen Reagenzien zur Freisetzung des Reporters wurde in dem vsv-G-Assay auch unterschiedliche Temperaturen eingesetzt. Zudem wurde der vsv-G-Ansatz nicht unter Einsatz weiterer spezifischer siRNAs von zusätzlichen TRAPP Untereinheiten durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl C7orf43 als auch die beiden TRAPP II Mitglieder TRAPPC9 und TRAPPC10 als funktional relevant für den ER zu Golgi Sekretionsweg identifiziert werden. Dennoch könnte es sich aufgrund des stark fragmentierten Phänotyps vom ERGIC, Golgi-Apparat und COPI Vesikeln nach Knockdown der TRAPP II spezifischen Untereinheiten TRAPPC9, TRAPPC10 und C7orf43 in Analogie zu  $\beta$ -COP, auch um einen indirekten Effekt auf den anterograden Transportweg handeln (Duden, 2003). Allerdings konnte RAB1A und SEC22B in der Netzwerkanalyse von C7orf43 als Interaktor nachgewiesen werden. Ein wichtiger RAB1 Effektor ist p115, das durch seine Interaktion mit weiteren Proteinen des internen Golgi Transportweges die Membranverbindung zwischen COPII Vesikeln und dem Golgi unterstützt und auch durch direkte p115-SNARE Interaktionen an der *trans*-SNARE Komplexbildung beteiligt ist (Allan et al., 2000; Bentley et al., 2006; Moyer et al., 2001). Speziell für die Interaktionen zwischen p115, GM130, RAB1 und Giantin wurde eine Beteiligung an dem anterograden Signalweg und auch eine Verbindung zu den COPI Vesikeln nachgewiesen (Beard

et al., 2005; Seemann et al., 2000). Werden die unterschiedlichen Interaktoren blockiert oder herunterreguliert, ergibt sich daraus eine Beeinträchtigung des Transportweges von ER zu Golgi (Alvarez et al., 2001; Moyer et al., 2001; Puthenveedu and Linstedt, 2004). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von p115 bzw. die Überexpression einer  $\beta$ -COP-bindedefizienten p115 Variante in einer Fragmentierung des Golgi-Apparates resultierte (Guo et al., 2008; Puthenveedu and Linstedt, 2004). Zur weiteren Analyse des Effektes auf den Sekretionsweg vom ER zum Golgi wurden die Auswirkungen des Knockdowns von C7orf43 auf RAB1 und p115 mit Hilfe des FRAP Assays überprüft (Abb. 3.32). Die langsameren Fluoreszenzerholungen bei RAB1 und p115 nach Depletion von C7orf43 legen nahe, dass C7orf43 in die Rekrutierung von RAB1 zum ERGIC involviert sein könnte und dass RAB1 möglicherweise in Abwesenheit von C7orf43 eine inaktive Form annimmt, da nur aktive RAB GTPasen membran-gebunden vorliegen (Dirac-Svejstrup et al., 1997). C7orf43 könnte somit als TRAPP II Mitglied ein wichtiger Interaktionspartner für RAB1 sein und neben seiner Interaktion mit den TRAPP II Untereinheiten TRAPPC9 und TRAPPC10 auch in Verbindung mit den RAB1 Effektoren stehen. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass p115 in Säugetierzellen auch mit monomeren SEC22B interagiert (Wang et al., 2015), welches als Interaktor von C7orf43 identifiziert werden konnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass SEC22B mit dem ERGIC lokalisiert (Cebrian et al., 2011), als Monomer an das Heterodimer SEC23-SEC24 via SEC24 bindet und in COPII Vesikel transportiert wird (Jahn et al., 2003; Liu et al., 2004; Mancias and Goldberg, 2007; Mossessova et al., 2003). Darüberhinaus wurde für den TRAPP II Komplex am ERGIC eine indirekte Interaktion mit den COPII-Vesikeln in Säugetieren festgestellt. Hierbei vermittelt TRAPPC9 durch Interaktion mit der Dynaktinuntereinheit p150<sup>GLUD</sup>, die mit den COPII Proteinen SEC23 und SEC24 interagiert, das Andocken und Fusionieren des COPII Vesikels mit dem ERGIC. Hieraus ergibt sich eine Adapterfunktion zwischen der ERGIC Membran und Dynaktin, wodurch der TRAPP II Komplex beim Transport von ERGIC Strukturen zum *cis*-Golgi entlang der Mikrotubuli beteiligt ist (Zong et al., 2012). C7orf43 könnte durch die Interaktion mit SEC22B direkt oder indirekt an diesem Vorgang beteiligt sein. Die TRAPP II Untereinheit Trs65 in Hefe erfüllt in dieser Hinsicht eine Art Adapterfunktion zwischen dem TRAPP II Komplex und den COPI Vesikeln (Chen et al., 2011). Das äquivalente Protein TRAPPC13 in Säugetierzellen ist jedoch Bestandteil des TRAPP III Komplexes. C7orf43 könnte diese Funktion als Teil von TRAPP II übernommen haben und durch seine Interaktion mit RAB1A und SEC22B eine Schlüsselrolle einnehmen.

#### **4.6 Modell des TRAPP II Komplexes mit C7orf43**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben unter Berücksichtigung bereits veröffentlichten Modelle (Barrowman et al., 2010; Bassik et al., 2013; Brunet and Sacher, 2014; Yu and Liang, 2012) die Erstellung eines erweiterten Modells für den TRAPP II Komplex in Säugetierzellen (Abb. 4.1). Da der Knockdown von C7orf43 keine Auswirkungen auf die Komplexzusammensetzung zeigte (Abb. 3.20), erscheint es wahrscheinlich, dass C7orf43 zeitlich nach TRAPPC9 und TRAPPC10 dem TRAPP II Komplex zugefügt wird (Abb. 4.1 C). Alternativ könnte natürlich auch eine Bindung von C7orf43 an den Kern Komplex ohne Beeinträchtigung der späteren Kopplung von TRAPPC9 und TRAPPC10 vorliegen (Abb. 4.1 A, B und D).

Nach Depletion von TRAPPC9 und TRAPPC10 ist eine vollständige Reduktion der Proteinmengen von C7orf43 und auch eine Beeinträchtigung der Bindung an den TRAPP II Komplex durch C7orf43 zu beobachten (Abb. 3.20) und auch der Einsatz der spezifischen siRNS von TRAPPC2L resultiert in einer leichten Reduktion der Proteinabundanz von C7orf43 (Abb. 3.20). Die Auswirkungen einer Depletion weiterer Kern TRAPP Mitglieder konnte auf Grund nicht verfügbarer spezifischer siRNS nicht analysiert werden. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Untereinheiten des Kern Komplexes die Proteinmengen von C7orf43 und eine Beeinträchtigung der Bindung an den TRAPP II Komplex beeinflussen. Werden den Modellen zusätzlich die Informationen aus der Netzwerkanalyse von C7orf43 hinzugefügt (Abb. 3.6), kann auch eine Interaktion mit TRAPPC6A und TRAPPC1 nicht ausgeschlossen werden (Abb. 4.1 A und B). Der dominante Einfluss der siRNS von TRAPPC9 und TRAPPC10 auf C7orf43 wie auch die Ergebnisse der Netzwerkanalyse lassen allerdings darauf schließen, dass beide äußerst wichtige Bindepartner für C7orf43 darstellen und weisen auch auf eine Rekrutierung von C7orf43 an den TRAPP II Komplex über eine Bindung an TRAPPC9 und TRAPPC10 hin (Abb. 4.1 C). Ein detaillierteres Modell könnte zukünftig mit Hilfe weiterer Methoden, wie z. B. der crosslink-basierten Massenspektrometrie oder auch der Analyse der Kristallstruktur des TRAPP II Komplexes, erreicht werden.



**Abb. 4.1: Erweitertes Modell des TRAPPII Komplexes mit C7orf43.** Die Kern TRAPP Untereinheiten sind durch unterschiedliche Grün-Farbtöne und die TRAPPII-Mitglieder durch verschiedene Rot-Nuancen gekennzeichnet. Modifiziert nach (Barrowman et al., 2010; Bassik et al., 2013; Brunet and Sacher, 2014; Levine et al., 2013; Yu and Liang, 2012)

#### 4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde C7orf43 als neues Mitglied des TRAPP II Komplexes identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass C7orf43 nicht nur wichtig für die Stabilität des Golgi-Apparates und des ERGICs sowie für die Funktion der COPI Vesikel ist, sondern auch zusammen mit den bereits bekannten TRAPP II Untereinheiten eine Rolle bei dem Sekretionsweg vom ER zum Golgi spielt. Offen bleibt die Frage, wie die exakte Bindung von C7orf43 an den TRAPP II Komplex erfolgt und welche Komplexmitglieder hierbei involviert sind. Weitere Forschungen sollten zudem die genaue Interaktion zwischen C7orf43 und RAB1A, p115 und SEC22B analysieren und versuchen deren exakten Mechanismus zu entschlüsseln. Eine crosslink-gekoppelte MS könnte Aufschluss über die Zusammensetzung des TRAPP II Komplexes und die Binderegionen der einzelnen Untereinheiten geben. Zudem könnten mit Hilfe dieser Methode die Bindestellen zwischen C7orf43 und seinen Interaktionspartnern wie SEC22B und RAB1A identifiziert werden. Durch Mutationen der identifizierten Binderegionen sowohl innerhalb des TRAPP II Komplexes als auch zu den Interaktionspartnern von C7orf43 könnten zusätzlich dessen Rolle innerhalb des Sekretionsweges vom ER zum Golgi, dessen Auswirkungen auf das ERGIC, den Golgi-Apparat und die COPI Vesikel und auch weitere Auswirkungen auf den zellulären Ablauf analysiert werden. Die Kristallisation von C7orf43 könnte zusätzliche Informationen über die Bindung an den TRAPP II Komplex und die Interaktionen mit RAB1A und SEC22B liefern. Das ERGIC ist ein vertebraten-typisches Organell und existiert nicht in Hefe. Die Interaktion des als vertebraten-typisch identifiziertes Protein C7orf43 (Abb. 3.10) mit RAB1A und SEC22B, aber auch die Effekte eines Knockdown auf das ERGIC, den Golgi-Apparat, die COPI Vesikel sowie RAB1 und p115 könnten hiermit in Verbindung stehen. C7orf43 könnte als zusätzliches Protein des TRAPP II Komplexes wichtige komplex-bedingte Interaktion gewährleisten. Es konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob der TRAPP II in Säugetieren ein GEF für RAB1 und/oder RAB11 ist, und in der vorliegenden Studie konnten für den Kern TRAPP Komplex weitere RAB GTPasen identifiziert werden. Außerdem wurde in Säugetieren in Verbindung mit den TRAPP Komplexen noch kein GEF-Assay durchgeführt, weshalb der GEF-Mechanismus aber auch die Interaktionen zu den RAB GTPasen genauer analysiert werden sollten. Auch die Frage, ob der Kern TRAPP Komplex eigenständig agiert, ist bislang nicht geklärt. Weiterführende Studien werden sich zudem dem Tiermodell und den Auswirkungen eines Knockdown von C7orf43 in Zebrafisch oder Maus widmen.

## 5. Anhang

### 5.1 Auflistung der Firmen und Hersteller

Abcam, Cambridge, UK

Acros Organics, Geel, Belgien

Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

ATCC, Manassas, Virginia, USA

BD Transduction, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA

Bethyl, Montgomery, Texas, USA

BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA

Covance, Princeton, New Jersey, USA

Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

Fuji, Tokio, Japan

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

Hesso Farhan, Institut für Biologie, Universität Konstanz, Deutschland/

Biotechnologisches Institut Thurgau, Kreuzlingen, Schweiz

InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA

Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA

Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Lonza, Visp, Schweiz

Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA

New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

Nippon Genetics, Tokio, Japan

OriGene, Rockville, Maryland, USA

Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA



## Anhang

Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA

Qiagen, Venlo, Niederlande

Roche, Penzberg, Deutschland

Santa Cruz, Dallas, Texas, USA

Sidney Yu, Biomed. Wissenschaften, Chinesische Universität von Hong Kong, Hong Kong, China

Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tocris Bioscience, Avonmouth, Bristol, UK

VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Whatman Schleicher & Schuell, München, Deutschland

Wade Harper, Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA

## 5.2 Laborgeräte

ÄKTApurifizier 10/100	GE Healthcare
Fraction Collector Frac-950, Äkta	GE Healthcare
Kühlzentrifuge, groß	5810R, Eppendorf
Kühlzentrifuge, klein	5424R, Eppendorf
GelDoc™XR+	Bio-Rad
Inkubationsschüttler Labor	Duomax 1030, Heidolph Instruments
Zellkulturinkubationsschrank	Heracell™ 240i, Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkbank	HeraSafe™ KS, Thermo Fisher Scientific
Zellzähler	TC20, Bio-Rad
LTQ Velos	Thermo Fisher Scientific
UHPLC der Velos	Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific
LTQ Velos Pro + Orbitrap Elite	Thermo Fisher Scientific
Nano-HPLC	EASY-nLCII, Thermo Fisher Scientific
Vakuumzentrifuge	Concentrator plus, Eppendorf
Spektralphotometer	Novaspec Plus, GE Healthcare
Konfokalmikroskop	TCS SP8, Leica
Thermocycler S1000™	Bio-Rad
Light Cycler 480	Roche
Inkubationsschüttler Eppis	Thermomixer Comfort, Eppendorf
Nanodrop	ND-1000, NanoDrop Technologies
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad

### 5.3 Primerauflistung

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und werden von 5' nach 3' aufgelistet.

#### Primer für das Invitrogen™ Gateway™ Klonierungssysteme

Gen / Protein	Sequenz
TRAPPC1_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGACTGTCCACAACCTGTACC
TRAPPC1_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCAGCCAGCCCGGG
TRAPPC2_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGTCTGGGAGCTTCTACTTTG
TRAPPC2_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCAGCTTAAAAGGTGTTTCTTCC
TRAPPC2L_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGCGGTGTGCATCG
TRAPPC2L_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCAGCACACCTGTATCATCATC
TRAPPC3_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGTGAGGCAGGCGCA
TRAPPC3_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTATTCTCTCCAGCTGGAAGA
TRAPPC4_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGCGATTTTTAGTGTGTATGTG
TRAPPC4_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTATGACCCAGGTCCAAAAGTTC
TRAPPC5_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGGCGCGCTTC
TRAPPC5_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCAGCGGCCCTCCAG
TRAPPC6A_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGCGGATACTGTGTTGTTT
TRAPPC6A_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTAGGATTCGGAATCACCA
TRAPPC6B_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGCGGATGAGGCGT
TRAPPC6B_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTACAGCTTCTGTATCATCACCTGA
TRAPPC8_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGCCCAGTGTGTACAATCA
TRAPPC8_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCACACATTACTGATGATGATCAG
TRAPPC9_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGTCCAGCTGGGG
TRAPPC9_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCAGGCCTGCGCCTC
TRAPPC10_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGACGCCTCTGAGGAG
TRAPPC10_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCATGTTACTGACTTCCAGGA
TRAPPC11_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGAGCCCCACACAGTGG
TRAPPC11_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCATGCAGCAGCAATAGAGG
TRAPPC12_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGGACGCTGGCG
TRAPPC12_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTAGGCCAGCTTGAGGCACT
TRAPPC13_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAAGTGAATCCCCCTAAA
TRAPPC13_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCAGCTTCCACTTTAATGGC
C7orf43_for	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGTCCCAGTGCGACTA
C7orf43_rev	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTACTTGACGGGTTCCACCA

Mutagenese-Primer für rescue-C7orf43

rescue_C7orf43_for	GGCCGGGAAGTACATCGAGTAATCACATTGTGACTCCATGCCAACTTTTTTG
rescue_C7orf43_rev	CAAAAAAGTTGGCATGGAGTCACAATGTGATTACTCGATGTACTIONCCCGGCC

Primer der qRT-PCR

Gen / Protein	Sequenz
ActinB	CGGGAAATCGTGCCTGACATTAAG
ActinB	TGATCTCCTTCTGCATCCTGTCGG
PBDG	CCCTGGAGAAGAATGAAGTGG
PBDG	TTCTCTGGCAGGGTTTCTAGG
TATA-box-binding protein	CACCTTACGCTCAGGGCTT
TATA-box-binding protein	TATTGGTGTCTGAATAGGCTGTG
TRAPPC10	CGTACCCTTCAGGACCACAC
TRAPPC10	GGACTGCGTGTTTCAGTGGTA

**5.4 Verwendete Konstrukte**

Alle Konstrukte wurden mit Hilfe des Invitrogen™ Gateway™ Klonierungssystems der Firma Thermo Fisher Scientific und den unter Punkt 2.1.2 angegebenen Vektoren hergestellt.

	pDONR223	pDEST-MYC-GAW-IP	pHAGE-N-Flag-HA	pHAGE-N-GFP	MSCV-i(N-Flag-HA)-IRES-PURO
TRAPPC1	X				X
TRAPPC2	X				X
TRAPPC2L	X				X
TRAPPC3	X				X
TRAPPC4	X				X
TRAPPC5	X				X
TRAPPC6A	X				X
TRAPPC6B	X				X
TRAPPC8	X				X
TRAPPC9	X				X
TRAPPC10	X		X	X	X
TRAPPC11	X				X
TRAPPC12	X				X
TRAPPC13	X				X
C7orf43	X		X	X	X
Rescue-C7orf43	X	X			

## 5.5 Publikationsliste

Human C7orf43 is a new mammalian TRAPP component required for ER-to-Golgi trafficking, Stefanie Nühlen, Kerstin Tillmann, Daniela Stadel, Roberta Crispino, Valentina Millarte, Roman Polishchuk, Hesso Farhan and Christian Behrends, *EMBO Reports*, Stand: Vorbereitung zur Re-submission

Lamb, C.A., S. Nühlen, D. Judith, D. Frith, A.P. Snijders, C. Behrends, and S.A. Tooze. 2015. TBC1D14 regulates autophagy via the TRAPP complex and ATG9 traffic. *The EMBO journal*.

## 5.6 Teilnahme an Workshops und Konferenzen

- |                  |   |
|------------------|---|
| 28. - 29.06.2012 | Hands-On Workshop „Utilizing nano UHPLC to maximize peptide and protein identification results“, ISAS, Dortmund |
| 25. - 27.06.2012 | 19. Arbeitstagung Mikromethoden der Proteinchemie, Ruhr-Universität Bochum                                      |
| 12. - 14.09.2011 | Teilnahme „Proteomics Workshop“, ISAS, Dortmund   |
| 05. - 13.05.2011 | Omics Meets Cell Biology, Keystone Symposia, Alpbach, Österreich  |

## 6. Literatur

- Abounit, K., T.M. Scarabelli, and R.B. McCauley. 2012. Autophagy in mammalian cells. *World journal of biological chemistry*. 3:1-6.
- Alers, S., A.S. Loffler, S. Wesselborg, and B. Stork. 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology*. 32:2-11.
- Allan, B.B., B.D. Moyer, and W.E. Balch. 2000. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science*. 289:444-448.
- Alvarez, C., R. Garcia-Mata, H.P. Hauri, and E. Sztul. 2001. The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic. *The Journal of biological chemistry*. 276:2693-2700.
- Amaya, C., C.M. Fader, and M.I. Colombo. 2015. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS letters*. 589:3343-3353.
- Appenzeller-Herzog, C., and H.P. Hauri. 2006. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of cell science*. 119:2173-2183.
- Arighi, C.N., L.M. Hartnell, R.C. Aguilar, C.R. Haft, and J.S. Bonifacino. 2004. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *The Journal of cell biology*. 165:123-133.
- Barlowe, C.K., and E.A. Miller. 2013. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*. 193:383-410.
- Barr, F., and D.G. Lambright. 2010. Rab GEFs and GAPs. *Current opinion in cell biology*. 22:461-470.
- Barr, F.A., and B. Short. 2003. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Current opinion in cell biology*. 15:405-413.
- Barrowman, J., D. Bhandari, K. Reinisch, and S. Ferro-Novick. 2010. TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:759-763.
- Barrowman, J., M. Sacher, and S. Ferro-Novick. 2000. TRAPP stably associates with the Golgi and is required for vesicle docking. *The EMBO journal*. 19:862-869.
- Barszczewski, M., J.J. Chua, A. Stein, U. Winter, R. Heintzmann, F.E. Zilly, D. Fasshauer, T. Lang, and R. Jahn. 2008. A novel site of action for alpha-SNAP in the SNARE conformational cycle controlling membrane fusion. *Molecular biology of the cell*. 19:776-784.
- Baschieri, F., and H. Farhan. 2012. Crosstalk of small GTPases at the Golgi apparatus. *Small GTPases*. 3:80-90.
- Bassik, M.C., M. Kampmann, R.J. Lebbink, S. Wang, M.Y. Hein, I. Poser, J. Weibezahn, M.A. Horlbeck, S. Chen, M. Mann, A.A. Hyman, E.M. Leproust, M.T. McManus, and J.S. Weissman. 2013. A systematic mammalian genetic interaction map reveals pathways underlying ricin susceptibility. *Cell*. 152:909-922.
- Beard, M., A. Satoh, J. Shorter, and G. Warren. 2005. A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *The Journal of biological chemistry*. 280:25840-25848.
- Bechler, M.E., and W.J. Brown. 2013. PAFAH1b phospholipase A2 subunits have distinct roles in maintaining Golgi structure and function. *Biochimica et biophysica acta*. 1831:595-601.
- Behnia, R., F.A. Barr, J.J. Flanagan, C. Barlowe, and S. Munro. 2007. The yeast orthologue of GRASP65 forms a complex with a coiled-coil protein that contributes to ER to Golgi traffic. *The Journal of cell biology*. 176:255-261.
- Behrends, C., and S. Fulda. 2012. Receptor proteins in selective autophagy. *International journal of cell biology*. 2012:673290.

- Behrends, C., M.E. Sowa, S.P. Gygi, and J.W. Harper. 2010. Network organization of the human autophagy system. *Nature*. 466:68-76.
- Bentley, M., Y. Liang, K. Mullen, D. Xu, E. Sztul, and J.C. Hay. 2006. SNARE status regulates tether recruitment and function in homotypic COPII vesicle fusion. *The Journal of biological chemistry*. 281:38825-38833.
- Bharucha, N., Y. Liu, E. Papanikou, C. McMahon, M. Esaki, P.D. Jeffrey, F.M. Hughson, and B.S. Glick. 2013. Sec16 influences transitional ER sites by regulating rather than organizing COPII. *Molecular biology of the cell*. 24:3406-3419.
- Blondeau, F., B. Ritter, P.D. Allaire, S. Wasiak, M. Girard, N.K. Hussain, A. Angers, V. Legendre-Guillemain, L. Roy, D. Boismenu, R.E. Kearney, A.W. Bell, J.J. Bergeron, and P.S. McPherson. 2004. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:3833-3838.
- Bogershausen, N., N. Shahrzad, J.X. Chong, J.C. von Kleist-Retzow, D. Stanga, Y. Li, F.P. Bernier, C.M. Loucks, R. Wirth, E.G. Puffenberger, R.A. Hegele, J. Schreml, G. Lapointe, K. Keupp, C.L. Brett, R. Anderson, A. Hahn, A.M. Innes, O. Suchowersky, M.B. Mets, G. Nurnberg, D.R. McLeod, H. Thiele, D. Waggoner, J. Altmuller, K.M. Boycott, B. Schoser, P. Nurnberg, C. Ober, R. Heller, J.S. Parboosingh, B. Wollnik, M. Sacher, and R.E. Lamont. 2013. Recessive TRAPPC11 mutations cause a disease spectrum of limb girdle muscular dystrophy and myopathy with movement disorder and intellectual disability. *American journal of human genetics*. 93:181-190.
- Bolte, S., and F.P. Cordelieres. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 224:213-232.
- Boncompain, G., S. Divoux, N. Gareil, H. de Forges, A. Lescure, L. Latreche, V. Mercanti, F. Jollivet, G. Raposo, and F. Perez. 2012. Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nature methods*. 9:493-498.
- Boncompain, G., and F. Perez. 2013. The many routes of Golgi-dependent trafficking. *Histochemistry and cell biology*. 140:251-260.
- Bonifacino, J.S., and B.S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116:153-166.
- Borner, G.H., M. Harbour, S. Hester, K.S. Lilley, and M.S. Robinson. 2006. Comparative proteomics of clathrin-coated vesicles. *The Journal of cell biology*. 175:571-578.
- Boya, P., F. Reggiori, and P. Codogno. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology*. 15:713-720.
- Brandizzi, F., and C. Barlowe. 2013. Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:382-392.
- Brocker, C., S. Engelbrecht-Vandre, and C. Ungermann. 2010. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Current biology : CB*. 20:R943-952.
- Brunet, S., and M. Sacher. 2014. In sickness and in health: the role of TRAPP and associated proteins in disease. *Traffic*. 15:803-818.
- Cabrera, M., M. Nordmann, A. Perz, D. Schmedt, A. Gerondopoulos, F. Barr, J. Piehler, S. Engelbrecht-Vandre, and C. Ungermann. 2014. The Mon1-Ccz1 GEF activates the Rab7 GTPase Ypt7 via a longin-fold-Rab interface and association with PI3P-positive membranes. *Journal of cell science*. 127:1043-1051.
- Cabrera, M., and C. Ungermann. 2013. Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) have a critical but not exclusive role in organelle localization of Rab GTPases. *The Journal of biological chemistry*. 288:28704-28712.
- Cai, H., S. Yu, S. Menon, Y. Cai, D. Lazarova, C. Fu, K. Reinisch, J.C. Hay, and S. Ferro-Novick. 2007. TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature*. 445:941-944.

- Cai, H., Y. Zhang, M. Pypaert, L. Walker, and S. Ferro-Novick. 2005. Mutants in trs120 disrupt traffic from the early endosome to the late Golgi. *The Journal of cell biology*. 171:823-833.
- Cai, Y., H.F. Chin, D. Lazarova, S. Menon, C. Fu, H. Cai, A. Sclafani, D.W. Rodgers, E.M. De La Cruz, S. Ferro-Novick, and K.M. Reinisch. 2008. The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes. *Cell*. 133:1202-1213.
- Cebrian, I., G. Visentin, N. Blanchard, M. Jouve, A. Bobard, C. Moita, J. Enninga, L.F. Moita, S. Amigorena, and A. Savina. 2011. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell*. 147:1355-1368.
- Chen, S., H. Cai, S.K. Park, S. Menon, C.L. Jackson, and S. Ferro-Novick. 2011. Trs65p, a subunit of the Ypt1p GEF TRAPP II, interacts with the Arf1p exchange factor Gea2p to facilitate COPI-mediated vesicle traffic. *Molecular biology of the cell*. 22:3634-3644.
- Chen, Y., and D.J. Klionsky. 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of cell science*. 124:161-170.
- Cherfils, J., and M. Zoghoufi. 2013. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews*. 93:269-309.
- Chia, P.Z., and P.A. Gleeson. 2014. Membrane tethering. *F1000prime reports*. 6:74.
- Chia, P.Z., P. Gunn, and P.A. Gleeson. 2013. Cargo trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Histochemistry and cell biology*. 140:307-315.
- Chin, H.F., Y. Cai, S. Menon, S. Ferro-Novick, K.M. Reinisch, and E.M. De La Cruz. 2009. Kinetic analysis of the guanine nucleotide exchange activity of TRAPP, a multimeric Ypt1p exchange factor. *Journal of molecular biology*. 389:275-288.
- Cho, Y.S., and H.J. Kwon. 2010. Control of autophagy with small molecules. *Archives of pharmacological research*. 33:1881-1889.
- Choi, C., M. Davey, C. Schluter, P. Pandher, Y. Fang, L.J. Foster, and E. Conibear. 2011. Organization and assembly of the TRAPP II complex. *Traffic*. 12:715-725.
- Choi, M.Y., C.C. Chan, D. Chan, K.D. Luk, K.S. Cheah, and J.A. Tanner. 2009. Biochemical consequences of sedlin mutations that cause spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *The Biochemical journal*. 423:233-242.
- Conibear, E. 2011. Vesicle transport: springing the TRAPP. *Current biology : CB*. 21:R506-508.
- Cox, R., S.H. Chen, E. Yoo, and N. Segev. 2007. Conservation of the TRAPP II-specific subunits of a Ypt/Rab exchanger complex. *BMC evolutionary biology*. 7:12.
- Cuervo, A.M., and F. Macian. 2014. Autophagy and the immune function in aging. *Current opinion in immunology*. 29:97-104.
- Cutrona, M.B., G.V. Beznoussenko, A. Fusella, O. Martella, P. Moral, and A.A. Mironov. 2013. Silencing of mammalian Sar1 isoforms reveals COPII-independent protein sorting and transport. *Traffic*. 14:691-708.
- D'Arcangelo, J.G., K.R. Stahmer, and E.A. Miller. 2013. Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochimica et biophysica acta*. 1833:2464-2472.
- Day, K.J., L.A. Staehelin, and B.S. Glick. 2013. A three-stage model of Golgi structure and function. *Histochemistry and cell biology*. 140:239-249.
- De Brabander, M.J., R.M. Van de Veire, F.E. Aerts, M. Borgers, and P.A. Janssen. 1976. The effects of methyl (5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate, (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro. *Cancer research*. 36:905-916.
- De Matteis, M.A., and A. Luini. 2008. Exiting the Golgi complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:273-284.
- Delprato, A. 2012. Topological and functional properties of the small GTPases protein interaction network. *PLoS one*. 7:e44882.
- Dirac-Svejstrup, A.B., T. Sumizawa, and S.R. Pfeffer. 1997. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *The EMBO journal*. 16:465-472.

- Duden, R. 2003. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Molecular membrane biology*. 20:197-207.
- Dumas, J.J., Z. Zhu, J.L. Connolly, and D.G. Lambright. 1999. Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure*. 7:413-423.
- Enrich, C., C. Rentero, A. Hierro, and T. Grewal. 2015. Role of cholesterol in SNARE-mediated trafficking on intracellular membranes. *Journal of cell science*. 128:1071-1081.
- Farhan, H., and C. Rabouille. 2011. Signalling to and from the secretory pathway. *Journal of cell science*. 124:171-180.
- Flanagan, J.J., and C. Barlowe. 2006. Cysteine-disulfide cross-linking to monitor SNARE complex assembly during endoplasmic reticulum-Golgi transport. *The Journal of biological chemistry*. 281:2281-2288.
- Frasa, M.A., K.T. Koessmeier, M.R. Ahmadian, and V.M. Braga. 2012. Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 13:67-73.
- Gedeon, A.K., A. Colley, R. Jamieson, E.M. Thompson, J. Rogers, D. Sillence, G.E. Tiller, J.C. Mulley, and J. Gecz. 1999. Identification of the gene (SEDL) causing X-linked spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *Nature genetics*. 22:400-404.
- Glick, B.S. 2014. Integrated self-organization of transitional ER and early Golgi compartments. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 36:129-133.
- Gordon, D.E., M. Mirza, D.A. Sahlender, J. Jakovleska, and A.A. Peden. 2009. Coiled-coil interactions are required for post-Golgi R-SNARE trafficking. *EMBO reports*. 10:851-856.
- Graham, T.R., and C.G. Burd. 2011. Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends in cell biology*. 21:113-121.
- Guo, Y., and A.D. Linstedt. 2013. Binding of the vesicle docking protein p115 to the GTPase Rab1b regulates membrane recruitment of the COPI vesicle coat. *Cellular logistics*. 3:e27687.
- Guo, Y., V. Punj, D. Sengupta, and A.D. Linstedt. 2008. Coat-tether interaction in Golgi organization. *Molecular biology of the cell*. 19:2830-2843.
- Guo, Y., D.W. Sirkis, and R. Schekman. 2014. Protein sorting at the trans-Golgi network. *Annual review of cell and developmental biology*. 30:169-206.
- Gwynn, B., R.S. Smith, L.B. Rowe, B.A. Taylor, and L.L. Peters. 2006. A mouse TRAPP-related protein is involved in pigmentation. *Genomics*. 88:196-203.
- Hay, J.C., D.S. Chao, C.S. Kuo, and R.H. Scheller. 1997. Protein interactions regulating vesicle transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in mammalian cells. *Cell*. 89:149-158.
- Helms, J.B., and J.E. Rothman. 1992. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*. 360:352-354.
- Hirata, T., M. Fujita, S. Nakamura, K. Gotoh, D. Motooka, Y. Murakami, Y. Maeda, and T. Kinoshita. 2015. Post-Golgi anterograde transport requires GARP-dependent endosome-to-TGN retrograde transport. *Molecular biology of the cell*. 26:3071-3084.
- Hirose, H., K. Arasaki, N. Dohmae, K. Takio, K. Hatsuzawa, M. Nagahama, K. Tani, A. Yamamoto, M. Tohyama, and M. Tagaya. 2004. Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *The EMBO journal*. 23:1267-1278.
- Hong, W. 2005. SNAREs and traffic. *Biochimica et biophysica acta*. 1744:120-144.
- Hong, W., and S. Lev. 2014. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends in cell biology*. 24:35-43.
- Hsia, K.C., and A. Hoelz. 2010. Crystal structure of alpha-COP in complex with epsilon-COP provides insight into the architecture of the COPI vesicular coat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:11271-11276.



- Huang, J., C.L. Birmingham, S. Shahnazari, J. Shiu, Y.T. Zheng, A.C. Smith, K.G. Campellone, W.D. Heo, S. Gruenheid, T. Meyer, M.D. Welch, N.T. Ktistakis, P.K. Kim, D.J. Klionsky, and J.H. Brummell. 2011. Antibacterial autophagy occurs at PI(3)P-enriched domains of the endoplasmic reticulum and requires Rab1 GTPase. *Autophagy*. 7:17-26.
- Hutagalung, A.H., and P.J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews*. 91:119-149.
- Ishihara, N., M. Hamasaki, S. Yokota, K. Suzuki, Y. Kamada, A. Kihara, T. Yoshimori, T. Noda, and Y. Ohsumi. 2001. Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Molecular biology of the cell*. 12:3690-3702.
- Jahn, R., T. Lang, and T.C. Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell*. 112:519-533.
- Jarvela, T., and A.D. Linstedt. 2014. Isoform-specific tethering links the Golgi ribbon to maintain compartmentalization. *Molecular biology of the cell*. 25:133-144.
- Jones, S., C. Newman, F. Liu, and N. Segev. 2000. The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Molecular biology of the cell*. 11:4403-4411.
- Kakuta, S., H. Yamamoto, L. Negishi, C. Kondo-Kakuta, N. Hayashi, and Y. Ohsumi. 2012. Atg9 vesicles recruit vesicle-tethering proteins Trs85 and Ypt1 to the autophagosome formation site. *The Journal of biological chemistry*. 287:44261-44269.
- Kartberg, F., M. Elsnér, L. Froderberg, L. Asp, and T. Nilsson. 2005. Commuting between Golgi cisternae--mind the GAP! *Biochimica et biophysica acta*. 1744:351-363.
- Kawamoto, K., Y. Yoshida, H. Tamaki, S. Torii, C. Shinotsuka, S. Yamashina, and K. Nakayama. 2002. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic*. 3:483-495.
- Keller, P., and K. Simons. 1997. Post-Golgi biosynthetic trafficking. *Journal of cell science*. 110 ( Pt 24):3001-3009.
- Kelly, E.E., C.P. Horgan, B. Goud, and M.W. McCaffrey. 2012. The Rab family of proteins: 25 years on. *Biochemical Society transactions*. 40:1337-1347.
- Khaminets, A., C. Behl, and I. Dikic. 2015. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in cell biology*.
- Kim, M.S., M.J. Yi, K.H. Lee, J. Wagner, C. Munger, Y.G. Kim, M. Whiteway, M. Cygler, B.H. Oh, and M. Sacher. 2005. Biochemical and crystallographic studies reveal a specific interaction between TRAPP subunits Trs33p and Bet3p. *Traffic*. 6:1183-1195.
- Kim, Y.G., S. Raunser, C. Munger, J. Wagner, Y.L. Song, M. Cygler, T. Walz, B.H. Oh, and M. Sacher. 2006. The architecture of the multisubunit TRAPP I complex suggests a model for vesicle tethering. *Cell*. 127:817-830.
- Klumperman, J. 2011. Architecture of the mammalian Golgi. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.
- Klumperman, J., A. Schweizer, H. Clausen, B.L. Tang, W. Hong, V. Oorschot, and H.P. Hauri. 1998. The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *Journal of cell science*. 111 ( Pt 22):3411-3425.
- Kummel, D., A. Oeckinghaus, C. Wang, D. Krappmann, and U. Heinemann. 2008. Distinct isocomplexes of the TRAPP trafficking factor coexist inside human cells. *FEBS letters*. 582:3729-3733.
- Lamb, C.A., S. Nuhlen, D. Judith, D. Frith, A.P. Snijders, C. Behrends, and S.A. Tooze. 2015. TBC1D14 regulates autophagy via the TRAPP complex and ATG9 traffic. *The EMBO journal*.
- Lee, I., N. Tiwari, M.H. Dunlop, M. Graham, X. Liu, and J.E. Rothman. 2014. Membrane adhesion dictates Golgi stacking and cisternal morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:1849-1854.
- Lee, W.Y., G. Goh, J. Chia, A. Boey, N.V. Gunko, and F. Bard. 2015. The Ubiquitin Ligase CBLC Maintains the Network Organization of the Golgi Apparatus. *PLoS one*. 10:e0138789.

- Levi, S.K., D. Bhattacharyya, R.L. Strack, J.R. Austin, 2nd, and B.S. Glick. 2010. The yeast GRASP Grh1 colocalizes with COPII and is dispensable for organizing the secretory pathway. *Traffic*. 11:1168-1179.
- Levine, T.P., R.D. Daniels, L.H. Wong, A.T. Gatta, A. Gerondopoulos, and F.A. Barr. 2013. Discovery of new Longin and Roadblock domains that form platforms for small GTPases in Regulator and TRAPP-II. *Small GTPases*. 4:62-69.
- Lewis, M.J., J.C. Rayner, and H.R. Pelham. 1997. A novel SNARE complex implicated in vesicle fusion with the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*. 16:3017-3024.
- Li, F., F. Pincet, E. Perez, W.S. Eng, T.J. Melia, J.E. Rothman, and D. Tareste. 2007. Energetics and dynamics of SNAREpin folding across lipid bilayers. *Nature structural & molecular biology*. 14:890-896.
- Liang, Y., N. Morozova, A.A. Tokarev, J.W. Mulholland, and N. Segev. 2007. The role of Trs65 in the Ypt/Rab guanine nucleotide exchange factor function of the TRAPP II complex. *Molecular biology of the cell*. 18:2533-2541.
- Linstedt, A.D., S.A. Jesch, A. Mehta, T.H. Lee, R. Garcia-Mata, D.S. Nelson, and E. Sztul. 2000. Binding relationships of membrane tethering components. The giantin N terminus and the GM130 N terminus compete for binding to the p115 C terminus. *The Journal of biological chemistry*. 275:10196-10201.
- Lipatova, Z., N. Belogortseva, X.Q. Zhang, J. Kim, D. Taussig, and N. Segev. 2012. Regulation of selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:6981-6986.
- Lipatova, Z., and N. Segev. 2014. Ypt/Rab GTPases regulate two intersections of the secretory and the endosomal/lysosomal pathways. *Cellular logistics*. 4:e954870.
- Lipatova, Z., A.H. Shah, J.J. Kim, J.W. Mulholland, and N. Segev. 2013. Regulation of ER-phagy by a Ypt/Rab GTPase module. *Molecular biology of the cell*. 24:3133-3144.
- Lippincott-Schwartz, J., L.C. Yuan, J.S. Bonifacino, and R.D. Klausner. 1989. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*. 56:801-813.
- Liu, Y., J.J. Flanagan, and C. Barlowe. 2004. Sec22p export from the endoplasmic reticulum is independent of SNARE pairing. *The Journal of biological chemistry*. 279:27225-27232.
- Loh, E., F. Peter, V.N. Subramaniam, and W. Hong. 2005. Mammalian Bet3 functions as a cytosolic factor participating in transport from the ER to the Golgi apparatus. *Journal of cell science*. 118:1209-1222.
- Longatti, A., C.A. Lamb, M. Razi, S. Yoshimura, F.A. Barr, and S.A. Tooze. 2012. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *The Journal of cell biology*. 197:659-675.
- Lord, C., D. Bhandari, S. Menon, M. Ghassemian, D. Nycz, J. Hay, P. Ghosh, and S. Ferro-Novick. 2011. Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature*. 473:181-186.
- Lu, L., and W. Hong. 2014. From endosomes to the trans-Golgi network. *Seminars in cell & developmental biology*. 31:30-39.
- Luini, A., A.A. Mironov, E.V. Polishchuk, and R.S. Polishchuk. 2008. Morphogenesis of post-Golgi transport carriers. *Histochemistry and cell biology*. 129:153-161.
- Lynch-Day, M.A., D. Bhandari, S. Menon, J. Huang, H. Cai, C.R. Bartholomew, J.H. Brumell, S. Ferro-Novick, and D.J. Klionsky. 2010. Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPP III, to the phagophore to promote autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:7811-7816.
- Mack, H.I., B. Zheng, J.M. Asara, and S.M. Thomas. 2012. AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 regulates ATG9 localization. *Autophagy*. 8:1197-1214.
- Mahfouz, H., A. Ragnini-Wilson, R. Venditti, M.A. De Matteis, and C. Wilson. 2012. Mutational analysis of the yeast TRAPP subunit Trs20p identifies roles in endocytic recycling and sporulation. *PLoS one*. 7:e41408.

- Mallard, F., B.L. Tang, T. Galli, D. Tenza, A. Saint-Pol, X. Yue, C. Antony, W. Hong, B. Goud, and L. Johannes. 2002. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *The Journal of cell biology*. 156:653-664.
- Mancias, J.D., and J. Goldberg. 2007. The transport signal on Sec22 for packaging into COPII-coated vesicles is a conformational epitope. *Molecular cell*. 26:403-414.
- Manders, E.M.M., F.J. Verbeek, and J.A. Aten. 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*. 169:375-382.
- Martinez-Alonso, E., M. Tomas, and J.A. Martinez-Menarguez. 2013. Golgi tubules: their structure, formation and role in intra-Golgi transport. *Histochemistry and cell biology*. 140:327-339.
- Meiling-Wesse, K., U.D. Epple, R. Krick, H. Barth, A. Appelles, C. Voss, E.L. Eskelinen, and M. Thumm. 2005. Trs85 (Gsg1), a component of the TRAPP complexes, is required for the organization of the preautophagosomal structure during selective autophagy via the Cvt pathway. *The Journal of biological chemistry*. 280:33669-33678.
- Menon, S., H. Cai, H. Lu, G. Dong, Y. Cai, K. Reinisch, and S. Ferro-Novick. 2006. mBET3 is required for the organization of the TRAPP complexes. *Biochemical and biophysical research communications*. 350:669-677.
- Montpetit, B., and E. Conibear. 2009. Identification of the novel TRAPP associated protein Tca17. *Traffic*. 10:713-723.
- Moreau, K., C. Puri, and D.C. Rubinsztein. 2015. Methods to analyze SNARE-dependent vesicular fusion events that regulate autophagosome biogenesis. *Methods*. 75:19-24.
- Morozova, N., Y. Liang, A.A. Tokarev, S.H. Chen, R. Cox, J. Andrejic, Z. Lipatova, V.A. Sciorra, S.D. Emr, and N. Segev. 2006. TRAPP subunits are required for the specificity switch of a Ypt-Rab GEF. *Nature cell biology*. 8:1263-1269.
- Mossessova, E., L.C. Bickford, and J. Goldberg. 2003. SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*. 114:483-495.
- Moyer, B.D., B.B. Allan, and W.E. Balch. 2001. Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic*. 2:268-276.
- Munro, S. 2011. The golgin coiled-coil proteins of the Golgi apparatus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.
- Nakamura, N., J.H. Wei, and J. Seemann. 2012. Modular organization of the mammalian Golgi apparatus. *Current opinion in cell biology*. 24:467-474.
- Nazarko, T.Y., J. Huang, J.M. Nicaud, D.J. Klionsky, and A.A. Sibirny. 2005. Trs85 is required for macroautophagy, pexophagy and cytoplasm to vacuole targeting in *Yarrowia lipolytica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*. 1:37-45.
- Nelson, D.S., C. Alvarez, Y.S. Gao, R. Garcia-Mata, E. Fialkowski, and E. Sztul. 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. *The Journal of cell biology*. 143:319-331.
- Pan, X., S. Eathiraj, M. Munson, and D.G. Lambright. 2006. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature*. 442:303-306.
- Papanikou, E., and B.S. Glick. 2014. Golgi compartmentation and identity. *Current opinion in cell biology*. 29:74-81.
- Parmar, H.B., and R. Duncan. 2016. A Novel Tribasic Golgi Export Signal Directs Cargo Protein Interaction with Activated Rab11 and AP-1-Dependent Golgi-Plasma Membrane Trafficking. *Molecular biology of the cell*.
- Pinar, M., H.N. Arst, Jr., A. Pantazopoulou, V.G. Tagua, V. de los Rios, J. Rodriguez-Salarichs, J.F. Diaz, and M.A. Penalva. 2015. TRAPP II regulates exocytic Golgi exit by mediating nucleotide exchange on the Ypt31 ortholog RabERAB11. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112:4346-4351.

- Puthenveedu, M.A., and A.D. Linstedt. 2001. Evidence that Golgi structure depends on a p115 activity that is independent of the vesicle tether components giantin and GM130. *The Journal of cell biology*. 155:227-238.
- Puthenveedu, M.A., and A.D. Linstedt. 2004. Gene replacement reveals that p115/SNARE interactions are essential for Golgi biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:1253-1256.
- Qasba, P.K., B. Ramakrishnan, and E. Boeggeman. 2008. Structure and function of beta -1,4-galactosyltransferase. *Current drug targets*. 9:292-309.
- Reggiori, F., C.W. Wang, U. Nair, T. Shintani, H. Abeliovich, and D.J. Klionsky. 2004. Early stages of the secretory pathway, but not endosomes, are required for Cvt vesicle and autophagosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*. 15:2189-2204.
- Robinson, M.S. 2015. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic*.
- Rogalski, A.A., and S.J. Singer. 1984. Associations of elements of the Golgi apparatus with microtubules. *The Journal of cell biology*. 99:1092-1100.
- Roquemore, E.P., and G. Banting. 1998. Efficient trafficking of TGN38 from the endosome to the trans-Golgi network requires a free hydroxyl group at position 331 in the cytosolic domain. *Molecular biology of the cell*. 9:2125-2144.
- Rossi, G., K. Kolstad, S. Stone, F. Palluault, and S. Ferro-Novick. 1995. BET3 encodes a novel hydrophilic protein that acts in conjunction with yeast SNAREs. *Molecular biology of the cell*. 6:1769-1780.
- Sacher, M., J. Barrowman, D. Schieltz, J.R. Yates, 3rd, and S. Ferro-Novick. 2000. Identification and characterization of five new subunits of TRAPP. *European journal of cell biology*. 79:71-80.
- Sacher, M., J. Barrowman, W. Wang, J. Horecka, Y. Zhang, M. Pypaert, and S. Ferro-Novick. 2001. TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Molecular cell*. 7:433-442.
- Sacher, M., Y. Jiang, J. Barrowman, A. Scarpa, J. Burston, L. Zhang, D. Schieltz, J.R. Yates, 3rd, H. Abeliovich, and S. Ferro-Novick. 1998. TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *The EMBO journal*. 17:2494-2503.
- Sacher, M., Y.G. Kim, A. Lavie, B.H. Oh, and N. Segev. 2008. The TRAPP complex: insights into its architecture and function. *Traffic*. 9:2032-2042.
- Saitoh, A., H.W. Shin, A. Yamada, S. Waguri, and K. Nakayama. 2009. Three homologous ArfGAPs participate in coat protein I-mediated transport. *The Journal of biological chemistry*. 284:13948-13957.
- Scales, S.J., R. Pepperkok, and T.E. Kreis. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell*. 90:1137-1148.
- Schaeffer, V., M. Akutsu, M.H. Olma, L.C. Gomes, M. Kawasaki, and I. Dikic. 2014. Binding of OTULIN to the PUB domain of HOIP controls NF-kappaB signaling. *Molecular cell*. 54:349-361.
- Sciorra, V.A., A. Audhya, A.B. Parsons, N. Segev, C. Boone, and S.D. Emr. 2005. Synthetic genetic array analysis of the PtdIns 4-kinase Pik1p identifies components in a Golgi-specific Ypt31/rab-GTPase signaling pathway. *Molecular biology of the cell*. 16:776-793.
- Scrivens, P.J., B. Noueihed, N. Shahrzad, S. Hul, S. Brunet, and M. Sacher. 2011. C4orf41 and TTC-15 are mammalian TRAPP components with a role at an early stage in ER-to-Golgi trafficking. *Molecular biology of the cell*. 22:2083-2093.
- Scrivens, P.J., N. Shahrzad, A. Moores, A. Morin, S. Brunet, and M. Sacher. 2009. TRAPPC2L is a novel, highly conserved TRAPP-interacting protein. *Traffic*. 10:724-736.
- Seemann, J., E.J. Jokitalo, and G. Warren. 2000. The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo. *Molecular biology of the cell*. 11:635-645.

- Shah, N., D.A. Kuntz, and D.R. Rose. 2008. Golgi alpha-mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:9570-9575.
- Shaw, M.A., N. Brunetti-Pierri, L. Kadasi, V. Kovacova, L. Van Maldergem, D. De Brasi, M. Salerno, and J. Gecz. 2003. Identification of three novel SEDL mutations, including mutation in the rare, non-canonical splice site of exon 4. *Clinical genetics*. 64:235-242.
- Shirahama-Noda, K., S. Kira, T. Yoshimori, and T. Noda. 2013. TRAPPIII is responsible for vesicular transport from early endosomes to Golgi, facilitating Atg9 cycling in autophagy. *Journal of cell science*. 126:4963-4973.
- Shorter, J., M.B. Beard, J. Seemann, A.B. Dirac-Svejstrup, and G. Warren. 2002. Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *The Journal of cell biology*. 157:45-62.
- Sonnichsen, B., M. Lowe, T. Levine, E. Jamsa, B. Dirac-Svejstrup, and G. Warren. 1998. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *The Journal of cell biology*. 140:1013-1021.
- Sowa, M.E., E.J. Bennett, S.P. Gygi, and J.W. Harper. 2009. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*. 138:389-403.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:513-525.
- Stephens, D.J., and R. Pepperkok. 2002. Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells. *Journal of cell science*. 115:1149-1160.
- Stinchcombe, J.C., H. Nomoto, D.F. Cutler, and C.R. Hopkins. 1995. Anterograde and retrograde traffic between the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *The Journal of cell biology*. 131:1387-1401.
- Stolz, A., A. Ernst, and I. Dikic. 2014. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature cell biology*. 16:495-501.
- Styers, M.L., A.K. O'Connor, R. Grabski, E. Cormet-Boyaka, and E. Sztul. 2008. Depletion of beta-COP reveals a role for COP-I in compartmentalization of secretory compartments and in biosynthetic transport of caveolin-1. *American journal of physiology. Cell physiology*. 294:C1485-1498.
- Surma, M.A., C. Klose, and K. Simons. 2012. Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochimica et biophysica acta*. 1821:1059-1067.
- Sztul, E., and V. Lupashin. 2009. Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *FEBS letters*. 583:3770-3783.
- Szul, T., and E. Sztul. 2011. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology*. 26:348-364.
- Tagaya, M., K. Arasaki, H. Inoue, and H. Kimura. 2014. Moonlighting functions of the NRZ (mammalian Dsl1) complex. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2:25.
- Tan, D., Y. Cai, J. Wang, J. Zhang, S. Menon, H.T. Chou, S. Ferro-Novick, K.M. Reinisch, and T. Walz. 2013. The EM structure of the TRAPPIII complex leads to the identification of a requirement for COPII vesicles on the macroautophagy pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:19432-19437.
- Tang, D., X. Zhang, S. Huang, H. Yuan, J. Li, and Y. Wang. 2015. Mena-GRASP65 interaction couples actin polymerization to Golgi ribbon linking. *Molecular biology of the cell*.
- Taussig, D., Z. Lipatova, J.J. Kim, X. Zhang, and N. Segev. 2013. Trs20 is required for TRAPP II assembly. *Traffic*. 14:678-690.
- Taussig, D., Z. Lipatova, and N. Segev. 2014. Trs20 is required for TRAPP III complex assembly at the PAS and its function in autophagy. *Traffic*. 15:327-337.
- Tillmann, K.D., V. Millarte, and H. Farhan. 2013. Regulation of traffic and organelle architecture of the ER-Golgi interface by signal transduction. *Histochemistry and cell biology*. 140:297-306.

- Tisdale, E.J. 1999. A Rab2 mutant with impaired GTPase activity stimulates vesicle formation from pre-Golgi intermediates. *Molecular biology of the cell*. 10:1837-1849.
- Tisdale, E.J., and M.R. Jackson. 1998. Rab2 protein enhances coatomer recruitment to pre-Golgi intermediates. *The Journal of biological chemistry*. 273:17269-17277.
- Tisdale, E.J., H. Plutner, J. Matteson, and W.E. Balch. 1997. p53/58 binds COPI and is required for selective transport through the early secretory pathway. *The Journal of cell biology*. 137:581-593.
- Tokarev, A.A., D. Taussig, G. Sundaram, Z. Lipatova, Y. Liang, J.W. Mulholland, and N. Segev. 2009. TRAPP II complex assembly requires Trs33 or Trs65. *Traffic*. 10:1831-1844.
- Tooze, S.A., and T. Yoshimori. 2010. The origin of the autophagosomal membrane. *Nature cell biology*. 12:831-835.
- Venditti, R., T. Scanu, M. Santoro, G. Di Tullio, A. Spaar, R. Gaibisso, G.V. Beznoussenko, A.A. Mironov, A. Mironov, Jr., L. Zelante, M.R. Piemontese, A. Notarangelo, V. Malhotra, B.M. Vertel, C. Wilson, and M.A. De Matteis. 2012. Sedlin controls the ER export of procollagen by regulating the Sar1 cycle. *Science*. 337:1668-1672.
- Wang, J., S. Menon, A. Yamasaki, H.T. Chou, T. Walz, Y. Jiang, and S. Ferro-Novick. 2013. Ypt1 recruits the Atg1 kinase to the preautophagosomal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:9800-9805.
- Wang, T., R. Grabski, E. Sztul, and J.C. Hay. 2015. p115-SNARE interactions: a dynamic cycle of p115 binding monomeric SNARE motifs and releasing assembled bundles. *Traffic*. 16:148-171.
- Ward, T.H., R.S. Polishchuk, S. Caplan, K. Hirschberg, and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *The Journal of cell biology*. 155:557-570.
- Webber, J.L., A.R. Young, and S.A. Tooze. 2007. Atg9 trafficking in Mammalian cells. *Autophagy*. 3:54-56.
- Westlake, C.J., L.M. Baye, M.V. Nachury, K.J. Wright, K.E. Ervin, L. Phu, C. Chalouni, J.S. Beck, D.S. Kirkpatrick, D.C. Slusarski, V.C. Sheffield, R.H. Scheller, and P.K. Jackson. 2011. Primary cilia membrane assembly is initiated by Rab11 and transport protein particle II (TRAPP II) complex-dependent trafficking of Rabin8 to the centrosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:2759-2764.
- Wong, M., and S. Munro. 2014. Membrane trafficking. The specificity of vesicle traffic to the Golgi is encoded in the golgin coiled-coil proteins. *Science*. 346:1256898.
- Wu, G. 2012. Regulation of post-Golgi traffic of G protein-coupled receptors. *Sub-cellular biochemistry*. 63:83-95.
- Xie, Z., and D.J. Klionsky. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology*. 9:1102-1109.
- Yamamoto, H., S. Kakuta, T.M. Watanabe, A. Kitamura, T. Sekito, C. Kondo-Kakuta, R. Ichikawa, M. Kinjo, and Y. Ohsumi. 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *The Journal of cell biology*. 198:219-233.
- Yamasaki, A., S. Menon, S. Yu, J. Barrowman, T. Meerloo, V. Oorschot, J. Klumperman, A. Satoh, and S. Ferro-Novick. 2009. mTrs130 is a component of a mammalian TRAPP II complex, a Rab1 GEF that binds to COPI-coated vesicles. *Molecular biology of the cell*. 20:4205-4215.
- Yang, W., and B. Storrie. 1998. Scattered Golgi elements during microtubule disruption are initially enriched in trans-Golgi proteins. *Molecular biology of the cell*. 9:191-207.
- Yang, Z., and D.J. Klionsky. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature cell biology*. 12:814-822.
- Yip, C.K., J. Berscheminski, and T. Walz. 2010. Molecular architecture of the TRAPP II complex and implications for vesicle tethering. *Nature structural & molecular biology*. 17:1298-1304.

- Yu, I.M., and F.M. Hughson. 2010. Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annual review of cell and developmental biology*. 26:137-156.
- Yu, S., and Y. Liang. 2012. A trapper keeper for TRAPP, its structures and functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 69:3933-3944.
- Yu, S., A. Satoh, M. Pypaert, K. Mullen, J.C. Hay, and S. Ferro-Novick. 2006. mBet3p is required for homotypic COPII vesicle tethering in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 174:359-368.
- Zacharogianni, M., A.A. Gomez, T. Veenendaal, J. Smout, and C. Rabouille. 2014. A stress assembly that confers cell viability by preserving ERES components during amino-acid starvation. *eLife*. 3.
- Zahoor, M.A., D. Yamane, Y.M. Mohamed, Y. Suda, K. Kobayashi, K. Kato, Y. Tohya, and H. Akashi. 2010. Bovine viral diarrhoea virus non-structural protein 5A interacts with NIK- and IKKbeta-binding protein. *The Journal of general virology*. 91:1939-1948.
- Zanetti, G., K.B. Pahuja, S. Studer, S. Shim, and R. Schekman. 2012. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nature cell biology*. 14:20-28.
- Zhao, C., E.C. Smith, and S.W. Whiteheart. 2012. Requirements for the catalytic cycle of the N-ethylmaleimide-Sensitive Factor (NSF). *Biochimica et biophysica acta*. 1823:159-171.
- Zong, M., A. Satoh, M.K. Yu, K.Y. Siu, W.Y. Ng, H.C. Chan, J.A. Tanner, and S. Yu. 2012. TRAPPC9 mediates the interaction between p150 and COPII vesicles at the target membrane. *PloS one*. 7:e29995.
- Zong, M., X.G. Wu, C.W. Chan, M.Y. Choi, H.C. Chan, J.A. Tanner, and S. Yu. 2011. The adaptor function of TRAPPC2 in mammalian TRAPPs explains TRAPPC2-associated SEDT and TRAPPC9-associated congenital intellectual disability. *PloS one*. 6:e23350.
- Zou, S., Y. Chen, Y. Liu, N. Segev, S. Yu, Y. Liu, G. Min, M. Ye, Y. Zeng, X. Zhu, B. Hong, L.O. Bjorn, Y. Liang, S. Li, and Z. Xie. 2013. Trs130 participates in autophagy through GTPases Ypt31/32 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*. 14:233-246.
- Zou, S., Y. Liu, C. Zhang, S. Yu, and Y. Liang. 2015. Bet3 participates in autophagy through GTPase Ypt1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell biology international*. 39:466-474.
- Zou, S., Y. Liu, X.Q. Zhang, Y. Chen, M. Ye, X. Zhu, S. Yang, Z. Lipatova, Y. Liang, and N. Segev. 2012. Modular TRAPP complexes regulate intracellular protein trafficking through multiple Ypt/Rab GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 191:451-460.

## **Danksagung**

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Behrends, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit unter seiner Betreuung durchführen zu können, bedanken. Sowohl Dank für die interessante Fragestellung als auch die Möglichkeit als Mitglied im Team Massenspektrometrie tätig sein zu können, möchte ich besonders hervorheben. Auch gilt mein Dank den vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen aber auch dem eingeräumten Spielraum zur Umsetzung eigener Ideen.

Auch herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volker Dötsch und Herrn Prof. Dr. Stefan Müller für die freundliche Bereiterklärung zur Erstellung der Gutachten.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Ivan Dikic für das produktive und angenehme Arbeitsklima. Durch die internationale und hoch wissenschaftliche Atmosphäre wurde das passende Umfeld für die Durchführung von Forschungsarbeiten geschaffen.

Weiter möchte ich mich bei dem gesamten Labor der AG Behrends für die angenehme Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft, Diskussionen, Ideen und schöne Zeit bedanken.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Meike Hoffmeister, für die vielen hilfreichen Diskussionen und für die entgegengebrachte Freundschaft.

Mein Dank gilt außerdem dem gesamten Team Massenspektrometrie für die großartige Teamarbeit und das Arbeitsklima.

Auch bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Hesso Farhan, Frau Dr. Kerstin Tillmann, Frau Dr. Valentina Millarte und Frau Dr. Daniela Stadel für die Kooperation bei den RUSH- und FRAP-Assays und bei Herrn Dr. Roman Polishchuk und Frau Dr. Roberta Crispino für die Elektronenmikroskopie sowie für die zahlreichen hilfreichen Diskussionen.

Dem gesamten Institut für Biochemie II möchte ich für die vielen Diskussionen, Anregungen, Tipps, Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre danken.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Euch alle einzeln aufzuzählen würde den Rahmen dieser Danksagung sprengen. Und auch die passenden Worte für diesen Dank kurzzufassen fallen mir schwer. Ihr seid die wichtigsten Menschen und ich hoffe noch sehr lange Teil eures Lebens sein zu können.



Eidesstattliche Erklärung

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Stefanie Nühlen, geboren am 17.08.1981 in Lübbecke, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Identifizierung des vertebraten-spezifischen Proteins C7orf43 als neue TRAPPII  
Komplexuntereinheit

selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe. Die vorliegende Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Frankfurt am Main, den

.....

Stefanie Nühlen